



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE FEIRA DE SANTANA

DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM RECURSOS GENÉTICOS VEGETAIS



ÊUDER REIS DIAS

ESTUDO FITOQUÍMICO E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE BIOLÓGICA DE

***Tibouchina pereirae* Aubl. (Melastomataceae)**

FEIRA DE SANTANA-BA

2013

ÊUDER REIS DIAS

ESTUDO FITOQUÍMICO E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE BIOLÓGICA DE
***Tibouchina pereirae* Aubl. (Melastomataceae)**

FEIRA DE SANTANA – BA

2013

ÊUDER REIS DIAS

ESTUDO FITOQUÍMICO E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE BIOLÓGICA DE
***Tibouchina pereirae* Aubl. (Melastomataceae)**

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

Orientador: Prof. Dr. Alessandro Branco

FEIRA DE SANTANA – BA
2013

Dias, Êuder Reis
d531a Estudo fitoquímico e avaliação da atividade biológica de *Tibouchina pereirae* aubl. (Melastomataceae)/ Êuder Reis Dias. – Feira de Santana, 2013.

80 f. : il.

Orientador: Alexsandro Branco.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual de Feira de Santana, Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais, 2013.

1. *Tibouchina pereirae*. 2. Antioxidante. 3. Antinociceptivo.
4. Flavonoides. 5. Planta medicinal. I. Branco, Alexsandro, orient.
II. Universidade Estadual de Feira de Santana. III. Título.

CDU: 582.884

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Alexsandro Branco
Orientador e Presidente da Banca
Universidade Estadual de Feira de Santana

Prof^ª. Dr^ª. Lídia Moreira Lima
Universidade Federal do Rio de Janeiro

Prof. Dr. Marcelo Santos Castilho
Universidade Federal da Bahia

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos que direta, e indiretamente, me auxiliaram no andamento e desenvolvimento desse trabalho.

Agradecimentos especiais:

A Deus.

A minha mãe por sempre estar ao meu lado.

Ao meu Orientador pela paciência e pelo auxílio que me foi dado durante todo o desenvolvimento do trabalho.

A professora Dr^a. Carla Branco por todo auxílio que me deu durante a Graduação e a Pós-Graduação.

Ao professor Dr^o. Marcelo Castilho (UFBA), por ter permitido minha ida até seu laboratório para realização de testes enzimáticos e a sua orientanda Camila que me auxiliou durante todo o tempo.

A professora Dr^a. Magna Suzana Alexandre-Moreira por ter me recebido de braços abertos quando fui realizar os testes em seu laboratório na UFAL;

A todos os colegas do Laboratório de Fitoquímica (UEFS), em especial Jener, Dayse, Patrícia, Letícia e Ludimilla Adorno.

A todos os amigos que conquistei na UFAL que foram verdadeiros “anjos” e me auxiliaram de maneira incrível, em especial para Thays, Mariana, Anderson, Ludimilla Stefanie, Aline, Priscila, Geraldo, Morgana e Max.

Aos colegas do Mestrado, em especial a Regina Célia, Ludimilla Adorno e Camila Gonzaga.

A todos os professores do programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais e ao secretário que estava sempre à nossa disposição para nos socorrer, Alberto.

A CAPES pelo auxílio financeiro.

“Lembre-se que as grandes mentes são céticas...
convicções são prisões.” (Nietzsche).

RESUMO

A família Melastomataceae apresenta cerca de 4.570 espécies, distribuídas em, aproximadamente, 180 gêneros presentes em todas as regiões tropicais e subtropicais do planeta, sendo que no Brasil é a sexta maior família de angiospermas, com mais de 1500 espécies. O gênero *Tibouchina* possui aproximadamente 350 espécies, porém são muito pouco estudadas, sendo que a espécie *Tibouchina pereirae* Aubl. é popularmente utilizada para o tratamento de problemas renais. Nesse estudo, foram avaliadas as atividades antioxidante e antinociceptiva de *T. pereirae*. Foram obtidos os extratos hexânico (EHTP), etanólico (EETP) e aquoso (EATP) a partir da maceração das partes aéreas de *T. pereirae*. A fração rica em flavonoides (FFTP) foi obtida a partir do fracionamento do EHTP. A análise por CLAE-DAD e CLAE-EM/EM desta fração possibilitou caracterizar estes flavonoides. A atividade antioxidante dos extratos foi avaliada utilizando o sistema de ensaio 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH) e os experimentos *in vivo* foram realizados em camundongos Swiss utilizando os testes de contorção abdominal induzida por ácido acético e da formalina. Os resultados obtidos demonstraram que o EHTP, EETP e EATP, assim como a fração FFTP apresentaram atividade seqüestradora radicalar, quando comparados aos padrões butilhidroxitolueno (BHT) e ácido ascórbico (AA). O EHTP e a FFTP reduziram a nocicepção induzida pelo ácido acético em 90,6% e 94,74%, respectivamente. A FFTP reduziu os efeitos da formalina em ambas fases em 54,35% e 92,05%, respectivamente, enquanto que o EHTP foi ativo somente na segunda fase do teste, com uma redução no tempo de lambida de 83,39%.

Palavras-chave: *Tibouchina pereirae*. Antioxidante. Antinocicepção. Planta Medicinal. Flavonoides.

ABSTRACT

The Melastomataceae family comprises 4,570 species in approximately 180 genera present in all tropical and subtropical regions of the planet. This family, in Brazil, is the sixth largest family of Angiosperms, with over 1500 species. The genus *Tibouchina* presents, approximately, 350 species, however, are poorly studied. The *Tibouchina pereirae* Aubl., a shrub, is popularly used for the treatment of kidney diseases. In this study, we show the antioxidant and antinociceptive effects of *T. pereirae*. The hexane (EHTP), ethanol (EETP) and aqueous (EATP) extracts were obtained by maceration from the aerial parts of *T. pereirae*. The flavonoid rich fraction (FFTP) was obtained from fractionation of EHTP. The analysis of FFTP by HPLC-DAD and HPLC-MS/MS led to characterization of these flavonoids. The antioxidant activity of extracts was evaluated using the 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) assay system and the *in vivo* experiments were conducted on Swiss mice using the acetic acid-induced writhing test and the formalin-induced pain test. Results showed that extracts (EHTP, EETP and EATP) and FFTP present antioxidant activity, when compared to standard butylated hydroxytoluene (BHT) and ascorbic acid (AA). The EHTP and FFTP (i.p., 100mg/Kg) reduced the nociception produced by acetic acid by 90,36% and 94,74%, respectively. The FFTP reduced the formalin effects in both phases by 54, 35% and 92,05%, while the EHTP only protected the second phase by 83,39%.

Keywords: *Tibouchina pereirae*; Antioxidant. Antinociception. Medicinal Plant. Flavonoids.

LISTA DE FIGURAS

Figura 01 – Estrutura básica dos flavonoides _____	08
Figura 02 – Processo geral de peroxidação lipídica _____	12
Figura 03 – Vias da Dor _____	18
Figura 04 – Cromatograma e espectros de UV da fração FFTP _____	25
Figura 05 – Cromatograma de íons totais da fração FFTP _____	26
Figura 06 – Espectro de massas de primeira ordem do pico 1 _____	27
Figura 07 – Espectro de massas de segunda ordem do pico 1 _____	27
Figura 08 – Estrutura dos flavonoides identificados na fração FFTP _____	30
Figura 09 - Efeito antinociceptivo do EHTP e FFTP (contorções) _____	33
Figura 10 - Efeito antinociceptivo do EHTP e da FFTP (formalina) _____	35

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Dados característicos dos flavonoides presentes na fração FFTP de *T. pereirae*. _____ 30

Tabela 2 - Atividade antioxidante pelo método do DPPH em percentagem de inibição (%) do extrato hexânico e da fração flavonoídica de *T. pereirae*. ____ 31

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

AA - Ácido Ascórbico

AINES - Antiinflamatórios não esteroidais

BHT - Butilhidroxitolueno

CCD – Cromatografia em Camada Delgada

CLAE-DAD - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência Acoplada com Detector de Arranjos de Diiodo

CLAE-EM/EM - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência Acoplada com Espectroscopia de Massas

Da - Daltons

DNA – Ácido Desoxirribonucléico

DPPH - 2,2-difenil-1-picril-hidrazila

EATP - Extratos Aquoso de *Tibouchina pereirae*

EETP - Extratos Etanólico de *Tibouchina pereirae*

EHTP - Extratos Hexânico de *Tibouchina pereirae*

E.P.M. – Erro Padrão Médio

AcOEt – Acetato de Etila

EtOH – Etanol

FFTP – fração Flavonoídica de *Tibouchina pereirae*

H₂O – Água

H₂SO₄ – Ácido Sulfúrico

HUEFS - Herbário da Universidade Estadual de Feira de Santana

IL-1 β - Interleucina-1 β

IL-8 – Interleucina 8

i.p. – Intraperitoneal

μ L – Microlitros

MeOH – Metanol

EROS – Espécies Reativas de Oxigênio

ERN – Espécies Reativas de Nitrogênio

SBED - Sociedade Brasileira para o Estudo da Dor

SNC – Sistema Nervoso Central

TNF- α – Fator de Necrose Tumoral- α

UV – Ultravioleta

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	01
2. REVISÃO DE LITERATURA	04
2.1. FAMÍLIA MELASTOMATACEAE	04
2.2. O GÊNERO TIBOUCHINA	05
2.3. FLAVONOIDES	08
2.3.1. ESPECTROMETRIA DE MASSAS NA ANÁLISE DE FLAVONOIDES	10
2.4. ANTIOXIDANTES	11
2.5. DOR	13
2.5.1. TIPOS DE DOR	14
2.5.2. MECANISMOS DE PERCEPÇÃO DA DOR	16
3. MATERIAIS E MÉTODOS	19
3.1. REAGENTES E EQUIPAMENTOS	19
3.2. ANIMAIS	20
3.3. PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS	20
3.3.1. COLETA DO MATERIAL VEGETAL	20
3.3.2. OBTENÇÃO DOS EXTRATOS DE <i>Tibouchina pereirae</i>	21
3.3.3. FRACIONAMENTO DOS EXTRATOS DE <i>Tibouchina pereirae</i>	21
3.3.4. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE CAPTADORA RADICALAR FRENTE AO DPPH	22
3.3.5. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA	22
3.3.5.1. VIA DE ADMINISTRAÇÃO	22
3.3.5.2. TESTE DAS CONTORÇÕES ABDOMINAIS INDUZIDAS PELA INJEÇÃO i.p. DE ÁCIDO ACÉTICO EM CAMUNDONGOS	23
3.3.5.3. NOCICEPÇÃO INDUZIDA PELA INJEÇÃO INTRAPLANTAR DE FORMALINA EM CAMUNDONGOS	24
3.4. ANÁLISE ESTATÍSTICA	24
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	25
4.1. OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DOS FLAVONOIDES EM <i>Tibouchina pereirae</i>	25
4.2. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE CAPTADORA RADICALAR FRENTE AO DPPH	31
4.3. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA	32

4.3.1. NOCICEPÇÃO INDUZIDA PELA INJEÇÃO INTRAPERITONEAL DE ÁCIDO ACÉTICO EM CAMUNDONGOS	32
4.3.2. NOCICEPÇÃO INDUZIDA PELA INJEÇÃO INTRAPLANTAR DE FORMALINA EM CAMUNDONGOS	34
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS	37
REFERÊNCIAS	38
ANEXO 1: ESTRUTURA QUÍMICA DOS COMPOSTOS IDENTIFICADOS NO GÊNERO <i>Tibouchina</i>	53
ANEXO 2: ESPECTRO DE MASSAS DA FRAÇÃO FFTP	61

1. INTRODUÇÃO

A medicina tradicional à base de plantas é comum entre comunidades desde a antiguidade (GAHUKAR, 2012). Durante muitos séculos, uma grande variedade de plantas medicinais foi utilizada como única alternativa terapêutica no combate de diversas enfermidades apresentadas pelo homem (DE MAGALHÃES, 2005; VIEIRA, 2005).

A assimilação de conhecimentos indígenas, associada às contribuições trazidas por escravos e imigrantes, representa um importante papel no surgimento da medicina popular no Brasil, na qual a utilização de plantas medicinais ocupa lugar de destaque (SIMÕES *et al.*, 2004).

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), uma parcela significativa da população mundial incorpora o uso de plantas da medicina tradicional aos cuidados médicos. Diversos estudos, ao longo dos anos, permitiram fazer uma associação entre diferentes espécies medicinais e suas respectivas atividades biológicas a partir da observação, descrição e investigação experimental. Tais estudos, apoiados principalmente nos conhecimentos de botânica, química, bioquímica e farmacologia, contribuíram amplamente para a descoberta de produtos naturais bioativos (OLIVEIRA *et al.*, 2010).

A atuação de plantas como fontes de agentes terapêuticos serve de modelo para novos medicamentos sintéticos ou como base para a semi-síntese de moléculas de alta complexidade que são utilizadas na terapêutica (BRUSCHI *et al.*, 2000). Porém, apesar da importância desses dados, estudos de 2007 revelam que pouco mais de 8% da flora nacional foi analisada na busca de novos compostos bioativos (HEINZMANN; BARROS, 2007), o que demonstra que esse campo necessita ser mais explorado.

Diversas substâncias de origem vegetal com importantes propriedades farmacológicas já foram descritas, incluindo a morfina, um potente analgésico, identificada na planta *Papaver somniferum*, a lobelina, utilizada para aliviar os sintomas da asma, identificada em *Lobelia nicotinaefolia*, a quinina, um dos principais componentes presentes na casca de *Cinchona officinalis*, que serviu como base para a produção de fármacos com atividade antimalárica. Uma molécula de alta complexidade isolada de um produto natural é a palitoxina,

esta foi identificada em corais de *Palythoa tuberculosa* e demonstrou possuir importante atividade na permeabilidade da membrana celular (BARREIRO, 2001).

Além destas, os alcalóides identificados na vinca, vincristina e vinblastina, são amplamente utilizados em todo o mundo para o tratamento de câncer. A vincristina tem sua aplicação voltada ao tratamento do câncer de pele, enquanto que a vinblastina é direcionada para o tratamento de tumores de mama, testículos, pele e linfoma (DAVID; NASCIMENTO; DAVID, 2004).

A busca de novos compostos bioativos a partir de produtos naturais vem aumentando devido ao ressurgimento de várias doenças consideradas extintas, assim como o surgimento de novas doenças causadas por diferentes linhagens de agentes infecciosos, tornando o mercado de fitomedicamentos promissor em todo o mundo (CALIXTO, 2000).

Dentre as diversas espécies existentes no território nacional, temos a *Tibouchina pereirae* Aubl. (Melastomataceae), conhecida popularmente como malva-de-garimpeiro. Essa planta é endêmica da região da Chapada Diamantina, Bahia, sendo utilizada popularmente, nesta região, para o tratamento de problemas renais (FUNCH *et al.*, 2004). De acordo com Amaro e colaboradores (2005), a terceira causa mais comum de problemas no trato urinário está relacionada ao desenvolvimento de litíase renal, atingindo cerca de 5 a 15% da população brasileira.

É importante ressaltar que o conhecimento empírico da flora utilizada na medicina tradicional são relevantes, mas não são suficientes para validar as plantas medicinais como medicamentos eficazes e seguros. Nesse sentido, as plantas medicinais não se diferenciam de qualquer outro xenobiótico sintético, e a preconização ou a autorização oficial do seu uso medicamentoso deve ser fundamentada em evidências experimentais comprobatórias de que o risco a que se expõem aqueles que a utilizam é suplantado pelos benefícios que possam advir (ARGENTA *et al.*, 2011).

A seleção de uma espécie vegetal baseada em dados etnofarmacológicos, constitui um importante atalho na pesquisa para a descoberta de novos fármacos. O uso tradicional que é descrito pode considerado como uma triagem quanto à sua utilidade terapêutica (ELIZABETSKY, 2003).

Neste sentido, a fitoterapia possui importante papel na assistência à saúde da população (CALIXTO, 2000). Desse modo, o objetivo deste trabalho foi isolar e avaliar a atividade antioxidante e antinociceptiva da fração flavonoídica obtidas das partes aéreas de *Tibouchina pereirae* Aubl.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. FAMÍLIA MELASTOMATACEAE

A família Melastomataceae conta com cerca de 4.570 espécies, distribuídas por praticamente todas as regiões tropicais e subtropicais do globo (RENNER, 1993; CLAUSING & RENNER, 2001). A maioria destas espécies ocorre nos Neotrópicos, sendo as formações florestais do leste do Brasil a região da América mais rica em Melastomataceae (GOLDENBERG; REGINATO, 2006).

No Brasil a Melastomataceae é a sexta maior família de Angiospermas, apresentando 68 gêneros e mais de 1.500 espécies distribuídas desde a região da Amazônia até o Rio Grande do Sul e se apresentando como, praticamente, todos os tipos de formações vegetais (RENNER, 1993).

As espécies desta família apresentam uma grande diversidade de hábitos, que variam desde herbáceas até arbustivas, ocupando ambientes distintos e diversificados (RODRIGUES, 2005), sendo comumente encontradas em formações rupestres, onde alguns gêneros são restritos a determinadas regiões (SANTOS, 2005). Seus representantes possuem folhas opostas, sem estípulas e acródromas, flores tetrâmeras ou pentâmeras, diplostêmones, estames geralmente falciformes e anteras poricidas (GOLDENBERG; REGINATO, 2006).

Diversos constituintes químicos já foram descritos em plantas da família Melastomataceae, incluindo hidrocarbonetos (RODRIGUES *et al.*, 2008), ácidos graxos (VILEGAS *et al.*, 1998; JAMAL *et al.*, 1999; CALDERON *et al.*, 2002), terpenóides (CALDERON *et al.*, 2002; JANG *et al.*, 2006; GRAYER *et al.*, 2008), esteróides (MACARI *et al.*, 1990; CUNHA *et al.*, 2003; SPESSOTO *et al.*, 2003; CALDERON *et al.*, 2002; ZHANG *et al.*, 2003; CREVELIN *et al.*, 2006; VENTURA *et al.*, 2007), esteróides glicosilados (MACARI *et al.*, 1990; CHATUVERDULA *et al.*, 2004) fenólicos simples (LI *et al.* 2001; RODRIGUES *et al.*, 2007; RODRIGUES *et al.*, 2008; GRAYER *et al.* 2008; KUSTER *et al.* 2009), Quinóides (LIMA *et al.*, 1970a; 1970b; BERNAYS *et al.*, 1984; BRONDANI *et al.*, 2003), xantonóide (CALDERON *et al.*, 2002), fenilpropanóides (JAMAL *et al.*, 1999; MONTENEGRO *et al.*, 2007), lignóide

(CALDERON *et al.*, 2002), taninos (YOSHIDA *et al.*, 1986; 1991a; 1991b; 1992; 1992a; 1992b; 1992c; 1995; 1999a; 1999b; 2005; ISAZA *et al.*, 2001; LI *et al.* 2001; CALDERÓN *et al.*, 2002; LING *et al.*, 2002), glicosídeos cianogênicos (ISAZA *et al.*, 2001; LING *et al.*, 2002; CALDERÓN *et al.*, 2002) e flavonoides.

