



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

***Vatairea* sp. (FABACEAE) APRESENTA BAIXA
TOXICIDADE ORAL AGUDA E ATIVIDADE ANTI-
INFLAMATÓRIA E ANTIOXIDANTE**

Sarah Andrade Toledo

Belém- Pará

2025

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

***Vatairea* sp. (FABACEAE) APRESENTA BAIXA
TOXICIDADE ORAL AGUDA E ATIVIDADE ANTI-
INFLAMATÓRIA E ANTIOXIDANTE**

Discente: Sarah Andrade Toledo

Orientador: Prof. Dr. Enéas de Andrade
Fontes Júnior

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, área de concentração: Fármacos e Medicamentos, do Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Pará como requisito final para a obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Belém, PA

2025

**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)**

T649v Toledo, Sarah Andrade.

Vatairea sp. (FABACEAE) APRESENTA BAIXA
TOXICIDADE ORAL AGUDA E ATIVIDADE ANTI-
INFLAMATÓRIA E ANTIOXIDANTE / Sarah Andrade Toledo,

. — 2025.

76 f. : il. color.

Orientador(a): Prof. Dr. Enéas de Andrade Fontes Júnior
Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Pará, ,,
Belém, 2025.

1. Vatairea guianensis. 2. Planta Medicinal. 3. Anti-
inflamatório. 4. Antioxidante. I. Título.

CDD 615.90072

SARAH ANDRADE TOLEDO

***Vatairea* sp. (FABACEAE) APRESENTA BAIXA
TOXICIDADE ORAL AGUDA E ATIVIDADE ANTI-
INFLAMATÓRIA E ANTIOXIDANTE**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, área de concentração: Fármacos e Medicamentos, do Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Pará como requisito final para a obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Aprovado em: ____/____/____

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Eneas de Andrade Fontes Júnior (Orientador)

Instituição: PPGCF/ UFPA Assinatura: _____

Prof.^a Dr.^a Luanna de Melo Pereira Fernandes

Instituição: PPGCF/ UFPA Assinatura: _____

Prof. Dr. Jofre Jacob da Silva Freitas

Instituição: CEPAM-UEPA Assinatura: _____

DEDICATÓRIA

Este trabalho é dedicado à minha família, que sempre entendeu o valor da educação e sempre me apoiou nos meus sonhos e decisões.

AGRADECIMENTOS

Agradeço sempre a Deus por todos os momentos vividos e por todas as graças alcançadas.

À minha mãe, Maria Auxiliadora, por todos os sacrifícios feitos em prol da minha educação e a todo o apoio fornecido.

Ao meu noivo, Rodolfo, por todo apoio, incentivo e cuidado durante todos esses anos, que sempre me impulsionou.

Agradeço às minhas amigas Carol, Lary, Harumi e Renatinha, minhas companheiras de trabalho, por sempre me ajudarem e estenderem a mão.

Agradeço aos meus amigos: Thales, Mario, Lanna, Lucas, Reymar, Raissa, Natan, Jennifer, Cristian e Victor pelos momentos incríveis jogando RPG, vocês fizeram meus dias mais tranquilos.

Agradeço à Brenda e Lucas pela ajuda em diversos momentos.

Agradeço imensamente ao Pedro que muito me ajudou ao longo desse período de pesquisa.

Ao meu orientador Prof. Eneas, por todo suporte e orientação, pelas conversas esclarecedoras.

Ao LAFICO pelo suporte na pesquisa, meus mais sinceros agradecimentos

Ao Laboratório de Histopatologia da UFRA pela ajuda e

Ao programa de pós-graduação (PPGCF) pela oportunidade, À CAPES pelo auxílio financeiro

Epígrafe

“A persistência é o caminho do êxito”

Charles Chaplin

RESUMO

***Vatairea* sp. (FABACEAE) POSSUI BAIXA TOXICIDADE ORAL AGUDA E ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA E ANTIOXIDANTE**

Palavras-chave: *Vatairea guianensis*, Planta Medicinal, Anti-inflamatório, Antioxidante.

As plantas do gênero *Vatairea* sp. são nativas da Amazônia e são popularmente conhecidas pelas suas atividades medicinais relacionadas ao tratamento de infecções e inflamações cutâneas. Apesar disso, poucos estudos foram realizados a respeito do gênero. Dessa forma, o presente estudo se propõe a investigar a toxicidade oral aguda e os efeitos sobre a bioquímica oxidativa desta planta, destacando a importância de estudos para a validação científica das plantas medicinais ressaltando a biodiversidade amazônica. Foram utilizados modelos animais para avaliação da segurança e o potencial terapêutico do extrato aquoso de *Vatairea* sp. O experimento de toxicidade envolveu a administração de uma dose de 2000 mg/kg do extrato aquoso oralmente nos animais, seguido por avaliação hipocrática e de mobilidade de emocionalidade. Os animais foram avaliados por 14 dias após o dia da administração, foram avaliados durante esses dias ganho de peso e consumo de ração e água, além de parâmetros bioquímicos como proteínas totais, albumina, triglicerídeos, colesterol, creatinina e aspartato aminotransferase. A partir da falta de óbitos, dos resultados semelhantes de consumo de ração e água e dos resultados obtidos dos parâmetros bioquímicos é possível apontar para uma segurança favorável e possíveis efeitos sobre a bioquímica como redução de colesterol e seus derivados, proteínas totais, albumina, creatinina e aspartato aminotransferase. Posterior a análise de toxicidade foi feita a análise da atividade antioxidante. Para análise da atividade antioxidante os animais foram separados em 7 grupos de 7 animais cada, um grupo branco (que não recebeu carragenina), um grupo que recebeu apenas carragenina, sem tratamento, 3 grupos EVAq em diferentes doses (50, 100 e 200 mg/kg) e dois padrões (dexametasona e vitamina E). Foram analisados migração leucocitária, quantidade de

nitritos, concentração de proteínas totais, quantificação de catalase, glutathione peroxidase e níveis de peroxidação lipídica. Em relação a contagem de leucócitos, as doses de 100 e 200 mg/kg foram eficazes em diminuir a quantidade de leucócitos presentes nas amostras. A respeito da concentração de nitritos, todas as doses de extrato foram capazes de diminuir consideravelmente a concentração de nitritos presentes nas amostras ($p=0,02$, $p<0,001$ e $p<0,001$, respectivamente), a partir dos dados obtidos, foi possível estabelecer uma relação de dose resposta, em que a DE50 foi de 86,62 mg/kg. Quanto a catalase, todas foram capazes de aumentar significativamente a quantidade de catalases disponíveis para sua ação antioxidante ($p=0,05$, $p<0,001$ e $p=0,002$, respectivamente). Considerando a glutathione peroxidase, apenas as doses de 100 e 200 mg/kg foram capazes de aumentar significativamente os níveis de glutathione peroxidases ($p<0,001$ para ambos), sendo semelhantes ao grupo branco e ao padrão vitamina E. Relativo a peroxidação lipídica, todas as doses foram capazes de diminuir significativamente os níveis de peroxidação lipídica ($p \leq 0,001$ para ambos), sendo as doses de 100 e 200 mg/kg semelhantes ao padrão vitamina E e ao grupo branco. Por fim, assim como o anterior, todas as doses foram capazes de diminuir a concentração de proteínas totais ($p<0,001$ para ambos) e a dose de 100 mg/kg foi semelhante ao grupo branco e ao grupo dexametasona. Dessa maneira, é possível concluir que o extrato aquoso da planta se apresenta com baixo risco de toxicidade oral aguda e potencial significativo na redução de parâmetros bioquímicos relacionados ao estresse oxidativo e atividade inflamatória, justificando investigações adicionais sobre seus componentes e aplicações terapêuticas.

ABSTRACT

***Vatairea* sp. (FABACEAE) HAS LOW ORAL ACUTE TOXICITY AND ANTIINFLAMMATORY AND ANTIOXIDANT ACTIVITY**

Keywords: *Vatairea guianensis*, Medicinal Plant, Antiinflammatory, Antioxidant

Plants of the genus *Vatairea* sp. are native to the amazon and are popularly known for their medicinal activities related to the treatment of infections and skin inflammations. Despite this, few studies have been performed regarding this genus. Therefore, the present study aims to investigate the acute oral toxicity and the effects on the oxidative biochemistry of this plant, highlighting the importance of studies for the scientific validation of medicinal plants, emphasizing amazonian biodiversity. Animal models were used to evaluate the safety and therapeutic potential of the aqueous extract of *Vatairea* sp. the toxicity experiment involved administering a dose of 2000 mg/kg of the aqueous extract orally to the animals, followed by a hippocratic evaluation and mobility assessment. The animals were evaluated for 14 days after the administration day, with assessments of weight gain, feed and water consumption, as well as biochemical parameters such as total proteins, albumin, triglycerides, cholesterol, creatinine, and aspartate aminotransferase (AST). Based on the lack of fatalities, similar feed and water consumption results, and the biochemical parameter results, it is possible to suggest a favorable safety profile and potential effects on biochemistry such as reductions in cholesterol and its derivatives, total proteins, albumin, creatinine, and aspartate aminotransferase. Following the toxicity analysis, the analysis of antioxidant activity was conducted for biochemical analysis, the animals were separated into 7 groups of 7 animals each, a white group (which did not receive carrageenan), a group that received only carrageenan, without treatment, 3 EVaq groups at different doses (50, 100 and 200 mg/kg) and two standard groups (dexamethasone and vitamin E). Leukocyte migration, nitrite amount, total protein concentration, catalase quantification, glutathione peroxidase and lipid peroxidation levels were analyzed. In all tests, at least one of the groups showed satisfactory results

in terms of reducing the oxidative or inflammatory state. After the toxicity analysis, the antioxidant activity was analyzed. For the analysis of antioxidant activity, the animals were separated into 7 groups of 7 animals each, a blank group (which did not receive carrageenan), a group that received only carrageenan, without treatment, 3 EVaq groups at different doses (50, 100 and 200 mg/kg) and two standards (dexamethasone and vitamin E). Leukocyte migration, amount of nitrites, total protein concentration, quantification of catalase, glutathione peroxidase and lipid peroxidation levels were analyzed. Regarding leukocyte count, the doses of 100 and 200 mg/kg were effective in reducing the amount of leukocytes present in the samples. Regarding the nitrite concentration, all extract doses were able to considerably reduce the concentration of nitrites present in the samples ($p=0.02$, $p<0.001$ and $p<0.001$, respectively). From the data obtained, it was possible to establish a dose-response relationship, in which the ED50 was 86.62 mg/kg. Regarding catalase, all were able to significantly increase the amount of catalases available for its antioxidant action ($p=0.05$, $p<0.001$ and $p=0.002$, respectively). Considering glutathione peroxidase, only the doses of 100 and 200 mg/kg were able to significantly increase the levels of glutathione peroxidases ($p<0.001$ for both), being similar to the blank group and the vitamin E standard. Regarding lipid peroxidation, all doses were able to significantly decrease the levels of lipid peroxidation ($p \leq 0.001$ for both), with the doses of 100 and 200 being similar to the vitamin E standard and the blank group. Finally, as with the previous one, all doses were able to decrease the concentration of total proteins ($p<0.001$ for both) and the dose of 100 mg/kg was similar to the blank group and the dexamethasone group. Thus, it is possible to conclude that the aqueous extract of the plant presents a low risk of acute oral toxicity and significant potential in reducing biochemical parameters related to oxidative stress and inflammatory activity, justifying further investigations on its components and therapeutic applications.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Registro Fotográfico da planta do gênero Vatairea sp.	21
Figura 2 - Sistema Antioxidante intracelular.	24
Figura 3- Processo de Resposta Imunológica da Carragenina.	29
Figura 4- Esquema de avaliação de toxicidade	34
Figura 5- Esquema de avaliação da atividade bioquímica oxidativa.....	39
Figura 6- Efeitos da dose de 2000 mg/kg por via oral de EVaq sobre atividade locomotora de ratos no teste do campo aberto.....	45
Figura 7 - Efeitos da dose de 2000 mg/kg por via oral de EVaq sobre a emocionalidade de ratos no teste do campo aberto.....	46
Figura 8 - Efeitos da dose de 2000 mg/kg por via oral de EVaq sobre o consumo de ração, água e ganho de peso dos ratos.	47
Figura 9 - Registro fotográfico da avaliação macroscópica dos órgãos vitais.	48
Figura 10- Registro fotográfico da avaliação macroscópica dos órgãos vitais.	49
Figura 11- Registro micrográfico da avaliação microscópica dos órgãos vitais.....	51
Figura 12- Registro micrográfico da avaliação microscópica dos órgãos vitais.....	52
Figura 13 - Efeitos antioxidantes do EVaq sobre a quantidade de nitritos nas amostras dos animais.....	54
Figura 14 – Curva de dose-resposta representando o efeito do EVaq sobre a concentração de nitritos em ratos.	55
Figura 15 - Efeitos anti-inflamatórios do EVaq sobre a quantidade de nitritos nas amostras dos animais.....	56
Figura 16- Efeitos do EVaq sobre a peroxidação lipídica nas amostras dos animais.	57
Figura 17- Efeitos do EVaq sobre a peroxidação lipídica nas amostras dos animais.	58
Figura 18- Efeitos do EVaq sobre a GPx nas amostras dos animais.....	59
Figura 19- Efeitos do EVaq sobre a concentração total de proteínas nas amostras dos animais	60
Figura 20 - Efeitos do EVaq sobre a migração leucocitária nas amostras dos animais	61

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Homólogos de NOX.....	25
Tabela 2 - Distribuição dos grupos experimentais de acordo com o tratamento	32
Tabela 3 - Distribuição dos grupos experimentais de acordo com o tratamento e a indução flogística	33
Tabela 4 - Efeitos da administração oral aguda do extrato aquoso de Vaitaria sp. (EVaq) em dose limite (2000 mg/kg) sobre marcadores bioquímicos de toxicidade.	53

LISTA DE ABREVIATURAS

ALT- Alamina amino-fransferase

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária

AST - Aspartato amino-transferase

C - Carbono

CAT - Catalase

CEUA - Comitê de Ética no Uso de Animais

CoQ10 - Coenzima Q10

COX - Ciclo-oxigenases

CRE - Creatinina

DE50 - Dose efetiva mínima ou dose em que 50% dos animais apresenta efeitos terapêuticos

DNA - Ácido desoxirribonucleico

EDTA - Ácido etilenodiamino tetra-acético

ERN - Espécie reativa de nitrogênio

ERO - Espécies reativas de oxigênio

Evaq - Extrato aquoso de Vatairea

FA - Fosfatase alcalina

GPx - Glutathione-peroxidase

GSH - Glutathione reduzida

GSSGr - Glutathione-redutase

H₂O - Água

H₂O₂ - Peróxido de hidrogênio

HE - Hematoxilina e eosina

HO₂[·] - Radical hidroperoxila

IP - Intraperitoneal

LAFICO - Laboratório de Farmacologia da Inflamação e do Comportamento

LO $\cdot$ - Alcoxila

LO $_2\cdot$ - Peroxila

LOOH - Hidroperóxidos lipídicos

LOX - Lipoxigenases

MDA - Malonaldeído

NADPH - Nicotinaminda Adenina Dinucleotídeo Fosfato Hidrogênio

NFK β - Fator nuclear kappa beta

NO $\cdot$ - Óxido nítrico

NOX - NADPH oxidase

O $_2$ - Oxigênio diatômico

O $_2^{2-}$ - Ânion superóxido

OCDE - Organização para Cooperação e Desenvolvimento Econômico

OH $\cdot$ - Radical hidroxila

ONOO - Peroxinitrito

SISGEN - Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético

SOD - Superóxido-dismutase

TBA - Ácido tiabitúrico

TBARS - MDA-TBA

UFPA - Universidade Federal do Pará

UR - Ureia

VLDL - Lipoproteínas de densidade muito baixa

XO - Xanina-oxidases

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	18
2	REFERENCIAL TEÓRICO	20
2.1	Plantas Medicinais.....	20
2.1.1	<i>Vatairea</i> sp.....	21
2.2	Estresse Oxidativo.....	22
2.2.1	ESPÉCIES REATIVAS	22
2.2.2	FONTES DE PRODUÇÃO DE RADICAIS LIVRES	24
2.2.3	DANOS OCASIONADOS PELO ESTRESSE OXIDATIVO	27
2.3	Inflamação	28
3	OBJETIVOS.....	31
3.1	Geral.....	31
3.2	Específicos.....	31
4	MATERIAIS E MÉTODOS.....	32
4.1	Preparação do extrato	32
4.2	Animais e grupos experimentais	32
4.3	Estudo de toxicidade	33
4.3.1	OBSERVAÇÃO DOS SINAIS HIPOCRÁTICOS	34
4.3.2	AVALIAÇÃO PONDERAL DO GANHO DE PESO.....	35
4.3.3	COLETA E PREPARO DAS AMOSTRAS	35
4.3.4	AVALIAÇÃO COMPORTAMENTAL	35
4.3.5	AVALIAÇÃO BIOQUÍMICA	35
4.3.6	AVALIAÇÃO HISTOPATOLÓGICA	38
4.4	Avaliação da Atividade sobre a Bioquímica Oxidativa.....	38
4.4.1	ACOMPANHAMENTO DO GANHO DE PESO.....	39

4.4.2	COLETA DE AMOSTRAS BIOLÓGICAS	39
4.4.3	MIGRAÇÃO LEUCOCITÁRIA	40
4.4.4	AVALIAÇÃO BIOQUÍMICA	40
4.5	Análise Estatística	43
5	RESULTADOS	45
5.1	Avaliação da Toxicidade Oral Aguda	45
5.1.1	LETALIDADE E AVALIAÇÃO HIPOCRÁTICA	45
5.1.2	ATIVIDADE MOTORA ESPONTÂNEA	45
5.1.3	PARÂMETROS DE EMOCIONALIDADE	46
5.1.4	CONSUMO DE RAÇÃO, ÁGUA E GANHO DE PESO	46
5.1.5	AVALIAÇÃO MACROSCÓPICA DOS ÓRGÃOS	47
5.1.6	AVALIAÇÃO MICROSCÓPICA DOS ÓRGÃOS	50
5.1.7	AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS BIOQUÍMICOS	53
5.2	Avaliação da Atividade Antioxidante	54
5.2.1	AVALIAÇÃO DE NITRITOS	54
5.2.2	AVALIAÇÃO DA PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA	56
5.2.3	AVALIAÇÃO DA CAT	57
5.2.4	AVALIAÇÃO DA GPX	58
5.2.5	AVALIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE PROTEÍNAS	59
5.2.6	MIGRAÇÃO LEUCOCITÁRIA	60
6	DISCUSSÃO	62
7	CONCLUSÃO	69
8	REFERÊNCIAS	70
9	PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA	76

1 INTRODUÇÃO

O balanço oxidativo é proveniente do equilíbrio entre a produção de espécies reativas a oxigênio e nitrogênio e mecanismos que as degradem, os chamados agentes antioxidantes. Os organismos aeróbios metabolizam a maior parte do oxigênio na mitocôndria e, apesar disso, entre 2 e 5% do oxigênio processado pela organela acabam se tornando radicais livres. Esses radicais livres são combatidos por meio de sistemas de prevenção, varredores e de reparo se utilizando de sistemas enzimáticos e não enzimáticos. As principais enzimas utilizadas no processo de prevenção são a superóxidos dismutase, catalase e glutathione peroxidase, elas se utilizam de sistemas diferentes, mas com o propósito final de impedir a formação do radical hidroxila ($\text{OH}^\bullet$), que não possui sistema enzimático de defesa e pode causar alterações na membrana celular, nas estruturas e/ou função biológicas, além de possibilitar mutações no DNA (ácido desoxirribonucleico) (Barbosa *et al.*, 2010; Velloso *et al.*, 2021).

São diversas doenças relacionadas com o desequilíbrio do balanço, entre elas cânceres, alzheimer, parkinson, aterosclerose, lúpus e doença renal crônica, dentre outras. Essas doenças são causadas por mecanismos distintos, porém relacionadas as falhas no balanço entre a produção de espécies reativas de nitrogênio e de oxigênio e a capacidade antioxidante enzimática e não enzimática do sistema biológico, denominada de estresse oxidativo, relacionado ao metabolismo celular, à resposta imunológica e ao processo de envelhecimento (Ebert *et al.*, 2022).

Os tratamentos encontrados atualmente para essas enfermidades frequentemente interferem na qualidade de vida dos pacientes que, por vezes demandam a substituição do medicamento ou a utilização de outros medicamentos para mitigar os efeitos indesejados devido a ocorrência de diversos efeitos adversos como cardiotoxicidade, hepatotoxicidade, bradicardia, anorexia entre outras (Schneider, 2022; Iuchino, De Carvalho, 2019; Reis, Marques, Marques; 2022; Chaves *et al.*, 2018).