Alguns autores já descreveram o uso de plantas dessa família na medicina tradicional para o tratamento da disenteria (SHARMA; CHHANGTE; DOLUI, 2001), erisipela, vermes intestinais, leucorréia, ulcerações, palpitações, males dos rins e bexiga, escabiose, dermatoses, eupepsia, reumatismo, resfriado, febre, infecções vaginais, hematúria, insônia, dores de garganta, dores de cabeça, (CRUZ, KAPLAN, 2004), dor de dente (KALA, 2005), furúnculos, como adstringente (WIARTA *et al.*, 2004), diarreia (INTA *et al.*, 2008), herpes (RAKAJUMAR; SHIVANNA, 2009), tuberculose (TABUTI; KUKUNDA, WAAKO, 2010), *diabetes melitus* (TROJAN-RODRIGUES; ALVES, RITTER 2012), dor de cabeça (ODONNE *et al.*, 2013), cicatrizante (RITTER *et al.*, 2012), abortivo e contraceptivo (KUMAR; KUMAR; PRAKASH, 2012), antinociceptivo (SULAIMAN *et al.*, 2004; JAMAL *et al.*, 1999) e antiinflamatório (VASCONCELOS *et al.*, 2006).

2.2.O GÊNERO *TIBOUCHINA*

O gênero *Tibouchina*, pertencente à Melastomataceae, foi descrito em 1775 por Aublet, que descreveu uma espécie da Guiana Francesa denominada de *Tibouchina aspera*; porém, poucos autores o aceitaram. Entre os autores que concordaram com o gênero descrito por Aublet, merecem destaque, De Candolle (1828) que aceita a descrição do gênero, porém com a única espécie descrita por Aublet e descreve novos gêneros (*Lasiandra* e *Chatogastra*); Baillon (1879) que descreve uma nova combinação, 104 anos após a descrição do gênero *Tibouchina*, a *T. trichopodal* e Krasser (1893), que também concorda com a descrição do gênero (SOUZA, 1986).

A classificação elaborada por TODZIA e ALMEDA (1991) posicionava o gênero na posição central da tribo Tibouchineae, porém, em 1993, uma nova classificação proposta por Renner, posicionou o mesmo na tribo Melastomeae, que é representada por exemplares com sementes cocleadas, estames com conectivos apendiculados e ovário revestido por tricomas. Este gênero se

diferencia de outros da família pela presença de todos os estames férteis, dispostos em ciclos heteromórficos, ovário com ápice revestido por tricomas e localizado na porção superior (súpero), fruto com 4 a 5 lóculos (capsular) e sementes cocleadas, minuciosamente tuberculadas (MEYER, 2008).

Este gênero apresenta dois centros de diversidade na América Latina, um presente nas Regiões Centro-Oeste e Sudeste do Brasil e um segundo no noroeste da América do Sul (MEYER; GUIMARÃES; KOZERA, 2010). No Brasil distribuem-se, especialmente, nos estados da região sudeste (TODZIA; ALMEDA, 1991).

Muitas das espécies deste gênero são utilizadas para ornamentação de ruas, parques e praças públicas por apresentarem flores atrativas, tolerantes à luminosidade direta e altura inferior a 10 m (SILVA; AFFONSO, 2005; MEYER, 2008).

Desde o trabalho realizado por Cogniaux em 1891, este gênero permanece, praticamente, sem revisão florística. Este autor estabeleceu 11 seções, englobando 195 espécies. Dentre estas seções, apenas *Octomeris* e *Lepidotae* não estão representadas no Brasil, país com a maior riqueza de espécies do gênero (MEYER; GUIMARÃES; KOZERA, 2010). O número de espécies pertencentes ao gênero é ainda incerto, variando de 240 (RENNER, 1993) a 350 espécies (TODZIA; ALMEDA, 1991). No Brasil, *Tibouchina* foi estudado, floristicamente, por Pereira (1960) que analisou as espécies do Rio de Janeiro e por Souza (1989) que estudou as do Estado do Rio Grande do Sul (GUIMARÃES; MARTINS, 1997). Porém, em trabalhos mais recentes, houve levantamento florístico do gênero em outros Estados brasileiros (GOLDENBERG; REGINATO, 2006; SILVA; AFONSO, 2005; GUIMARÃES; MARTINS, 1997).

Do ponto de vista fitoquímico, este gênero possui poucos estudos, quando comparado a outros gêneros de Melastomataceae, entretanto foi relatada a presença de antocianinas (JANNA et al, 2007; OKOMURA et al, 2002; BOBBIO et al 1985), taninos (MOTTA et al, 2005; YOSHIDA et al, 1986; YOSHIDA et al, 1991_a; YOSHIDA et al, 1991_b; YOSHIDA et al, 1999_a; YOSHIDA et al, 1999_b), fenólicos solúveis (MOTTA et al, 2005) e flavonoides (MOTTA et al, 2005; COLORADO et al, 2007; KUSTER et al, 2009) em

algumas espécies pertencentes ao gênero. As estruturas dos compostos identificados no gênero *Tibouchina* estão ilustradas no Anexo 1.

Bobbio e colaboradores (1985) descreveram a presença das antocianinas peonidina-3-sufurosídeo **(1)**, malvidina-3,5-diglicosídeo **(2)**, malvidina-3-(*p*-coumaroil)-sambubiosídeo-5-glicosídeo **(3)** e peonidina-5-sambubiosídeo **(4)** em flores de *Tibouchina granulosa*. Okomura e outros (2002) identificaram nessa mesma espécie as antocianinas peonidina **(5)** e pelargonidina **(6)**. Janna e colaboradores (2007) descreveram a existência de antocianinas em flores de *Tibouchina semidecandra* L.

Em trabalho realizado por Motta (2005) foi identificada a presença de fenólicos solúveis, flavonoides e taninos em folhas de *Tibouchina pulchra*. Os flavonoides luteolina-7-O-galactosídeo **(7)**, canferol **(8)** e alguns derivados glicosilados (3-O-galactosídeo **(9)** e 3-O-glicosídeo **(10)**), quercetina **(11)** e derivados (quercetina-3-O-arabinosídeo **(12)**, quercetina-3-O-galactosídeo **(13)** e quercetina-3-O-ramnosídeo **(14)**), miricetina **(15)** e alguns glicosídeos (miricetina-3-O-galactosídeo **(16)** e miricetina-3-O-ramnosídeo **(17)**) foram identificados em diferentes partes do vegetal.

Kuster (2009) descreveu a presença de ácidos fenólicos e alguns flavonoides em folhas de *Tibouchina grandifolia*. Foram identificados o ácido protocatéico **(18)**, ácido gálico **(19)** e os flavonoides quercetina **(11)** e alguns derivados 3-O-monoglicosídeos (quercetina-3-O- β -D-glicuronídeo **(20)**, quercetina-3-O- β -D-glicopiranosídeo **(21)**, quercetina-3-O- β -D-galactopiranosídeo **(22)**, quercetina -3-O- α -L-glicuronídeo **(23)**, quercetina-3-O- α -L-ramnopiranosídeo **(24)**, quercetina-3-O- β -L-arabinopiranosídeo **(25)**) além da quercetina-3-O- β -D-(6''-*E-p*-coumaroil)-glicopiranosídeo **(26)**, identificado pela primeira vez no gênero.

Em estudo realizado por Colorado e colaboradores (2007) foi descrito a presença do ácido elágico **(27)** e dos flavonoides canferol **(8)**, canferol-7-O-*p*-coumaroil **(28)**, quercetina 3-O-ramnosídeo **(14)** e quercetina-3'-O-ramnopiranosídeo **(29)** em folhas de *Tibouchina ciliaris*.

Os primeiros estudos realizados para identificação de taninos em *Tibouchina* foram realizados por Yoshida e colaboradores em 1986. Foram descritos a presença dos taninos nobotanino A **(30)**, B **(31)**, D **(32)** e F **(33)** em folhas de *Tibouchina semidecandra* Cogn. (YOSHIDA et al, 1986).

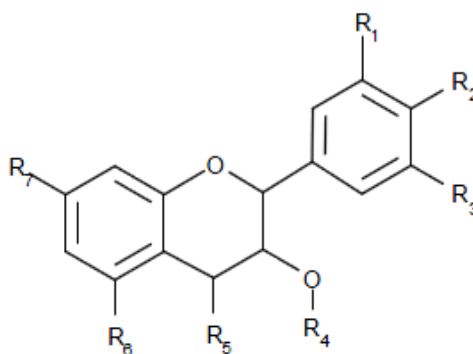
Em trabalho posterior, Yoshida e colaboradores (1991_A) descreveram a presença de novos taninos e outros compostos em folhas dessa mesma espécie. Foram identificados os flavonoides quercetina-3-O-(6''-galoil)-galactosídeo **(34)** e quercetina-3-O- α -L-arabinofuranosídeo **(35)** e os taninos pedunculagina **(36)**, casuarictina **(37)**, praeconxinas A **(38)** e B **(39)**, 6-O-galoil-2,3-O-(S)-hexahidroxidifenoil-D-glicose **(40)**, casuarinina **(41)**, metilvescalagina **(42)**, 1,2,3,6-tetra-O-galoil- β -D-glicose **(43)**, 2,3-O-(S)-hexahidroxidifenoil-D-glicose **(44)**, castalagina **(45)**, vescalagina **(46)**, além dos já identificados nobotaninos A **(30)**, D **(32)** e F **(33)**. Além destes, Yoshida (1991_B) também isolou e identificou os nobotaninos C **(47)** e E **(48)**, além do já conhecido nobotanino B **(31)**.

Dentre os compostos já identificados em algumas espécies do gênero, os flavonoides merecem destaque por ser um grupo de metabólitos secundários que influenciam na saúde humana e animal (COLORADO et al, 2007).

2.3. FLAVONOIDES

Os flavonoides englobam uma classe muito importante de pigmentos naturais e têm a estrutura química C₆-C₃-C₆, sendo que as duas partes da molécula com seis carbonos são anéis aromáticos, e os dois anéis aromáticos (A e B) são ligados por uma cadeia de três átomos de carbono, que formam um heterociclo oxigenado (pirano) (VOLP *et al.*, 2008). A Figura 1 ilustra a estrutura básica dos flavonóides.

Figura 1: Estrutura básica dos flavonoides



Fonte: Adaptado de VOLP et al, 2008.

Estes compostos pertencem a um grupo de substâncias com uma grande variedade de estruturas fenólicas encontradas em frutas, vegetais, grãos, cascas, raízes, caules, flores, chás e vinhos (NIJVELDT *et al.*, 2001). Estima-se que cerca de 10.000 diferentes membros dessa classe já foram identificados (DIXON; PASINETTI, 2010). Estruturalmente, esses compostos consistem em dois grupos majoritários, os 2-fenilcromanos (os flavonoides, incluindo flavanonas, flavonas, flavonols, flavan-3-ols, e antocianidinas) e os 3-fenilcromanos (os isoflavonoides, incluindo isoflavonas, isoflavans, e pterocarpanos) (DIXON; PASINETTI, 2010).

Esses compostos apresentam diferentes propriedades para a planta, incluindo coloração das flores, proteção contra radiação, resistência a doenças, defesa contra herbívoros (HARBORNE; WILLIAMS, 2000), proteção contra micróbios e insetos (SAMANTA; DAS; DAS, 2011), atração de polinizadores (DIXON; PASINETTI, 2010) entre outras. Além de possuírem importante atividade na planta, esses compostos podem contribuir na saúde humana (HARBORNE; WILLIAMS, 2000).

Tem sido relatado que esses compostos podem apresentar um largo espectro de efeitos biológicos, incluindo as ações antibacteriana, antiviral, antiinflamatória, antialérgica e vasodilatadora. Além disso, os flavonoides são capazes de inibir a peroxidação lipídica (LPO), a agregação plaquetária, alterar a permeabilidade e fragilidade capilar, e atuar em sistemas de enzimas, incluindo ciclooxygenase e a lipoxigenase. Além destas ações, esses compostos exercem efeitos como antioxidantes, eliminadores de radicais livres e agentes quelantes de cátions divalentes (COOK; SAMMAN, 1996).

Diversos flavonoides, incluindo agliconas e seus derivados glicosilados e acetilados foram identificados em espécies de Melastomataceae (TERAHARA *et al.*, 1993; BOMFIM-PATRÍCIO *et al.*, 2001; ISAZA *et al.*, 2001; LI *et al.* 2001; CALDERON *et al.*, 2002; ZHANG *et al.*, 2003; MIMURA *et al.*, 2004; ANDREO *et al.*, 2006; JANG *et al.*, 2006; MONTENEGRO *et al.* 2007; RODRIGUES *et al.*, 2007; SUZANTI *et al.*, 2007; VENTURA *et al.*, 2007; GRAYER *et al.*, 2008; MANCINI *et al.*, 2008; MAZURA *et al.*, 2008; RODRIGUES *et al.*, 2008; SANTOS *et al.*, 2008; KUSTER *et al.* 2009; MOLEIRO *et al.*, 2009; NISHIJIMA *et al.*, 2009; WANG *et al.* 2008; WAN *et al.*, 2009).

2.3.1. ESPECTROMETRIA DE MASSAS NA ANÁLISE DE FLAVONOIDES

A espectrometria de massas (EM) é uma poderosa ferramenta utilizada para a identificação e determinação estrutural de flavonóides glicosilados (STOBIECKI, 2000). As grandes vantagens dessa técnica são sua alta sensibilidade, permitindo a detecção de compostos presentes na amostra em escala de microgramas (μg) (PINHEIRO; JUSTINO, 2012), e a possibilidade de acoplamento com outras técnicas separação, como a cromatografia gasosa ou a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), o que permite a análise de mistura de compostos (STOBIECKI, 2000; PINHEIRO; JUSTINO, 2012), fornecendo informações sobre a massa molecular e as características estruturais dos compostos analisados (CYUCKENS; CLAEYS, 2004).

Além desse acoplamento com técnicas de separação, foram desenvolvidas, também, técnicas capazes de proporcionar o aprisionamento de íons no interior do analisador de massas, essa característica permite que analito em questão seja submetido a diversos ciclos de fragmentação em um processo chamado de espectrometria de massas no modo tandem (EM^n), onde n representa o número de fragmentações realizadas pelo analito. Nessa técnica estão envolvidos pelo menos três estágios. No primeiro estágio há seleção do íon precursor (que originará os outros íons). O estágio seguinte compreende a fragmentação desse íon precursor com a geração de íons-fragmentos (íons filhos), por fim, o terceiro estágio está relacionado à análise e detecção dos fragmentos obtidos através de métodos específicos (SOUZA, 2008).

De um modo geral, a análise por EM gera íons através de um método adequado de ionização dos compostos em estudo. Os íons gerados são separados por sua relação massa-carga (m/z) em um analisador de massas e detectados por meio de um detector, que “contabiliza” os íons presentes. A magnitude do sinal elétrico em função da razão m/z é convertida por um processador de dados, o qual gera o espectro de massas correspondente (GROSS, 2004).

Quando acoplado à CLAE, a técnica de espectrometria de massas (CLAE-EM) se torna uma poderosa ferramenta para a análise de produtos naturais (CYUCKENS; CLAEYS, 2004), incluindo flavonoides (PINHEIRO;

JUSTINO, 2012). Em relação a esses compostos, é possível obter informações sobre a aglicona, sobre os tipos de carboidratos presentes (mono-, di-, tri- ou tetrasacarídeos e hexoses, deoxihexoses ou pentoses) ou outros substituintes presentes, a estereoquímica das unidades de monossacarídeos terminais, a sequência da parte de glicano, as ligações interglicosídicas e os pontos de ligação dos substituintes à aglicona (CYUCKENS; CLAEYS, 2004).

2.4. ANTIOXIDANTES

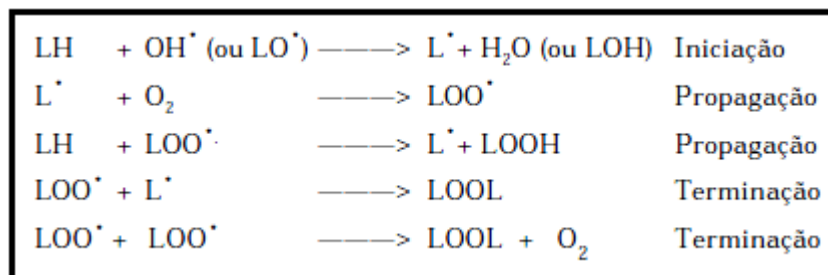
Espécies reativas de oxigênio (EROs) e nitrogênio (ERN), compreendem o radical hidroxila (OH^\bullet), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), ânion superóxido ($\text{O}^{\bullet-}$), óxido nítrico (NO^\bullet), peroxinitrito (ONOO^-) entre outros (PERRON; BRUMAGHIM, 2009). Os neutrófilos, assim como os macrófagos, produzem EROS que desempenham importante papel no processo infeccioso, atuando como microbicida (GARCIA JÚNIOR; PITHON-CURI; CURI, 2000), porém estes compostos são as maiores fontes de estresse oxidativo nas células, atacando proteínas, lipídeos e o DNA. O dano oxidativo ao DNA tem sido apontado como a causa do câncer, envelhecimento, doenças neurodegenerativas, como as doenças de Alzheimer e Parkinson, doenças cardiovasculares, como a arteriosclerose, sendo a principal causa de morte celular e danos no tecido resultantes de ataque cardíaco e acidente vascular cerebral (AVC) (PERRON; BRUMAGHIM, 2009).

A membrana celular é um dos principais componentes atingidos pela ação de ROS, que promove alteração em sua estrutura e permeabilidade, que vai ocasionar a perda da seletividade na troca iônica e liberação de conteúdos intracelulares, culminando com a morte celular (FERREIRA; MATSUBARA, 1997). Esse processo de peroxidação lipídica é iniciado com a cisão homolítica de uma ligação carbono-hidrogênio do grupo metileno das cadeias de ácidos graxos poliinsaturados e do colesterol (SOUZA *et al.*, 2007).

A Figura 2 ilustra o processo de peroxidação lipídica. Iniciado o processo, são formados radicais de carbono que podem reagir com oxigênio gerando novos radicais (peroxilas) que, por sua vez, poderão atacar novas cadeias de ácidos graxos poliinsaturados, propagando a reação. Os hidroperóxidos resultantes possuem curta meia-vida e, quando reagem com

metais formam compostos reativos (aldeídos (malonaldeído, acroleína, crotonaldeído) e epóxidos), que são passíveis de causar danos ao DNA, (SOUZA *et al.*, 2007).

Figura 2: Processo geral de peroxidação lipídica (L representa a cadeia de ácido graxo poliinsaturado).



Fonte: FERREIRA; MATSUBARA, 1997.

Antioxidante é uma substância química que impede a oxidação de outros produtos químicos. Ele protege os componentes celulares essenciais, neutralizando os efeitos prejudiciais dos radicais livres, que são subprodutos naturais do metabolismo celular (BADARINATH; RAO; CHETY; RAMKANTH; RAJAN; GNANAPRAKASH, 2010). Halliwell (1996) define antioxidante como sendo uma substância que seja capaz de atrasar ou inibir a oxidação de um substrato oxidável de maneira eficaz. O antioxidante, geralmente, está presente em concentração menor, quando comparada a esse substrato. Estes compostos têm baixa energia de ativação para doar átomo de hidrogênio e, portanto, não pode iniciar a segunda reação dos radicais livres. Os elétrons dos radicais livres formados são estáveis e, assim, retardam a oxidação.

Em organismos biológicos, para evitar as consequências relativas à ação de ROS sobre as células, existem sistemas antioxidantes endógenos que podem atuar em duas linhas: uma delas é responsável por inativar as EROs, são classificados como antioxidantes primários. Neste grupo estão incluídas as enzimas glutathiona reduzida (GSH), superóxido-dismutase (SOD), catalase, glutathiona-peroxidase (GSH-Px) e vitamina E (tocoferol). A segunda linha, que é responsável por reparar os danos causados por ação desses agentes, é composta pelo ácido ascórbico (vitamina C), pela glutathiona-redutase (GSH-Rd) e pela GSH-Px (NOORI, 2012). Com exceção da vitamina E, que é um antioxidante estrutural da membrana, a maior parte dos agentes antioxidantes está no meio intracelular (FERREIRA; MATSUBARA, 1997).