Dessa forma, há um grande interesse de descobrir novos fármacos a partir dos usos tradicionais de plantas amazônicas, como a planta do gênero *Vatairea* sp., utilizada para o tratamento de irritações dermatológicas e doenças bacterianas e

fúngicas na pele, sendo utilizado a centenas de anos por povos originários da América do Sul (Sarquis et al, 2019; Pedrollo et al., 2016, Coelho-Ferreira, 2009). A espécie a ser estudada é encontrada na região amazônica, mas não exclusivamente no Brasil, também é encontrada no Peru, Colômbia, Venezuela, Guiana, Guiana Francesa e Suriname. (Cardoso, Ramos e Lima, 2015).

Ademais, estudos já realizados com a planta do gênero demonstraram a baixa toxicidade oral do extrato hidroalcolico das sementes (da Silva et al., 2011). Os extratos produzidos e estudados apresentaram quantidade significativa de flavonoides, que variam de acordo com a parte utilizada da planta. A classe fitoquímica está intrinsicamente relacionada com atividade antioxidante devido sua estrutura química atuando sobre a diminuição de radicais livres por meio da eliminação de espécies reativas, promovendo a ativação de enzimas antioxidantes e inibindo oxidases (Rodriguez-arce e Saldías, 2021; Shen et al, 2022; Souza, 2017; Çiçek et al., 2022; Simões et al, 2016). Além disso, foram demonstradas propriedades anti-inflamatória (Coutinho, Muzitano e Costa, 2009), e a capacidade de retardar o processo cicatricial impedindo a formação de cicatrizes hipertróficas (da Silva et al., 2011).

Poucos estudos *in vivo* foram realizados com a planta do gênero e os existentes demonstram que a lecitina isolada a partir do extrato hidroalcolico das sementes de *Vaitarea sp.* apontam para uma estimulação do sistema imunológico a partir do aumento da migração leucocitária e aumento da presença de TNF- α (Marques et al., 2017; 2021). A partir disso, nota-se a carência de estudos a respeito do tema. Portanto objetivou-se estudar a toxicidade oral aguda e seus efeitos sobre a bioquímica oxidativa de um extrato aquoso das folhas e do alburno da planta, ainda não elucidados, em modelos murinos.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Plantas Medicinais

As plantas medicinais são utilizadas para o tratamento de enfermidades desde o início da raça humana, sendo o principal recurso terapêutico até o desenvolvimento de processos industriais. Com isso, a população passou a acessar medicamentos isolados e padronizados, deixando o tratamento tradicional como uma segunda opção de terapêutica (Leite, 2009; Carvalho e Silveira, 2010).

Apesar do distanciamento das comunidades da medicina tradicional, após o desenvolvimento de medicamentos industrializados, em 1978, através da conferência de Alma Ata, os conhecimentos populares voltam a ter relevância. Com esse reconhecimento ocorreu a valorização da fitoterapia por meio do uso dos recursos locais disponíveis, destacando-se a facilidade do uso além do baixo custo para os usuários (OMS, 2004). A partir desse incentivo, a indústria voltou a buscar na fitoterapia, medicamentos para o tratamento de diversos problemas de saúde. Nesse contexto, é válido destacar a origem natural ou isolamento de estruturas químicas a partir de produtos naturais de diversos medicamentos, como é o caso da penicilina e do ácido acetilsalicílico (Barros, 2010; Barreiro e Bolzani, 2009).

Dessa maneira, destaca-se o reconhecimento dos metabólitos secundários das plantas medicinais como importante para no desenvolvimento de novos fármacos, devido sua interação com alvos farmacológicos e modulação sobre funções fisiológicas (Dias et al., 2005; Von Poser e Mentz, 2004; Sousa et al., 2008). Nesse sentido, evidencia-se a floresta amazônica devido sua abundante biodiversidade e o conhecimento dos povos tradicionais preservados como fonte para o estudo de novos princípios ativos (Braga, 2021).

Apesar disso, ainda há muito a ser explorado e estudado das plantas amazônicas. Dentre elas, as plantas do gênero *Vatairea* sp. se destacam tanto por seu uso na produção de móveis, quanto por seu uso tradicional. O gênero inclui árvores de pequeno, médio e grande porte, com cerne amargo e inodoro (Cardoso, Ramos e Lima, 2020). Alguns de estudos apontam interessante ação antimicrobiana contra *S. aureus*, *E. faecalis*, *P. aeruginosa* e *Salmonella* sp. (da Silva et al., 2011), além de uma interessante atividade cicatrizante (da Silva et al., 2011). Estudos a respeito de sua fitoquímica apontam abundante presença de antraquinonas e

flavonoides, o que corroboraria com as atividades encontradas (Souza et al., 2015; Ottobelli et al., 2011). Por fim, Ferreira et al. (2023) através de um estudo computacional, identificaram moléculas com grande potencial antioxidante que estariam presentes na planta.

2.1.1 *Vatairea* sp.

A espécie a ser analisada é uma árvore mediana pertencente à família Fabaceae (Figura 1). Está presente na Amazônia, caatinga, cerrado e mata atlântica, com sua estatura ficando entre 8 e 25 m de altura. Seu tronco apresenta grandes saponemas na base, com casca lisa ou com leves fissuras, seu centro apresenta cor castanho-amarelado a castanho escuro (Cardoso, Ramos e Lima, 2020). A planta é conhecida popularmente como angelim-do-igapó, fava-bolacha, fava-de-impigem e faveira-do-igapó em português e em espanhol é conhecida como guáboa na Venezuela e marupa-del-bajo no Peru (SiBBR, 2020).



Figura 1 - Registro Fotográfico da planta do gênero *Vatairea* sp.

Fonte: Cardoso, Ramos e Lima, 2020

No Brasil, as sementes e a casca são utilizadas para o tratamento de irritações na pele (Sarquis et al, 2019), coceira, “impingia” (nome popular para infecção fúngica (Pedrollo et al., 2016), eczema e psoríase (Coelho-Ferreira, 2009). Estudos comprovam as atividades etnofarmacológicas e apontam uma atividade *in vitro* interessante sobre *S. aureus*, na qual o extrato aquoso foi capaz de inibir o crescimento da bactéria (Oliveira et al., 2013). Além disso, foi realizado um estudo *in vivo* com um extrato hidroetanólico a partir das sementes que demonstra significativa diminuição na formação de cicatrizes hipertróficas (da Silva et al., 2011).

Além disso, são poucos os estudos que tragam a luz as propriedades tanto fitoquímicas quanto biológicas da espécie. Autores como Sousa et al. (2013 e 2017) e Piedade e Filho (1988) evidenciam grande presença de flavonoides, isoflavonas e antraquinonas, corroborando os usos populares. Essas classes fitoquímicas estão amplamente relacionadas ao combate do estresse oxidativo e à consequente diminuição dos parâmetros inflamatórios (Simões et al., 2016).

2.2 Estresse Oxidativo

2.2.1 ESPÉCIES REATIVAS

Quando o balanço entre a liberação de antioxidante, seja endógeno ou exógeno, e a produção de radicais livres, átomos ou moléculas que não possuem sua última camada eletrônica estável, encontra-se em desequilíbrio apresenta-se o estresse oxidativo. As espécies reativas de oxigênio (EROs) são, em sua maioria, originadas de subprodutos de reações do oxigênio diatômico (O_2) para formação de água (H_2O), como os radicais ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$) e o $OH^{\bullet}$, podendo ocorrer tanto de oxidações ou reduções incompletas de O_2 (Velloso et al., 2021).

Ademais, em relação a formação das EROs, quando se é adicionado um elétron ao O_2 é formado o $O_2^{\bullet-}$. Quando este recebe um próton se transforma em radical hidroperoxila ($HO_2^{\bullet}$), com a consequente dismutação espontânea, se torna peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Apesar de não ser, em si, um radical livre o H_2O_2 é extremamente deletério e capaz de atravessar barreiras. Na presença de ferro gera $OH^{\bullet}$, o mais reativo das EROs, pois se combina imediatamente com qualquer estrutura próxima, podendo causar danos ao DNA e outras enzimas fundamentais para o funcionamento celular. Por fim, além das EROs existem também outros radicais livres,

a espécie reativa de nitrogênio (ERN), peroxinitrito (ONOO), derivado da reação de com o óxido nítrico ($\text{NO}^\bullet$), e os ácidos graxos poli-insaturados, alcóxila ($\text{LO}^\bullet$) e peróxila ($\text{LOO}^\bullet$) convertidos de hidroperóxidos lipídicos (LOOH) por meio da catalização de íons ferro (Ferreira e Matsubara, 1997).

A peroxidação lipídica é uma reação em cadeia, dividida em iniciação, propagação e terminação. Esse processo inicia-se com radical livre extraído um hidrogênio de um ácido graxo poli-insaturado presente na membrana lipídica das células, formando um radical lipídico. Por ser altamente reativo e instável o radical lipídico rapidamente se liga ao O_2 formando o radical $\text{LOO}^\bullet$. Este, por sua vez, pode abstrair hidrogênio de outro ácido graxo poli-insaturado, gerando outro radical lipídico e um LOOH. A cadeia de reação encerra-se com o ligação de dois LOOH ou quando antioxidantes doam um hidrogênio no lugar do ácido graxo poli-insaturado, neutralizando os radicais (Teixeira et al., 2024).

Por fim, os antioxidantes (molécula capaz de proteger, inibir ou retardar a oxidação de outras moléculas) podem ter diferentes funções a depender do tipo de radical livre ao qual estão se ligando e a qual alvo estão “protegendo” (Halliwell, 1995). Além da divisão quanto a origem há, também, a divisão quanto à sua forma de ação, no qual quando agindo diretamente sobre o átomo de hidrogênio ou por meio da transferência de elétrons são chamados de antioxidante primários e quando sua ação se dá por meio do impedimento da reação oxidante são conhecidos como antioxidantes secundários (Shahidi, 2015). Ademais, há uma terceira classificação dos antioxidantes, também pelo seu mecanismo de ação, sendo estes separados em preventivos, sequestradores de radicais e reparadores enzimáticos (Haida e Hakiman, 2019).

Em síntese, o equilíbrio entre antioxidante e radicais livres é crucial para manutenção da saúde celular. O entendimento de diferentes tipos e mecanismos de ação dos antioxidantes se torna fundamental para o desenvolvimento de estratégias eficazes de combates ao estresse oxidativo e suas consequências (Figura 2).

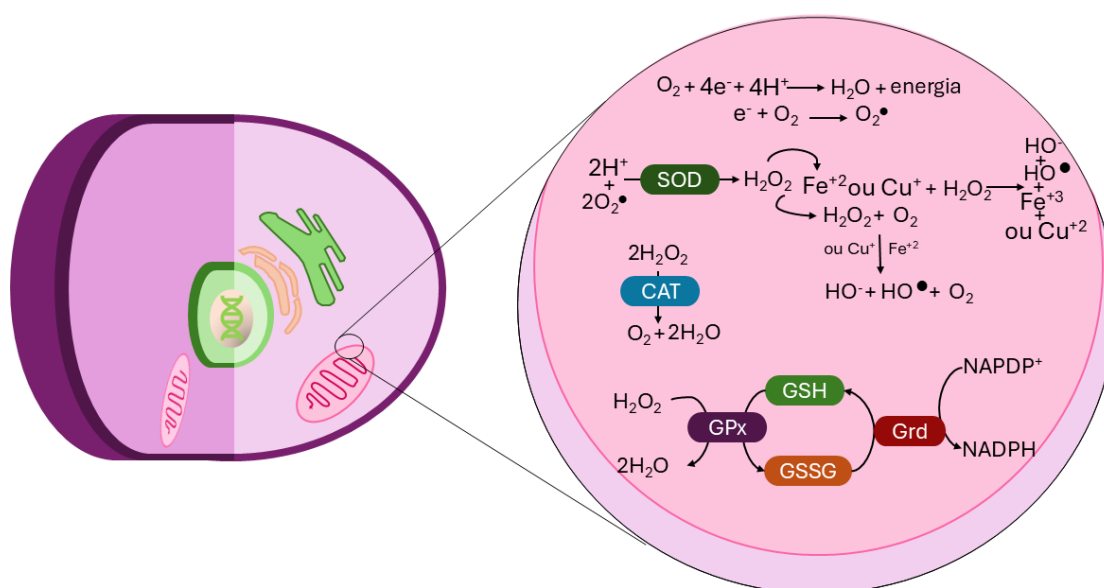


Figura 2 - Sistema Antioxidante intracelular.

Fonte: Autor

2.2.2 FONTES DE PRODUÇÃO DE RADICAIS LIVRES

Radicais livres são produzidos constantemente pelo organismo, desempenhando papéis tanto no combate a microrganismos quanto como subprodutos de reações para a sua manutenção. Além disso, podem, também, aparecer em decorrência do meio externo. Os principais locais da geração metabólica das EROs são mitocôndrias, membranas celulares e citoplasma, sendo a mitocôndria o maior delas. Essa organela é responsável por cerca de 85 a 90% da metabolização de oxigênio, utilizando, principalmente, a cadeia transportadora de elétrons como forma de metabolização do oxigênio. Essa via consome, por meio da oxidação, quatro moléculas de citocromo C, com remoção de um elétron de cada e inserção deles em uma molécula de O_2 para formação de água. Esse processo é controlado pela enzima, citocromo oxidase, impedindo a geração excessiva de radicais livres. Entretanto de 2 a 5% do oxigênio contido na mitocôndria é desviado para outras vias e reduzidos univalentemente, gerando, assim, os radicais livres (Barbosa et al, 2010).

Nas membranas celulares, a principal responsável pelo acontecimento do estresse oxidativo é a enzima NADPH oxidase (NOX) que é ativada na presença de

O₂, gerando EROs como produto de reações essenciais para o funcionamento do organismo, tais como: sinalização molecular, proteção contra invasores, produção de energia e ativação genética. Existem diversos homólogos de NOX distribuídos pelos tecidos (Tabela 1), apesar de presentes no citosol, estão em conformação auto inibitória, sendo apenas ativadas na membrana celular ao se agrupar com o complexo flavocitocromo b₅₅₈, domínio redox que age transferindo elétrons do NADPH para O₂ (Cavalcante et al., 2022).

HOMÓLOGOS	CÉLULAS DE EXPRESSÃO	ERO PRODUZIDA
NOX1	Cólon, músculo liso vascular e célula de adenocarcinoma	O ₂ ^{•-}
NOX2	Fagócitos	O ₂ ^{•-}
NOX3	Sistema auditivo	O ₂ ^{•-}
NOX4	Células endoteliais, músculo liso vascular, fibroblastos, cardiomiócitos, músculo esquelético, osteoclastos, adipócitos e neurônios	H ₂ O ₂
NOX5	Baço e testículos	O ₂ ^{•-}
DUOX 1 e 2	Trato gastrointestinal e sistema tireoidiano	H ₂ O ₂

Tabela 1 - Homólogos de NOX

Fonte: Cavalcante et al., 2022

O sistema antioxidante possui diversos mecanismos para impedir e restaurar os danos causados pelos radicais livres. Dentre eles encontram-se a superóxido-dismutase (SOD), catalase (CAT), glutatona-peroxidase (GPx) e a vitamina E, também conhecido como α -tocoferol, que impedem a ação dos radicais livres, já por outro lado, para a restauração do dano, além da GPx, a glutatona-redutase (GSSGr) e o ácido ascórbico, também conhecido como vitamina C, atuam na restauração interna de danos celulares (Ross e Moldeus, 1991).

Os antioxidantes podem ser divididos em enzimáticos (endógenos) e não enzimáticos (exógenos). Entre os antioxidantes endógenos mais conhecidos, devido sua maior efetividade, destacam-se a SOD, CAT e GPx. Seus mecanismos são variados: a SOD, por exemplo, atua por meio da catalisação da decomposição do O₂^{•-} em H₂O₂ e O₂ e pode apresentar três isoformas, a depender do metal ao qual se liga como cofator. A CAT converte o H₂O₂ em H₂O, evitando a formação de produtos

tóxicos. Além disso, a GRd reduz a glutatona, para que ela possa ser ativada em glutatona reduzida (GSH) e permitindo que ela atue como um sequestrador de ERO. Em conjunto, o GSH e a GPx inibem a redução de hidroperóxidos, protegendo o organismo contra danos oxidativos (Lushchak, 2014; Sies e Jones, 2020 e Forman, Zhang e Rinna, 2009).

Os antioxidantes não enzimáticos com maior relevância fisiológica são a vitamina E e C, carotenoides e polifenóis. Por não serem produzidos naturalmente pelo organismo humano, eles precisam ser obtidos por meio da alimentação em quantidades adequadas. Além desses, outro importante antioxidante não enzimático é a coenzima Q10 (CoQ10), fisiologicamente produzida. A vitamina E possui oito isoformas, sendo o α -tocoferol a mais eficiente. Sua ação inclui a inibição de peróxidos lipídicos, impedindo que esses reajam com outros ácidos graxos poli-insaturados, além de regular a atividade de enzimas como SOD, CAT, GPx. A vitamina C, além da função de também impedir a formação de N-nitroso, também promove a reativação da vitamina E e é um sequestrador de radicais livres muito eficiente (Sema Demirci-Çekiç et al., 2022).

Entre os antioxidantes não enzimáticos, os polifenóis, compostos químicos de metabolismo secundários das plantas medicinais, desempenham papel crucial devido à sua abundância na dieta humana e à diversidade de seus efeitos biológicos. Dentre os polifenóis destaca-se os flavonoides, que tem sido grande alvo de estudo nos últimos anos, sua estrutura é determinante para sua capacidade antioxidante. Quanto mais hidroxilas presentes nos flavonoides, principalmente em carbono (C) C3 e C4, mais a molécula suportaria a deslocalização em torno do anel aromático como resultado da doação de elétrons. Além disso, a ação também está aparentemente relacionada com a capacidade de inibir enzimas oxidativas como xantina-oxidases (XO), ciclo-oxigenases (COX), lipoxigenases (LOX), entre outras. Os flavonóides também estão associados com tratamento e/ou diminuição do risco de presença de diversas doenças crônicas degenerativas, como a doença arterial coronariana, doenças cerebrovasculares, doença renal crônica e câncer (Dornas et al., 2007; Moraes et al., 2022)

Devido à curta meia-vida dos radicais livres, a identificação direta no organismo é difícil. Portanto, são utilizados métodos indiretos, como a determinação de produtos

de reações entre radicais livres e macromoléculas biológicas, ou técnicas para identificação direta das enzimas relacionadas ao processo antioxidante. Alguns exemplos de produtos de reações de radicais livres são os isoprostanos, lipídeos hidroperóxidos e lipídeos hidróxidos (resultados da peroxidação lipídica utilizados outros biomarcadores como peroxidação lipídica), o radical tirosila e nitrotriptofano (resultados de danos à proteínas, tirosina e triptofano respectivamente) (Salmito *et al.*, 2023; Barbosa *et al.*, 2008).

2.2.3 DANOS OCASIONADOS PELO ESTRESSE OXIDATIVO

Uma variedade de eventos pode levar à formação de EROs, tanto por processos fisiológicos quanto por influência de fatores externos. Dentre os mecanismos endógenos, destacam-se a oxidação de NADPH, o funcionamento de peroxissomos, mitocôndria, citocromo P-450, XO e apoptose. Dentre os fatores exógenos incluem: radiação ultravioleta, infecções, poluentes e danos teciduais, os quais promovem um aumento na ativação de fagócitos e alteram a transferência de elétrons na cadeia respiratória. Consequentemente, ocorre danos às estruturas celulares pela ligação dos radicais livres como proteínas, carboidratos, lipídio e ácidos nucleicos ocasionando mal funcionamento ou morte celular (Radi, 2018).

Além disso, como fator amplificador de doenças, as ERO podem induzir a perda da integridade de membranas celulares, causando rigidez e deformidades em articulações, por meio de radicais hidroxila e peroxila (Ramos *et al.*, 2000). Adicionalmente, infecções virais estão associadas ao aumento da produção de citocinas, as quais aceleram o processo inflamatório e, consequentemente, promovem estresse oxidativo, dano tecidual e morte celular. Esse mecanismo foi amplamente observado em infecções causadas pelo vírus SARS- CoV-2, contribuindo para a progressão da doença e a morte de diversos pacientes (KHOMICH *et al.*, 2018; HUANG *et al.*, 2019; Zatti, Ferlito e Branco, 2022).

O aumento da liberação de citocinas inflamatórias também é um fator relevante em doenças autoimunes, como a doença de Cronh, uma grave doença inflamatória do trato gastrointestinal que comumente causa diarreia, cólica abdominal, febre e sangramento retal. A intensa liberação de citocinas pró-inflamatórias e liberação de radicais livres associados a esses agravos de saúde, é fortemente influenciada pela ação dos neutrófilos, primeiras células especializadas em fagocitose que chegam ao

local inflamado, para a destruição tanto de células comprometidas quanto de eliminação de patógenos (Basílio et al., 2021; ABCD, 2024; Yang et al., 2024).

2.3 Inflamação

O sistema imunológico é complexo e composto por células, como os neutrófilos (principal célula circulante do sistema imunológico), moléculas efetoras, como as citocinas (proteínas sinalizadoras e mediadoras inflamatórias), sistema complemento (proteínas plasmáticas que opsonizam e lisam patógenos, facilitando sua eliminação), anticorpos (proteínas que ajudam o reconhecimento específico de antígenos, facilitando sua eliminação) e órgãos linfoides, como a medula óssea. O sistema imunológico é responsável pela defesa do organismo contra agente invasores e substâncias estranhas, como a carragenina, por meio do reconhecimento e eliminação desses agentes (Nunes, Rocha e Loureiro, 2024).