Além dos sistemas de proteção endógenos, existem antioxidantes exógenos provenientes dos alimentos e de outras fontes alimentares. Muitas ervas, especiarias, vitaminas e vegetais apresentam compostos com propriedades antioxidantes, dentre estes podemos citar os flavonoides, isoflavonas, flavonas, antocianinas, cumarinas, lignanas, catequinas, isocatequinas e epicatequina (NOORI, 2012).

Os flavonoides estão universalmente presentes em frutas e vegetais como um grupo de compostos polifenólicos. O interesse nesses compostos tem aumentado ultimamente devido a ampla atividade farmacológica relacionada a inibição de certas enzimas e sua atividade antioxidante. Estes se apresentam como potentes drogas para serem usadas no tratamento de muitas doenças, incluindo câncer, arteriosclerose, doenças cardiovasculares, doenças neurodegenerativas, como as doenças de Alzheimer e Parkinson, e outras doenças relacionadas à idade (MENDES *et al*, 2012). Em sistemas biológicos, os efeitos protetores observados desses compostos são atribuídos a sua capacidade de transferência de elétrons, de quelar metais, de ativação de enzimas antioxidantes, de reduzir os radicais alfa-tocoferol e inibir oxidases (HEIM; TAGLIAFERRO; BOBILYA, 2002).

Os flavonoides apresentam um grande número de substituintes em suas estruturas, porém, a atividade antioxidante depende do número de hidroxilas presentes na aglicona (Figura 1). Quando há substituição do hidrogênio da hidroxila dos anéis A, B ou C por alguma molécula de açúcar, a atividade antioxidante é reduzida (RICE-EVANS; MILLER; PANGAGA, 1996).

2.5. DOR

A dor pode ser descrita como um alerta utilizado pelo Sistema Nervoso Central (SNC) para sinalizar um processo de agressão ao organismo com risco para sua integridade física. Este alerta é capaz de desencadear um conjunto de reações de adaptação, de ordem psicológica, autônoma e motora, visando afastar o organismo da causa da agressão, preservando-o (VITOR *et al.*, 2008). A Associação Internacional para o Estudo da Dor (IASP), 2013, definiu a dor de maneira mais ampla como sendo uma experiência sensorial e emocional

desagradável associada a um dano real ou potencial de tecidos ou descrita em termos de tal dano.

Por se tratar de uma experiência subjetiva, a dor não pode ser facilmente medida, requerendo consciência. De acordo com NEWSHAN e STAATS (2013), a incapacidade de se comunicar verbalmente não nega a possibilidade que um indivíduo esteja sentindo dor e precisa de tratamento analgésico adequado. Quando se descreve como uma "experiência", há uma separação entre esta e a nocicepção, que é o processo neural, envolvendo a transdução e transmissão de um estímulo nocivo para o cérebro através de uma via da dor (STEEDS, 2013). A dor é o resultado de uma interação complexa entre os sistemas de sinalização, modulação de centros superiores e a percepção única do indivíduo (STEEDS, 2013).

O fenômeno da dor engloba dois componentes: um sensorial e outro emocional/afetivo. O primeiro é o responsável pelo mecanismo neurofisiológico da dor, permitindo que haja a transmissão e a interpretação do estímulo nocivo que, geralmente, é forte o suficiente para produzir lesão tecidual. E o segundo está relacionado à percepção do estímulo doloroso, que se segue após a tomada de consciência e pela reação a dor do indivíduo (JULIUS & BASBAUM, 2001; ALMEIDA; ROIZENBLATT; TUFIK, 2004). É importante salientar que a dor se manifesta de diferentes formas e por isso não pode ser entendida ou tratada como uma entidade única (BESSON, 1999).

2.5.1. TIPOS DE DOR

A dor pode receber várias denominações, que irão variar de acordo com o tipo de lesão e/ou os mediadores envolvidos, podendo ser denominada de dor nociceptiva (quando há estimulação fisiológica de receptores), dor neuropática (que está associada à lesão ou disfunção do sistema nervoso) (SCHESTATSKY, 2008) e psicogênica (relacionada a fatores psicológicos na gênese da dor) (VITOR et al., 2008). Além dessa classificação, existem algumas alterações que podem provocar manifestações dolorosas, como a hiperalgesia (onde há redução do limiar da dor, causando uma maior sensibilidade ao estímulo doloroso) (ALI; MEYER; CAMPBELL, 1996), alodinia

(dor em resposta a um estímulo não nocivo) e hiperestesia (sensibilidade anormal a estímulos sensoriais) (BESSON, 1999).

A dor nociceptiva consiste na estimulação persistente de nociceptores, seja térmico, químico ou mecânico. Neste tipo de dor ocorre ativação contínua das vias centrais da dor e pode ser identificado em pessoas com câncer, Herpes zoster, entre outras. Já a dor neuropática, segundo a IASP (2013), é definida como aquela causada ou iniciada por uma lesão primária ou por disfunção do SNC e/ou Periférico (SNP). Esta desordem pode ser provocada por compressão, transecção, infiltração, isquemia, injúria metabólica de corpos celulares de neurônios ou uma combinação desses fatores. Dor do membro fantasma e doenças como Diabetes mellitus e Parkinson são as principais causas da dor neuropática. A dor psicogênica, por sua vez, está relacionada à prevalência de fatores psicológicos na gênese da sensação dolorosa. Esse tipo de dor pode ser observado em distúrbios psicológicos como na depressão e na ansiedade generalizada (VITOR *et al.*, 2008).

De acordo com a Sociedade Brasileira para o Estudo da Dor (SBED) (2013), a dor pode ser classificada, de acordo com a sua duração de manifestação, em três tipos: aguda, crônica e recorrente. A dor aguda se manifesta em períodos curtos e está associada a lesões em tecidos ou órgãos e pode desaparecer quando a causa é corretamente diagnosticada. A dor crônica é aquela que se estende por um tempo maior, podendo estar associada a uma doença crônica. Já a dor recorrente se manifesta em períodos de curta duração, porém com repetição freqüente, mesmo que não haja um processo causador específico.

A dor aguda tem um valor biológico adaptativo e permite ao organismo localizar com rapidez e precisão o estímulo causador da resposta dolorosa. Este é um importante mecanismo de defesa, pois evitará ou reduzirá os danos que seriam causados ao tecido, caso o mesmo continuasse exposto ao estímulo doloroso (SERPELL; MAKIN; HARVEY, 1998).

A dor crônica, por sua vez, não possui caráter defensivo, já que a mesma pode estar presente mesmo na ausência do estímulo nocivo. Em geral, esta não é bem localizada, podendo ser maciça, contínua ou recorrente. A dor crônica pode acarretar conseqüências físicas, comportamentais, mentais, psicológicas e psicossociais, além de envolver grave estresse emocional. Esse

tipo de dor difere da dor aguda em relação à sua persistência, alterações adaptativas e dificuldade de tratamento (REBOUÇAS JÚNIOR, 2010).

2.5.2. MECANISMOS DE PERCEPÇÃO DA DOR

A percepção da dor ocorre em dois estágios distintos. O primeiro, denominado nocicepção, refere-se à transdução do estímulo doloroso ao SNC por receptores especializados, os nociceptores. O segundo estágio é referente ao processamento elaborado dessa informação nociceptiva, levando à percepção consciente da dor (VITOR *et al.*, 2008).

O primeiro processo da nocicepção é a decodificação de sensações mecânica, térmica e química em impulsos elétricos pelos nociceptores, que estão presentes grande parte do organismo. Estes são terminações nervosas livres dos neurônios de primeira ordem, cuja função é preservar a homeostasia tecidual, assinalando uma injúria potencial ou real. Iniciado o estímulo, este é levado até o SNC através de fibras aferentes denominadas de nociceptivas. (LENT, 2004; KLAUMANN; WOLK; SILLAS, 2008).

A estimulação dos nociceptores promove uma liberação local de mediadores químicos, tais como bradicinina, prótons, histamina, serotonina, metabólitos do ácido araquidônico, ATP, adenosina, citocinas, aminoácidos excitatórios, óxido nítrico, substância P, neurotrofinas, bombesina, opióides, somatostatina, acetilcolina, entre outros. Estes mediadores interagem com nociceptores específicos conduzindo à propagação do sinal nociceptivo por alteração na permeabilidade da membrana da fibra nervosa gerando o potencial de ação (VITOR *et al.*, 2008).

As fibras aferentes de primeira ordem foram classificadas em termos de estrutura, diâmetro, grau de mielinização e velocidade de condução em A β , A δ ou C (JULIUS; BASBAUM, 2001). As fibras A β são fibras de diâmetro grande (maior que 10 μ m), mielinizadas e de condução rápida, responsáveis por sensações inócuas. As fibras A δ são de diâmetro intermediário (2 a 6 μ m), mielinizadas. Sua velocidade de condução é intermediária, modulando a primeira fase da dor (mais aguda). Já as fibras C possuem diâmetro pequeno (0,4 a 1,2 μ m), não são mielinizadas e com velocidade de condução lenta, responsáveis pela segunda dor ou dor difusa, queimação persistente (a dor

permanece mesmo após o estímulo nocivo ter cessado) (KLAUMANN; WOLK; SILLAS, 2008).

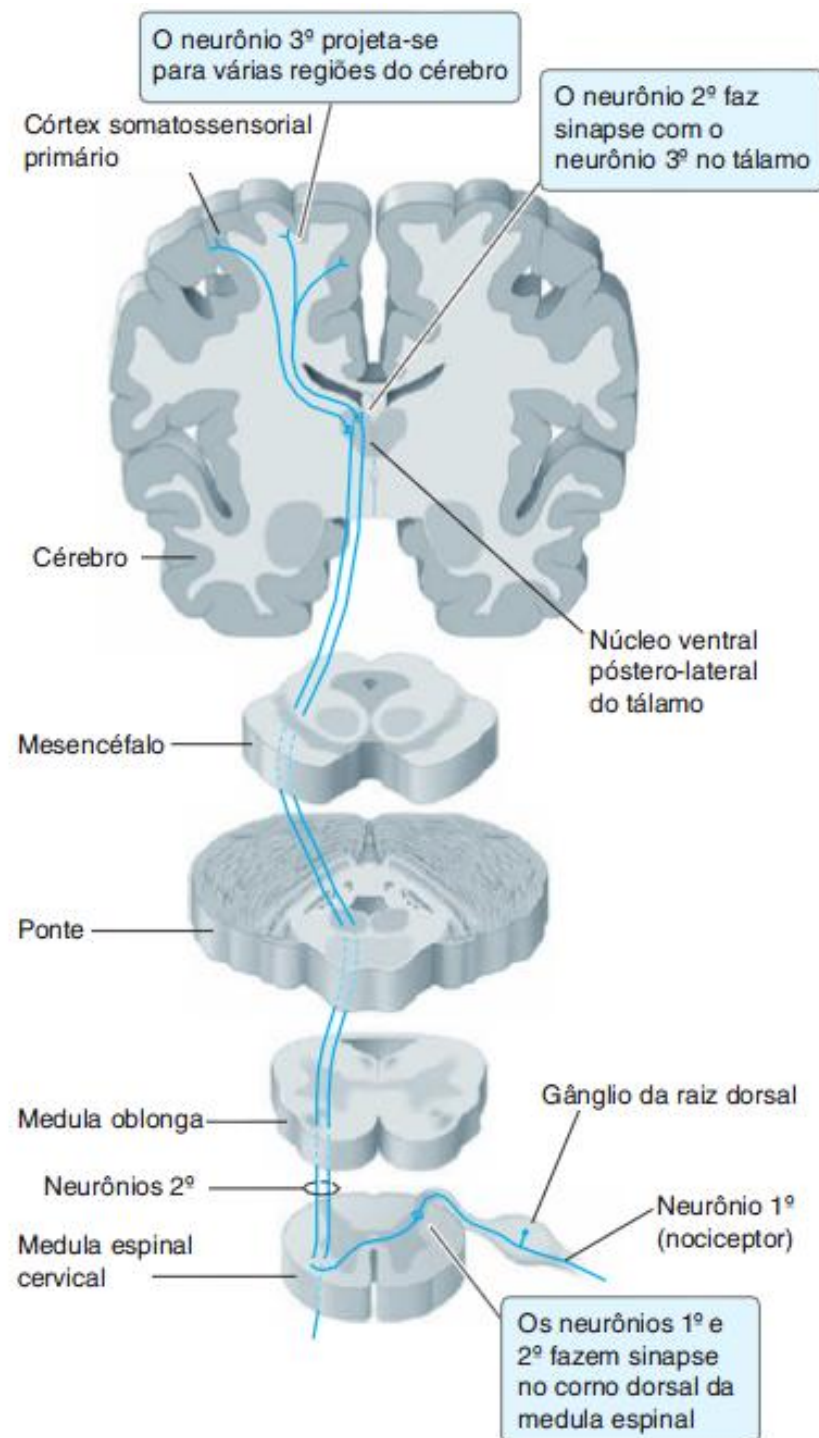
Após a transdução, o estímulo atinge a medula espinhal através das fibras A δ e C, que se incorporam aos demais nervos periféricos, e o tronco encefálico, através do nervo trigêmeo. Nos gânglios espinhais e no gânglio trigêmeo estão localizados os corpos dos neurônios primários da dor. No corno dorsal da medula e no núcleo espinhal do trigêmeo está localizada a maioria dos neurônios de segunda ordem, que recebem as sinapses dos aferentes de primeira ordem (LENT, 2004).

As fibras aferentes primárias chegam organizadamente ao corno dorsal da medula espinhal, onde as fibras A δ terminam nas lâminas I e V e as fibras C na lâmina II (Millan, 1999), lâminas onde estão localizados os nociceptores (VITOR et al., 2008). Após a interação direta ou indireta com neurônios aferentes primários no corno dorsal, os neurônios de segunda ordem são acionados na medula espinhal, transmitindo os impulsos nociceptivos para estruturas do tronco cerebral e diencéfalo, incluindo tálamo, substância cinzenta periaquedutal, formação reticular da medula, complexo amigdalóide, hipotálamo, entre outras (MILLAN, 1999). O SNC utiliza projeções eferentes no cérebro e na medula espinal para modular os sinais nociceptivos de entrada e modificar, assim, a percepção da dor (SCHULMAN; STRICHARTZ, 2005). Os principais neurotransmissores responsáveis pela transmissão do impulso nervoso das fibras aferentes primárias para os neurônios do corno dorsal da medula são a substância P e o glutamato e são responsáveis, respectivamente, pela produção de potenciais excitatórios rápido e lento (MILLAN, 1999; VITOR et al., 2008).

A Figura 3 ilustra o processamento dos estímulos nocivos, a nível neural e pode ser resumido da seguinte forma: Os nociceptores primários (1^o) possuem corpos celulares no gânglio da raiz dorsal e fazem sinapse com neurônios aferentes secundários (2^o) no corno dorsal da medula espinhal. Os aferentes secundários seguem o seu trajeto nas áreas laterais da medula espinal, alcançando, finalmente, o tálamo, onde fazem sinapse com neurônios aferentes terciários (3^o). O processamento da dor é complexo, e os aferentes 3^o têm muitos destinos, incluindo o córtex somatossensorial (localização da dor) e

o sistema límbico (aspectos emocionais da dor) (SCHULMAN; STRICHARTZ, 2005).

Figura 3: Vias da dor.



Fonte: SCHULMAN; STRICHARTZ, 2005.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. REAGENTES E EQUIPAMENTOS

Para o estudo fitoquímico foi utilizada sílica gel 60 (70-230 mesh), da marca Vetec®, para cromatografia em coluna (CC). Os solventes utilizados foram hexano, etanol, metanol, água destilada, acetato de etila, ácido acético, ácido sulfúrico, todos grau Padrão Análítico (P.A.). Para cromatografia em camada delgada (CCD) utilizou-se cromatofolhas de alumínio recoberta com sílica gel 60 (Merck®).

As análises por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada com detector de arranjos de diiodo (CLAE-DAD) foram realizadas no cromatografo líquido Merck-Hitachi LaChrom Elite® equipado com bomba HITACHI L-2130, detector de arranjos diiodo (DAD) VRW HITACHI L-2300 e com amostrador automático com 100µL de *loop*. Os dados foram adquiridos e processados utilizando o programa Ezchrom Elite®. As frações foram analisadas utilizando a coluna de fase reversa *Purospher*® STAR RP-18e (250mm x 4,6 mm, partículas de 5µm) Merck®. A taxa de injeção foi de 1 mL/min e a temperatura do forno foi mantida em 30°C. O volume de injeção foi de 20 µL. As amostras foram filtradas através de filtro Millipore com diâmetro de 0,22 µm antes da injeção. Foram somente analisado(s) o(s) pico(s) majoritário(s) de cada cromatograma. As análises foram realizadas de acordo com metodologia descrita por Leite e colaboradores (2012).

Os experimentos de CLAE-DAD acoplado à Espectroscopia de Massas (CLAE-DAD-EM) foram realizados pela central analítica do Instituto de Química da Universidade de São Paulo (IQUSP). O equipamento utilizado em CLAE-DAD-EM foi o Esquire 3000 Plus - Bruker Daltonics, com ionização electrospray, capilar de 4000V, nebulizador: 27psi, gás seco de 7 litros / min e temperatura de 320 °C. O solvente utilizado foi metanol.

A avaliação da atividade antioxidante foi realizada utilizando o solvente etanol 95% (P.A.) para a solubilização das amostras. As substâncias utilizadas foram butilhidroxitolueno (BHT), ácido ascórbico (AA) e 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH). A leitura da absorbância foi realizada em espectrofotômetro UV-visível (Varian) no comprimento de onda de 518 nm.

Nos testes para avaliação da atividade antinociceptiva, as substâncias e reagentes utilizados foram ácido acético (Merck® AG, Darmstadt, Alemanha); dipirona (Sigma® Chemical CO., St. Louis, MO, EUA); indometacina (Merck®) e Tween 20 (Sigma®). A solução de formalina (2,5%) foi preparada a partir de formaldeído (Merck®) em solução salina (0,9%). O extrato hexânico e a fração flavonoídica foram diluídos em Tween 20 (0,05%) e água destilada (veículo) em todos os experimentos. As demais substâncias foram diluídas em Tween 20 (0,05%) e água destilada.

3.2. ANIMAIS

Para avaliação da atividade antinociceptiva foram utilizados camundongos Swiss adultos, com peso compreendido entre 25-35 gramas, machos e fêmeas, com 6-8 semanas de idade, distribuídos em grupos de 6-8 animais por tratamento. Todos os animais são provenientes do Biotério Central da Universidade Federal de Alagoas (BIOCEN-UFAL).

Todos os procedimentos realizados foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFAL (Protocolo nº 23065.004873/2011-01). Os animais utilizados foram mantidos em ambiente com temperatura controlada (25-28°C), ciclo claro-escuro de 12 horas e tratados com ração e água. O número de animais utilizados e a intensidade do estímulo nocivo foram os mínimos necessários para demonstrar os efeitos das substâncias testadas. Sendo que todos os experimentos seguiram as normas internacionais para o estudo com animais de laboratório (ZIMMERNANN, 1983).

3.3. PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS

3.3.1. COLETA DO MATERIAL VEGETAL

Tibouchina pereirae foi coletada na cidade de Mucugê, Bahia, e identificada pelo Dr. Francisco Haroldo Feitosa do Nascimento (UEFS). Uma exsicata foi depositada no Herbário da Universidade Estadual de Feira de Santana (HUEFS) sob a numeração 191056.

3.3.2. OBTENÇÃO DOS EXTRATOS DE *Tibouchina pereirae*

As partes aéreas (1,20 Kg) foram secas em estufa a 50°C por 28h e, em seguida, o material foi moído em moinho de facas (Tipo Willey). O material triturado (417,30 g) foi transferido para um recipiente onde foram adicionados 2,7L de hexano e macerado por de três dias. Após esta etapa, o solvente foi filtrado e submetido à evaporação com uso de evaporador rotativo com pressão reduzida.

Após remoção do *n*-hexano, foi adicionado 1,3L de etanol 95% e submetido à nova maceração por mais três dias. Após este período, o extrato foi filtrado para um recipiente e submetido evaporação sob pressão reduzida em evaporador rotativo a 45° C.

Concluída a maceração com etanol, o mesmo foi coletado e então foram adicionados 2,0L de água destilada e deixado macerar por igual período. Após três dias, o macerado foi transferido para um recipiente e deixado evaporar em estufa com circulação de ar em temperatura controlada (55°C). Todos os extratos foram armazenados sob refrigeração.

O processo de maceração forneceu os extratos hexânico (EHTP), etanólico (EETP) e aquoso (EATP) brutos com os seguintes rendimentos: 12,35g (2,36%) para o extrato hexânico, 28,99g (6,95%) do extrato etanólico e 53,35g (12,78%) do extrato aquoso.

3.3.3. FRACIONAMENTO DOS EXTRATOS DE *Tibouchina pereirae*

Os extratos hexânico e etanólico foram submetidos a CC separadamente. A eluição foi realizada com solventes de polaridade crescente e com variações de 10% (hexano, acetato de etila, etanol, metanol e água) em volumes de 100 mL, sendo coletadas frações de 50 mL, cada.

O fracionamento do extrato hexânico rendeu 39 frações, enquanto que o extrato etanólico forneceu 16 frações. Todas as frações obtidas foram submetidas à análise por CCD em sistema de eluentes composto por hexano;EtOAc na proporção 7:3. As frações que apresentaram o mesmo perfil cromatográfico foram unidas e ao final, resultaram em 17 frações, para o

extrato hexânico e 9 frações para o extrato etanólico, que foram analisadas por CLAE-DAD.

3.3.4. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE CAPTADORA RADICALAR FRENTE AO DPPH

A avaliação da atividade antioxidante pelo método fotolorimétrico do DPPH, seguiu a metodologia descrita por Sá e colaboradores (2012). Nos ensaios foram preparadas soluções de 243, 81, 27, 9, 3 e 1 µg/ mL dos extratos hexânico, etanólico e aquoso de *T. pereirae* e da fração flavonoídica em etanol. A 2,5 mL das amostras, foi adicionado 1,0 mL da solução de DPPH (50 µg/mL) em etanol e deixado reagir por 30 minutos.

O controle negativo foi realizado com 1,0 mL da solução de DPPH (50 µg/mL) em 2,5 mL de etanol; e como branco foi utilizado uma solução dos extratos (EHTP, EETP e EATP) e da fração flavonoídica (FFTP), nas concentrações de 243, 81, 27, 9, 3 e 1 µg/ mL, em 1,0 mL de etanol. Os reagentes padrões (BHT e AA) foram utilizados nas mesmas concentrações das amostras. Todos os ensaios foram realizados em triplicata e a média foi calculada.

A percentagem de inibição do radical DPPH, pelas amostras, foi calculada de acordo com a fórmula a seguir.

$$\% \text{ inibição} = ((Ac_{(0)} - Aa_{(t)})/Ac_{(0)}) \times 100$$

Onde:

- $Ac_{(0)}$ é a absorbância do controle negativo no tempo 0 min.
- $Aa_{(t)}$ é a absorbância da amostra no tempo 30 min.

3.3.5. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA

3.3.5.1. VIA DE ADMINISTRAÇÃO

A avaliação da ação antinociceptiva do EHTP, assim como a fração flavonoídica FFTP, obtida a partir deste, foi realizada por meio da administração pela via intraperitoneal (i.p.). Esta via foi escolhida, pois elimina o efeito de primeira passagem e/ou anula a possibilidade dos compostos

presentes nas amostras de estarem sofrendo degradação em pH ácido estomacal. Os animais receberam diferentes doses do extrato e da fração flavonoídica, 40 minutos antes da administração do agente irritante.

A atividade antinociceptiva do EHTP e da FFTP foi avaliada através da utilização de modelos de nocicepção induzidos pelo ácido acético (0,6% v/v, 0,1mL/10g) (KOSTER *et al.*, 1959; COLLIER *et al.*, 1968; FONTENELE *et al.*, 1996) e formalina (2,5%, 20µL/pata) (HUNSKAAR AND HOLE, 1987; TJØLSEN *et al.*, 1992).

3.3.5.2. TESTE DAS CONTORÇÕES ABDOMINAIS INDUZIDAS PELA INJEÇÃO INTRAPERITONEAL DE ÁCIDO ACÉTICO EM CAMUNDONGOS

Para verificar o efeito antinociceptivo do EHTP e da FFTP no teste de contorções abdominais, foi administrado ácido acético (AcOH) (0,6% v/v) diluído em água destilada. A administração da solução de AcOH promove uma resposta nociceptiva induzida que pode ser caracterizada como contorções abdominais as quais consistem na contração da musculatura abdominal juntamente com a extensão de uma das patas posteriores (COLLIER *et al.*, 1968; BENTLEY *et al.*, 1981).

Um grupo de animais foi pré-tratado com o EHTP (100mg/Kg), enquanto que outros grupos foram pré-tratados com a FFTP (3, 10, 30 e 100 mg/Kg) administrados 40 minutos antes da injeção da solução de AcOH. O grupo controle recebeu solução de AcOH (0,6% v/v) correspondente a 0,1 mL/10 g. O controle positivo recebeu dipirona sódica (100 µmol/Kg), 40 minutos antes da injeção da solução de AcOH. Após injeção do AcOH, os camundongos foram colocados em recipientes individuais e o número de contorções abdominais foi quantificado durante um período de 20 minutos, iniciando a contagem 5 minutos após a injeção da solução de AcOH. A atividade antinociceptiva foi determinada tomando como base o número de contorções abdominais dos animais pré-tratados com o EHTP e a FFTP, comparado com as contorções do grupo controle. A atividade antinociceptiva foi expressa como percentagem de inibição do número de contorções observadas no grupo controle.

3.3.5.3. NOCICEPÇÃO INDUZIDA PELA INJEÇÃO INTRAPLANTAR DE FORMALINA EM CAMUNDONGOS

O efeito antinociceptivo do EHTP e da FFTP foi confirmado através do teste de nocicepção realizado pela injeção intraplantar de formalina. Esse modelo permite identificar dois tipos de dor: a dor neurogênica, causada pela estimulação direta de neurônios nociceptivos, e a dor inflamatória, caracterizada pela liberação de mediadores inflamatórios. Os camundongos receberam na região plantar da pata posterior direita, 20 μ L da solução de formalina 2,5% (0,92% de formaldeído). Após a injeção, os animais foram colocados em recipientes individuais para observar por quanto tempo os mesmos permaneceriam lambendo ou mordendo a pata em que foi administrada a formalina. Durante 30 minutos houve a observação dos animais, sendo assim dividido: a primeira fase corresponde ao tempo de 0 a 5 minutos após a injeção da formalina, para observar a fase neurogênica da dor; a segunda fase corresponde ao tempo de 15 a 30 minutos após a injeção da formalina, representando a fase inflamatória.

Diferentes grupos de animais foram pré-tratados com o EHTP (100 mg/Kg) e a FFTP (100 mg/Kg), administrados pela via intraperitoneal, 40 minutos antes da injeção da formalina.

3.4. ANÁLISE ESTATÍSTICA

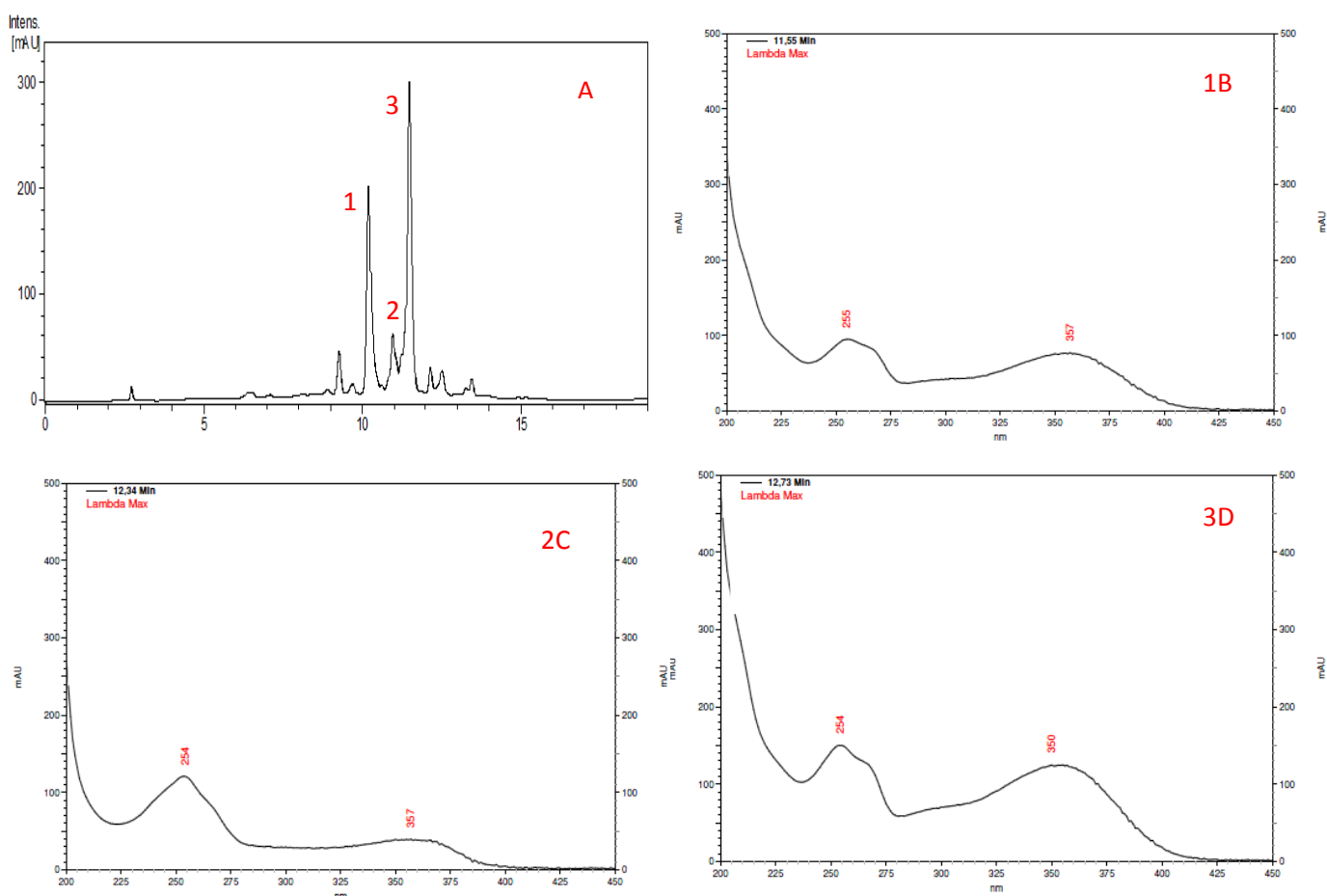
Os dados obtidos dos experimentos foram expressos como a média e o erro padrão da média (média \pm E.P.M.). As análises estatísticas dos resultados foram realizadas por meio da análise de variância (ANOVA) seguido do teste de Dunnett utilizando o programa GraphPad Prism 5.0. Valores de $P < 0,05$ foram considerados significativos (* $P < 0,05$; ** $P < 0,01$ e *** $P < 0,001$).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DOS FLAVONOIDES EM *Tibouchina pereirae*

As frações obtidas no fracionamento dos extratos hexânico e etanólico foram analisadas por CLAE-DAD para avaliar a presença de flavonoides. As frações analisadas apresentaram uma mistura de diferentes compostos (dados não mostrados), incluindo flavonoides, porém apenas uma das frações do extrato hexânico (fração 39, eluída em EtOH:H₂O: 80/20) apresentou a maior proporção de picos para esses compostos, sendo então denominada de fração flavonoídica de *T. pereirae* (FFTP). A Figura 4 ilustra o cromatograma e os espectros de UV dos flavonoides majoritários caracterizados na fração FFTP.

Figura 4: Cromatograma (6A) e espectros de UV dos picos majoritários da fração FFTP (1B, 2C e 3D). Os espectros de UV desses picos apresentaram absorções características de compostos da classe dos flavonoides.

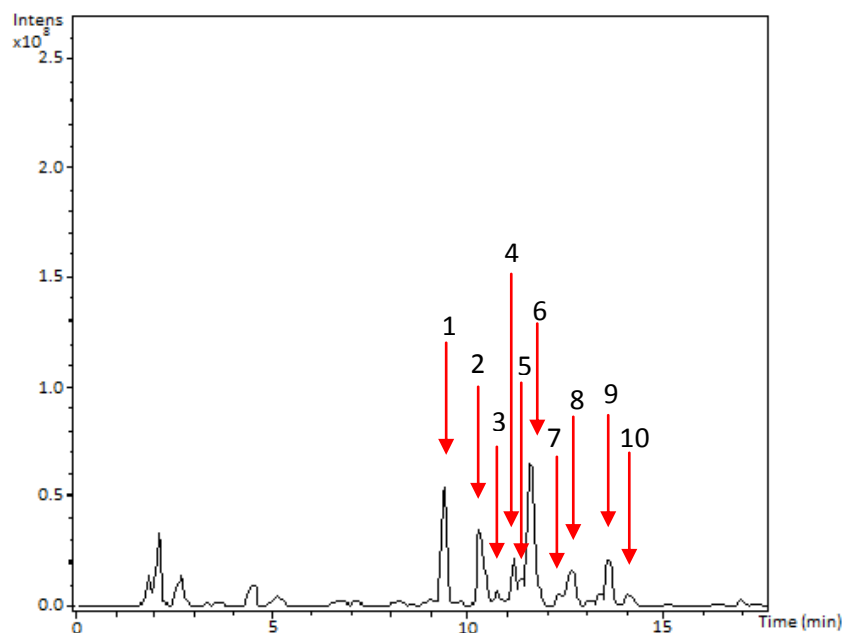


Fonte: Autor, 2013.

Os espectros de UV obtidos da análise da fração FFTP são característicos de compostos da classe dos flavonoides. A análise de flavonoides pela técnica de espectrometria no ultravioleta/visível é rotineiramente utilizada devido à existência de duas bandas características (PINHEIRO; JUSTINO, 2012). De acordo com a estrutura dos flavonoides (**Figura 1**), a Banda I, que corresponde ao anel B, apresenta absorção na faixa de 300 a 550 nm, enquanto que a banda II, correspondente ao anel A, apresenta absorção na faixa de 240 a 285 nm. Tsimogiannis e col. (2007) relataram que os compostos das classes dos flavonóis apresentam uma faixa de absorção da banda II compreendida entre 250-290 nm, enquanto que a banda I desses compostos, segundo Santos, Schripsema e Kuster (2005), apresenta uma faixa de absorção compreendida entre 348-354 nm.

Através da análise por CLAE-EM/EM da fração FFTP foi possível caracterizar a estrutura química dos flavonoides contidos na mesma. A Figura 5 apresenta o cromatograma de íons totais obtido através da análise da fração FFTP.

Figura 5: Cromatograma de íons totais da fração FFTP no modo positivo. Os picos enumerados (1 a 10) correspondem aos flavonoides presentes na fração.

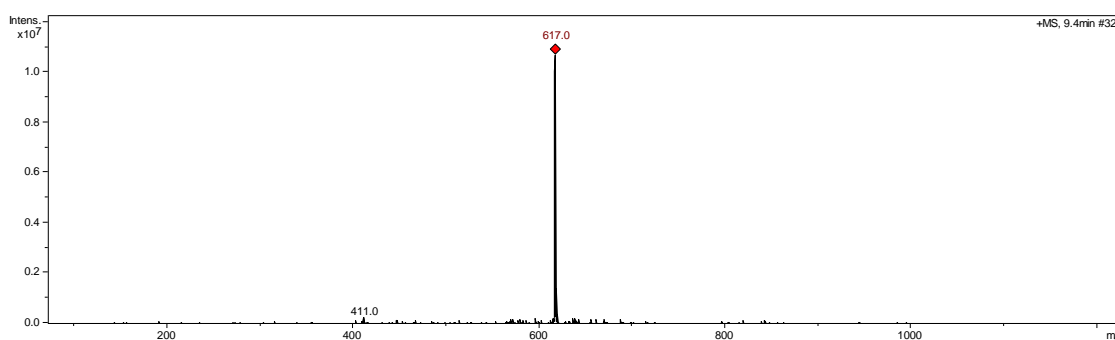


Fonte: Autor, 2013.

A técnica de CLAE-EM desta fração permitiu obter informações sobre os compostos presentes na mesma. O espectro de massas de primeira ordem

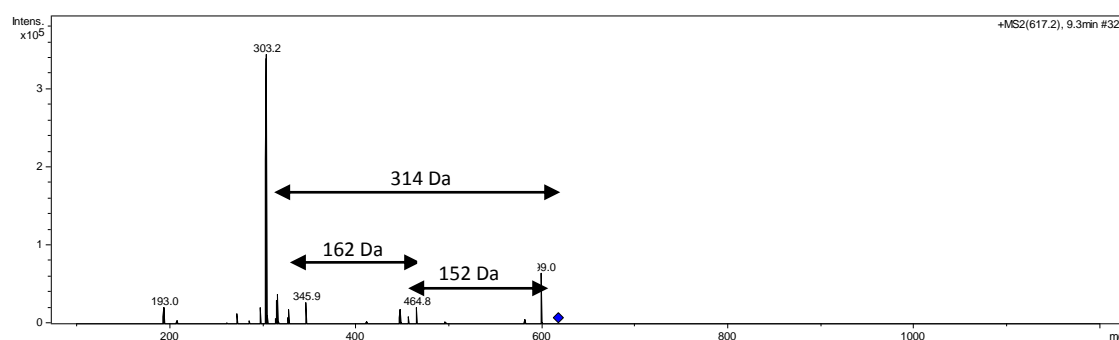
(EM) do pico 1 mostrou o íon molecular protonado em $[M+H]^+$ m/z 617 Da (Figura 6). A Figura 7 ilustra o espectro de massas de segunda ordem do composto (EM/EM), nesse espectro é possível observar o fragmento em m/z 465 Da $[M+H-152]^+$, que corresponde à perda de 152 Da, que é indicativo da presença da porção galoil (Gal) na molécula. O íon em 346 $[M+H-152-162]^+$, mostra a perda de 162 Da, o que é indicativo da presença de glicose na molécula (MOURA; VILEGAS; SANTOS, 2011). O segundo principal fragmento observado (m/z 303 Da), indica a perda de m/z 314 Da, que resulta de uma porção constituída por uma glicose associada a uma molécula de ácido gálico (SHIEBER *et al.*, 2005). O fragmento em m/z 303 Da é correspondente a aglicona protonada do flavonol quercetina (MOURA; VILEGAS; SANTOS, 2011). Os espectros de massas dos demais picos estão representados no Anexo 2.

Figura 6: Espectro de massas de primeira ordem (EM) do pico 1



Fonte: Autor, 2013.

Figura 7: espectro de massas de segunda ordem (EM/EM) do pico 1.



Fonte: Autor, 2013.