A carragenina utilizada pela indústria como aditivo alimentar e na pesquisa como indutor da inflamação. A carragenina ao entrar em contato com as células dendríticas, macrófagos e outras células residentes ativa receptores *Toll-like 4* que por sua vez ativam o fator nuclear kappa beta (NFK β) (Borsani et al., 2021; Borthakur et al., 2006). O NFK β ativa a produção de Interleucinas que são liberadas pela célula, além da liberação de quimiocinas e chega as células endoteliais. Nas células endoteliais venosas as interleucinas acionam a produção de selectinas E e a liberação de selectinas P (ABBAS et al., 2019).

Quando as selectinas são expostas, os leucócitos presentes na corrente sanguínea começam a se aproximar do endotélio vascular (1), quando essa aproximação acontece, as selectinas L presentes nos leucócitos se ligam aos carboidratos presentes no endotélio vascular e as selectinas presentes no endotélio vascular ligam-se aos carboidratos dos leucócitos e começa o processo de rolamento (2). Durante o processo de rolamento os leucócitos se encontram com as quimiocinas liberadas pelas células do tecido afetado. Essa conexão das quimicinas com os leucócitos há ativação das integrinas presentes nos leucócitos, assim que ativados as integrinas ligam-se a imunoglobulinas (ICAM) presentes na superfície do endotélio

vascular. Essa ligação, mais forte que com as selectinas, para o rolamento e estabiliza o leucócito no local em que será feita a passagem (4) para o tecido onde está o local da inflamação (Figura 3) (ABBAS et al., 2019).

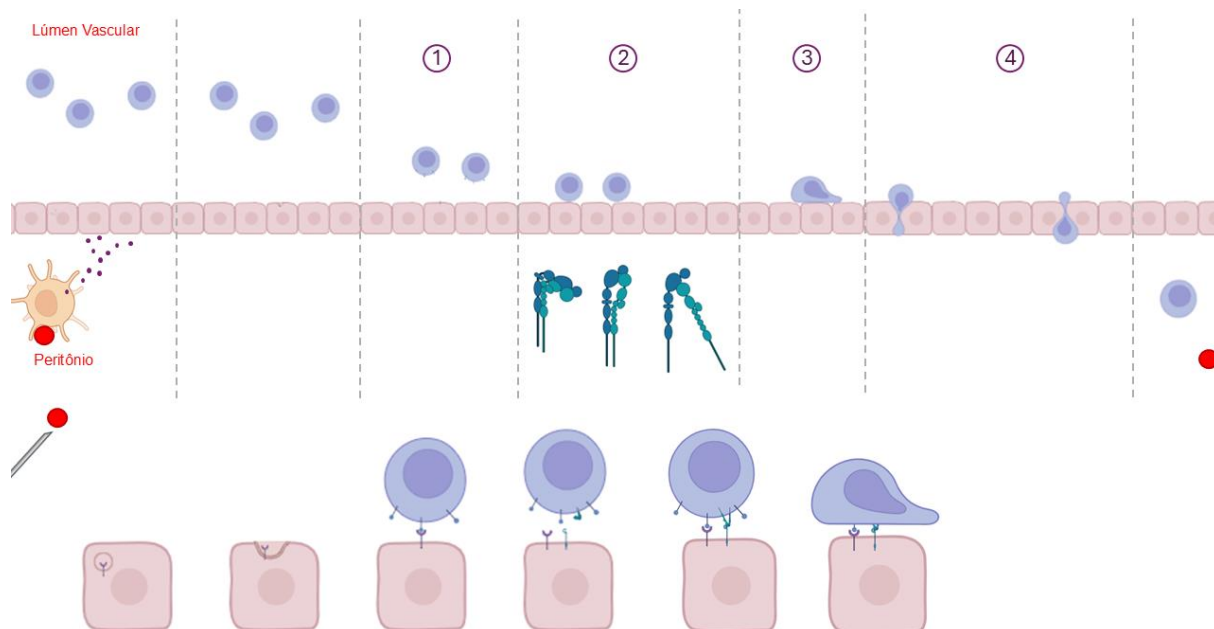


Figura 3- Processo de Resposta Imunológica da Carragenina.

Fonte: Autor

Assim que chegam ao local da inflamação as células do sistema imunológico são ativadas e começam a reconhecer padrões moleculares associados a patógenos ou a danos (PAMPs e DAMPs). Esse processo de reconhecimento desencadeia a liberação de mediadores pró-inflamatórios e a rápida produção e liberação de radicais livres, conhecido como explosão oxidativa ou como *burst* oxidativo (Toebe et al., 2023).

O *burst* oxidativo é relacionado a diversas espécies de radicais livres, dentre eles o óxido nítrico. O óxido nítrico tem como função, além de destruir microrganismos que possam ter adentrado o tecido, favorecer o aumento do calibre dos vasos da região, o que aumenta o fluxo sanguíneo da região e, consequentemente, a ocorrência da diapedese (processo da passagem das células do sistema imunológico para os tecidos) e o extravasamento do conteúdo plasmático para os tecidos (Sharma; Al-Omran; Parvathy, 2007).

Apesar de essencial para a defesa do organismo, o *burst* oxidativo pode causar danos ao tecido saudável se não devidamente controlado, além de aumentar o processo inflamatório (Toebe et al., 2023). Dentro desse contexto, o controle por meio do sistema antioxidante, enzimático e não enzimático, torna-se fundamental para o interrompimento do *burst* oxidativo e da continuação da inflamação e compostos

bioativos como isoflavonas (flavonoides), como os abundantemente presentes na planta do gênero *Vatairea* sp., tem grande potencial na diminuição desse processo.

3 OBJETIVOS

3.1 Geral

Avaliar a toxicidade oral aguda de um extrato aquoso de uma planta do gênero *Vatairea* sp. (EVAq) e seus efeitos sobre o balanço oxidativo sistêmico em modelo murino de inflamação.

3.2 Específicos

- Verificar a toxicidade oral aguda da dose limite (2000 mg/kg) do extrato;
- Avaliar os efeitos do extrato sobre a concentração de nitritos;
- Investigar sua ação sobre os agentes antioxidantes enzimáticos;
- Avaliar sua ação sobre marcadores de extravasamento plasmático e migração leucocitária;
- Avaliar seu efeito sobre o dano celular oxidativo.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Preparação do extrato

As folhas da planta do gênero *Vatairea* sp. foram coletadas em Belém, estado do Pará, Brasil durante o mês novembro, posteriormente foram identificadas por Manoel R. Cordeiro da Embrapa Amazônia Oriental, Pará, Brasil e cadastradas no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético (SISGEN) sob o código A678D8C. As folhas foram secas e trituradas em moinho pulverisette 12, rendendo 55,0843 g de material vegetal que foi preparado em proporção de 1g de material vegetal para 10 mL de água em infusão a 100°C durante 30 minutos. Após filtragem, o extrato aquoso foi levado para estufa de circulação de ar à 45°C para secagem.

4.2 Animais e grupos experimentais

O presente trabalho foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) sob o número 7859231123. Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Farmacologia da Inflamação e do Comportamento (LAFICO) da Universidade Federal do Pará (UFPA).

Para o estudo de toxicidade foram utilizadas 24 ratas fêmeas da espécie *Rattus norvegicus* (Wistar) (58 dias; peso= 150-200g), obtidas no biotério do Instituto Evandro Chagas. Os animais foram divididos em grupos (Quadro 1) e alocados no Biotério da Faculdade de Farmácia da UFPA, sendo mantidos em gaiolas de material plástico (39x32x16 cm), forradas com serragem. Ademais, os animais estiveram submetidos à temperatura controlada de $22 \pm 1^\circ\text{C}$ a exaustão e ciclo de luz claro e escuro de 12h, além de alimentação e água disponibilizadas *ad libitum*.

GRUPO	N	Hipocrático (h)	Open Field (h)	Acompanhamento	Eutanásia
Controle	6	0 - 4	2	-	6 h
EVaq	6	0 - 4	2	-	6 h
Controle-14	6	0 - 4	24	14 dias	15º dia
EVaq-14	6	0 - 4	24	14 dias	15º dia

Tabela 2 - Distribuição dos grupos experimentais de acordo com o tratamento

Fonte: Autor

Para o estudo de atividade da bioquímica oxidativa foram utilizados 49 ratos machos da *Rattus norvegicus* (Wistar) (50 dias; peso= 150-200g), foram obtidos no biotério do Instituto Evandro Chagas. Os animais serão divididos em grupos (Quadro 2) e alocados no Biotério da Faculdade de Farmácia da UFPA, sendo mantidos em gaiolas de material plástico (39x32x16 cm), forradas com serragem. Ademais, os animais foram submetidos à temperatura controlada de $22 \pm 1^\circ\text{C}$ a exaustão e ciclo de luz claro e escuro de 12h, além de alimentação e água disponibilizadas *ad libitum*.

Grupo	Tratamento	Agressão	N
Branco	Água Destilada	Solução salina 0,9%	7
Controle 1	Dexametasona	Carragenina	7
Controle 2	Vitamina-E	Carragenina	7
Carragenina	Água Destilada	Carragenina	7
EVaq ₁	200 mg/kg	Carragenina	7
EVaq ₂	100 mg/kg	Carragenina	7
EVaq ₃	50 mg/kg	Carragenina	7

Tabela 3 - Distribuição dos grupos experimentais de acordo com o tratamento e a indução flogística

Fonte: Autor

4.3 Estudo de toxicidade

O protocolo experimental da análise da toxicidade (Figura 4) foram adaptados da Diretriz de Produtos Químicos Nº 420 da Organização para Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OCDE). A partir disso os animais foram mantidos 7 dias em ambientação em suas gaiolas (n= 6/grupo) antes do início dos testes, sendo submetidos a jejum a partir das 18 h da noite anterior ao início dos testes, com ambientação no local do experimento prévia de 1h (OCDE, 2001).

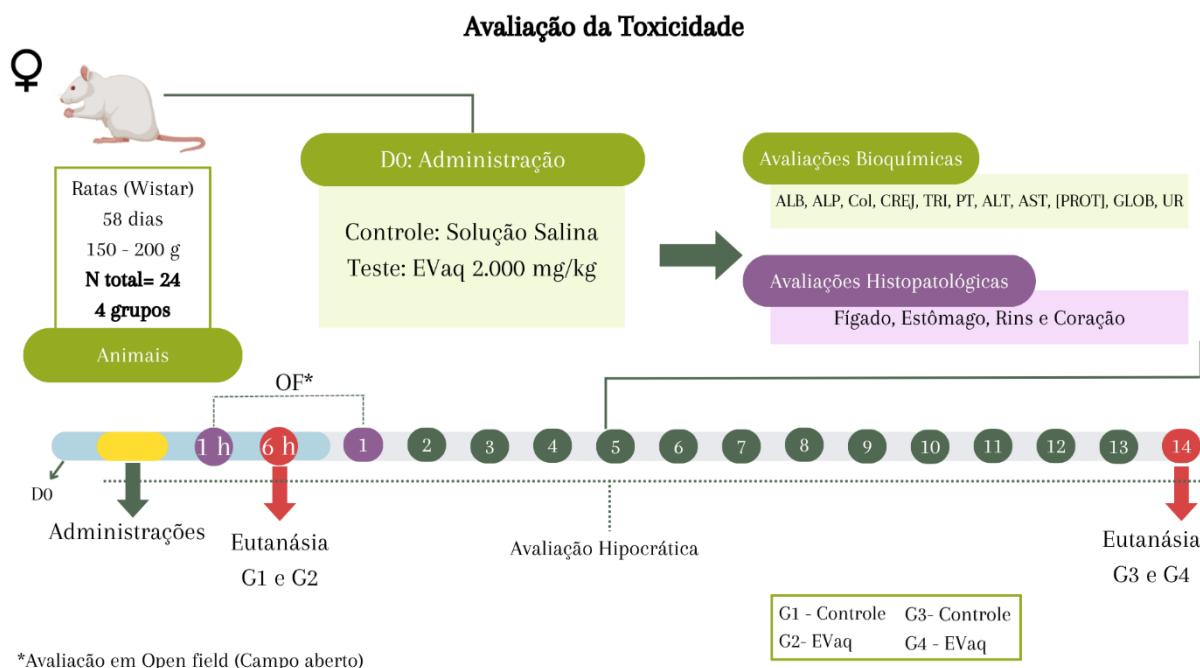


Figura 4- Esquema de avaliação de toxicidade

Fonte: Autor

Os grupos foram avaliados em dois momentos distintos, em um primeiro sendo eutanasiados 6h após a administração (2000 mg/kg EVaq para o grupo teste e solução salina para o grupo controle) via gavagem e em um segundo momento 14 dias após o dia da administração.

4.3.1 OBSERVAÇÃO DOS SINAIS HIPOCRÁTICOS

Durante as 4 primeiras horas após a administração foram observados os aspectos corporais, alteração de comportamento e morte. Nesse período, os animais também não receberam alimentação (OCDE, 2001).

Os parâmetros de alteração avaliados foram: frêmito vocal, hiperemia, cianosis, hipnose, ptosis palpebral, nistagmo, lacrimação, salivação, ereção pilomotora, alterações na cauda, defecação, diarreias, micção, diminuição da atividade motora, ataxia, perda de força, paralisia de pescoço, paralisia pernas, dispneia, tremores, aumento da atividade motora, convulsões clônicas, convulsões tônicas, fasciculação, sensibilidade auditiva.

4.3.2 AVALIAÇÃO PONDERAL DO GANHO DE PESO

Uma balança semianalítica (PRIX Toledo 9094 PLUS) foi utilizada para pesar os animais 1h antes do tratamento e diariamente por 14 dias após o tratamento. O cálculo do ganho de peso foi feito pela diferença entre as pesagens e o peso do animal no dia do início do teste.

4.3.3 COLETA E PREPARO DAS AMOSTRAS

Os animais, de acordo com os grupos, foram eutanasiados sob anestesia induzida por isoflurano (3,5% para indução da anestesia e 1,5% para manutenção), por via inalatória, 6h ou 14 dias após a administração do extrato. O sangue utilizado para determinação de parâmetros bioquímicos foi coletado por punção cardíaca e submetido a centrifugação de 3500 rpm durante 10 minutos para a separação do soro.

Foram coletados os rins, fígado, estômago, pulmões e coração dos animais para avaliação macroscópica e determinação do peso relativo. Após isto, as amostras dos órgãos foram fixadas em solução de formol a 10% por 24h para avaliação histopatológica.

4.3.4 AVALIAÇÃO COMPORTAMENTAL

Será realizado o teste de campo aberto (*open field*) para a avaliação do comportamento motor espontâneo e emocionalidade dos animais. Foram analisados: distância total percorrida, velocidade média do animal e distância percorrida nos quadrantes centrais e periféricos.

4.3.5 AVALIAÇÃO BIOQUÍMICA

A coleta de sangue foi feita em tubo com gel ativador de coágulo para a separação do soro que foi, então, utilizado em pequenas alíquotas para análises automatizadas dos seguintes parâmetros: determinação de creatinina (CRE), ureia (UR), fosfatase alcalina (FA), alamina amino-fransferase (ALT) e aspartato amino-transferase (AST).

a. Determinação da CRE

O teste de determinação da CRE (Wiener lab) consiste na desproteinização do picrato alcalino em meio tamponado proporcionado pela CRE, produzindo cromogênio que pode ser medido a 510 nm.

Para a realização do teste 2 mL de ácido pícrico foi adicionado a 0,4 mL de amostra e então misturados. A mistura foi deixada em repouso por 10 minutos e posteriormente centrifugada a 3000 rpm durante 5 minutos. Foi, então, removido o sobrenadante e adicionado 0,25 mL de tampão de glicina a mistura que foi incubada por 20 minutos a temperatura ambiente para posterior leitura.

Para a determinação do valor foi então utilizada a fórmula matemática a baixo em que ABS é o valor encontrado da leitura da amostra em espectrofotômetro já com o valor da leitura apenas dos reagentes utilizados subtraído e P é o valor da amostra padrão do teste.

$$\text{Creatinina (mg/L)} = \text{ABS} \times \frac{20 \text{ mg/L}}{P} \quad (1)$$

b. Determinação de UR

A determinação de UR consiste na produção de dióxido de carbono e amoníaco pela decomposição da ureia pela urease. Os produtos sofrem nova reação como o salicilato e hipoclorito, em meio alcalino, e é obtido o indofenol de cor verde, e é lido em espectrofotômetro a 570 nm (Wiener Lab)

Foi adicionado 1 mL de reagente contendo tampão Good pH 7,6; 2-oxoglutarato; glutamato desidrogenase e NADHt a 10 microlitros das amostras coletadas, as amostras foram homogeneizadas e ficaram 60 segundos em repouso para a primeira leitura, tendo uma segunda leitura sigo realizada 120 segundos após a adição do reagente a amostra.

Para a determinação do valor foi utilizada a fórmula matemática abaixo, em que L_1 é o valor da primeira leitura e L_2 é o valor da segunda leitura da amostra e P_1 é o valor da primeira leitura e P_2 é o valor da segunda leitura da amostra padrão do kit.

$$\text{Ureia (g/L)} = (L_1 - L_2) \times \frac{0,6}{(P_1 - P_2)} \quad (2)$$

c. Determinação da FA

Quando hidrolisado em pH alcalino pela fosfatase alcalina, o p-nitrofenilfosfato produz o fosfato e p-nitrofenol. A velocidade de aparição do ânion p-nitrodenolato é proporcional a quantidade de enzimas na amostra e é medido a 405 nm pelo espectrofotômetro (Wiener Lab).

Para a realização do teste um comprimido de p-nitrofenilfosfato foi adicionado a 2,5 mL de uma solução de dietanolamina 1 mol/L, pH 9,8 com sais de magnésio 0,5 mmol/L e agitado até que fosse completamente dissolvido. Posteriormente, 2,5 mL dessa solução então foi adicionada à 20 microlitros da amostra, que foi homogeneizada e então lida em espectrofotômetro 4 vezes (uma imediatamente após a adição do reagente a amostra e as outras 3 em intervalos de um minuto entre elas).

Para a determinação do valor foi utilizada fórmula matemática abaixo em que A_0 é a leitura feita imediatamente após a adição do reagente a amostra A_1 é a leitura feita após 1 minuto, A_2 é a leitura feita após 2 minutos e A_3 é a leitura feita após 3 minutos.

$$\text{Fosfatase Alcalina (U/L)} = \left(\frac{(A_1 - A_0) + (A_2 - A_1) + (A_3 - A_2)}{3} \right) \times 6812 \quad (3)$$

d. Determinação da ALT

A formação do piruvato e do L-glutamato a partir da L- alanina e do 2-oxaglutarato pela ALT e posterior reação do piruvato e NADH por meio da LDH formam o L-lactato, após a leitura da absorbância os valores são utilizados para os cálculos dos valores de ALT (Wiener Lab).

Para a realização do teste 20 mL de uma solução contendo solução tampão TRIS pH 7,5 e L-alanina foi adicionado um frasco de uma solução contendo 2-oxaglutarato, NADH e lactato desidrogenase que teve uma alíquota de 1 mL retirada e adicionada à 100 microlitros da amostra. Foram feitas 4 leituras em espectrofotômetro a primeira 1 minuto após a adição do reagente a amostra e as seguintes com um minuto de intervalo entre si começando 1 minuto após a primeira leitura.

Para a determinação do valor foram efetuados os cálculos matemáticos que seguem o mesmo raciocínio da análise anterior.

$$\text{ALT (U/L)} = \left(\frac{(A_1 - A_0) + (A_2 - A_1) + (A_3 - A_2)}{3} \right) \times 1740 \quad (4)$$

e. Determinação de AST

A formação do piruvato e do L-glutamato a partir da L- alanina e do 2-oxaglutarato pela GTP e posterior reação do piruvato e NADH por meio da LDH formam o L-lactato, após a leitura da absorbância os valores são utilizados para os cálculos dos valores de GTP (Wiener Lab).

Para preparar o reagente a ser utilizado 20 mL uma solução de 2-oxaglutarato, NADH, malato desidrogenado e lactato desidrogenase num frasco de com uma solução tampão TRIS pH 7,8 e L-aspartato seguido de agitação. Posteriormente, uma alíquota de 1 mL do reagente é adicionada à 100 microlitros da amostra. Para a leitura das absorbâncias foram seguidas a mesma sequência da análise anterior.

Para a determinação do valor foram usados cálculos matemáticos que seguem o mesmo raciocínio da análise de FA.

$$\text{AST (U/L)} = \left(\frac{(A_1 - A_0) + (A_2 - A_1) + (A_3 - A_2)}{3} \right) \times 1740 \quad (5)$$

4.3.6 AVALIAÇÃO HISTOPATOLÓGICA

As amostras utilizadas na avaliação histopatológica (fígado, estômago, rins e coração) foram desidratadas em séries crescentes de etanol (70-100%), diafanização em xilol e, finalmente, inclusão em parafina.

As secções de 5 µm foram obtidas em micrótomo convencional a partir dos blocos de inclusão, sendo montadas diretamente em lâminas histológicas durante a microtonia. Por fim, para a avaliação em microscópio óptico, as lâminas foram coradas e fixadas com hematoxilina e eosina (HE).

4.4 Avaliação da Atividade sobre a Bioquímica Oxidativa

O protocolo experimental para o teste de atividade da bioquímica oxidativa (Figura 5) foi adaptado de Souza e Ferreira (1985). Os animais foram divididos em 7 grupos (n= 7 animais/grupo), e foram tratados com três doses diferentes de EVaq, definidas após o estudo de toxicidade e utilizados para controle positivo vitamina-E (150 mg/kg), via gavagem, e a dexametasona (4 mg/ kg), via intreperitoneal (IP). Por fim, como agente flogístico será utilizada a carrageninina (1% em 1 mL) via IP. Os tratamentos e controles positivos foram administrados durante cinco dias

consecutivos, com intervalo de 24h entre as administrações, no quinto dia, 1h após a administração dos tratamentos, foi feita a administração do agente flogístico e feita a coleta após 4h.

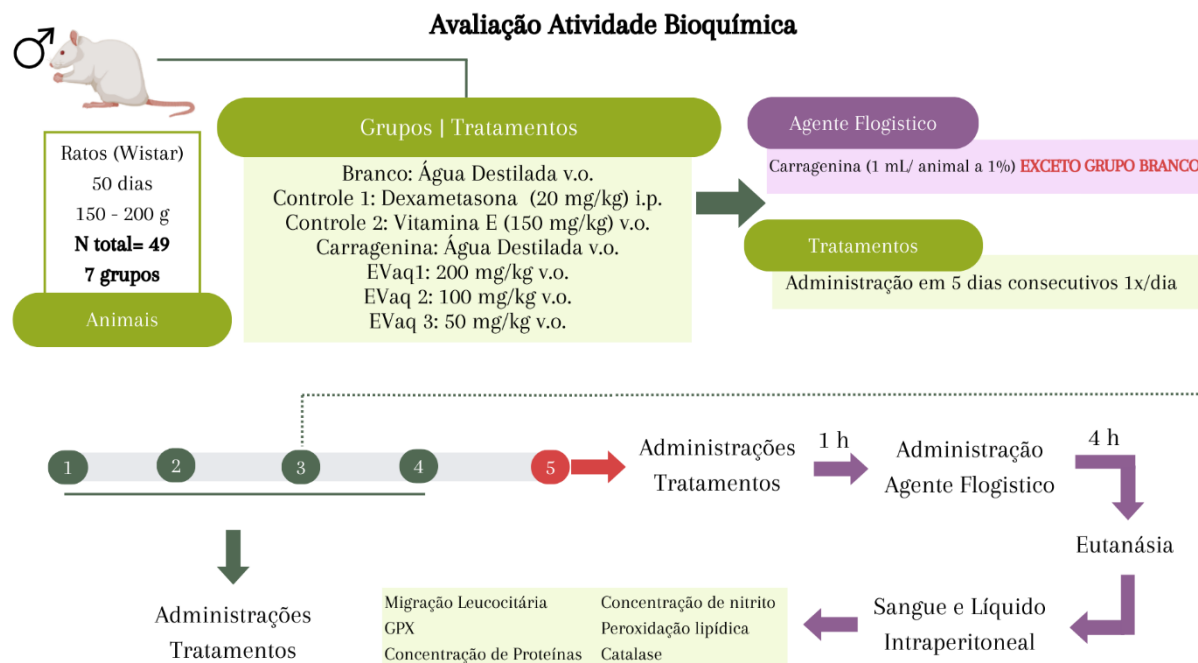


Figura 5- Esquema de avaliação da atividade bioquímica oxidativa

Fonte: Autor

4.4.1 ACOMPANHAMENTO DO GANHO DE PESO

Os animais foram pesados com uma balança semianalítica (PRIX Toledo 9094 PLUS) 1 h antes das administrações dos tratamentos durante os 5 dias consecutivos. A diferença entre as pesagens e o peso do animal no dia do início do teste foi utilizada como cálculo do ganho de peso.

4.4.2 COLETA DE AMOSTRAS BIOLÓGICAS

Para coleta das amostras os animais foram anestesiados com isoflurano (3,5% para indução da anestesia e 1,5% para manutenção) e eutanasiados por punção cardíaca, à medida que o sangue foi coletado. A cavidade peritoneal foi lavada com 10 mL de solução salina e o líquido foi coletado para a avaliação de marcadores de estresse oxidativo. As amostras foram armazenadas em microtubos e acondicionadas em freezer à -80°C.

4.4.3 MIGRAÇÃO LEUCOCITÁRIA

O teste baseia-se na leitura na capacidade da resposta a estímulos inflamatórios do sistema imunológico dos animais e a capacidade de diapedese de leucócitos para o local da inflamação (Souza e Ferreira, 1985).

Imediatamente após a coleta do líquido da lavagem intraperitoneal, uma alíquota de 20 microlitros foi separada para coloração e leitura em microscópio. A alíquota foi adicionada à 380 microlitros de solução de Turk (uma solução composta por ácido acético, para lise de hemácias, e azul de metileno, para coloração de leucócitos). Essa mistura foi deixada por 2 a 4 minutos para fixação da coloração, posteriormente a esse tempo, uma alíquota de 20 microlitros foi retirada dessa mistura de corante e lavado de líquido intraperitoneal e adicionada em uma câmara de Neubauer para contagem das células leucocitárias (Hall et al., 1998).

Para determinação do valor total de células foi feito o seguinte cálculo matemático em que N representa o número de leucócitos encontrados na leitura da amostra, Q representa a quantidade quadrantes utilizados para leitura, DIL, representa a diluição da amostra e 10000 o fator de correção

$$\text{Migração leucocitária (células} \times 10^6) = \left(\frac{N}{Q}\right) \times DIL \times 10000 \quad (6)$$

4.4.4 AVALIAÇÃO BIOQUÍMICA

a. Avaliação da concentração de nitritos

O teste se baseia na leitura da concentração de nitrito na amostra em um comprimento de onda de 540 nm por meio de um espectrofotômetro. Tais nitritos formam compostos azoicos ao interagirem com o reagente Griess (Sulfanilamida 1% em ácido fosfórico 5% e Naftil-etileno-diamina 0,01%). Os compostos azoicos conferem uma coloração azulada proporcional a concentração de cromógeno (Green et al., 1981). A concentração foi calculada através da curva padrão e corrigida pela quantidade de proteínas totais individuais de cada amostra.

Para a realização do teste foram utilizados 50 microlitros de amostra de líquido intraperitoneal e 50 microlitros do reagente de Griess que foram colocados em poços de microplacas e homogeneizados. Após as amostras ficarem incubadas durante 10 minutos em abrigo da luz, foram lidas em espectrofotômetro. Todas as amostras foram feitas em duplicata.

Para encontrar a concentração de nitritos foi feita uma média das absorbâncias (A_1 , A_2) encontradas para a mostra e subtraído a média dos valores encontrados para o branco (apenas os reagentes). Posteriormente esse valor foi colocado na equação da curva padrões, obtida previamente. Por fim, o valor obtido foi dividido pelo valor da concentração de proteínas obtido através do método de Bradford (P).

$$\text{Nitritos} = \frac{\left\{ \left[\left(\frac{A_1 + A_2}{2} \right) - b \right] 266,1143 \right\} + 0,5856}{P} \quad (7)$$

b. Avaliação da peroxidação lipídica

O método de avaliação da peroxidação lipídica proposto por De Leon (2020) é baseado na produção de um cromóforo rosa estável com coloração proporcional a presença de lipídeos oxidados que será lido por espectrofotômetro com leitura no comprimento de onda de 532 nm. O cromóforo é formado, principalmente, na reação de Malonaldeído (MDA) com o ácido tiabitérico (TBA) causando a formação de MDA-TBA, conhecido como TBARS.

Para a realização do teste foi adicionado 200 microlitros de amostra de líquido intraperitoneal em um microtubo com 20 microlitros de tiobarbitúrico, depois foi adicionado 200 microlitros de TBA, 200 microlitros de ácido clorídrico e homogeneizado. Os microtubos foram levados a banho seco à 100°C por 25 minutos. Após resfriamento foi adicionado 618 microlitros de butanol, as amostras foram homogeneizadas e centrifugas à 1200 rotações por minuto por 3 minutos. Por fim, 20 microlitros foram removidos do sobrenadante e adicionados aos poços das placas, as leituras foram feitas em duplicadas em espectrofotômetro a 532 nm.

Para encontrar a quantificação da peroxidação lipídica foi feita uma média entre as leituras da absorbância das amostras (A_1 , A_2) e teve a média das leituras do branco

(apenas os reagentes) subtraídas desse valor. Posteriormente, esses valores foram colocados na equação da curva.

$$\text{Peroxidação Lipídica} = \left\{ \left(\frac{A_1 + A_2}{2} \right) - b \right\} \times 63,093 - 3,2123 \quad (8)$$

c. Avaliação da atividade da CAT

O método baseia-se na capacidade da catalase, presente na amostra, de transformar H_2O_2 em água. A metodologia descrita por Aebi (1984) quantifica, em 240 nm durante 5 minutos, a velocidade de decomposição do H_2O_2 . Primeiramente é feita uma solução de H_2O_2 10mM com tampão de fosfato a um pH de 7,0 preparada e titulada no dia da análise. Uma alíquota de 2 mL da solução foi adicionada em uma cubeta de quartzo para leitura e, por fim, adicionados 20 μL da amostra, para ser feita a leitura.

Os valores obtidos (Abs) dividido pelo valor de correção e multiplicado pelo valor de diluição (dil). Esse valor é corrigido pelo valor obtido no teste de Bradford, conforme fórmula matemática abaixo:

$$\text{CAT} = \frac{\text{Abs} / (0,071 \times \text{dil})}{P} \quad (9)$$

d. Avaliação da concentração de GPx

O teste é baseado na reação espontânea da GPx com a o radical -OOH que acontece principalmente no citosol. Foi adicionado 500 microlitros de NADPH, 380 microlitros de amostra de líquido intraperitoneal, 50 microlitros de GSH, 10 microlitros de GSSG redutase e, por fim, 10 microlitros NaN_3 em um microtubo que foi agitado e incubado a 37°C por 10 minutos. Posteriormente, 50 microlitros de TBHP foi adicionado ao microtubo, que foi agitado e tirada uma alíquota suficiente para preencher a cubeta para leitura em espectrofotômetro a 340 nm (Wendel, 1981).

Para obter o valor da concentração de GPx o valor obtido na leitura é dividido pelo valor de correção da cubeta e, então, esse valor é corrigido pelo valor da concentração de proteínas obtido pelo teste de Bradford.

$$GPx = \frac{Abs/_{6,22}}{P} \quad (10)$$

e. Avaliação da concentração de Proteínas

O teste se baseia na reação do corante Azul Brilhante de Coomassie G-250 no pH ácido do reagente de bradford ao ligar-se às proteínas. A partir da reação a proteína presente na amostra de líquido intraperitoneal liga-se ao corante e estabiliza-o na absorbância de 465 a 595 nm. Para a determinação dos valores há a comparação dos resultados com uma curva padrão com valores conhecidos.

Para a realização do teste, primeiramente, foi preparado a solução de Bradford, dissolvendo o corante azul brilhante de Coomassie em etanol, adicionando ácido fosfórico e acertando o volume da solução com água destilada. Ao ser utilizada a solução foi agitada e filtrada. Foi adicionado 1 mL de solução Bradford e 20 microlitros de amostra em um eppendorf, homogeneizada e reservada com abrigo de luz durante 5 minutos. Posteriormente as amostras foram lidas em 595 nm em triplicata.

Para encontrar o valor da concentração de proteínas, foi feita uma média dos valores de absorbância obtidos através das leituras (A_1 , A_2 , A_3), o valor do branco (b) do teste (feito apenas com os reagentes) foi diminuído do valor das médias. A partir disso, os valores foram colocados na equação da curva feita previamente.

$$\text{Concentração de Proteínas} = \left\{ \left[\left(\frac{A_1 + A_2 + A_3}{3} \right) - b \right] 2,7948 \right\} - 0,012 \quad (11)$$

4.5 Análise Estatística

A análise estatística foi conduzida a partir do programa estatístico Sigmaplot®. O teste Shapiro-Wilk ($p < 0,05$) foi utilizado para a determinação da normalidade do grupo. Para os testes de atividade motora, emocionalidade, peso relativo dos órgãos e bioquímica da toxicidade, em casos de distribuição normal o teste t de student e análises de variâncias foram utilizadas, em casos de distribuição não-gaussiana,

foram utilizados testes U de Mann-witney. Para a avaliação do consumo de água, ração e ganho de peso foi utilizado o anova de uma via de medidas repetidas.

Para os testes de atividade antioxidante em caso de normalidade da amostra foi utilizado o anova de uma via com pós teste de Holm-sidak, para amostras não-gaussianas foi utilizado o anova de uma via com pós teste de Dunn.

5 RESULTADOS

5.1 Avaliação da Toxicidade Oral Aguda

5.1.1 LETALIDADE E AVALIAÇÃO HIPOCRÁTICA

Os animais do grupo EVaq (2000 mg/kg) não apresentaram diferenças em relação ao grupo controle nos parâmetros de: frêmito vocal, hiperemia, cianosis, hipnose, ptosis palpebral, nistagmo, lacrimação, salivação, ereção pilomotora, alterações na cauda, defecação, diarreias, micção, diminuição da atividade motora, ataxia, perda de força, paralisia de pescoço, paralisia pernas, dispneia, tremores, aumento da atividade motora, convulsões clônicas, convulsões tônicas, fasciculação, sensibilidade auditiva.

5.1.2 ATIVIDADE MOTORA ESPONTÂNEA

Foram avaliados parâmetros de velocidade média total, distância total percorrida e quantidade total de *rearing*, comportamento animal de se apoiar sobre as patas traseiras. Tanto na avaliação da velocidade média total, quanto na avaliação de distância total percorrida, 1 h após a administração do extrato, houve uma diferença estatisticamente significativa ($p < 0,01$) indicando que os animais que receberam o extrato reduziram a velocidade (Figura 6A), deambulação total (Figura 6B) em relação ao grupo controle, entretanto o *rearing* não tiveram diferenças estatisticamente significativas.

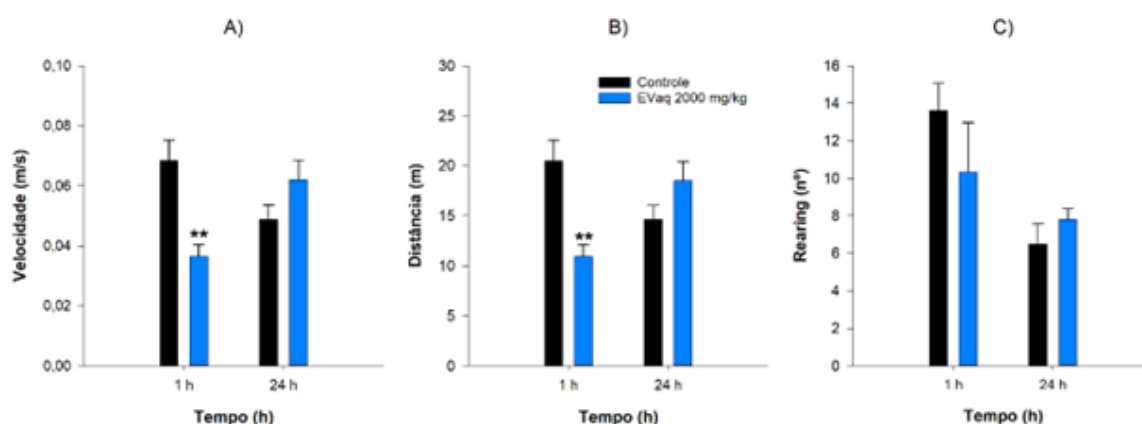


Figura 6- Efeitos da dose de 2000 mg/kg por via oral de EVaq sobre atividade locomotora de ratos no teste do campo aberto. Dados apresentados como média $\pm$ erro padrão ($n=6$) da (A) velocidade média de locomoção, (B) distância total percorrida e (C) número de rearings, avaliados 1 h e 24 h após a administração. ** $p < 0,01$ versus controle. A avaliação estatística deu-se por meio do teste t de student.

Fonte: Autor

5.1.3 PARÂMETROS DE EMOCIONALIDADE

Os parâmetros de emocionalidade avaliados foram tempo (Figura 7A) e distância percorrida no centro do aparato (Figura 7B). Não foi encontrada diferença estatisticamente relevante entre os grupos, além disso em ambos os grupos não foram registrados episódios de *freezing*.

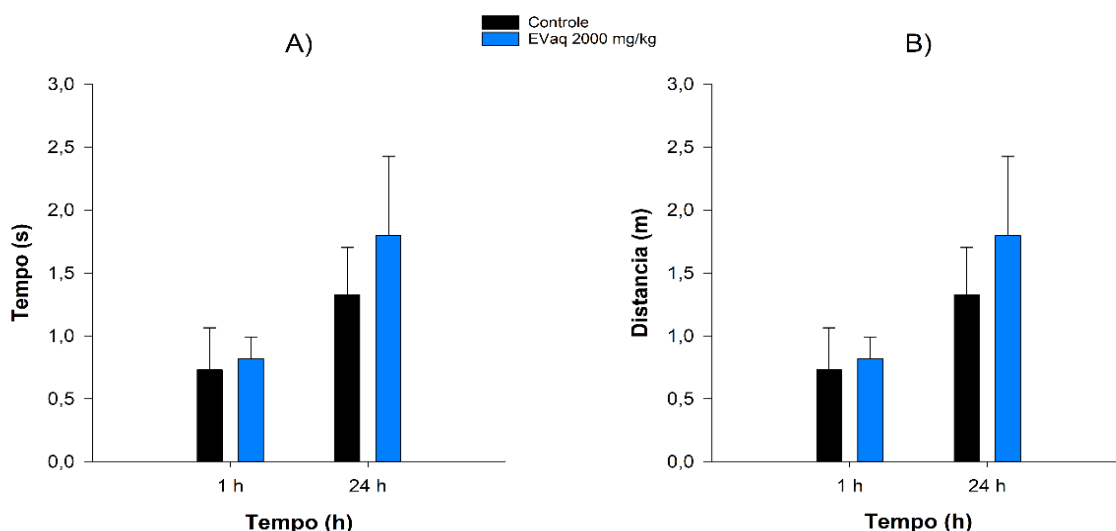


Figura 7 - Efeitos da dose de 2000 mg/kg por via oral de EVaq sobre a emocionalidade de ratos no teste do campo aberto. Dados apresentados como média $\pm$ erro padrão (n=6) do (A) tempo total no centro do aparato, (B) distância total percorrida no centro do aparato, avaliados 1 h e 24 h após a administração. A avaliação estatística deu-se por meio do teste T de student.

Fonte: Autor

5.1.4 CONSUMO DE RAÇÃO, ÁGUA E GANHO DE PESO

Os animais que foram administrados agudamente por via oral com o EVaq (2000 mg/kg) não apresentaram diferença significativa em comparação com o grupo controle nos perfis de ganho de peso (Figura 8A) ou consumo de ração (Figura 9C). Em relação ao consumo de água, os animais tratados com EVaq apresentaram uma discreta redução em relação ao controle nos dias 11, 12 e 13 de acompanhamento. Todavia, o consumo voltou a normalizar nos dias 14 e 15, mantendo médias equivalentes aos controles (Figura 8B).