A análise do EM do pico 2 permitiu a caracterização do composto como sendo o flavonóide quercetina 3-O-rutinosídeo (rutina), através da comparação

com dados da literatura. O espectro do pico 2 apresentou o íon molecular protonado em m/z 611 Da $[M + H]^+$ indicando sua fórmula molecular correspondente a $C_{27}O_{16}H_{31}$. O EM/EM gerou fragmentos representativos de m/z 465 Da $[M+H-146]^+$ e m/z 303 Da $[M+H-146-162]^+$, indicando as perdas de ramnose (Ram) (146 Da) e glicose (Glu) (162 Da), respectivamente. A massa de 303 Da é correspondente a aglicona quercetina (STOBIECKI, 2000; MOURA; VILEGAS; SANTOS, 2011).

O pico 3 apresentou o íon molecular protonado em $[M+H]^+$ em m/z 631 Da. O EM/EM deste pico, gerou os fragmentos em $[M+H-152]^+$ m/z 479 Da, que indica a perda de 152 Da, que é correspondente ao grupamento galoil. O fragmento observado em m/z 317 Da corresponde a perda de 314 Da, que indica a presença de glicose associada ao ácido gálico (SHIEBER *et al.*, 2005). O fragmento em m/z 317 Da corresponde a aglicona protonada do flavonol isoramnetina (WANG, D-M. *et al.*, 2012).

A análise do pico 4 apresentou o íon molecular protonado $[M + H]^+$ em m/z 595 Da. O EM/EM mostrou a presença de fragmentos importantes em m/z 449 $[M+H-146]^+$ e m/z 287 $[M+H-146-162]^+$, esta última corresponde a aglicona protonada canferol (STOBIECKI, 2000; MOURA; VOLEGAS; SANTOS, 2011). A partir da comparação com dados da literatura, foi possível identificar esse composto como sendo canferol-3-O-rutinoside (nicotiflorina) (STOBIECKI, 2000; MA *et al.*, 2000).

O pico 5 apresentou no EM o íon molecular em $[M+H]^+$ m/z 479 Da. O EM/EM forneceu o fragmento em m/z 317 Da $[M+H-162]^+$, que indica a perda de 162 Da, que corresponde a perda de glicose (MOURA; VILEGAS; SANTOS, 2011). O fragmento em m/z 317 Da corresponde a aglicona da isoramnetina (WANG, D-M. *et al.*, 2012).

A análise do EM do pico 6 revelou a presença do íon molecular protonado $[M + H]^+$ em m/z 625 Da. O EM/EM desse composto gerou os fragmentos em m/z 479 $[M+H-146]^+$ e m/z 317 $[M+H-146-162]^+$, que correspondem a perdas de unidades de ramnose (146 Da) e glicose (162 Da), respectivamente, (MOURA; VILEGAS; SANTOS, 2011). O fragmento em m/z 317 Da corresponde a aglicona da isoramnetina (WANG, D-M. *et al.*, 2012). O perfil de fragmentação apresentado por esta molécula é correspondente ao composto isoramnetina 3-O-rutinosídeo (narcissina) (CAI; GU; TANG, 2010).

Os picos correspondentes aos compostos 7 - 10 não foram caracterizados, porém, o espectro de UV observado para a maioria destes apresentou valores de absorções característicos da classe dos flavonoides.

Assim, a caracterização dos flavonoides quercetina 3-O-(galoil)-glicosídeo, quercetina 3-O-rutinosídeo (rutina), isoramnetina 3-O-(galoil)-glicosídeo, canferol 3-O-rutinosídeo (nicotiflorina), isoramnetina 3-O-glicosídeo e isoramnetina 3-O-rutinosídeo (narcissina) foi possível a partir da análise do perfil de fragmentação dos compostos presentes na fração FFTP. A presença de flavonoides em extrato hexânico já foi descrito na literatura (SULTANA *et al.*, 2012), assim como a presença de outros compostos glicosilados neste extrato (RAO; SAVITHRAMMA, 2011). A Figura 8 ilustra a estrutura dos flavonoides presentes na fração FFTP. A Tabela 1 apresenta os valores do tempo de retenção (em minutos) ($T_{R(MIN)}$), absorção no UV (λ_{max}), assim como os fragmentos obtidos nas análises por CLAE-DAD e CLAE-EM/EM da fração FFTP.

Tabela 1 – Dados característicos dos flavonoides presentes na fração FFTP de *T. pereirae*.

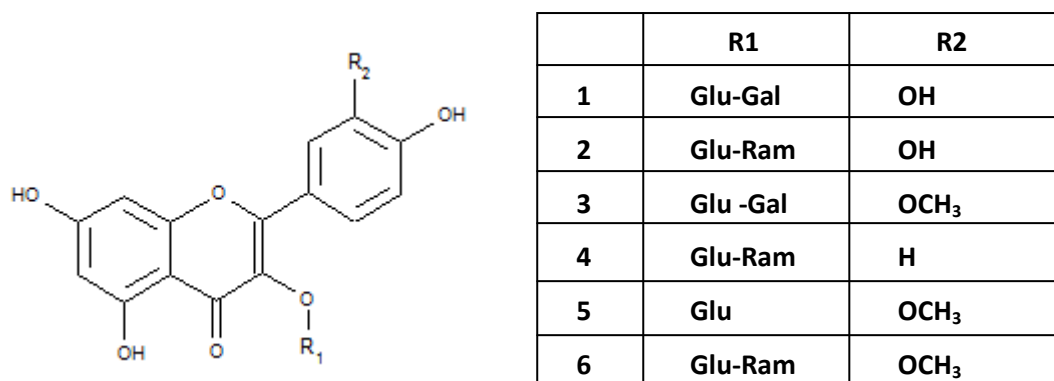
	$T_{R(MIN)}$	CLAE-DAD λ_{max} [nm]	CLAE-EM/EM		COMPOSTO	REFERÊNCIAS
			EM $[M+H]^+$	EM/EM		
1	9.4	262, sh 291, 348	617	464, 303	Quercetina 3-O-(galoil) glicosídeo	SHIEBER <i>et al.</i> , 2005; MOURA; VILEGAS; SANTOS, 2011
2	10.2	255, sh 297, 357	611	465, 303	Rutina	STOBIECKI, 2000; MA <i>et al.</i> , 2001; MOURA; VILEGAS; SANTOS, 2011.
3	10.8	254, sh 299, 358	631	479, 317	Isoramnetina 3-O-galoil glicosídeo	SHIEBER <i>et al.</i> , 2005; WANG, D-M. <i>et al.</i> , 2012.
4	11.2	254, sh 298, 357	595	449, 287	Nicotiflorina	MA <i>et al.</i> , 2000; STOBIECKI, 2000; MA <i>et al.</i> , 2001; MOURA; VILEGAS; SANTOS, 2011.
5	11.4	253, 344	479	317	Isoramnetina 3-O-glicosídeo	MOURA; VILEGAS; SANTOS, 2011; WANG, D-M. <i>et al.</i> , 2012.
6	11.6	254, sh 297, 353	625	479, 317	Narcissina	CAI; GU; TANG, 2010; MOURA; VILEGAS; SANTOS, 2011.
7	12.3	-	611	438, 287	*n/d	-
8	12.6	249, sh 297, 363	611	303	n/d	-
9	13.6	252	625	458, 359, 317	n/d	-
10	14.0	251	625	479, 317	n/d	-

n/d – compostos não identificados: sh – ombro (*shoulder*)

*O espectro de UV não foi determinado

Fonte: Autor, 2013.

Figura 8: Estrutura dos flavonoides identificados na fração FFTP.



Fonte: Autor, 2013.

4.2. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE CAPTADORA RADICALAR FRENTE AO DPPH

Os extratos hexânico, etanólico e aquoso, assim como a fração flavonoídica (FFTP) apresentaram atividade antioxidante pelo método do DPPH. As absorbâncias dos extratos e da fração testadas, depois de 30 minutos de contato com a solução de DPPH em etanol, foram obtidas por espectrofotômetro UV-visível. A partir dessas foi obtido o percentual de inibição, que corresponde a atividade antioxidante das amostras testadas (Tabela 2).

Tabela 2 – Atividade antioxidante pelo método do DPPH em percentagem de inibição (%) dos extratos e da fração flavonoídica de *T. pereirae*.

Concentração da amostra (µg/mL)	BHT	AA	EHTP	EETP	EATP	FFTP
243	87,50	97,86	93,75	94,02	94,70	90,67
81	84,52	95,80	94,26	92,27	93,97	89,55
27	86,58	95,69	75,84	92,68	92,06	89,54
9	48,25	95,27	39,97	49,35	88,86	70,32
3	27,68	47,43	22,89	21,69	42,42	39,07
1	13,46	23,91	21,22	12,51	9,63	31,21

AA – ácido ascórbico; **BHT** – butilhidroxitolueno; **EHTP** – extrato hexânico *T. pereirae*; **EETP** – extrato etanólico de *T. pereirae*; **EATP** – extrato aquoso *T. pereirae*; **FFTP** – fração flavonoídica *T. pereirae*.

Fonte: Autor, 2013.

Os extratos brutos (EHTP, EETP, EATP) e a fração flavonoídica (FFTP) apresentaram um percentual de inibição do DPPH de 93,75, 94,02, 94,70 e 90,67%, respectivamente, já o BHT inibiu o radical livre em 87,50%, enquanto que o AA inibiu 97,86% na concentração de 243 µg/mL. Tanto os extratos quanto a fração flavonoídica testados apresentaram maior atividade antioxidante que o composto padrão BHT na maior concentração testada, sendo que, o extrato aquoso (EATP) exibiu maior capacidade antioxidante, dentre os extratos testados, nessa concentração, enquanto que na menor concentração (1 µg/mL), a fração flavonoídica apresentou maior capacidade antioxidante, superando os padrões BHT e AA. Os extratos com solventes mais

polares apresentaram importante atividade antioxidante, segundo Simões e colaboradores (2004), a presença de compostos fenólicos em extratos preparados com esses solventes garantem esta atividade. De acordo com Noori (2012), os flavonoides são compostos que apresentam esta propriedade.

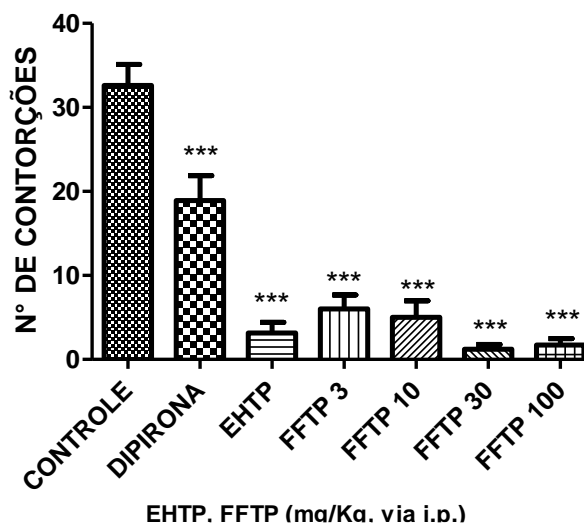
Já foi descrito que os compostos nicotiflorina, narcissina e rutina apresentam atividade antioxidante, porém os compostos derivados da quercetina apresentaram maior poder antioxidante (FIORENTINO *et al.*, 2007). A quercetina é um potente antioxidante, cuja atividade é favorecida pela presença de hidroxilas nas posições 5, 7, 3' e 4'. Quando há substituição da hidroxila na posição 3 do anel C por um grupo glicosídico, a atividade antioxidante da quercetina é reduzida devido a interferência na planaridade da molécula o que dificulta a transferência do elétron para o radical DPPH (AGUIAR *et al.*, 2009), porém, quando o grupamento galoil está presente na porção glicosídica, a redução a atividade antioxidante causada por essa glicosilação é cancelada, devido às propriedades antioxidantes já conhecidas deste substituinte (ZIELIŃSKA *et al.*, 2001).

4.3. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA

4.3.2. NOCICEPÇÃO INDUZIDA PELA INJEÇÃO INTRAPERITONEAL DE ÁCIDO ACÉTICO EM CAMUNDONGOS

A Figura 9 apresenta os resultados obtidos pela administração do EHTP (100 mg/Kg) e da FFTP (3, 10, 30, 100 mg/Kg) pela via i.p.. Os animais tratados com o EHTP exibiram redução de 90,36%, em relação ao grupo controle, no número de contorções abdominais induzidas pela injeção do ácido acético, enquanto que o grupo que recebeu o fármaco padrão (dipirona, 100 µmol/Kg) apresentou uma redução de 42,02% no número de contorções. Além do EHTP, foi avaliada a atividade antinociceptiva da FFTP em diferentes concentrações, e os resultados mostraram que houve uma redução na média do número de contorções abdominais observadas nesse grupo na ordem de 81,60%, 84,67%, 96,32% e 94,74%, respectivamente. Portanto, pode-se observar que assim como a dipirona, o EHTP e a FFTP possuem importante atividade antinociceptiva.

Figura 9: Efeito antinociceptivo do EHTP e FFTP administrados 40 minutos antes pela via i.p., em modelo de contorções abdominais induzidas pela injeção de ácido acético (0,6%) em camundongos. Cada grupo representa a média das contorções (n = 6 camundongos) e as linhas verticais representam o E.P.M. Diferem estatisticamente do controle (***) $P < 0,001$.



Fonte: Autor, 2013.

O teste de contorções abdominais induzidos por ácido acético é amplamente empregado como um modelo de dor para a busca de agentes analgésicos que atuem periféricamente. Nesse estudo, a injeção do agente irritante na cavidade peritoneal do animal aumenta os níveis de mediadores como citocinas, histamina, serotonina, bradicinina, entre outros, que são capazes de ativar os nociceptores periféricos causando a contorção (SAHA *et al.*, 2013), sendo que estes são alvos de substâncias antiinflamatórias não esteroidais (AINES) e/ou alvos de substâncias para fármacos opióides (COOLIER, DINNEN & SCHNEIDER, 1968). Além desses mediadores, o ácido acético é capaz de induzir a biosíntese de prostaglandinas, que são importantes mediadores envolvidos nas contorções abdominais induzidas por esse agente (SAHA *et al.*, 2013). Dentre os mediadores que são liberados, as prostaglandinas possuem importante papel na nocicepção nesse modelo, além dos mediadores já citados, algumas outras substâncias podem estar envolvidas na resposta inflamatória causada pelo ácido acético, como o fator de necrose tumoral α (TNF- α), interleucina 1 β (IL-1 β) e interleucina 8 (IL-8), sendo modulada tanto por macrófagos quanto por mastócitos peritoneais (PAULINO *et al.*, 2012).

A inibição das contorções abdominais induzidas por ácido acético não possui especificidade, sendo que esse teste responde tanto para substâncias

com atividade analgésica como para algumas outras que não possuem essa propriedade, como os bloqueadores adrenérgicos, anti-histamínicos, relaxantes musculares, inibidores da monoamina oxidase (MAO) e neurolépticos, desse modo, o resultado positivo não indica, necessariamente, que o composto testado possua atividade analgésica (LE BARS, GOZARIU, CADDEN, 2001), sendo necessário utilizar outros modelos de nocicepção para confirmar a ação analgésica dos compostos testados.

4.3.3. NOCICEPÇÃO INDUZIDA PELA INJEÇÃO INTRAPLANTAR DE FORMALINA EM CAMUNDONGOS

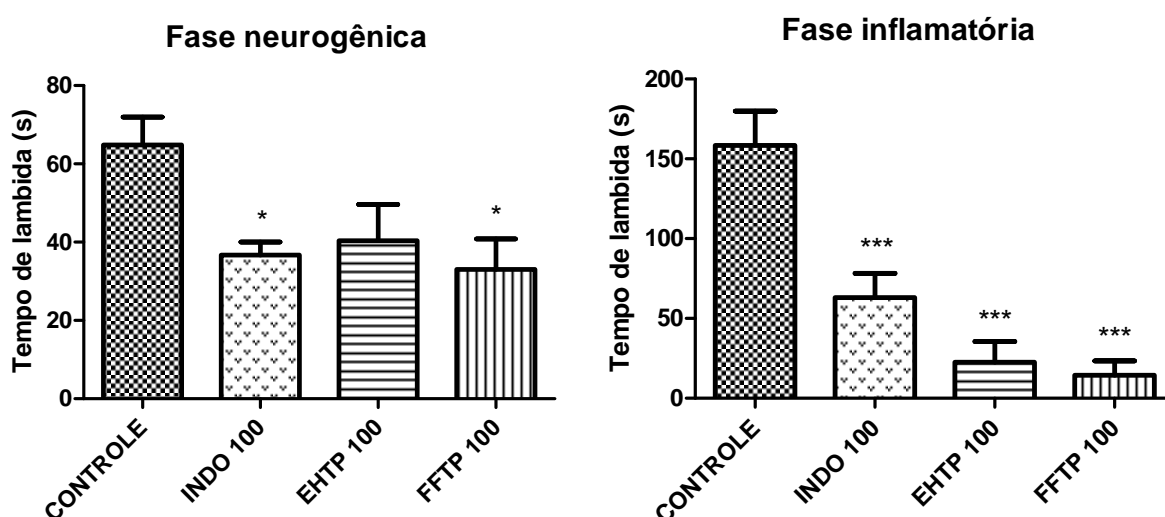
Os resultados apresentados na Figura 10 mostram a inibição do EHTP e da FFTP (100 mg/Kg, para ambos), assim como da indometacina (100 μ mol/kg), administrados pela via i.p., nas duas fases da nocicepção induzida pela formalina. O EHTP promoveu inibição, somente, na segunda fase do teste (fase inflamatória), com uma redução de 83,39% do tempo de lambedura induzido pela formalina, quando comparado ao grupo controle. Entretanto, a FFTP promoveu uma redução significativa no tempo de lambedura nas fases neurogênica e inflamatória, com uma redução de 54,35% e 92,05%, respectivamente. A indometacina promoveu uma redução de 43,43 % e 60,23% no tempo de lambedura nas fases neurogênica e inflamatória, respectivamente.

O teste da formalina mede a resposta a um nociceptivo de longa duração e pode ter uma maior semelhança com dor clínica (ROSLAND *et al.*, 1990). Esse teste avalia a propriedade antinociceptiva em duas fases distintas: a primeira fase (neurogênica) é marcada pela estimulação direta das fibras C aferentes pelo agente flogístico, havendo o envolvimento da substância P e da bradicinina. Na segunda fase (inflamatória), a dor é induzida devido à produção e ação de diferentes mediadores inflamatórios como prostaglandinas, histamina, bradicinina e serotonina no tecido periférico (IMAM *et al.*, 2012). Os mediadores envolvidos na primeira fase do teste podem suprimidos por analgésicos de ação central (como a morfina), enquanto que na segunda fase

há a sensibilidade a fármacos antiinflamatórios não esteróides (AINES) (TJØLSEN *et al.*, 1992).

Os resultados mostraram que o EHTP e a FFTP, na dose de 100 mg/kg, inibiram o tempo de lambida de maneira significativa, entretanto o EHTP tem ação somente na segunda fase do teste, enquanto FFTP atuou nas duas etapas, indicando que o extrato foi efetivo apenas na redução da dor inflamatória, enquanto que a fração flavonoídica foi efetiva tanto para a dor neurogênica como também para a dor inflamatória, podendo estar envolvido na inibição de vias centrais e periféricas de geração da dor.

Figura 10: Efeito antinociceptivo do EHTP e da FFTP, administrados 40 minutos antes, no ensaio de nocicepção induzida pela formalina (2,5%), (A) primeira (fase neurogênica) e (B) segunda fase (fase inflamatória). Cada grupo representa a média das contorções ($n = 6$) e as linhas verticais representam o E.P.M. Diferem estatisticamente do controle (* $P < 0,05$; *** $P < 0,001$).



Fonte: Autor, 2013.