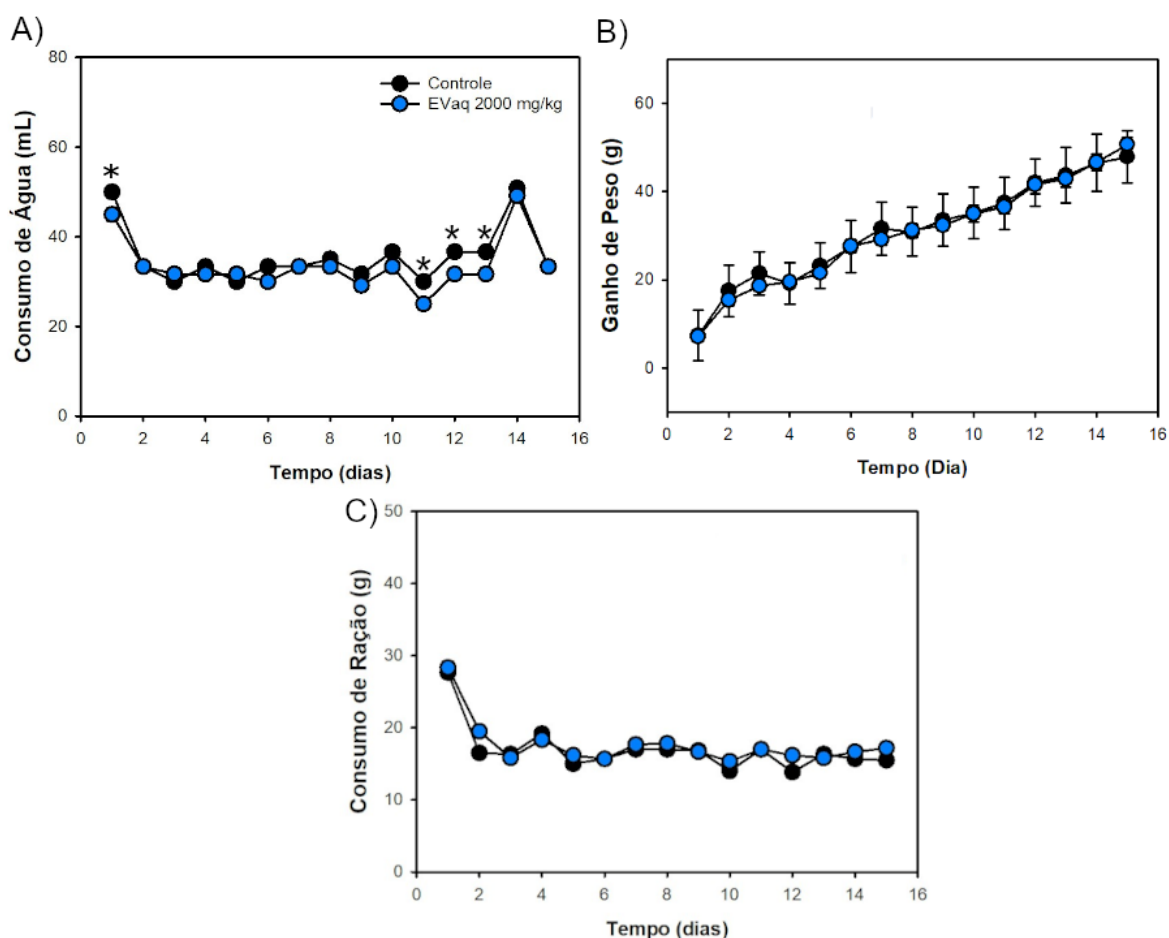


Figura 8 - Efeitos da dose de 2000 mg/kg por via oral de EVaq sobre o consumo de ração, água e ganho de peso dos ratos. Dados apresentados como média $\pm$ erro padrão (n=6) do (A) consumo de água, (B) ganho de peso e (C) consumo de ração, avaliados 1 h e 24 h após a administração. * $p < 0,001$. A avaliação estatística deu-se por meio do teste de ANOVA de uma via de medidas repetidas seguido do teste de Holm-Sidak.

Fonte: Autor

5.1.5 AVALIAÇÃO MACROSCÓPICA DOS ÓRGÃOS

Não foram observadas diferenças em relação a estrutura (Figura 9), coloração ou textura superficial do coração, pulmões, rins, fígado e estômago dos animais que receberam EVaq 2000 mg/kg em relação aos animais do grupo controle (Figura 10), tanto na coleta 6 h após a administração quanto na coleta após 14 dias. Além disso não houve diferença estatisticamente relevante da massa dos órgãos entre os grupos.

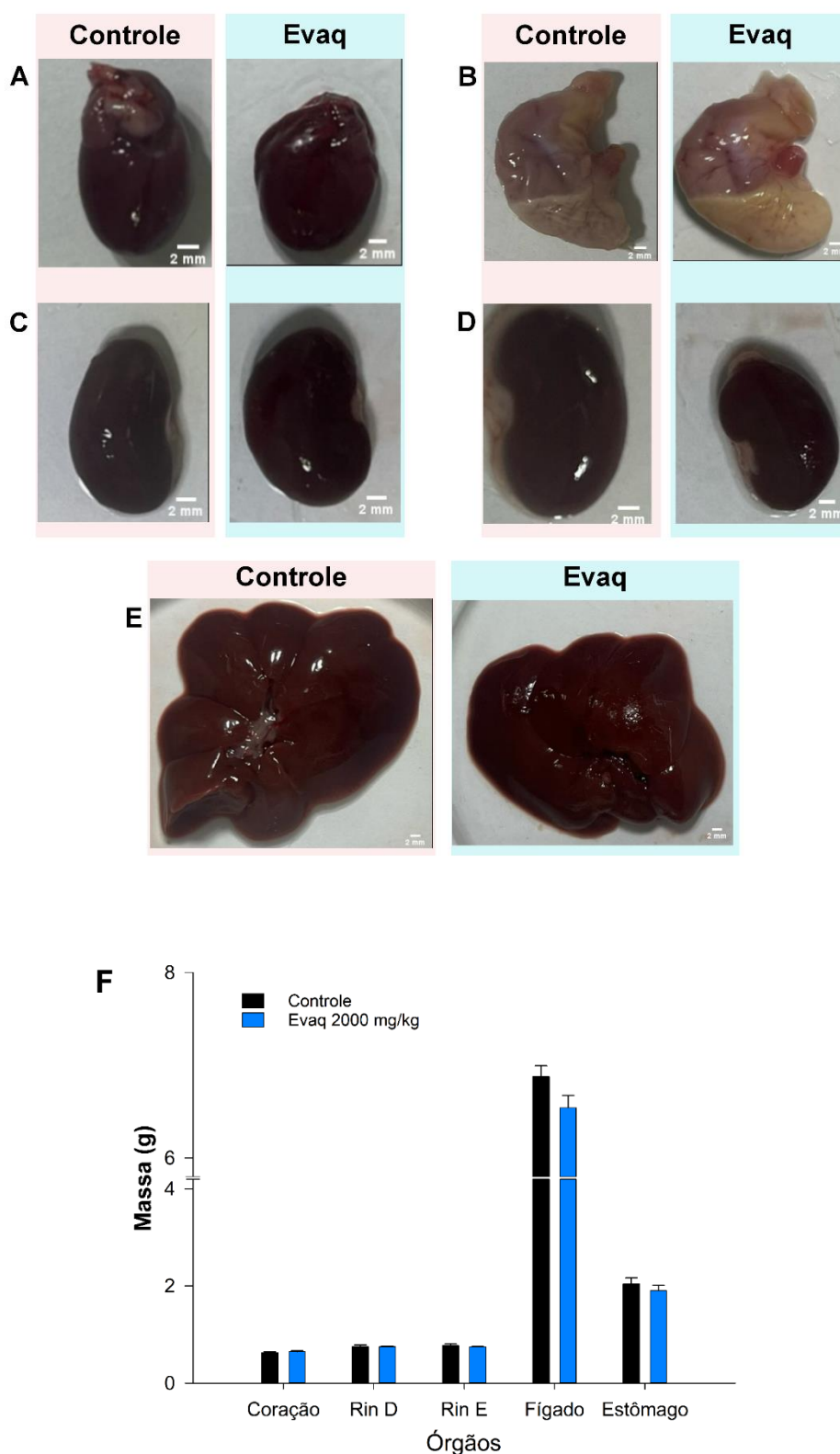


Figura 9 - Registro fotográfico da avaliação macroscópica dos órgãos vitais. Controle₀ e EVAq₀ foram coletados 6 h após a administração da dose do extrato. Foram coletados coração (A), estômago (B), rim direito (C), rim esquerdo (D), Fígado (E) e gráfico do peso relativo dos órgãos (F). Dados apresentados como média $\pm$ erro padrão (n=6) da coleta após 14 dias da administração. A avaliação estatística deu-se por meio do teste t de Student.

Fonte: Autor

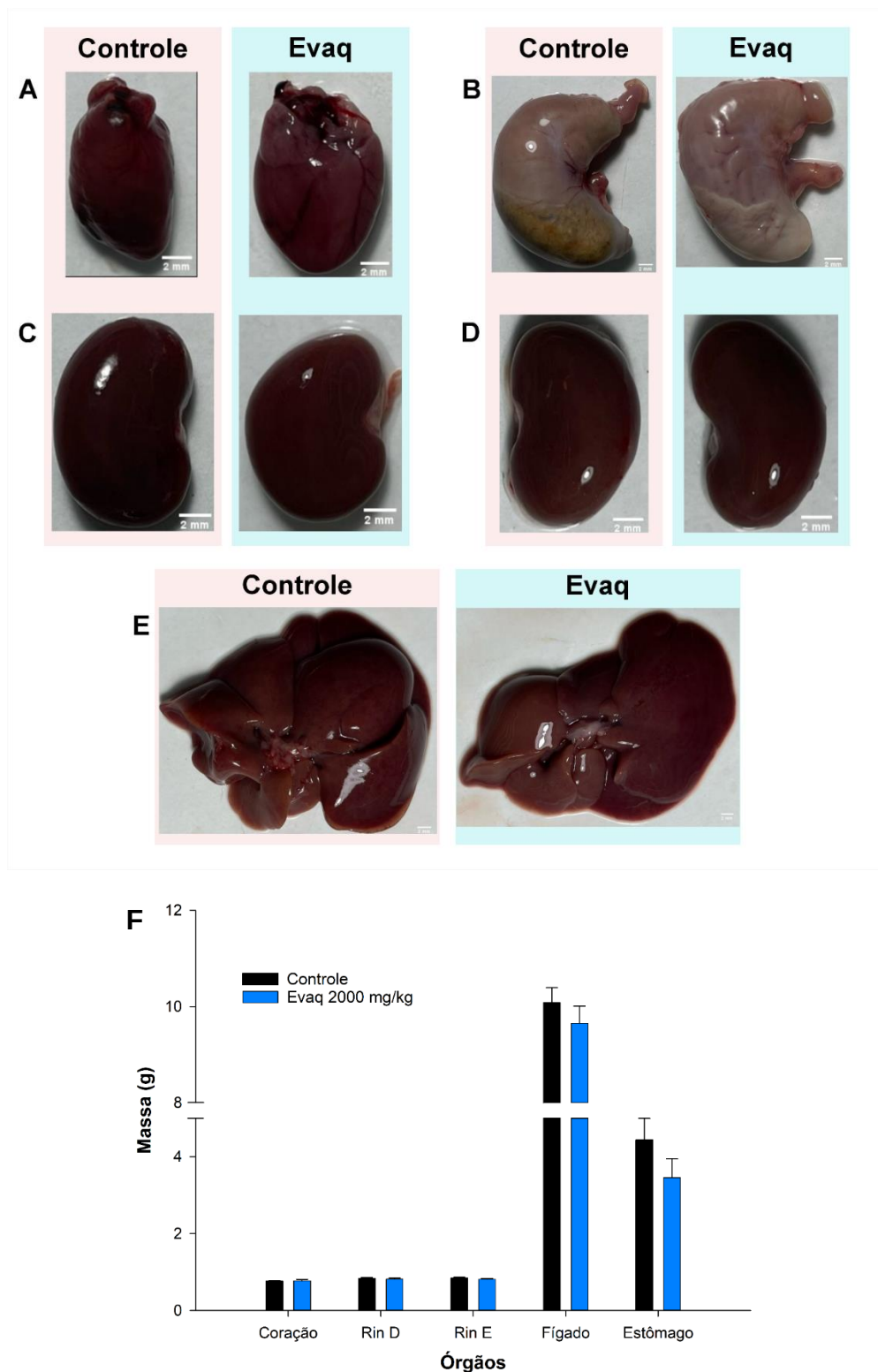


Figura 10- Registro fotográfico da avaliação macroscópica dos órgãos vitais. Controle₁₄ e EVAq₁₄ foram coletados 14 dias após a administração da dose do extrato. Foram coletados coração (A), estômago (B), rim direito (C), rim esquerdo (D), Fígado (E) e gráfico do peso relativo dos órgãos (F). Dados apresentados como média $\pm$ erro padrão (n=6) da coleta após 14 dias da administração. A avaliação estatística deu-se por meio do teste t de Student.

5.1.6 AVALIAÇÃO MICROSCÓPICA DOS ÓRGÃOS

Foram avaliados parâmetros teciduais habituais de todos os tecidos, os rins de todos os animais de todos os grupos não apresentaram sinais histológicos de toxicidade ou alterações histológicas significativas, assim como fígado, estômago e coração (Figura 11 e 12).

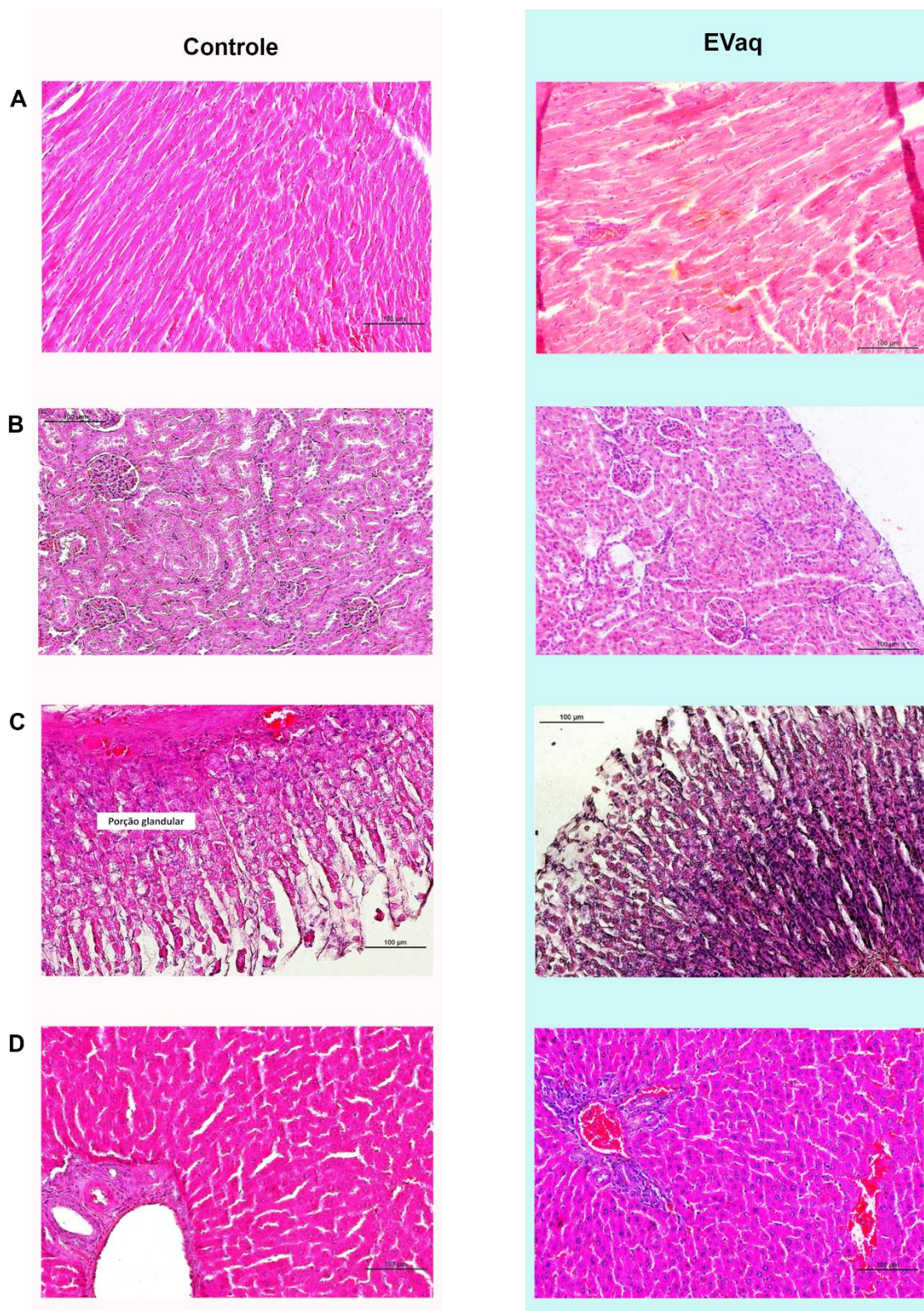


Figura 11- Registro micrográfico da avaliação microscópica dos órgãos vitais. Controle₀ e EVaq₀ foram coletados 6 h após a administração da dose do extrato. Foram coletados coração (A), rim (B), estômago (C), fígado (D).

Fonte: Autor

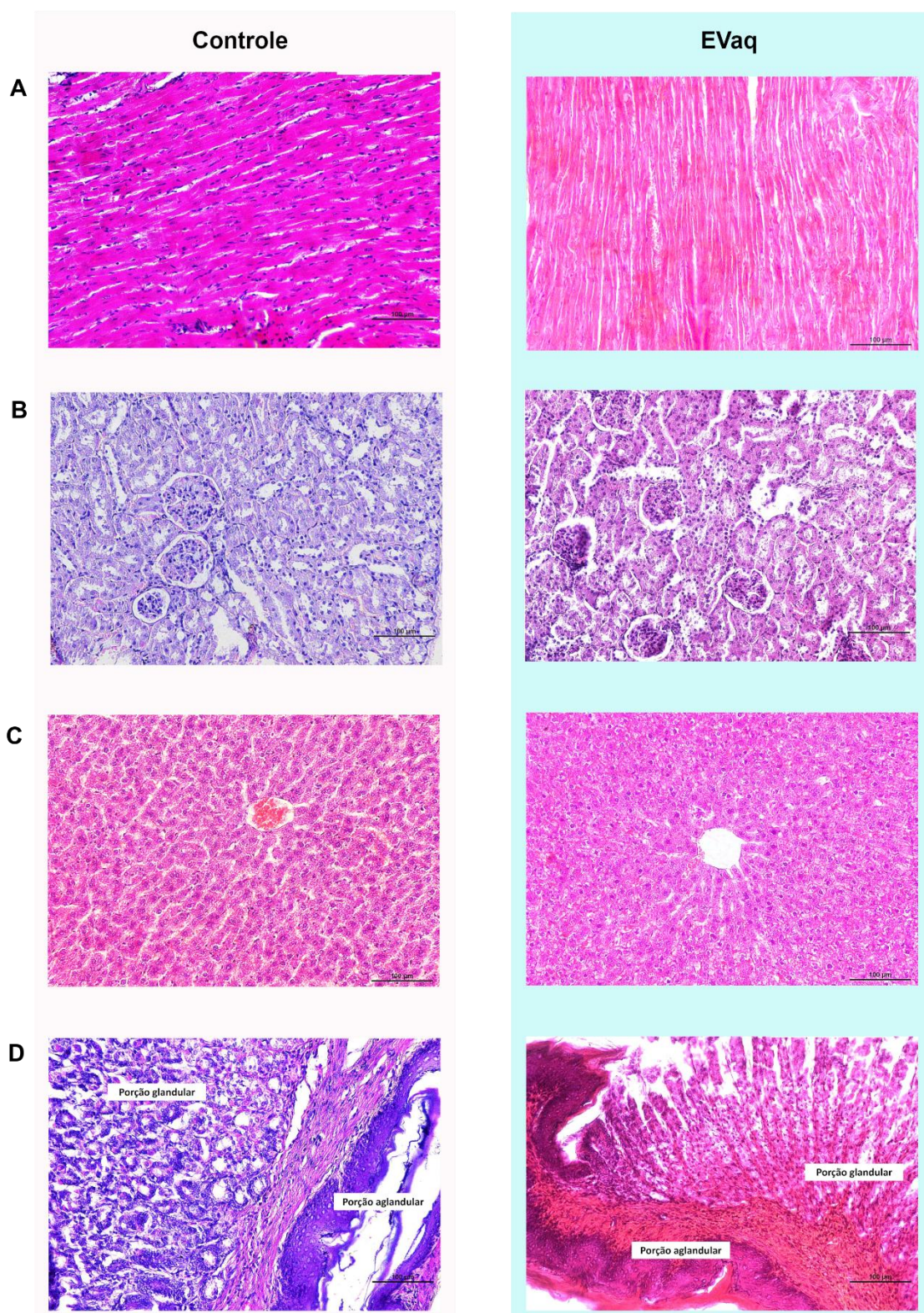


Figura 12- Registro micrográfico da avaliação microscópica dos órgãos vitais. Controle₁₄ e EVaq₁₄ foram coletados 6 h após a administração da dose do extrato. Foram coletados coração (A), rim (B), estômago (C), fígado (D).

Fonte: Autor

5.1.7 AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS BIOQUÍMICOS

A dose limite de 2000 mg/kg (v.o.) de EVaq promoveu reduções significativas, quando avaliados 1 h após administração, nos seguintes parâmetros: Proteínas totais, albumina, VLDL (lipoproteínas de densidade muito baixa) e triglicerídeos. Em relação aos parâmetros 14 dias após a administração, quando avaliados em relação ao grupo controle houve diminuições significativas de: Proteínas totais, albumina, colesterol, creatinina e AST. Os parâmetros de: colesterol, creatinina, AST, ALT, fosfatase alcalina, ureia, globulinas não apresentaram alterações entre os grupos no mesmo dia em que foram administrados. Em relação aos animais eutanasiados 14 dias após o dia da administração os parâmetros que se mostraram semelhantes entre os grupos foram: Lipoproteínas de densidade muito baixa, triglicerídeos, ALT, fosfatase alcalina, ureia, albuminas e globulinas (Tabela 4).