Atividades anti-inflamatória e antinociceptiva de extratos vegetais têm sido atribuídas principalmente a substâncias flavonoídicas, as quais são potentes inibidores da enzima óxido nítrico sintase tipo 2, responsável pela síntese de óxido nítrico (NO), que indiretamente bloqueiam as vias da ciclooxigenase (COX) e/ou lipoxigenase (LOX) e da proteína quinase C e L-arginina/NO (MOTTA *et al.*, 2013). Essas vias têm sido implicadas em uma série de eventos moleculares envolvidos nas atividades antiinflamatória e antinociceptiva. Além disso, os flavonoides são capazes de inibir a fosfolipase A2 e a fosfolipase C, enzimas importantes da cascata de mediadores dos processos inflamatórios (MOTTA *et al.*, 2013).

Alguns flavonoides, como a quercetina, apresentam interessante atividade antioxidante e antiinflamatória (QUEIROZ *et al.*, 2010). Muita atenção tem sido dada a relação existente entre essas duas atividades desses compostos, já que estes apresentam a capacidade de inibir enzimas que são responsáveis por gerar espécies reativas de oxigênio (ROS), como a COX, LOX entre outras (QUEIROZ *et al.*, 2010). Além disso, alguns compostos dessa classe podem apresentar a capacidade de inibir a degranulação de neutrófilos. Já foi relatado que alguns flavonoides, incluindo a quercetina, o canferol e a isoramnetina, são capazes de regular a produção de NO em resposta ao estímulo inflamatório (QUEIROZ *et al.*, 2010).

Flavonoides com hidroxilas na posição 5 e 7 do anel A, ligação dupla entre os carbonos 2 e 3 em combinação com a presença do grupamento cetônico no carbono 4, são potentes inibidores da ciclooxygenase-2 (COX-2) (QUEIROZ *et al.*, 2010). Vale ressaltar que o córtex cerebral expressa COX-2, o que sugere um provável papel das prostaglandinas na modulação da informação nociceptiva desta estrutura. Também foi demonstrada a expressão de citocinas no córtex cerebral (KLAUMANN; WOLK; SILLAS, 2008). A presença da ligação dupla entre os carbonos 2 e 3 do anel C parece ser a maior responsável pela atividade inibitória de enzimas. O grupamento carbonila na posição 4 do anel C também sugere uma inibição direta da peroxidação lipídica (QUEIROZ *et al.*, 2010).

A quercetina 3-O-rutinosídeo apresenta uma relativa atividade analgésica (CECHINEL FILHO; YUNES, 1998) e antiinflamatória (MATERSKA, 2008). Foi relatado que o canferol 3-O-rutinosídeo é capaz de reduzir significativamente o número de contorções abdominais induzidas pelo ácido acético em camundongos (LI *et al.*, 2006). Foi demonstrado que o flavonóide isoramnetina 3-O-rutinosídeo possui importante atividade antiinflamatória (ATTA *et al.*, 2011). A presença desses compostos explicaria as atividades antinociceptiva e antiinflamatória observadas no extrato hexânico e na fração flavonoídica.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A família Melastomataceae apresenta-se amplamente distribuída pelo planeta, porém, muitas de suas espécies são pouco estudadas tanto no aspecto químico quanto em relação à atividade biológica.

A *Tibouchina pereirae*, uma espécie endêmica da região da Chapada Diamantina, Bahia, possui seu uso popular para o tratamento de problemas renais e este trabalho evidenciou que esta planta exerceu importante atividade antinociceptiva. Um dos principais problemas renais é a litíase urinária (conhecido como cálculo renal), em que sua maior característica é a dor intensa e aguda na região lombar, isso poderia justificar, pelo menos em parte, o uso etnomedicinal dessa espécie. Além desta atividade, os extratos testados e a fração flavonoídica apresentaram atividade seqüestradora radicalar pelo método de captura do DPPH. O estudo fitoquímico revelou a presença dos flavonoides glicosilados quercetina 3-O-rutinosídeo, canferol 3-O-rutinosídeo, isoramnetina 3-O-rutinosídeo e isoramnetina 3-O-glicosídeo, e dos derivados acetilados quercetina 3-O-galoil glicosídeo e isoramnetina 3-O-galoil glicosídeo, através do estudo de espectrometria de massas, no extrato hexânico das partes aéreas desta espécie.

A presença desses compostos pode explicar a atividade antioxidante e antinociceptiva que foi apresentada pelo extrato hexânico e pela fração de flavonoides testada. Porém, há a necessidade de proceder ao isolamento destes para avaliar a capacidade antioxidante e antinociceptiva e determinar qual deles é o maior responsável por estas atividades, além disso, outros estudos farmacológicos e químicos são necessários a fim de caracterizar o(s) mecanismo(s) responsável(eis) pela ação antinociceptiva e, também, para identificar outros agentes ativos presentes na planta.

REFERÊNCIAS

- AGUIAR, R. M.; REZENDE, L. C.; QUEIROZ, C. A.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P. Relação estrutura-atividade antioxidante de quercetina e seus derivados glicosilados. In: 32ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2009, Fortaleza. **Resumos...**Fortaleza: Sociedade Brasileira de Química, 2009.
- ALI,Z.; MEYER, R. A.; CAMPBELL, J. N. Secondary hyperalgesia to mechanical but not heat stimuli following a capsaicin injection in hairy skin. **Pain**, v. 68, p.401-411, 1996.
- ALMEIDA, T. F.; ROIZENBLATT, S.; TUFIK, S. Afferent pain pathways: a neuro- anatomical review. **Brain Research**, v. 1000, n. 1-2, p.40-56, 2004.
- AMARO, C. R.; GOLDEBERG, J.; AMARO, J. L.; PADOVANI, C. R. Metabolic assessment in patients with urinary lithiasis. **International Brazilian Journal of Urology**, v. 31, n. 1, p. 29-33, 2005.
- ANDREO, M. A.; BALLESTEROS, K. V. R.; HIRUM-LIMA, C. A.; ROCHA, L. R. M. da; BRITO, A. R. M. S.; VILEGAS, W. Effect of *Mouriri pusa* extracts on experimentally induced gastric lesions in rodents: Role of endogenous sulfhydryls compounds and nitric oxide in gastroprotection. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 107, p. 431-441, 2006.
- ARGENTA, S. C.; ARGENTA, L. C.; GIACOMELLI, S. R.; CEZAROTTO, V. S. Plantas medicinais: cultura popular versus ciência. **Vivências**, v. 7, n.12, p.51-60, maio, 2011.
- ATTA, E. M.; HASEM, A. I.; AHMED, A. M.; ELQOSY, S. M.; JASPARS, M.; EL-SHARKAW, E. R. Phytochemical studies on *Diplotaxis harra* growing in Sinai. **European Journal of Chemistry**, v. 2, n. 4, p. 535-538, 2011.
- BADARINATH, A.V.; RAO, M., K.; CHETTY, C. M. S.; RAMKANTH, S.; RAJAN, T. V. S.; GNANNAPRAKASH, K. A Review on In-vitro Antioxidant Methods: Comparisions, Correlations and Considerations. **International Journal of PharmTech Research**, v. 2, n. 2, p. 1276-1285, April-June, 2010.
- BARREIRO, E. J. Sobre a química dos remédios, dos fármacos e dos medicamentos. **Cadernos Temáticos de Química da Nova Escola**, n. 3, p. 4-9, 2001.
- BENTLEY, G.A.; NEWTON, S.H.; STARR, J. Evidence for an action of morphine and the enkephalins on sensory nerve endings in the mouse peritoneum. **British Journal of Pharmacology**, v.73, n. 2, p.325-332, 1981.
- BERNAYS, A; LUPI, R; BETTOLO, M; MASTROFRANCESCO, C; TAGLIATESTA, P. Antifeedant nature of the quinone primin and its quinol

miconidin from *Miconia* spp. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 40, p. 1110-1111, 2005.

BESSON, J. M. The neurobiology of pain. **The Lancet**, v. 353, n. 9164, p.1610–15, 1999.

BOBBIO, F. O.; BOBBIO, P. A.; DEGÁSPARI, C. H.. Anthocyanins from *Tibouchina grandiflora*. **Food Chemistry**, v. 18, p. 153-159, 1985.

BOMFIM-PATRÍCIO, M. C.; SALATINO, A.; MARTINS, A. B.; WURDACK, J. J.; SALATINO, M. L. F. Flavonoids of *Lavoisiera*, *Microlicia* and *Trembleya* (Melastomataceae) and their taxonomic meaning. **Biochemical Systematics and Ecology**. v. 29, p.711-726, 2001.

BRONDANI, D. J.; SILVA-FILHO, A. A.; LEITE, A. C. L.; MELO DO NASCIMENTO, C. R.; NETO, R. Síntese e avaliação da atividade antimicrobiana de análogos da primina 5 e 6 alquil-substituídos. **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 22, p. 217-221, 2003.

BRUSCHI, M. L.; FRANCO, S. L.; NOVELLO, C. R. Projeto de manipulação e desenvolvimento de medicamentos e correlatos a base de plantas na disciplina de farmacotécnica. In: Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil, 2000. Recife. **Anais.....** Recife – UFPE, 2000.

CAI, W.; GU, X.; TANG, J. Extraction, purification, and characterisation of the flavonoids from *Opuntia milpa alta* skin. **Czech Journal of Food Sciences**, v. 28, n. 2, 108–116, 2010.

CALDERÓN, A. L.; TERREAUX, C.; SCHENK, K.; PATTISON, P.; BURDETTE, J. E.; PEZZUTO, J. M.; GUPTA, M. P.; HOSTETTMANN, K. Isolation and structure elucidation of an isoflavone and a sesterterpenoic acid from *Henriettella fascicularis*. **Journal of Natural Products**, v. 65, p. 1949-1953, 2002.

CALIXTO, J. B. Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytotherapeutic agents). **Brazilian Journal of Medical and Biological Research.**, Ribeirão Preto, v. 33, n. 2, p. 179-189, 2000.

CECHINEL FILHO, V.; YUNES, R. A. Estratégias para a obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais. Conceitos sobre modificação estrutural para otimização da atividade. **Química Nova**, v. 21, n. 1, 1998.

CHATUVERDULA, V. S. P. ; JONES, Z. Gao; JONES, S. H.; FENG, X.; HECHT, S. M.; KINGSTON, D. G. I. A new ursane triterpene from *Monochaetum vulcanicum* that inhibits DNA polymerase lyase. **Journal of Natural Products**, v. 67, p. 899-901, 2004.

CLAUSING, G. & S. S. RENNER. Molecular phylogenetics of Melastomataceae and Memecylaceae: implications for character evolution. **American Journal of Botany**, n. 88, p. 486-498, 2001.

COLORADO, A.; MAYA, D. C.; GAMBA, S. J. D.; HIPÓLITO, J.; TAPIAS, L. J.; VELOZA, L. Â.; RAMÍREZ, L. S.. Flavonoides del extracto isopropanol-agua de *Tibouchina ciliaris* (Melastomataceae). **Scientia Et Technica**, v. 13, n. 33, p. 355-357, abr., 2007.

COLLIER, H.O.J.; DINNEEN, J.C.; JOHNSON, C.A.; SCHNEIDER, C.. The abdominal constriction response and its suppression by analgesic drugs in the mouse. **British Journal of Pharmacology and Chemotherapy**, v. 32, p. 295–310, 1968.

COOK, N. C.; SAMMAN, S. Flavonoids---Chemistry, metabolism, cardioprotective effects, and dietary sources. **Nutritional Biochemistry**, v. 7, p. 66-76, 1996.

CREVELIM, E. J.; TURATTI, I. C. C.; CROTTI, A. E. M.; VENEZIANI, R. C. S.; LOPES, J. L. C.; LOPES, N. P.; CUNHA, W. R. Identification of biologically active triterpenes and sterols present in hexane extracts from *Miconia* species using high-resolution gas chromatography. **Biomedical Chromatography**, v. 20, p. 827-830, 2006.

CRUZ, A. V. M.; KAPLAN, M. A. C. Estudo Comparativo do Perfil Químico e do Uso Popular de Espécies das Famílias Myrtaceae e Melastomataceae. **Rev. Flores. Amb.**, n. 11, p. 47-52, 2004.

CUNHA, W. R.; MARTINS, C.; FERREIRA, D. D.; CROTTI, A. F. M., ALBUQUERQUE, S. In vitro trypanocidal activity of triterpenes from *Miconia* species. **Planta Medica**, v. 69, p. 474-478, 2003.

DAVID, J. P. L.; NASCIMENTO, J. A. P.; DAVID, J. M. Produtos fitoterápicos: uma perspectiva de negócio para a indústria, um campo pouco explorado pelos farmacêuticos. **Infarma**, v. 16, n. 9-10, p. 71-76, 2004.

DE MAGALHÃES, P. M. **VII Jornada Paulista de Plantas Medicinais. Livro de Resumos e Programação**, 2005.

DIXON, R. A.; PASINETTI, G. M. Flavonoids and Isoflavonoids: From Plant Biology to Agriculture and Neuroscience. **Plant Physiology**, v. 154, p. 453-457, 2010.

ELIZABETSKY, E. Etnofarmacologia. **Ciência e Cultura**, v. 55, n. 3, p. 35-36, jul./ set., 2003.

FERREIRA, A. L. A.; MATSUBARA, L. S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Revista da Associação Médica Brasileira**, Botucatu, v. 43, n. 2, p. 61-68, 1997.

FIORENTINO, A.; D'ABROSCA, B.; PACIFICO, S.; GOLINO, A.; MASTELLONE, C.; ORIANO, P.; MONACO, P. Reactive Oxygen Species Scavenging Activity of Flavone Glycosides from *Melilotus neapolitana*. **Molecules**, v. 12, p. 263-270, 2007.

FONTENELE, J.B.; VIANA, G.S.B.; XAVIER-FILHO, J.; ALENCAR, J.W. Anti-inflammatory and analgesic activity of a water-soluble fraction from shark cartilage. **Brazilian Journal of Medicine and Biologic Research**., v. 29, p. 643–646, 1996.

FUNCH, L. S.; HARLEY, R.; FUNCH, R.; GIULIETTI, A. M.; MELO, E. de. **Plantas úteis da Chapada Diamantina**. São Carlos: RiMA, 2004.

GARCIA JÚNIOR, J. R.; PITHON-CURI, T.C.; CURI, R. Conseqüências do exercício para o metabolismo da glutamina e função imune. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**, v. 6, n. 3, p. 99-107, mai./jun., 2000.

GAHUKAR, R. T. Evaluation of plant-derived products against pests and diseases of medicinal plants: A review. **Crop Protection**, v. 42, p. 202-209, 2012.

GOLDENBERG, R.; REGINATO, M. Sinopse da família Melastomataceae na Estação Biológica de Santa Lúcia, Santa Teresa, Espírito Santo. **Boletim do Museu de Biologia Mello Leitão**, n. 20, p.33-58. dez. 2006.

GRAYER, R. J.; THABREW, M. I.; HUGHES, R. D.; BRETHERTON, S.; LEVER, A.; VEITCH, N. C.; KITE, G. C.; LELLI, R.; SIMMONDS, M. S. J. Phenolic and terpenoid constituents from the Sri Lankan medicinal plant *Osbeckia aspera*. **Pharmaceutical Biology**, v. 46, p. 154-161, 2008.

GROSS, J. H. **Mass spectrometry**: a textbook. Heidelberg, Germany: Springer Verlag, 2004. 518 p.

GUIMARÃES, P. J. F.; MARTINS, A. B. *Tibouchina* sect. *Pleroma* (D. Don) Cogn. (Melastomataceae) no estado de São Paulo. **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, V.20, n.1, p.11-33, jun. 1997.

HALLIWELL, B. Antioxidant: the basics - what they are and how to evaluate them. **Advances in Pharmacology**, v. 38, p. 3-20, 1996.

HARBORNE, J. B.; WILLIAMS, C. A. Advances in flavonoid research since 1992. **Phytochemistry**, v. 55, p. 481-504, 2000.

HEIM, K. E.; TAGLIAFERRO, A. R.; BOBILYA, T. J. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity Relationships. The **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 13, p. 572–584, 2002.

HEINZMANN, B. M.; BARROS, F. M. C. de. Potencial das plantas nativas brasileiras para o desenvolvimento de fitomedicamentos tendo como exemplo *lippia alba* (mill.) N. E. Brown (verbenaceae). **Saúde**, v. 33, n. 1, p 43-48, 2007.

HIROBE, C.; QIAO, Z.S.; TAKEYA, K.; ITOKAWA, H. Cytotoxic flavonoids from *Vitex agnus-castus*. **Phytochemistry**, v. 46, n. 3, p. 521-524, 1997.

HUNSKAAR, S. & HOLE, K. The formalin test in mice: dissociation between inflammatory pain. **Pain**, v. 30, p. 103-114, 1987.

INTA, A.; SHENGJI, P.; BALSLEV, H.; WANGPAKAPATTANAWONG, P.; TRISONTHI, C. A comparative study on medicinal plants used in Akha's traditional medicine in China and Thailand, cultural coherence or ecological divergence?. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 116, n. 3, p. 508-517, 2008.

INTERNATIONAL Association for the Study of Pain. (2013). Definição de Dor. http://www.iasp-pain.org/AM/Template.cfm?Section=Pain_Definitions

ISAZA, J. H.; ITO, H.; YOSHIDA, T. A flavonol glycoside-lignan ester and accompanying acylated glucosides from *Monochaetum multiflorum*. **Phytochemistry**, v. 58, p. 321-327, 2001.

IMAM, M. Z.; NAHAR, N.; AKTER, S.; RANA, MD. S. Antinociceptive activity of methanol extract of flowers of *Impatiens balsamina*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 142, p. 804-810, 2012.

JAMAL, C. M.; TAVARES, K. G.; RASLAN, D. S.; MIRAGLIA, M. C. M.; DUARTE, L.D.G. Isolation of constituents as analgesic agents from *Lavoisiera pulcherrima* DC (Melastomataceae). **Acta Horticulturae**, v. 501, p. 145-150, 1999.

JANG, D. S.; SU, B. N.; PAWLUS, A. D.; KANG, Y.; KARDONO, L. B. S.; RISWANN, S.; AFRIASTINI, J. J.; FONG, H. H. S.; PEZZUTO, J. M.; KINGHORN, A. D. Beccaridiol, na unusual 28-nortriterpenoid from the leaves of *Diplectria beccariana*. **Phytochemistry**, v. 67, p. 1832-1837, 2006.

JANNA, O. A.; KHAIRUL, A.K.; MAZIAH, M.. Anthocyanin stability studies in *Tibouchina semidecandra* L. **Food Chemistry**, v. 101, p. 1640-1646, 2007.

JULIUS, D.; BASBAUM, A. I. Molecular mechanisms of nociception. **Nature**, v. 413, n. 6852, p.203-210, 2001.

KALA, C. P. Ethnomedicinal botany of the Apatani in the Eastern Himalayan region of India. **Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine**, n. 1, p. 213-229, 2005.

KLAUMANN, P. R.; WOLK, A. F. P. F.; SILLAS, T. Patofisiologia da dor. **Archives of Veterinary Science**, v. 13, n.1, p.1-12, 2008.

KOSTER, R.; ANDERSON, M.; DE-BEER, E.J. Acetic acid analgesic screen. **Federation Proceedings**, v. 18, p. 418-420, 1959.

KUMAR, D.; KUMAR, A.; PRAKASH, O. Potential antifertility agents from plants: A comprehensive review. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 140, n. 1, p. 1-32, 2012.

KUSTER, R. M.; ARNOLD, N.; WESSJOHANN, L. Anti-fungal flavonoids from *Tibouchina grandifolia*. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 37, p. 63-65, 2009.