Parâmetros	1 dia			15 dias		
	Controle	EVAq	p	Controle	EVAq	p
Proteínas totais (g/dL)	6,57 ± 0,19	6,06 ± 0,1	0,018*	7,38 ± 0,36	6,31 ± 0,24	<0,01 *
Albumina (g/dL)	4,73 ± 0,03	4,45 ± 0,04	<0,001*	4,98 ± 0,23	4,43 ± 0,05	<0,01 *
Colesterol (mg/dL)	49 ± 3,01	44,83 ± 2,27	0,148	57,5 ± 2,74	50,33 ± 1,31	0,02 *
Lipoproteínas de Densidade Muito Baixa (mg/dL)	12,17 ± 1,19	9,33 ± 0,99	0,048 *	37,17 ± 5,16	33,83 ± 2,95	0,294
Creatinina (mg/dL)	0,55 ± 0,03	0,52 ± 0,25	0,206	0,55 ± 0,006	0,47 ± 0,008	<0,001 *
Triglicerídeos (mg/dL)	60,5 ± 5,64	46 ± 4,97	0,041*	185,67 ± 26,02	169 ± 15,18	0,302
Alamina Aminotransferase (U/L)	28,67 ± 1,26	30 ± 3,15	0,351	47,17 ± 2,95	47,67 ± 2,6	0,451
Aspartato Aminotrasferase (U/L)	202,33 ± 22,89	223,33 ± 33,73	0,309	183,17 ± 21,37	130,33 ± 1,26	0,025 *
Fosfatase Alcalina (U/L)	167,83 ± 9,16	201 ± 18,11	0,066	226 ± 29,48	296 ± 34,76	0,765
Ureia (mg/dL)	42,67 ± 1,94	43,83 ± 2,55	0,362	48,67 ± 3,92	44,33 ± 2,77	0,194
Albuminas/Globulinas	2,66 ± 0,21	2,79 ± 0,01	0,298	2,5 ± 1,68	2,38 ± 0,17	0,093
Globulinas (mg/dL)	1,85 ± 0,16	1,6 ± 0,07	0,087	2,4 ± 0,33	1,88 ± 0,07	0,065

Tabela 4 - Efeitos da administração oral aguda do extrato aquoso de *Vaitaria* sp. (EVAq) em dose limite (2000 mg/kg) sobre marcadores bioquímicos de toxicidade. Dados expressos como média ± e.p.m. * P valor <0,05

Fonte: Autor

5.2 Avaliação da Atividade Antioxidante

5.2.1 AVALIAÇÃO DE NITRITOS

Todos os grupos se apresentaram estatisticamente diferentes em relação ao grupo carragenina, além disso, também houve diferença entre os grupos EVaq 50 mg/kg e 100 mg/kg e os grupos 100 mg/kg e 200 mg/kg (Figura 11), de forma que foi possível estabelecer uma relação de dose resposta representada pela equação a baixo e dessa maneira foi possível definir a DE50 (dose efetiva mínima ou dose em que 50% dos animais apresenta efeitos terapêuticos) em 82,62 mg/kg (Figura 12).

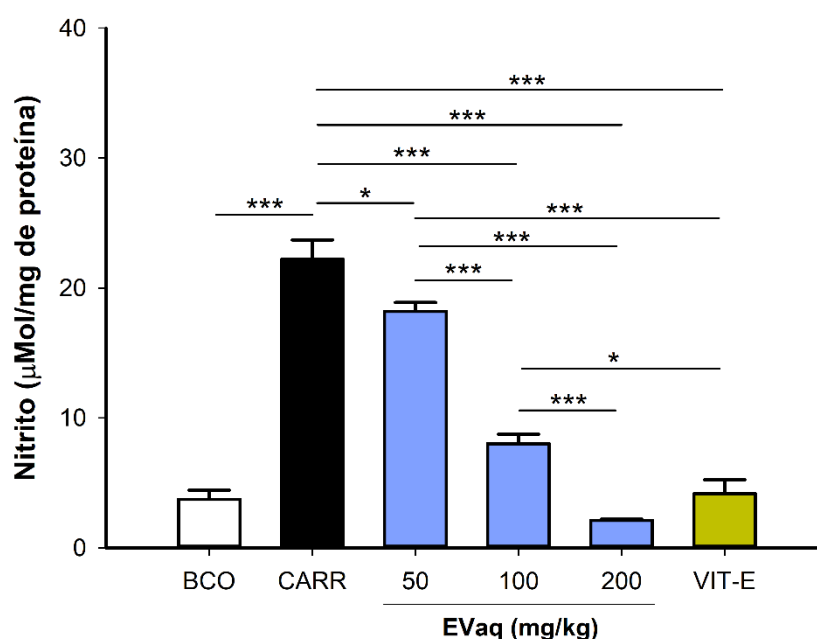


Figura 13 - Efeitos antioxidantes do EVaq sobre a quantidade de nitritos nas amostras dos animais. Dados apresentados como média $\pm$ erro padrão da amostra (n=7). BCO= grupo Branco, CARR= grupo carragenina, 50 = grupo EVaq 50 mg/kg, 100= grupo EVaq 100 mg/kg, 200= grupo EVaq 200mg/kg e VIT-E= grupo vitamina E. Dados apresentados como média $\pm$ erro padrão (n=7). A avaliação estatística deu-se por meio do teste ANOVA de uma via. *p<0,05; **p<0,01; ***<0,001

Fonte: Autor

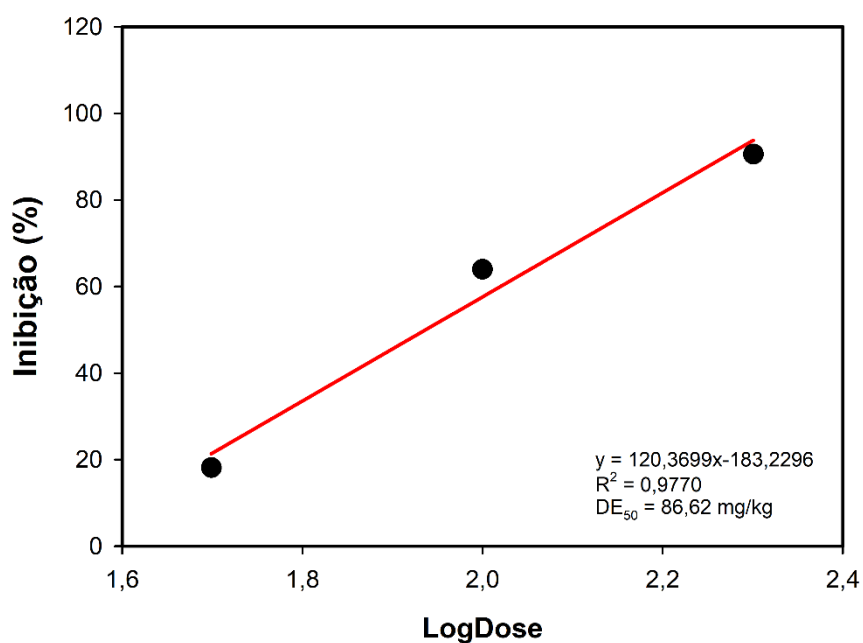


Figura 14 – Curva de dose-resposta representando o efeito do EVaq sobre a concentração de nitritos em ratos. Os dados foram expressos como média $\pm$ desvio padrão de (n=7). A curva foi ajustada por regressão linear.

Fonte: Autor

Por fim, também foi possível ver uma diferença significativa entre o grupo dexametasona e o grupo carragenina, mas não entre o grupo EVaq 200 mg/kg e o grupo dexametasona (Figura 13).

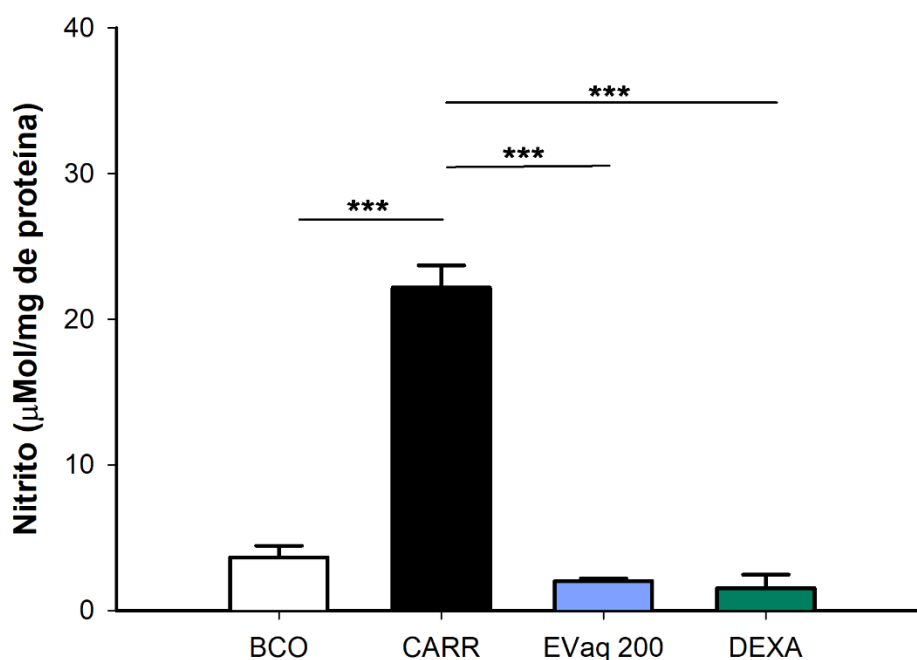


Figura 15 - Efeitos anti-inflamatórios do EVaq sobre a quantidade de nitritos nas amostras dos animais. Dados apresentados como média $\pm$ erro padrão da amostra ($n=7$). BCO= grupo Branco, CARR= grupo carragenina, 50 = grupo EVaq 50 mg/kg, 100= grupo EVaq 100 mg/kg, 200= grupo EVaq 200mg/kg e DEXA= dexametasona. Dados apresentados como média $\pm$ erro padrão ($n=7$). A avaliação estatística deu-se por meio do teste ANOVA de uma via. * $p<0,05$; ** $p<0,01$; *** $p<0,001$

Fonte: Autor

5.2.2 AVALIAÇÃO DA PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA

Foi encontrada diferença estatística entre todos os grupos em relação ao grupo carragenina. Além disso, foi encontrada diferença significativa entre os grupos de diferentes doses de EVaq (Figura 14), não foi encontrada diferença estatisticamente significativa entre o grupo de 100 e o grupo de 200 mg/kg de EVaq.

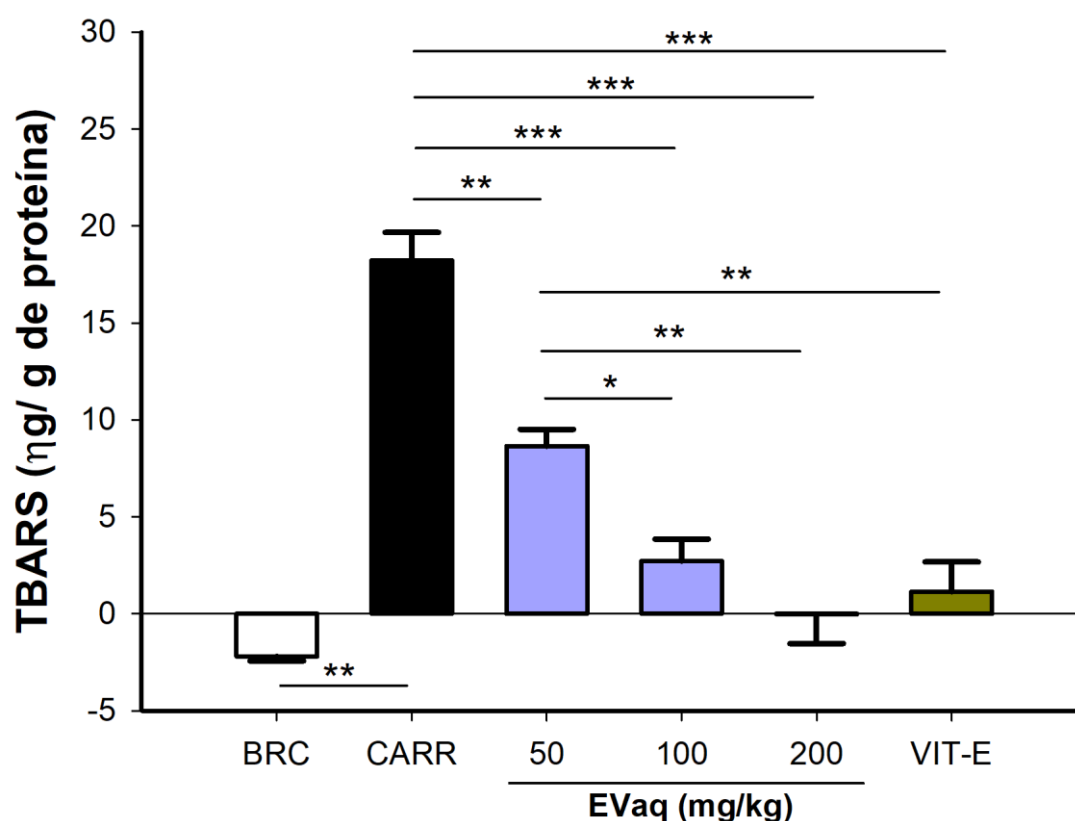


Figura 16- Efeitos do EVaq sobre a peroxidação lipídica nas amostras dos animais. Dados apresentados como média $\pm$ erro padrão da amostra (n=7). BCO= grupo Branco, CARR= grupo carragenina, 50 = grupo EVaq 50 mg/kg, 100= grupo EVaq 100 mg/kg, 200= grupo EVaq 200mg/kg e VIT-E= grupo vitamina E. Dados apresentados como média $\pm$ erro padrão (n=7). A avaliação estatística deu-se por meio do teste ANOVA de uma via. *p<0,05; **p<0,01; ***<0,001

Fonte: Autor

5.2.3 AVALIAÇÃO DA CAT

O grupo branco apresentou diferença estatisticamente relevante em relação ao grupo carragenina ($p<0,001$), assim como os grupos dos animais que receberam doses de EVaq (50 mg/kg: $p=0,05$; 100 mg/kg: $p<0,001$; 200 mg/kg: 0,002). O grupo vitamina E não apresentou diferença estatística em relação ao grupo carragenina. Além disso, também houve diferença estatística entre os grupos EVaq doses de 50 e 100 mg/kg ($p=0,039$) e 100 e 200 mg/kg ($p=0,023$) e entre o grupo EVaq 100 mg/kg e o grupo vitamina E ($p=0,015$) (Figura 15).

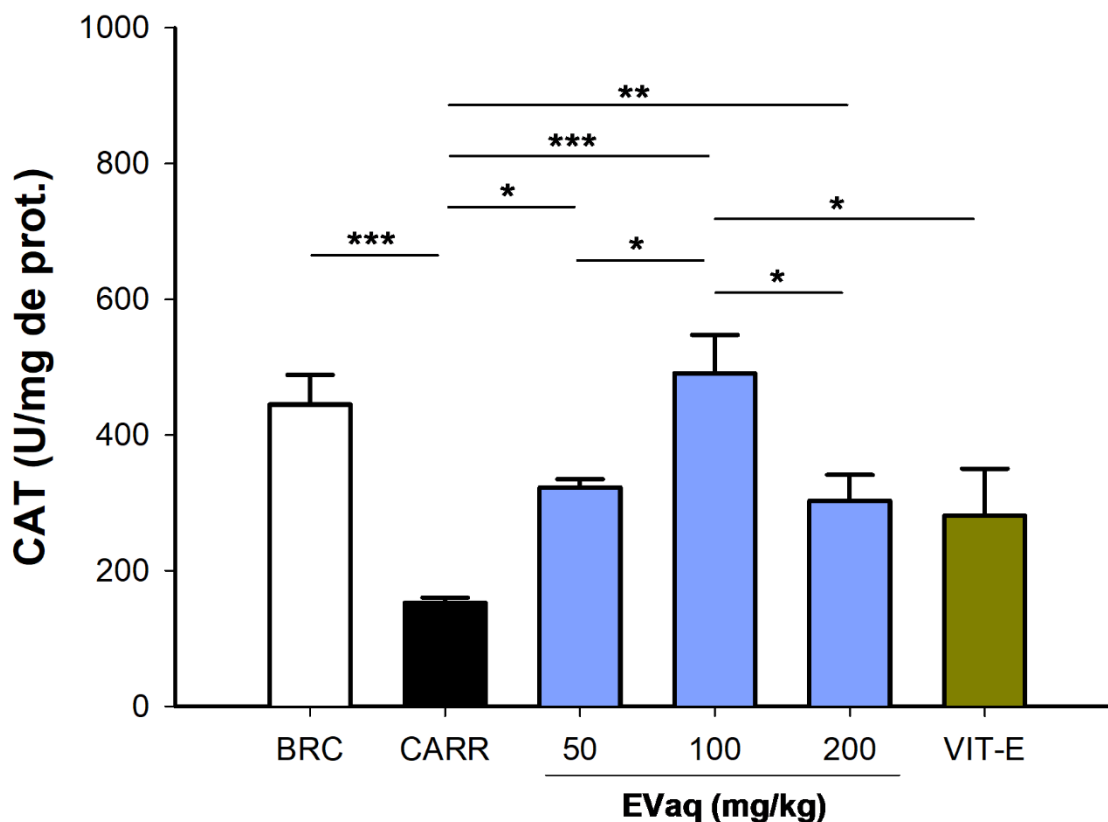


Figura 17- Efeitos do EVaq sobre a peroxidação lipídica nas amostras dos animais. Dados apresentados como média $\pm$ erro padrão da amostra (n=7). BCO= grupo Branco, CARR= grupo carragenina, 50 = grupo EVaq 50 mg/kg, 100= grupo EVaq 100 mg/kg, 200= grupo EVaq 200mg/kg e VIT-E= grupo vitamina E. Dados apresentados como média $\pm$ erro padrão (n=7). A avaliação estatística deu-se por meio do teste ANOVA de uma via. *p<0,05; **p<0,01; ***<0,001

Fonte: Autor

5.2.4 AVALIAÇÃO DA GPX

O grupo carragenina e o grupo branco apresentaram diferenças estatísticas entre si (p<0,001). Os grupos que receberam as doses de 100 e 200 mg/kg de EVaq foram estatisticamente diferentes do grupo carragenina (p<0,001 para ambos), entretanto o grupo EVaq 50 mg/kg não foi estatisticamente diferente do grupo carragenina (p=0,386). Além disso, o grupo vitamina E foi estatisticamente diferente

do grupo carragenina ($p=0,031$). Por fim, o grupo EVaq 50 mg/kg foi estatisticamente diferente dos grupose EVaq 100 e 200 mg/kg ($p=0,009$ e $p=0,008$, respectivamente) (Figura 16).

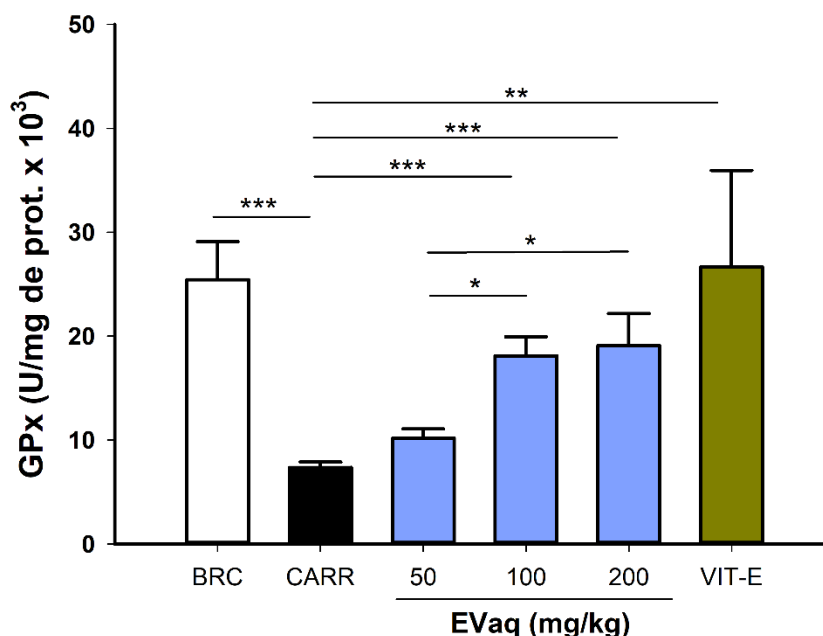


Figura 18- Efeitos do EVaq sobre a GPx nas amostras dos animais. Dados apresentados como média $\pm$ erro padrão da amostra ($n=7$). BCO= grupo Branco, CARR= grupo carragenina, 50 = grupo EVaq 50 mg/kg, 100= grupo EVaq 100 mg/kg, 200= grupo EVaq 200mg/kg e VIT-E= grupo vitamina E. Dados apresentados como média $\pm$ erro padrão ($n=7$). A avaliação estatística deu-se por meio do teste ANOVA de uma via. * $p<0,05$; ** $p<0,01$; *** $p<0,001$.

Fonte: Autor

5.2.5 AVALIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE PROTEÍNAS

O grupo carragenina foi estatisticamente diferente do grupo branco ($p<0,001$). O grupo carragenina também foi estatisticamente diferente dos grupos: EVaq 50 mg/kg; EVaq 100 mg/kg; EVaq 200 mg/kg e dexametasona ($p<0,001$ em todos os casos). Além disso, os grupos EVaq 50 e 200 mg/kg foram estatisticamente diferentes do grupo dexametasona ($p<0,001$ e $p=0,001$). Por fim, o grupo EVaq 100 mg/kg foi estatisticamente diferente dos grupos EVaq 50 e 200 mg/kg ($p=0,001$ e $p=0,004$, respectivamente) (Figura 17).

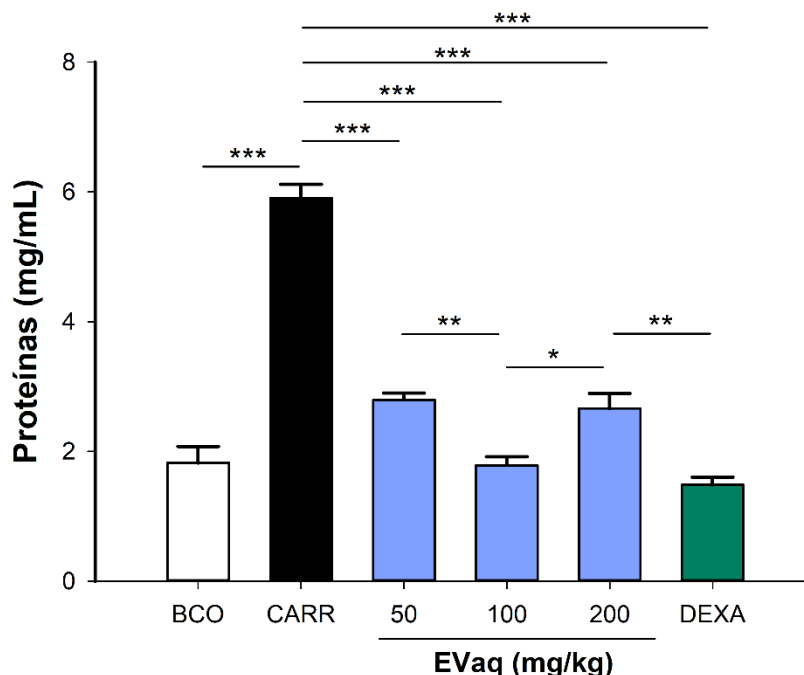


Figura 19- Efeitos do EVaq sobre a concentração total de proteínas nas amostras dos animais. Dados apresentados como média $\pm$ erro padrão da amostra ($n=7$). BCO= grupo Branco, CARR= grupo carragenina, 50 = grupo EVaq 50 mg/kg, 100= grupo EVaq 100 mg/kg, 200= grupo EVaq 200mg/kg e DEXA= grupo dexametasona. Dados apresentados como média $\pm$ erro padrão ($n=7$). A avaliação estatística deu-se por meio do teste ANOVA de uma via. * $p<0,05$; ** $p<0,01$; *** $p<0,001$ Fonte: Autor

5.2.6 MIGRAÇÃO LEUCOCITÁRIA

O grupo carragenina e o grupo branco apresentaram diferença estatística significativa ($p<0,001$). Além disso, o grupo carragenina apresentou diferença estatística entre os grupos: EVaq 100 mg/kg ($p=0,005$), EVaq 200 mg/kg ($p=0,004$), dexametasona ($p<0,001$) e vitamina E ($<0,001$). O grupo EVaq 50 mg/kg foi estatisticamente semelhante ao grupo carragenina ($p=0,979$). Os grupos EVaq 100 e 200 mg/kg foram estatisticamente semelhantes aos grupos dexametasona ($p=0,288$ e $p=0,568$, respectivamente), vitamina E ($p=0,686$ e $p=0,870$, respectivamente) e, por fim, branco ($p=0,694$ e $p=0,870$, respectivamente) (Figura 18).

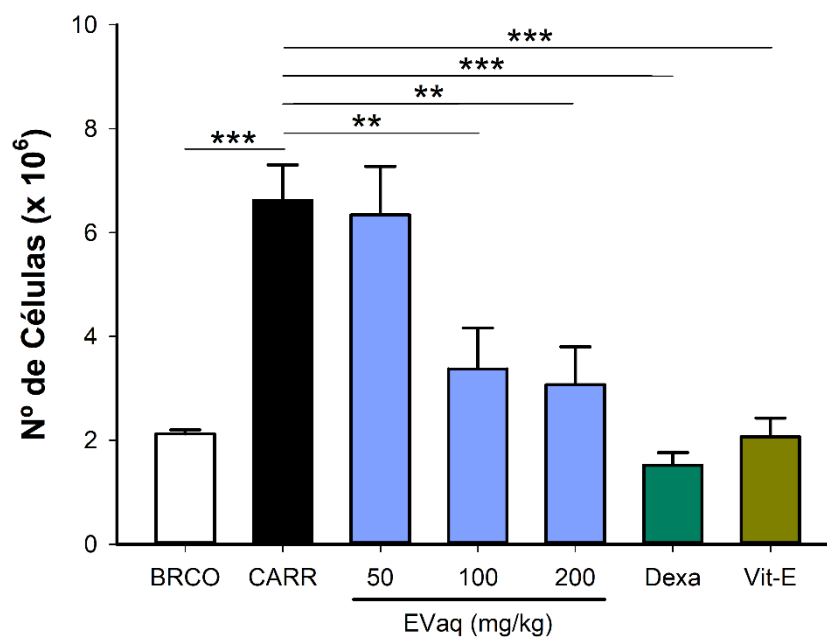


Figura 20 - Efeitos do EVaq sobre a migração leucocitária nas amostras dos animais. Dados apresentados como média $\pm$ erro padrão da amostra (n=7). BCO= grupo Branco, CARR= grupo carragenina, 50 = grupo EVaq 50 mg/kg, 100= grupo EVaq 100 mg/kg, 200= grupo EVaq 200mg/kg, DEXA= grupo dexametasona e VIT-E= grupo vitamina E. Dados apresentados como média $\pm$ erro padrão (n=7). A avaliação estatística deu-se por meio do teste ANOVA de uma via. *p<0,05; **p<0,01; ***<0,001

Fonte: Autor

6 DISCUSSÃO

O presente trabalho avaliou, pela primeira vez, a toxicidade do extrato aquoso das folhas de uma planta do gênero *Vatairea* sp., administrado agudamente por via oral em dose de 2000 mg/kg. Os animais do grupo controle e extrato apresentaram comportamentos hipocráticos semelhantes e nenhum óbito. Além disso, os órgãos dos animais apresentaram aparência e massa semelhante, com alterações na atividade locomotora espontânea, além de apresentarem uma interessante diminuição de parâmetros como VLDL, triglicerídeos e colesterol.

A busca pelo avanço e melhoria dos tratamentos em saúde acompanha a busca por novos medicamentos e, conseqüentemente, a procura por novos compostos. Dentro desse contexto, plantas medicinais vem sendo alvo de estudos devido seu uso histórico e tradicional em diversas comunidades. A partir disso, o maior centro de biodiversidade do mundo, a Amazônia, entra em destaque, sendo amplamente utilizado como fonte de matéria prima para pesquisa e desenvolvimento de produtos (Braga et al., 2020).

Apesar disso, é de extrema importância que esses extratos tenha a toxicidade estudada, para garantir a segurança do uso, visto que, apesar de amplamente utilizadas, plantas medicinais tem alto potencial de toxicidade. Apenas em 2012, foram registrados 1026 casos de intoxicação por plantas, a maioria deles em crianças de 0 a 4 anos (Campos et al., 2016). Destaca-se a importância de estudos que avaliem o potencial tóxico de plantas utilizadas terapeuticamente em períodos agudos, subcrônicos e crônicos (Camara et al., 2023; Liu et al., 2022; Couliadiaty., 2024).

Dessa forma, instituições como a Organização para Cooperação Econômica e Desenvolvimento (Organization of Economic Cooperation and Development – OECD) ganham destaque ao empenhar-se em padronizar estudos de toxicidade de produtos químicos (OECD, 2001) e são utilizadas como referências por órgãos governamentais como a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) para o registro de fitoterápicos.

Neste estudo foi utilizada a diretriz 420 para testes de produtos químicos da OECD, indicado para avaliação de toxicidade oral aguda com administração de dose fixa. Este recomenda o uso de ratos Wistar, fêmeas, com 56 dias de vida e adota dose inicial de 2000 mg/kg do xenobiótico como dose limite inicial, avaliando número de óbitos, alterações anatomofisiológicas, comportamentais, histológicas e bioquímicas (OECD,2001).

Nesta pesquisa, os parâmetros hipocráticos se mantiveram semelhantes entre os grupos durante todo o estudo. Apesar disso, foram encontradas diminuições na velocidade média de locomoção e distância total percorrida no grupo avaliado 1h após a administração do extrato, apesar disso, na avaliação de 24 h após a administração as diminuições na velocidade e na distância total percorridas foram revertidas. Tais achados podem indicar que o extrato causou analgesia e/ou sedação, que pode ser confundida com incoordenação motora (Orlandi et al., 2011).

Entretanto, o comportamento animal de apoiar-se apenas nas patas traseiras, *rearing*, não sofreu alteração, indicando preservação parcial das funções motoras dos animais. Além disso, o parâmetro de consumo de ração não se apresentou alterado no primeiro dia de avaliação, confirmando a movimentação dentro da gaiola para manutenção de funções básicas. Apesar da redução no consumo de água observados nos dias 11, 12 e 13 do acompanhamento, este foi discreto e normalizou a partir do dia 14, não se mostrando associado a qualquer evidência de toxicidade.

A avaliação de tais parâmetros se mostra essencial em estudos toxicológicos, pois atestam o funcionamento de órgãos fundamentais para excreção de xenobióticos: o fígado e os rins. Um dos principais parâmetros avaliados para a verificação do funcionamento hepático são as aminotransferases (AST e ALT), pois se encontram dentro das células hepáticas e quando encontradas em grande quantidade circulantes no sangue indicam danos ao órgão. A ALT se apresenta no citosol celular mantendo o ácido pirúvico estável por meio da doação do grupo amina da enzima, já a AST não se apresenta exclusivamente no fígado, mas também nos rins, coração e pâncreas dentro das mitocôndrias realizando a transaminação de L-aspartato e α -cetoglutarato em oxalacetato e glutamato (Aamir et al., 2019; Markinze e Durfor, 2020).

Os dados obtidos demonstram diminuição nos níveis de AST em animais que receberam o extrato e foram eutanasiados 14 dias após a administração, além de não

apresentarem diferenças morfológicas visíveis nos fígados dos animais e nem alterações estatisticamente relevantes em outros parâmetros hepáticos. Dessa forma, é possível sugerir uma ação hepatoprotetora.

Em relação ao sistema renal, o principal achado encontrado no estudo foi a diminuição da concentração de creatinina no sangue dos animais que receberam o extrato e foram eutanasiados 14 dias após a administração. A creatinina é formada pela creatina hidrolisada não enzimaticamente e assim que é produzida, entra na circulação sanguínea e é filtrada pelos rins. Tornando-a um dos marcadores essenciais para capacidade de filtração glomerular. Quando a creatinina se apresenta em níveis mais elevados, indica possíveis falhas no funcionamento renal (Kohlmeier, 2015). Assim como em relação a função hepática, não houve alterações morfológicas visíveis entres os rins dos animais do grupo extrato e controle, podendo sugerir uma ação protetora dos órgãos.

As proteínas totais são compostas por diversas frações proteicas e quando apresenta decréscimo, geralmente significa diminuição da albumina (proteína amplamente encontrada no plasma e que possui metade da sua produção no fígado). Quando essa fração se encontra em baixas quantidades pode significar desnutrição, má absorção de nutrientes ou doença hepática crônica avançadas (Gaw et al., 2015).

O colesterol, os triglicerídeos e as VLDL, são lipídeos que fazem parte do ciclo natural de existência passando por metabolização hepática e são obtidos principalmente por meio da dieta. O colesterol é essencial para as membranas celulares e produção hormonal e de ácidos biliares, já os triglicerídeos são estoque de energia do organismo que, ao serem utilizados por aumento da necessidade ou por situações perigosas ou por déficit calórico, são secretados pelo fígado como VLDL. Apesar disso, quando em grandes quantidades podem causar sérios problemas para o sistema cardiovascular como aparecimento de arteroscleromas, placas de gordura nas veias e artérias que diminuem o calibre do vaso, podendo causar infartos, acidentes vasculares cerebrais etc. (Marshall et al., 2016).

Os dados encontrados demonstram diminuição dos parâmetros de proteínas totais, albumina, VLDL e triglicerídeos no grupo extrato em relação ao grupo controle. Entretanto, pela aparência e massa normais do fígado, é possível sugerir que houve menor absorção de gordura mantida ao longo do tempo, como indicado pela redução

dos níveis do colesterol na análise de 14 dias após administração, indicando possível ação dislipidêmica. Esta possível ação pode estar relacionada com a presença abundante de isoflavonas na planta (Souza et al., 2013; Souza et al., 2016; Da Silva et al., 2015).

Além do fígado e rins, coração e estômago foram coletados e tiveram sua massa, aparência e histopatologia avaliados. Os órgãos dos animais do grupo EVaq não apresentaram diferenças estatisticamente relevantes do peso corporal em relação ao grupo controle. Ademais, não foram encontradas diferenças macro e microscópicas entre os órgãos dos animais do grupo controle e extrato em relação ao tamanho, cor e aspecto dos órgãos analisados, contribuindo, juntamente com os dados anteriores, para a indicação da ausência de toxicidade em dose de 2000 mg/kg.

Como não foi constatado presença de toxicidade, o estudo avançou para a fase da avaliação da atividade antioxidante. Como as ERO são rapidamente transformadas em formas menos reativas, fica inviável sua mensuração direta. Dessa forma, para conseguir compreender o contexto geral da atividade do extrato é necessário avaliar enzimas ou subprodutos dessas transformações. Assim, foram avaliados concentração do óxido nítrico, migração leucocitária, concentração de proteínas, GPx, catalase e peroxidação lipídica.

A primeira resposta à entrada de substâncias estranhas ao organismo é a migração de células do sistema imunológico para o local em que essa substância foi aplicada para que ela possa ser neutralizada, gerando um processo de inflamação. Assim, para uma primeira avaliação da atividade do extrato, foi feita uma contagem de leucócitos presentes no líquido intraperitoneal (ABBAS et al., 2019).

Os animais que não receberam a carragenina e os animais que receberam apenas a carragenina sem nenhum tratamento apresentaram uma diferença estatisticamente significativa ($p < 0,001$), apontando para a presença do processo inflamatório nos animais submetidos a injeção com carragenina. Os animais que receberam EVaq em doses de 100 e 200 mg/kg apresentaram consideravelmente menos células ($p < 0,005$ e $p < 0,004$, respectivamente) que o grupo carragenina, indicando possível atividade anti-inflamatória e, consequentemente, antioxidante, essas comparáveis aos padrões dexametasona e vitamina E, que não apresentaram diferença significativa em relação aos grupos EVaq.

Assim que os leucócitos chegam ao local afetado começam um processo de neutralização de possíveis patógenos e aumento do processo inflamatório. Para isso, os agora macrófagos presentes no tecido em que a carragenina foi aplicada liberam óxido nítrico que, além de radical livre, exerce a função de vasodilatador, favorecendo o processo de diapedese de novas células do sistema imunológico (ABBAS et al., 2019; Green et al., 1981).

O grupo branco e o grupo carragenina apresentaram diferença significativa ($p < 0,001$) entre eles, demonstrando que a carragenina foi efetiva em induzir o processo inflamatório e o aumento da produção de óxido nítrico. Em relação aos grupos que receberam o EVaq, em todas as doses eles foram capazes de diminuir significativamente a produção de óxido nítrico (50 mg/kg $p = 0,02$; 100 mg/kg $p < 0,001$ e 200 mg/kg $p < 0,001$).

Entre as doses de EVaq também houve diferenças significativas de forma que foi possível estabelecer uma relação de dose-resposta com a dose mínima efetiva de 86,62 mg/kg. Apesar de efetivas, as doses de 50 e 100 mg/kg de EVaq não foram tão eficientes ($p < 0,001$ e $p = 0,02$) quanto os padrões dexametasona e vitamina E para redução dos níveis inflamatórios e oxidantes. Em contrapartida, não foi possível encontrar diferença estatística entre a dose de 200 mg/kg de EVaq e os padrões, fazendo-os comparáveis em relação a efetividade para o controle de processos inflamatórios e oxidantes.

A determinação de uma dose-resposta é muito importante para o auxílio de determinação de doses seguras, evitando sub e sobre dosagem. Além disso, essa relação reforça a existência da ação farmacológica, descartando a alta probabilidade de efeitos aleatórios ou não relacionados (Wagner, 2011)

A CAT é uma das principais enzimas antioxidantes existentes e é utilizada a medida em que é necessária para o controle de processos inflamatórios ou para o balanço oxidativo que acontece naturalmente. O método utilizado quantifica a quantidade de CATs disponíveis para a ligação com o H_2O_2 presente na amostra, dessa forma, quanto mais CATs disponíveis significa que menos foram utilizadas por processos oxidantes (Ross e Moldeus, 1991).

O grupo branco e o grupo carragenina tiveram uma diferença estatística significativa ($p < 0,001$), indicando que o grupo branco tinha mais CATs disponíveis para

ligação que o grupo carragenina. Todos os grupos EVaq (50, 100 e 200 mg/kg) apresentaram uma melhora significativa em relação ao grupo que não recebeu tratamento, apenas carragenina ($p=0,05$, $p<0,001$ e $p=0,002$, respectivamente). Apesar de eficiente em relação a outras análises, a vitamina E não foi capaz de aumentar o nível de CAT disponíveis ($p=0,067$). O grupo EVaq 100 mg/kg foi capaz de reverter o processo oxidante para o mesmo nível dos animais que não receberam administração de carragenina ($p=0,529$). Dessa maneira, a análise indica fortemente ação antioxidante do extrato, principalmente em doses de 100 mg/kg.

Outra importante enzima antioxidante é a GPx que, assim como a CAT, converte H_2O_2 em água. O método de análise utilizado, assim como o da CAT, quantifica o teor de GPx disponíveis para ligação de radicais livres. Dessa forma, quanto mais GPx livres, menor o teor do processo oxidante (Sema Demirci-Çekiç et al., 2022).

O grupo branco e o grupo carragenina apresentaram diferenças significativas entre eles ($p<0,001$), demonstrando a capacidade da carragenina em aumentar os níveis dos processos oxidantes. Em relação aos grupos que receberam EVaq, a dose de 50 mg/kg não foi efetiva em reduzir os processos oxidantes ($p=0,386$), em contrapartida, as doses de 100 e 200 mg/kg apresentaram diferença significativa em relação ao grupo carragenina ($p<0,001$ em ambos os casos) e não apresentaram diferenças entre os grupos vitamina E ($p=0,495$) e o grupo branco ($p=0,19$). Dessa forma, é possível apontar ação antioxidante significativa.

A peroxidação lipídica é uma consequência direta da ação dos radicais livres e está diretamente ligada a estrutura das membranas celulares da região afetada pela inflamação ou processo oxidativo. O método utilizado mede diretamente os lipídeos oxidados pelos radicais livres. Dessa maneira, quanto mais elevado o grau de peroxidação lipídica maior o grau de dano as membranas celulares das amostras dos animais analisados (De Leon, 2020).

O grupo branco e o grupo que recebeu vitamina E apresentaram uma diferença estatisticamente relevante entre eles e o grupo carragenina ($p=0,002$ e $p<0,001$, respectivamente), o que indica que a carragenina foi efetiva em aumentar os processos oxidativos de forma a elevar os níveis de peroxidação lipídica e que a vitamina E foi eficiente em evitar consideravelmente o dano celular. Em relação aos

grupos que receberam doses do EVaq (50, 100 e 200 mg/kg), todos foram estatisticamente diferentes do grupo carragenina ($p=0,001$, $p<0,001$ e $p<0,001$). Além disso, os grupos das doses de 100 e 200 mg/kg não tiveram diferença estatística entre o grupo branco e o grupo vitamina E, indicando que além de conseguirem impedir o dano lipídico, também foram capazes de equiparar-se aos níveis observados tanto no grupo branco quanto no grupo vitamina E, o que reforça seu potencial como agente antioxidante eficaz.

A dosagem de proteínas totais é fundamental para garantir a comparabilidade e a correção dos ensaios bioquímicos, uma vez que permite normalizar os valores de atividade biológica em função da carga proteica de cada amostra, evitando vieses decorrentes de variações. Apesar de não ter uma correlação direta com atividade inflamatória ou oxidante, os resultados obtidos refletem os resultados encontrados em outras análises (Bradford, 1976).