LEITE, T. C. C.; SENA, A. R. de; SILVA, T. R. dos S.; SANTOS, A. K. A. dos S.; UETANABARO, A. P. T.; BRANCO, A. Antimicrobial activity of *Marcetia DC* species (Melastomataceae) and analysis of its flavonoids by reverse phase-high performance liquid chromatography coupled-diode array detector. **Pharmacognosy Magazine**, v. 8, n. 31, p. 209-241, 2012.

LENT, R. **Cem Bilhões de Neurônios**: Conceitos Fundamentais de Neurociência. Atheneu, São Paulo, 2004.

LI, R.; GUOB, M.; ZHANGB, G., XUA, X.; LI, Q. Nicotiflorin reduces cerebral ischemic damage and upregulates endothelial nitric oxide synthase in primarily cultured rat cerebral blood vessel endothelial cells. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 107, p. 143-150, 2006.

LI, X. C.; JACOB, M. R.; PASCO, D. S.; ELSOHL, H. N.; NIMROD, A. C.; WALKER, L. A.; CLARCK, A. M. Phenolic compounds from *Miconia myriantha* inhibiting *Candida* aspartic proteases. **Journal of Natural Products**, v. 64, p. 1282-1285, 2001.

LIMA, O. G.; BETTOLO, G. B. M.; MONACHE, F. D.; COELHO, J. S. B.; D'ALBUQUERQUE, I. L.; MACIEL, G. M.; LACERDA, A.; MARTINS, D. G. Atividade antimicrobiana e antineoplásica de produto identificado como 2-metóxi-6-n-pentil-*p*-benzoquinona (primina) isolado de *Miconia sp* (Melastomataceae). **Revista do Instituto de Antibióticos UFPE**, v. 10, p. 29-34, 1970a.

LIMA, O. G.; BETTOLO, G. B. M.; MONACHE, F. D.; COELHO, J. S. B.; D'ALBUQUERQUE, I. L.; CAVALCANTI, M. S. B.; MARTINS, D. G.; OLIVEIRA, L. L. Primeiras observações sobre a atividade antimicrobiana e antineoplásica de produto identificado como 2-metóxi-6-n-pentil-1,4-dihidroxibenzeno (miconidina) isolada de extratos de raízes de *Miconia sp* (Melastomataceae). **Revista do Instituto de Antibióticos UFPE**, v. 10, p. 35-39, 1970b.

LING, S. K.; TANAKA, T.; KOUNO, I. New cyanogenic and alkyl glycoside constituents from *Phyllagathis rotundifolia*. **Journal of Natural Products**, v. 65, p. 131-135, 2002.

MA, Y.; VEDERNIKOVA, I.; HEUVEL, H. V. dan; CLAEYS, M. Internal glucose residue loss in protonated o-diglycosyl flavonoids upon low-energy collision-induced dissociation. **Journal of American Society for Mass Spectrometry**, v. 11, p. 136-144, 2000.

MA, Y.; CYUCKENS, F.; HUEVEL, H. V. DEN; CLAEYS, M. Mass spectrometric methods for the characterisation and differentiation of isomeric O-diglycosyl flavonoids. **Phytochemical Analysis**, v. 12, p. 159–165, 2001.

MACARI, P. A. T.; EMERECIANO, V. P.; FERREIRA, Z. M. G. S. Identificação de triterpenos de *Miconia albicans triana* através de análise por microcomputador. **Química Nova**, v. 13, p. 260-262, 1990.

MANCINI, E.; MARTINO, L. de; BELISARIO, M. A.; FEO, V. de. Flavonoids of *Miconia alypifolia* and their antioxidant activity. **Pharmacology online**, v. 2, p. 452-460, 2008.

MANIR, M.; KIM, J. K.; LEE, B. G.; MOON, S.S. Tea catechins and flavonoids from the leaves of *Camellia sinensis* inhibit yeast alcohol dehydrogenase. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 20, p. 2376-2381, 2013.

MATERSKA, M. Quercetin and its derivatives: chemical structure and bioactivity – a review. **Polish Journal of Food and Nutrition Sciences**, v. 58, n. 4, p. 407-413, 2008.

MAZURA, M. P.; SUSANTI, D.; RASADAH, M. A. Antiinflammatory action of components from *Melastoma malabathricum*. **Pharmaceutical Biology**, v. 45, p. 372-375, 2008.

MENDES, A. P. S.; BORGES, R. S.; CHAVES NETO, A. M. J.; MACEDO, N. G. M. de; SILVA, A. B. F. da. The basic antioxidant structure for flavonoids derivatives. **Journal of Molecular Modeling**, v. 18, n. 9, p. 4073-80, sep., 2012.

MEYER, F. S. **O gênero *Tibouchina* Aubl. (Melastomataceae) no estado do Paraná**. 2008.114p. Dissertação (Mestrado em Botânica) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2008.

MEYER, F. S.; GUIMARÃES, P. J. F.; KOZERA, C. Uma nova espécie de *Tibouchina* Aubl. (Melastomataceae), endêmica do Paraná, Brasil. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 33, n.2, p.265-269, abr.-jun. 2010.

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

MIMURA, M. R. M.; SALATINO, A.; SALATINO, M. L. F. Distribution of flavonoids and the taxonomy of *Huberia*. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 32, o. 27-34, 2004.

MONTENEGRO, H.; GONZALEZ, J.; ORTEGA-BARRIA, E.; CUBILLA-RIOS, L. Antiprotozoal Activity of Flavonoid Glycosides Isolated from *Clidemia sericea* and *Mosquitoxylon jamaicense*. **Pharmaceutical Biology**, v. 45, p. 376-380, 2007.

MOLEIRO, F. C.; ANDREO, A.; SANTOS, R. de C., MORAES, T. de M.; RODRIGUES, C. M.; CARLI, C. B.; LOPES, F. C.; PELLIZON, C. H.; CARLOS, I. Z.; BAUAB, T. M.; VILEGAS, W.; HIRUMA-LIMA, C. A. *Mouriri elliptica*: validation of gastroprotective, healing and anti-*Helicobacter pylori* effects. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 123, n. 3, p. 359-368, 2009.

MORIKAWA, T.; NINOMIYA, K.; ZHANG, Y.; YAMADA, T.; NAKAMURA, S.; MATSUDA, H.; MURAOKA, O.; HAYAKAWA, T.; YOSHIKAWA, M. Flavonol glycosides with lipid accumulation inhibitory activity from *Sedum sarmentosum*. **Phytochemistry Letters**, v. 53, p. 53-58, 2012.

MOTTA, E.V.S.; PINTO, N.C.C.; DUQUE, A.P.N.; MENDES, R. F.; BELLOZI, P.M.Q.; SCIO, E. Atividades antioxidante, antinociceptiva e anti-inflamatória das folhas de *Mucuna pruriens* (L.) DC. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.15, n. 2, p. 264-272, 2013.

MOTTA, L. B.; KRAUS, J. E.; SALATINO, A.; SALATINO, M. L.F. Distribution of metabolites in galled and non-galled foliar tissues of *Tibouchina pulchra*. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 33, p. 971-981, 2005.

MOURA, A. C. da S.; VILEGAS, W.; SANTOS, L. C. dos. Identificação de alguns constituintes químicos de *indigofera hirsuta* linn. (fabaceae) por CLAE-IES-EM (TOF) e avaliação da atividade antirradicalar. **Química Nova**, v. 34, n. 7, 1136-1140, 2011.

NASHIJIMA, C. M.; RODRIGUES, C. M.; SILVA, M. A.; LOPES-FERREIRA, M.; VILEGAS, W.; HIRUMA-LIMA, C. A. Anti-hemorrhagic activity of four brazilian vegetable species against *Bothrops jararaca* venom. **Molecules**, v. 14, n. 3, p. 1072-1082, 2008.

NEWSHAN, G.; STAATS, J. A.. Evidence-Based Pain Guidelines in HIV Care. **Journal of the Association of Nurses in AIDS Care**, v. 24, n. 1S, p. S112-S126, Jan./Feb., 2013.

NIJVELDT, R.J.; NOOD, E. v.; HOORN, D. E.C.V.; BOELEN, P. G.; NORREN, K.V.; LEEUWEN, P. A.M. V. Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 74, p. 417-425, 2001.

NOORI, S. An Overview of Oxidative Stress and Antioxidant Defensive System. **Open Access Scientific Reports**, v. 1, n. 8, p. 1-9, 2012.

ODONNE, G.; VALADEAU, C.; ALBAN-CASTILHO, J.; STIEN, D.; SAUVAIN, M.; BOURDY, G. Medical ethnobotany of the Chayahuita of the *Paranapura basin* (Peruvian Amazon). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 146, n. 1, p. 127-153, 2013.

OLIVEIRA, L. S. de; MUZITANO, M. F.; COUTINHO, M. A. S.; MELO, G. O. de; COSTA, S. S. Plantas Mediciniais como Recurso Terapêutico em Comunidade do Entorno da Reserva Biológica do Tinguá, RJ, Brasil – Metabólitos

Secundários e Aspectos Farmacológicos. **InterSciencePlace**, n. 17, p. 54-74, abr./jun., 2011.

OKUMURA, F.; SOARES, M. H. F. B.; CAVALHEIRO, É. T. G. Identificação de pigmentos naturais de espécies vegetais utilizando-se cromatografia em papel. **Química Nova**, v. 25, n. 4, p. 680-683, 2002.

PERRON, N. R.; BRUMAGHIN, J. L. A Review of the Antioxidant Mechanisms of Polyphenol Compounds Related to Iron Binding. **Cell Biochemistry and Biophysics**, n. 57, p. 75-100, 2009.

PINHEIRO, P. F.; JUSTINO, G. C. Structural Analysis of Flavonoids and Related Compounds – A Review of Spectroscopic Applications. **Phytochemicals – A Global Perspective of Their Role in Nutrition and Health**. Manhattan: Dr Venketeshwer Rao, 2012.

QUEIROZ, A. C. de; LIRA, D. P.; FREIRE, T. de L. M.; SOUZA, E. T. de; MATTA, C. B. B. da; AQUINO, A. B. de; SILVA, L. H. A. C.; SILVA, D. J. C. da; MELLA, E. A. C.; AGRA, M. de F.; BARBOSA FILHO, J. M.; ARAÚJO-JÚNIOR, J. X. de; SANTOS, B. V. de O.; ALEXANDRE-MOREIRA, M. S. The antinociceptive and anti-inflammatory activities of *Piptadenia stipulacea* Benth. (Fabaceae). **Journal of Ethnopharmacology**, v.128, p. 377-383, 2010.

RAJAKUMAR, N.; SHIVANNA, M.B. Ethno-medicinal application of plants in the eastern region of Shimoga district, Karnataka, India. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 126, n. 1, p. 64-73, 2009.

RAO, M. L.; SAVITHRAMMA, N. Phytochemical studies of *Svensonia hyderabadensis* (walp.) Mold: A rare medicinal plant. **Der Pharmacia Lettre**, v. 3, n. 4, p. 51-55, 2011.

REBOUÇAS JÚNIOR, J. P. **Avaliação da atividade antinociceptiva do veneno da serpente *Bothrops moojeni***. 2010. 81 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Fisiológicas) – Faculdade de Ciências Fisiológicas, Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza.

RENNER, S. S. Phylogeny and classification of the Melastomataceae and Memecylaceae. **Nordic Journal of Botany**, n. 13, p. 519-540, 1993.

RODRIGUES, J.; RINALDO, D.; SANTOS, L. C. dos; VILEGAS, W. An unusual C6-C6" linked flavonoid from *Miconia cabucu*. **Phytochemistry**, v. 68, p. 1781-1784, 2007.

RODRIGUES, J.; MICHELIN, D. C.; RINALDO, D.; ZOCCOLO, G. J.; CAMPNER DOS SANTOS, L.; VILEGAS, W.; SALGADO, H. R. N. Antimicrobial Activity of *Miconia* Species (Melastomataceae). **Journal of Medicinal Food**, v. 1, p. 120-126, 2008.

RODRIGUES, K. F. **A tribo Microlicieae (Melastomataceae) na serra do Cabral, Minas Gerais**. 2005. Campinas, 142p. Dissertação de Mestrado –

Programa de Pós-Graduação em Botânica, Universidade Estadual de Campinas.

RICE-EVANS, C. A.; MILLER, N. J.; PANGAGA, G. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 20, n. 7, p. 933-956, 1996.

RITTER, R. A.; MONTEIRO, M. V. B.; MONTEIRO, F. O. B.; RODRIGUES, S. T.; SOARES, M. L.; SILVA, J. C. R.; PALHA, M. das D. C.; BIONDI, G. F.; RAHAL, S. C.; TOURINHO, M. M. Ethnoveterinary knowledge and practices at Colares island, Pará state, eastern Amazon, Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 144, n. 2, p. 346-352, 2012.

ROSLAND J. H.; TJØLSEN, A.; MÆHLE, B.; HOLE, K. The formalin test in mice – effects of formalin concentration. **Pain**, v. 42, p. 235-242, 1990.

SÁ, P. G. S. de; GUIMARÃES, A. L.; OLIVEIRA, A. P. de; SIQUEIRA FILHO, J. A. de; FONTANA, A. P.; DAMASCENO, P. K. F.; BRANCO, C. R. C.; BRANCO, A.; ALMEIDA, J. R. G. da S. Fenóis totais, flavonoides totais e atividade antioxidante de *Selaginella convoluta* (Arn.) Spring (Selaginellaceae). **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 33, n.4, p. 561-566, 2012.

SAHA, S.; SUBRAHMANYAM, E. V. S.; KONDANGALA, C.; MANDAL, S. C.; SHASTRY, S. C. Evaluation of antinociceptive and anti-inflammatory activities of extract and fractions of *Eugenia jambolana* root bark and isolation of phytoconstituents. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 23, n. 4, p. 651-661, 2013.

SAMANTA, A.; DAS, G.; DAS, S. K. Roles of flavonoids in plants. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 6, p. 12-15, 2011.

SANTOS, A. K. A. **A família Melastomataceae: Tribo Melastomaeae Bartl. no município de Rio de Contas–Bahia, Brasil**. 2005. Feira de Santana, 150p. Dissertação de Mestrado – Programa de Pós-Graduação em Botânica, Universidade Estadual de Feira de Santana.

SANTOS, F. V.; TUBALDINI, F. R.; CÓLUS, I. M. R.; ANDRÉO, M. A.; BAUAB, T. M.; VILEGAS, C. Q.; LEITE, F.; VILEGAS, W.; VARANDA, E. A. Mutagenicity of *Mouriri pusa* Gardner and *Mouriri elliptica* Martius. **Food Chem. Toxic.**, v. 46, p. 2721-2727, 2008.

SANTOS, P. M.L. dos; SCHRIPEMA, J.; KUSTER, R. M. Flavonoides O-Glicosilados de *Croton campestris* St. Hill. (Euphorbiaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 15, n. 4, p. 321-325, out./dez., 2005.

SCHESTATSKY, P. Definição, diagnóstico e tratamento da dor neuropática. **HCPA**, v.28, n. 3, p.177-87, 2008.

SCHIEBER, A.; MIHALEVB, K.; BERARDINIA, N.; MOLLOVB, P.; CARLEA, R. Flavonol Glycosides from Distilled Petals of *Rosa damascena* Mill. **Zeitschrift für Naturforschung**, v. 60 c, p. 379-384, 2005.

SCHULMAN, J. M.; STRICHARTZ, G. R. Local Anesthetic Pharmacology. In: GOLAN, D. E.; TASHJIAN JUNIOR, A. H.; ARMSTRONG, E. J.; ARMSTRONG, A. W. **Principles of Pharmacology**: The pathophysiologic basis of drug therapy. 2nd Ed. Lippincott Williams & Wilkins: Baltimore, 2005.

SEGHIRI, R.; BOUMAZA, O.; MEKKIOU, R.; BENAYACHE, S.; MOSSET, P.; QUINTANA, J.; ESTÉVEZ, F.; LÉON, F.; BERMEJO, J.; BENAYACHE, F. A flavonoid with cytotoxic activity and other constituents from *Centaurea Africana*. **Phytochemistry Letters**, v. 2, p.114-118, 2009.

SERPELL, M. G.; MARKIN, A.; HARVEY, A. Acute pain physiology and pharmacological targets: The present and future. **Acute Pain**, v. 1, n. 3, p. 31-47, june, 1998.

SHARMA, H. K.; CHHANGTE, L.; DOLUI, A.K. Traditional medicinal plants in Mizoram, India. **Fitoterapia**, n. 72, p. 146-161, **2001**.

SILVA, C. V. da; AFFONSO, P.. Levantamento de *Tibouchina* Aubl. (Melastomataceae) no Parque Estadual da Serra do Mar – Núcleo Curucutu – São Paulo. **Revista do Instituto Florestal**, São Paulo, v. 17, n. 2, p. 195-206, dez. 2005.

SIMÕES, C. M. O. **Farmacognosia**: da planta ao medicamento. Porto Alegre: UFRGS/UFSC, 2004.

SOCIEDADE Brasileira para o Estudo da Dor (2013). Tipos de Dor. Retirado de: <http://www.dor.org.br/publico/classificacao.asp>

SOUSA, C. M. de M.; ROCHA E SILVA, H.; VIEIRA-JUNIOR, G. M.; AYRES, C. C.; COSTA, C. L. da C.; ARAÚJO, D. S.; CAVALCANTE; L. C. D.; BARROS, E. D. S.; ARAÚJO, P. B. de M.; BRANDÃO, M. S.; CHAVES, M. H. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 351-355, 2007.

SOUZA, L. M. de. **Aplicações da espectrometria de massas e da cromatografia líquida na caracterização estrutural de biomoléculas de baixa massa molecular**. 2008. 182 f. Tese (Doutorado em ciências) – Faculdade de Ciências, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2008.

SOUZA, M. L. D. R. Estudo taxonômico do gênero *Tibouchina* aubl. (Melastomataceae) no Rio Grande do Sul – Brasil. **Insula**, Florianópolis, v. 16, p. 3-108, 1986.

SPESSOTO, M. A.; FERREIRA, D. S.; CROTTI, A. E. M.; SILVA, M. L. A.; CUNHA, W. R. Evaluation of the analgesic activity of extracts of *Miconia rubiginosa* (Melastomataceae). **Phytomedicine**, v. 10, p. 606-609, 2003.

STEEDS, C. E. The anatomy and physiology of pain. **Surgery**, v. 31, n. 2, p. 49-53, feb., 2013.

STUBIECKI, M. Application of mass spectrometry for identification and structural studies of flavonoid glycosides. **Phytochemistry**, n. 54, p. 237-256, 2000.

SULAIMAN, M. R.; SOMCHIT, M.N.; ISRAF, D. A.; AHMAD, Z.; MOIN, S.. Antinociceptive effect of *Melastoma malabathricum* ethanolic extract in mice. **Fitoterapia**, v. 75, p. 667-672, 2004.

SULTANA, M.; VERMA, P. K.; RAINA, R.; PRAWEZ, S.; DAR, M. A. Quantitative analysis of total phenolic, flavonoids and tannin contents in acetone and n-hexane extracts of *ageratum conyzoides*. **International Journal of ChemTech Research**, v. 4, n. 3, p.996-999, 2012.

SUSANTI, D.; SIRAT, H. M.; AHMAD, F.; ALI, R. M.; AIMI, N.; KITAJIMA, M. Antioxidant and citotoxic flavonoids from the flowers of *Melastoma malabathricum*. **Food Chemistry**, v. 103, p. 710-716, 2007.

TABUTIA, J. R.S.; KUKUNDA, C. B.; WAAKOC, P. J. Medicinal plants used by traditional medicine practitioners in the treatment of tuberculosis and related ailments in Uganda. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 127, n. 1, p. 130-136, 2010.