O grupo carragenina apresentou significativa em relação ao grupo branco ($p<0,001$) e dexametasona ($p<0,001$), demonstrando que a carragenina foi capaz de alterar o estado dos animais, como a carragenina promove o processo inflamatório, pode-se apontar para a inflação como sendo a causa do aumento das proteínas presentes nas amostras.

Todos os grupos que receberam EVaq (50, 100 e 200 mg/kg) se apresentaram estatisticamente diferentes do grupo carragenina ($p<0,001$), além disso o grupo que recebeu a dose de 100 mg/kg também não apresentou diferença estatística entre o grupo branco e o grupo dexametasona. Isso pode indicar que todos os grupos apresentaram atividade anti-inflamatória, e que a dose de 100 mg/kg foi a que teve o melhor efeito, retornando sendo comparável ao padrão e aos níveis do grupo branco.

7 CONCLUSÃO

Sendo este um estudo pioneiro em relação a toxicidade de um extrato feito a partir das folhas de uma planta do gênero *Vatairea* sp. é possível concluir que o extrato não apresenta toxicidade em doses iguais ou inferiores a 2000 mg/kg. Além disso, a partir dos resultados obtidos é possível inferir forte atividade anti-inflamatória e antioxidante em doses a partir de 86,62 mg/kg. Diante do exposto, a pesquisa reforça a necessidade de mais estudos em relação ao gênero aprofundando os estudos a respeito das atividades anti-inflamatórias e explorando novas atividades farmacológicas e outros modelos de toxicidade.

8 REFERÊNCIAS

- AAMIR, K. et al. Oral Toxicity of Arjunolic Acid on Hematological, Biochemical and Histopathological Investigations in Female Sprague Dawley Rats. **PeerJ**, 2019.
- ABBAS, A. K. et al. **Imunologia celular e molecular**. Rio De Janeiro (Rj): Elsevier, 2019.
- ABCD. Sobre Doença de Crohn. < <https://www.abcd.org.br/sobre-a-doenca-de-crohn/>>. Acesso em 7 de junho de 2024.
- AEBI, H. [13] Catalase in vitro. **Methods in Enzymology**, p. 121–126, 1984.
- Aguilar Diaz De Leon, J., Borges, C.R. Evaluation of Oxidative Stress in Biological Samples Using the Thiobarbituric Acid Reactive Substances Assay. *J. Vis. Exp.* (159), e61122, doi:10.3791/61122 (2020).
- BARBOSA, Kiriague Barra Ferreira et al. Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. **Revista de nutrição**, v. 23, p. 629-643, 2010.
- BARBOSA, Kiriague Barra Ferreira et al. Estresse oxidativo: avaliação de marcadores. **Nutrire Rev. Soc. Bras. Aliment. Nutr**, p. 111-128, 2008.
- BARROS, Helena MT. 1968 a 2008: 40 anos de história recente dos medicamentos. **Páginas da história da medicina**, p. 54, 2010.
- BASÍLIO, Fernanda Silva; DOS SANTOS, Júlia Maiara; BRANCO, Cátia Santos. O papel do estresse oxidativo na Doença de Crohn: Uma revisão narrativa. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 4, p. e52910414445-e52910414445, 2021.
- BORSANI, B. et al. The Role of Carrageenan in Inflammatory Bowel Diseases and Allergic Reactions: Where Do We Stand? **Nutrients**, v. 13, n. 10, p. 3402–3402, 27 set. 2021.
- BORTHAKUR, A. et al. Carrageenan induces interleukin-8 production through distinct Bcl10 pathway in normal human colonic epithelial cells. **AJP Gastrointestinal and Liver Physiology**, v. 292, n. 3, p. G829–G838, 10 nov. 2006.
- BRADFORD, M. M. **A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding**. Analytical biochemistry, v. 72, n. 1-2, p. 248-254, 1976.
- BRAGA, Fernão Castro. Brazilian traditional medicine: Historical basis, features and potentialities for pharmaceutical development. **Journal of Traditional Chinese Medical Sciences**, v. 8, p. S44-S50, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.jtcms.2020.06.005>
- Cardoso, D.B.O.S.; Ramos, G.; Lima, H.C. **Vatairea in Flora e Funga do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. 2015 Disponível em: <<https://floradobrasil.jbrj.gov.br/FB83856>>. Acesso em: 01 jul. 2024
- CARVALHO, A. C. B.; SILVEIRA, D. Drogas vegetais: uma antiga nova forma de utilização de plantas medicinais. **Brasília Médica**, v.48, n.2, p.219-237, 2010

CAVALCANTE, Keoma KL et al. Estresse Oxidativo e Nox: Doenças Relacionadas e Principais Classes de Inibidores Sintéticos e Naturais. 2023.

CHAVES, Joceli Corrêa et al. Tratamento farmacológico e assistência psicológica na Doença de Alzheimer. **Revista Saúde em Foco**, v. 10, p. 963-973, 2018.

ÇIÇEK, Serhat S. et al. Antimicrobial prenylated isoflavones from the leaves of the Amazonian medicinal plant *vatairea guianensis* Aubl. **Journal of Natural Products**, v. 85, n. 4, p. 927-935, 2022.

CAMPOS, S. C. et al. Toxicidade de espécies vegetais. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v. 18, n. 1 suppl 1, p. 373–382, 1 jan. 2016.

COELHO-FERREIRA, Márlia. Medicinal knowledge and plant utilization in an Amazonian coastal community of Marudá, Pará State (Brazil). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 126, n. 1, p. 159-175, 2009.

COULIDIATY, A. G. V. et al. Acute and Chronic Oral Toxicity of Hydroethanolic Extract of *Sclerocarya birrea* (Anacardiaceae) in Wistar Rats. **Journal of Experimental Pharmacology**, v. Volume 16, p. 231–242, 1 jul. 2024.

COUTINHO, Marcela AS; MUZITANO, Michele F.; COSTA, Sônia S. Flavonoides: Potenciais agentes terapêuticos para o processo inflamatório. **Revista Virtual de Química**, v. 1, n. 3, p. 241-256, 2009

da SILVA, C. T. L. et al. Topical healing activity of the hydroethanolic extract from the seeds of *Vatairea guianensis* (aublet). **International J Pharm Sci Rev Res**, v. 8, n. 2, p. 1-8, 2011.

DA SILVA, Laís Rodrigues et al. Flavonóides: constituição química, ações medicinais e potencial tóxico. **Acta toxicológica argentina**, v. 23, n. 1, p. 36-43, 2015.

DA SILVA, Cléia Tereza LAMARÃO et al. Antimicrobial activity of extracts obtained from the seeds of *Vatairea guianensis* (Aublet). **Boletín latinoamericano y del caribe de plantas medicinales y aromaticas**, v. 10, n. 5, p. 456-462, 2011.

DE SOUZA, Gloria EP; FERREIRA, S. H. Blockade by antimacrophage serum of the migration of PMN neutrophils into the inflamed peritoneal cavity. **Agents and Actions**, v. 17, p. 97-103, 1985.

DIAS, A. K. C.; CARDOSO, M. G.; BARBIÉRI, R. S. Avaliação fitoquímica e análise de extratos de *Pellicourea rigida* (douradinha) – Um estudo preliminar. **Revista Científica Faminas**, Minas Gerais, v.1, n.1, p. 14-19, 2005

DORNAS, Waleska Claudia Amaral et al. Flavonoides: potencial terapêutico no estresse oxidativo. 2007.

EBERT, Thomas et al. Ageing–Oxidative stress, PTMs and disease. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 86, p. 101099, 2022.

ESTERBAUER, H.; CHEESEMAN, K. H. **Determination of aldehydic lipid peroxidation products: malonaldehyde and 4-hydroxynonenal**. Methods in enzymology. Academic Press, p. 407-421, 1990.

FONSECA, S. et al. Role of the Solvent and Intramolecular Hydrogen Bonds in the Antioxidative Mechanism of Prenylisoflavone from Leaves of *Vatairea guianensis*. **The journal of physical chemistry A**, v. 127, n. 51, p. 10807–10816, 18 dez. 2023.

GAW, A. et al. **Bioquímica Clínica**. Tradução: Márcio Luis Acencio et al. 5. ed. Rio de Janeiro: Elsevier Mosby, 2015.

GREEN, L. C. et al. **Nitrate biosynthesis in man**. Proceedings of the National Academy of Sciences, v. 78, n. 12, p. 7764-7768, 1981

HAIDA, Zainol; HAKIMAN, Mansor. A comprehensive review on the determination of enzymatic assay and nonenzymatic antioxidant activities. **Food science & nutrition**, v. 7, n. 5, p. 1555-1563, 2019.

HALLIWELL, Barry. Antioxidant characterization: methodology and mechanism. **Biochemical pharmacology**, v. 49, n. 10, p. 1341-1348, 1995.

Huang C, Wang Y, Li X, Ren L, et al. Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. *Lancet* 2020; 395:497-506. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)30183-5](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30183-5)

IUCHNO, Clarissa Weiss; DE CARVALHO, Gisele Pereira. Toxicidade e efeitos adversos decorrente do tratamento quimioterápico antineoplásico em pacientes pediátricos: revisão integrativa. **Ciência & Saúde**, v. 12, n. 1, p. e30329-e30329, 2019.

Khomich OA, Kochetkov SN, Bartosch B, Ivanov AV. Redox biology of respiratory viral infections. *Viruses* 2018; 10(8):392. <https://dx.doi.org/10.3390%2Fv10080392>

KOHLMEIER, M. Amino Acids and Nitrogen Compounds. *Nutrient Metabolism*, 2015.

LEITE, J. P. V. Fitoterapia: Bases Científicas e Tecnológicas. São Paulo: **Atheneu**, 2009.

Liu, T.; Zhang, Y.; Liu, J.; Peng, J.; Jia, X.; Xiao, Y.-F.; Zheng, L.; Dong, Y. Evaluation of the Acute and Sub-Acute Oral Toxicity of Jaranol in Kunming Mice. *Frontiers in Pharmacology*, 2022.

LUSHCHAK, V. I. Classification of oxidative stress based on its intensity. **PubMed**, v. 13, p. 922–37, 1 jan. 2014.

MARQUES, Gabriela F O et al. Contribution of the carbohydrate-binding ability of *Vatairea guianensis* lectin to induce edematogenic activity. **Biochimie**, v. 140, p. 58-65, 2017.

MARQUES, Gabriela F O et al. *Vatairea guianensis* lectin stimulates changes in gene expression and release of TNF- α from rat peritoneal macrophages via glycoconjugate binding. **Journal of Molecular Recognition**, v. 34, n. 10, p. e2922, 2021.

MARZINKE, M. A.; D. Robert Dufour. Laboratory Diagnosis of Liver Disease. 2020.

MARSHALL, W. J. et al. **BIOQUÍMICA CLÍNICA: Aspectos Clínicos E Metabólicos**. Tradução: Ariadiny De Lima Caetano et al. 3. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2016.

MENEZES, F. et al. *Margaritaria nobilis* L.f. (Phyllanthaceae) Ethanolic Extract: Low Acute Oral Toxicity and Antinociceptive Activity. **Pharmaceuticals**, v. 16, n. 5, p. 689–689, 3 maio 2023.

MORAES, G. V.; JORGE, G. M.; GONZAGA, R. V.; SANTOS, D. A. dos. Antioxidant potential of flavonoids and therapeutic applications. **Research, Society and Development**, [S. l.], v. 11, n. 14, p. e238111436225, 2022. DOI: 10.33448/rsd-v11i14.36225. Disponível em: <https://rsdjournal.org/index.php/rsd/article/view/36225>. Acesso em: 23 jun. 2024.

NUNES, C. M.; ROCHA, M. E. DE S.; LOUREIRO, R. R. A INFLUÊNCIA DO ESTRESSE NO SISTEMA IMUNOLÓGICO. **Revista ft**, v. 29, n. 140, p. 37–38, 30 nov. 2024.

OECD. Guidelines for the testing of chemicals, n. 420: Acute oral toxicity – fixed dose procedure. Paris, dec, 2001.

OLIVEIRA, Amanda A. et al. Antimicrobial activity of amazonian medicinal plants. **SpringerPlus**, v. 2, p. 1-6, 2013.

OMS. Conferência Internacional sobre Cuidados Primários de Saúde: Declaração de Alma-Ata, 1978. Brasília, DF: **Ministério da Saúde**, 2004.

ORLANDI, L. et al. Anti-inflammatory and antinociceptive effects of the stem bark of *Byrsonima intermedia* A. Juss. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 137, n. 3, p. 1469–1476, 1 out. 2011.

PEDROLLO, Camilo Tomazini et al. Medicinal plants at Rio Jauaperi, Brazilian Amazon: Ethnobotanical survey and environmental conservation. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 186, p. 111-124, 2016.

Radi R. Oxygen radicals, nitric oxide, and peroxynitrite: Redox pathways in molecular medicine. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2018; 115(23):5839–5848. <https://doi.org/10.1073/pnas.1804932115>

Ramos VA, Ramos PA, Dominguez MC. Papel do estresse oxidativo na manutenção da inflamação em pacientes com artrite reumatóide juvenil. *Jornal de Pediatria*. 2000; 76(2):125-32.

REIS, Sara Pinheiro; MARQUES, Maria Laura Dias Granito; MARQUES, Claudia Cristina Dias Granito. Diagnóstico e tratamento da doença de alzheimer. **Brazilian Journal of Health Review**, v. 5, n. 2, p. 5951-5963, 2022.

RODRÍGUEZ-ARCE, Esteban; SALDÍAS, Marianela. Antioxidant properties of flavonoid metal complexes and their potential inclusion in the development of novel strategies for the treatment against neurodegenerative diseases. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 143, p. 112236, 2021.

Ross D, Moldeus P. Antioxidant defense systems and oxidative stress. *In* Vigo-Pelfrey C (ed): *Membrane lipid oxidation* 1th ed. Boca Raton, CRC Press, 1991;151-70.

SALMITO, F. T. S. et al. BIOMARCADORES DE ESTRESSE OXIDATIVO NA DOENÇA RENAL CRÔNICA: AVANÇOS E DESAFIOS. **Revista Contemporânea**, v. 3, n. 8, p. 11199–11209, 10 ago. 2023.

SARQUIS, R. DO S. F. R. et al. The Use of Medicinal Plants in the Riverside Community of the Mazagão River in the Brazilian Amazon, Amapá, Brazil: Ethnobotanical and Ethnopharmacological Studies. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2019, p. 1–25, 10 abr. 2019.

SCHNEIDER, Lon S. A critical review of cholinesterase inhibitors as a treatment modality in Alzheimer's disease. **Dialogues in clinical neuroscience**, 2022.

Sema Demirci-Çekiç, Gülay Özkan, Aslı Neslihan Avan, Seda Uzunboy, Esra Çapanoğlu and Reşat Apak (2022). Biomarkers of Oxidative Stress and Antioxidant Defense. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, [online] 209, pp.114477–114477. doi:<https://doi.org/10.1016/j.jpba.2021.114477>.

SIBBR. **Species: Vatairea guianensis (Angelim-Do-Igapó)**. Disponível em: <<https://ala-bie.sibbr.gov.br/ala-bie/species/289150#classification>>. Acesso em: 1 jul. 2024.

SHAHIDI, Fereidoon. Antioxidants: Principles and applications. In: **Handbook of antioxidants for food preservation**. Woodhead Publishing, 2015. p. 1-14.

SHARMA, J. N.; A. AL-OMRAN; PARVATHY, S. S. Role of nitric oxide in inflammatory diseases. **Inflammopharmacology**, v. 15, n. 6, p. 252–259, 1 dez. 2007.

SHEN, Nan et al. Plant flavonoids: Classification, distribution, biosynthesis, and antioxidant activity. **Food chemistry**, v. 383, p. 132531, 2022.

SIMÕES, Cláudia Maria Oliveira et al. **Farmacognosia: do produto natural ao medicamento**. Artmed Editora, 2016.

SIES, H.; JONES, D. P. Reactive oxygen species (ROS) as pleiotropic physiological signalling agents. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 21, 30 mar. 2020.

SOUSA, F. C. F; MELO, C. T. V; CITÓ, M. C. O; FÉLIX, F. H. C.; VASCONCELOS, S. M. M; FONTELES, M. M. F; BARBOSA FILHO, J. M; VIANA, G. S. B. Plantas medicinais e seus constituintes bioativos: uma revisão da bioatividade e potenciais benefícios nos distúrbios da ansiedade em modelos animais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. João Pessoa, v. 18, n. 4, 2008.

SOUZA, Ronilson F. et al. A New Prenylisoflavone from the Antifungal Extract of Leaves of *Vatairea guianensis* Aubl. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 28, p. 1132-1136, 2017.

Souza, R.F. de, Marinho, V.H.S., Silva, G.A. da, Costa-Júnior, L.M., Silva, J.K.R. da, Bastos, G.N.T., Arruda, A.C., Silva, M.N. da and Arruda, M.S.P. (2013). New Isoflavones from the Leaves of *Vatairea guianensis* Aublé. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 24(6). doi:<https://doi.org/10.5935/0103-5053.20130231>.

TEIXEIRA, L. de A. C.; CARBONIERI, M. N.; MOREIRA, E. M. L.; COUTO, L. M. Revisão sistemática da recuperação de trauma raquimedular com terapia antioxidante. **Journal Archives of Health**, [S. l.], v. 5, n. 3, p. e1676 , 2024. DOI: 10.46919/archv5n3espec-004.

TOEBE, A. L. et al. Estresse Oxidativo em um Modelo In Vitro de Inflamação Aguda em Células Imunes Periféricas. **Saúde e Desenvolvimento Humano**, v. 11, n. 3, 27 out. 2023.

VAN RENSBURG, R; REUTER, H. An overview of analgesics: NSAIDs, paracetamol, and topical analgesics Part 1. **South African Family Practice**, v. 61, n. sup1, p. S4–S10, 2019

VELLOSA, José Carlos Rebuglio et al. Estresse oxidativo: uma introdução ao estado da arte. **Brazilian Journal of Development**, v. 7, n. 1, p. 10152-10168, 2021.

WAGNER, H. Synergy research: Approaching a new generation of phytopharmaceuticals. **Fitoterapia**, v. 82, n. 1, p. 34–37, jan. 2011.

YANG, H. et al. Editorial: Free radicals and antioxidants in diseases associated with immune dysfunction, inflammatory process, and aberrant metabolism. **Frontiers in endocrinology**, v. 15, 16 jan. 2024.

ZATTI, P. H.; FERLITO, J. V.; BRANCO, C. dos S. . Study of the role of oxidative stress and antioxidants in SARS-CoV-2 infection: a systematic review . **Research, Society and Development**, [S. l.], v. 11, n. 8, p. e52711831346, 2022. DOI: 10.33448/rsd-v11i8.31346. Disponível em: <https://rsdjournal.org/index.php/rsd/article/view/31346>. Acesso em: 7 jun. 2024.

9 PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA



UFPA
Universidade Federal do Pará

**Comissão de Ética no
Uso de Animais**

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE ORAL AGUDA E EFEITO SOBRE A BIOQUÍMICA OXIDATIVA DE UMA PLANTA AMAZÔNICA DO GÊNERO *Vatairea* sp. (FABACEAE)", protocolada sob o CEUA nº 7859231123 (ID 002468), sob a responsabilidade de **Enéas de Andrade Fontes Júnior** e equipe; *Sarah Andrade Toledo* - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal do Pará (CEUA/UFPA) na reunião de 01/02/2024.

We certify that the proposal "EVALUATION OF ACUTE ORAL TOXICITY AND EFFECT ON THE OXIDATIVE BIOCHEMISTRY OF AN AMAZONIAN PLANT OF THE GENUS *Vatairea* sp. (FABACEAE)", utilizing 73 Heterogenics rats (49 males and 24 females), protocol number CEUA 7859231123 (ID 002468), under the responsibility of **Enéas de Andrade Fontes Júnior** and team; *Sarah Andrade Toledo* - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Federal University of Para (CEUA/UFPA) in the meeting of 02/01/2024.

Finalidade da Proposta: [Pesquisa](#)

Vigência da Proposta: de 11/2023 a 10/2025

Área: [Farmacologia da Inflamação E do Comportamento - Lafico](#)

Origem: [Biotério da SACPA - Instituto Evandro Chagas](#)

Espécie: [Ratos heterogênicos](#)

sexo: [Fêmeas](#)

idade: [50 a 60 dias](#)

N: [24](#)

Linhagem: [Rattus norvegicus \(Wistar\)](#)

Peso: [150 a 200 g](#)

Origem: [Biotério da SACPA - Instituto Evandro Chagas](#)

Espécie: [Ratos heterogênicos](#)

sexo: [Machos](#)

idade: [50 a 60 dias](#)

N: [49](#)

Linhagem: [Rattus norvegicus \(Wistar\)](#)

Peso: [150 a 200 g](#)

Local do experimento: Laboratório de Farmacologia da Inflamação e do Comportamento (LAFICO)

Belém, 08 de julho de 2024

Profa. Dra. Barbarella de Matos Macchi
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal do Pará

Prof. Dr. James Tony Lee
Vice-Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal do Pará