TERAHARA, N.; SUZUKI, H.; TOKI, K.; KUWANO, H.; SAITO, N.; HONDA, T. A diacylated anthocyanin from *Tibouchina urvilleana* flowers. **Journal of Natural Products**, v. 56, p. 335-340, 1993.

TIAN, Y.; SUN, L.M.; LIU, X.Q.; LI, B.; WANG, Q.; DONG, J. X. Anti-HBV active flavone glucosides from *Euphorbia humifusa* Willd. **Fitoterapia**, v. 81, p. 799-802, 2010.

TJØLSEN, A.; BERGE O.G.; HUNSKAAR, S.; ROSLAND, J.H.; HOLE, K. The formalin test: an evaluation of the method. **Pain**, v. 51, p. 5–17, 1992.

TODZIA, C. A.; ALMEDA, F. A revision of *Tibouchina* section *Lepidotae* (Melastomataceae: Tibouchinae). **Proceedings of the California Academy of Sci.**, San Francisco, v. 47, p. 175-206, 1991.

TROJAN-RODRIGUES, M.; ALVES, T.L.S.; SOARES, G.L.G.; RITTER, M.R. Ritter. Plants used as antidiabetics in popular medicine in Rio Grande do Sul, southern Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 139, n. 1, p. 155-163, 2012.

TSIMOGIANNIS, D.; SAMIOTAKI, M.; PANAYOTOU, G.; VASSILIKI, O. Characterization of Flavonoid Subgroups and Hydroxy Substitution by HPLC-MS/MS. **Molecules**, v. 12, p. 593-606, 2007.

VOLP, A. C. P.; RENHE, I. R. T.; BARRA, K.; STRIGUETA, P. C. Flavonoides antocianinas: características e propriedades na nutrição e saúde. **Revista Brasileira de Nutrição Clínica**, v. 23, n. 2, p. 141-149, 2008.

VASCONCELOS, M. A. L.; ROYO, V. A.; FERREIRA, D. S.; CROTTI, A. E. M.; SILVA, M. L. A. E.; CARVALHO, J. C. T.; BASTOS, J. K.; CUNHA, W. R. In vivo analgesic and antiinflammatory activities of ursolic acid and oleanolic acid from *Miconia albicans* (Melastomataceae). **Journal of Biosciences**, v. 61, p. 477-482, 2006.

VENTURA, C. P.; SOUZA FILHO, J. D.; OLIVEIRA, A. B.; BRAGA, F. C. A flavanone and other constituents of the Brazilian endemic species *Trembleya laniflora* (D. Don.) Cogn. (Melastomataceae). **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 35, p. 40-41, 2007.

VIEIRA, P. C. Estratégias para o isolamento de princípios ativos de plantas. **VII Jornada Paulista de Plantas Medicinais. Livro de Resumos e Programação**, 2005.

VILEGAS, W.; CABRERA, A.; BERNARDI, A. C.; POZETTI, G. L.; BOER, C. E.; ALÉCIO, A. C.; ROCHA, A. B. Constituintes químicos de *Cambessedesia espora* DC (Melastomataceae). **Revista de Ciências Farmacêuticas**, v. 19, p. 235-241, 1998.

VITOR, A.O.; PONTE, E.L.; SOARES, P.M.; LIMA, R.C.S.; VASCONCELOS, S.M.M. Psicofisiologia da dor: uma revisão bibliográfica. **Revista Eletrônica de Comunicação, Informação & Inovação em Saúde**, v.2, n.1, p.87-96, 2008.

WAN, C.; ZHENG, X.; CHEN, H.; ZOU, X.; SONG, Z.; ZHOU, S.; QUI, Y. Flavonoid constituents from herbs of *Sarcopyramis bodinieri* var. *delicata*. **Zhongguo Zhong Yao Za Zhi**, v. 34, n. 2, p. 172-174, 2009.

WANG, D-M.; PU, W-J.; WANG, Y-H.; ZHANG, Y-J.; WANG, S-S. A New Isorhamnetin Glycoside and Other Phenolic Compounds from *Callianthemum taipaicum*. **Molecules**, v. 17, p. 4595-4603, 2012.

WIARTA, C.; MORANAA, S.; KHALIFAHB, S.; MAHANB, M.; ISMAILB, S.; BUCKLEA, M.; NARAYANAA, A.K.; SULAIMANC, M. Antimicrobial screening of plants used for traditional medicine in the state of Perak, Peninsular Malaysia. **Fitoterapia**, v. 75, n. 1, p. 68-73, 2004.

WANG, X. M.; WAN, C. P.; ZHOU, S. R.; QIU, Y. Antibacterial activity of *Melastoma candidum* D. Don. **Molecules**, v. 13, p. 1793-1798, 2008.

XI, Z.; CHEN, W.; WUC, Z.; WANG, Y.; ZENG, P.; ZHAO, G.; LI, X.; SUN, L. Anti-complementary activity of flavonoids from *Gnaphalium affine* D. Don. **Food Chemistry**, v. 130, p. 165-170, 2012.

YOSHIDA, Takashi; IKEDA, Yoshitaka; OHBAYASHI, Hideyuki; ISHIHARA, Koukichi; OHWASHI, Wakayo; SHINGU, Tetsuro; OKUDA, Takuo. Dimeric ellagitannins in plants of Melastomataceae. **Chemical Pharmaceutical Bulletin**, v. 34, n. 6, p. 2676—2679, 1986.

YOSHIDA, T.; HABA, K.; OHBAYASHI, H.; ISHIHARA, K.; OHWASHI, W.; OKANO, Y.; SHINGU, T.; OKUDA, T. (1991). Tannins and related polyphenols of Melastomataceous plants. I. Hydrolysable tannins from *Tibouchina semidecandra* Cogn. **Chemical Pharmaceutical Bulletin**, v. 39, p. 2233-2240, 1991_a.

YOSHIDA, T.; HABA, K.; OHBAYASHI, H.; ISHIHARA, K.; OHWASHI, W.; OKANO, Y.; SHINGU, T.; OKUDA, T. (1991). Tannins and related polyphenols of Melastomataceous plants. II. Nobotanins B, C and E, hydrolysable tannin dimmers and trimer from *Tibouchina semidecandra* Cogn. **Chemical Pharmaceutical Bulletin**, v. 39, p. 2264-2270, 1991_b.

YOSHIDA, T.; NAKATA, F.; HOSOTANI, K.; NITTA, A.; OKUDA, T. 1992. Tannins and related polyphenols of melastomataceous plants 04. Dimeric hydrolyzable tannins from *Melastoma malabathricum*. **Chemical Pharmaceutical Bulletin**, v. 40 p. 2829-2833, 1992.

YOSHIDA, T.; HABA, K.; NAKATA, F.; OKANO, Y.; SHINGU, T.; OKUDA, T. Tannins and related polyphenols of melastomataceous plants 03. Nobotanin G, nobotanin H and nobotanin J, dimeric hydrolyzable tannins from *Heterocentron roseum*. **Chemical Pharmaceutical Bulletin**, v. 40, p. 66-71, 1992_a.

YOSHIDA, T.; NAKATA, F.; HOSOTANI, K.; NITTA, A.; OKUDA, T. Tannins and related polyphenols of melastomataceous plants 5.3. New complex tannins from *Melastoma malabathricum*. **Chemical Pharmaceutical Bulletin**, v. 40, p. 1727-1732, 1992_b.

YOSHIDA, T.; NAKATA, T.; HOSOTANI, K.; NITTA, A.; OKUDA, T. Dimeric hydrolysable tannins from *Melastoma malabathricum*. **Phytochemistry**, v. 31, p. 2829-2833, 1992_c.

YOSHIDA, Takashi; AKAMURA, Yoshiaki; YOKURA, Nami; ITO, Hideyuki; ISAZA, José Hipólito; RAMIREZ, Stella; PELAEZ, Diana P.; RENNER, Sussane S.. Oligomeric hydrolysable tannins from *Tibouchina multifora*. **Phytochemistry**, v. 52, p. 1661-1666, 1999_a.

YOSHIDA, Takashi; NAKATA, Fumihisa; OKUDA, Takuo. Tannins and Related Polyphenols of Melastomataceous Plants. VIII.1) Nobotanins L, M and N, Trimeric Hydrolyzable Tannins from *Tibouchina semidecandra* **Chemical Pharmaceutical Bulletin**, v. 47, n. 6, p. 824—827, 1999_b.

YOSHIDA, T.; ITO, H.; ISAZA, J.H. Pentameric ellagitannin oligomers in melastomataceous plants-chemotaxonomic significance. **Phytochemistry**, v. 66, p. 1972-1983, 2005.

ZIELIŃSKA, M.; KOSTRRZEWA, A.; IGNATOWICZ, E.; BUDZIANOWSKI, J. The flavonoids, quercetin and isorhamnetin 3-O-acylglucosides diminish neutrophil oxidative metabolism and lipid peroxidation. **Acta Biochimica Polonica**, v. 48, n.1, p. 183-189, 2001.

ZIMMERMANN, M. Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. **Pain**, v. 16, p. 109-110, 1983.

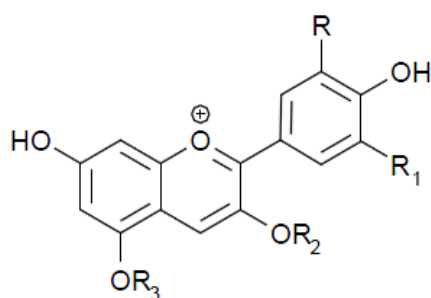
ZHANG, Z.; ELSOHL, H. N.; CONG LI, X.; KHAN, S. I.; BROEDEL, S. E.; RAULLI, R. E.; CIHLAR, R. L.; WALKER, L. A. Flavanone glycosides from *Miconia trailii*. **Journal of Natural Products**, v. 66, p. 39-41, 2003.

ANEXO 1

**ESTRUTURA QUÍMICA DOS COMPOSTOS IDENTIFICADOS NO
GÊNERO *Tibouchina***

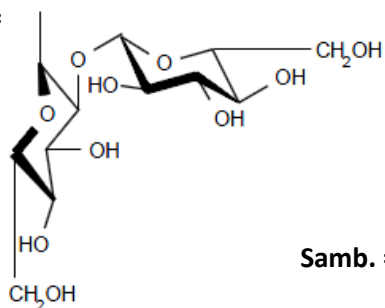
Tibouchina granulosa

(Bobbio *et al.*, 1985; Okomura *et al.*, 2002)

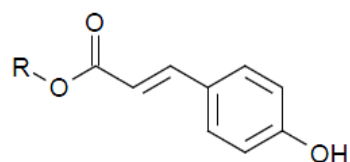


1	R = OCH₃	R₁ = H	R₂ = Sulf.	R₃ = H	Peonidina-3-sufurosídeo
2	R = OCH₃	R₁ = OCH₃	R₂ = Glicose	R₃ = Glicose	Malvidina-3,5-diglicosídeo
3	R = OCH₃	R₁ = OCH₃	R₂ = Coum. – Samb.	R₃ = Glicose	Malvidina-3-(<i>p</i>- coumaroil)- sambubiosídeo-5- glicosídeo
4	R = OCH₃	R₁ = H	R₂ = H	R₃ = Samb.	Peonidina-5- sambubiosídeo
5	R = OCH₃	R₁ = H	R₂ = H	R₃ = H	Peonidina
6	R = H	R₁ = H	R₂ = H	R₃ = H	Pelargonidina

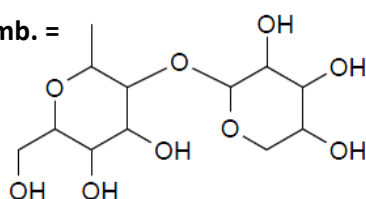
Sulf. =



Coum. =

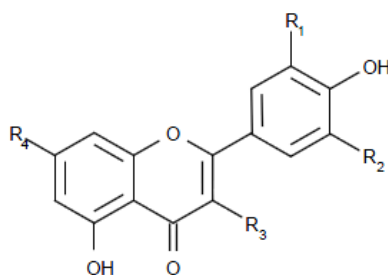


Samb. =



Tibouchina pulchra

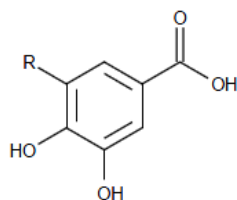
(Motta *et al.*, 2005)



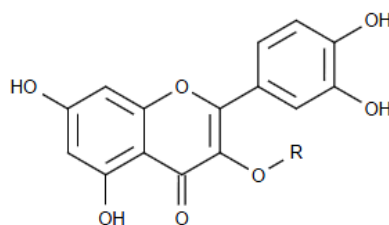
7	R₁= OH	R₂= H	R₃= H	R₄=O-galactose	Luteolina 7-O-galactosídeo
8	R₁= H	R₂= H	R₃=OH	R₄= OH	Canferol
9	R₁= H	R₂= H	R₃= O-galactose	R₄= OH	Canferol 3-O-galactosídeo
10	R₁= H	R₂= H	R₃= O-glicose	R₄= OH	Canferol 3-O-glicosídeo
11	R₁= OH	R₂= H	R₃= OH	R₄= OH	Quercetina
12	R₁= OH	R₂= H	R₃= O-arabinose	R₄= OH	Quercetina 3-O-arabinosídeo
13	R₁= OH	R₂= H	R₃= O-galactose	R₄= OH	Quercetina 3-O-galactosídeo
14	R₁= OH	R₂= H	R₃= O-ramnose	R₄= OH	Quercetina 3-O-ramnosídeo
15	R₁= OH	R₂= OH	R₃= OH	R₄= OH	Miricetina
16	R₁= OH	R₂= OH	R₃= O-galactose	R₄= OH	Miricetina 3-O-galactosídeo
17	R₁= OH	R₂= OH	R₃= O-ramnose	R₄= OH	Miricetina 3-O-ramnosídeo

***Tibouchina grandifolia* Cogn.**

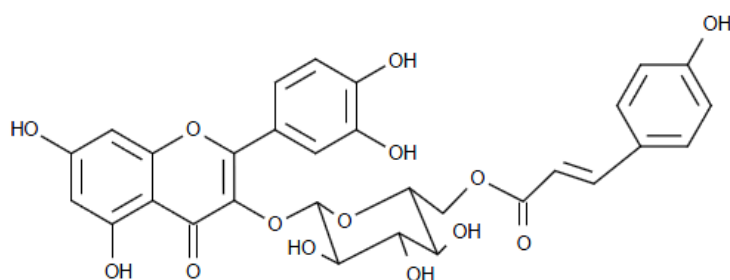
(Kuster *et al.*, 2009)



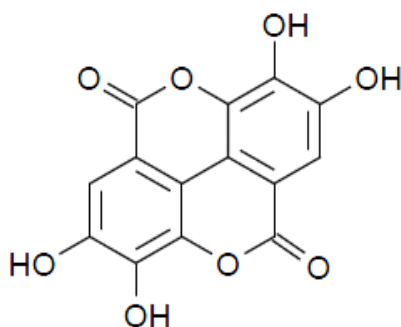
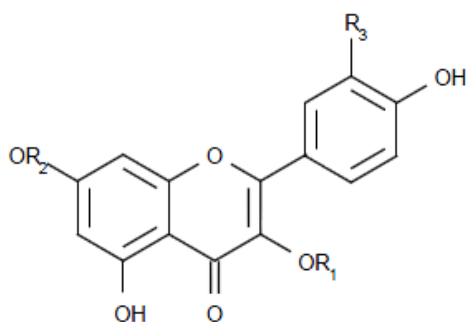
18	Ácido protocatéico	R = H
19	Ácido Gálico	R = OH



20	R = Ácido glicurônico	Quercetina 3-O-β-D-glicuronídeo
21	R = Glicose	Quercetina 3-O-β-D-glicopiranosídeo
22	R = Galactose	Quercetina 3-O-β-D-galactopiranosídeo
23	R = Ácido glicurônico	Quercetina 3-O-α-L-glicuronídeo
24	R = Ramnose	Quercetina 3-O-α-L-ramnopiranosídeo
25	R = Arabinose	Quercetina 3-O-β-L-arabinopiranosídeo



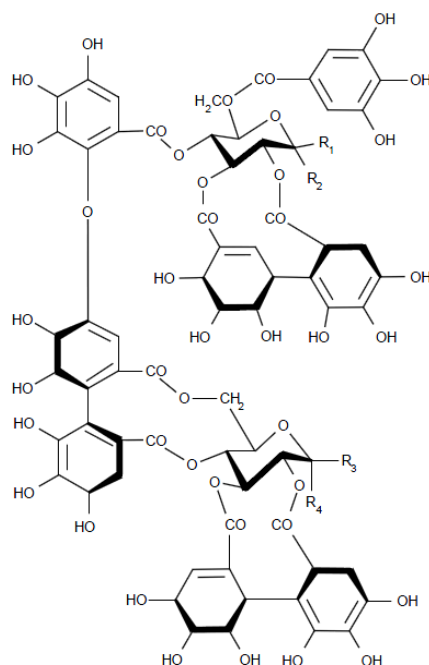
26	Quercetina-3-O-β-D-(6''-E-p-coumaroil)-glicopiranosídeo
-----------	--

Tibouchina ciliaris(Colorado *et al.*, 2007)**27 Ácido Elágico**

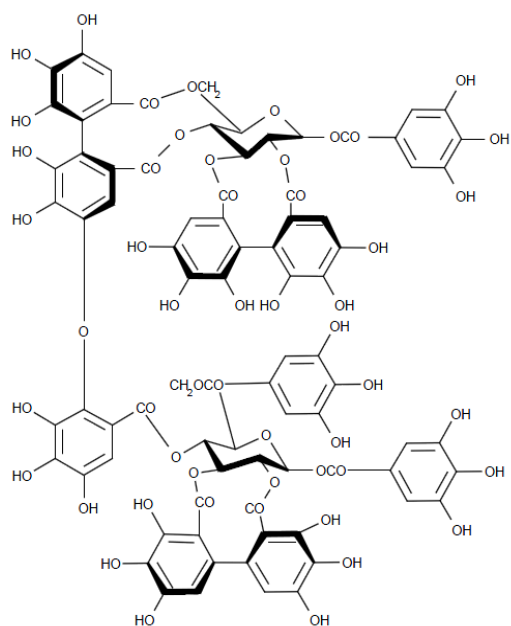
28	R₁ = H	R₂ = coumaroil	R₃ = H	Canferol 7-<i>O</i>-<i>p</i>-coumaroil
29	R₁ = H	R₂ = H	R₃ = ramnose	Quercetina 3'-<i>O</i>-ramnosídeo

Tibouchina semidecandra Cogn.

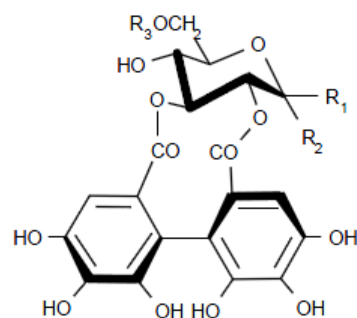
(Yoshida *et al.*, 1986)



Nobotanino A		Nobotanino F	
30	$R_1 = H$	33	$R_1 = O\text{-galloil}$
	$R_2 = OH$		$R_2 = H$
	$R_3 = O\text{-galloil}$		$R_3 = O\text{-galloil}$
	$R_4 = H$		$R_4 = H$



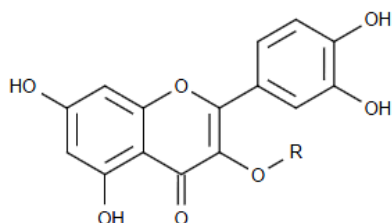
31 Nobotanino B



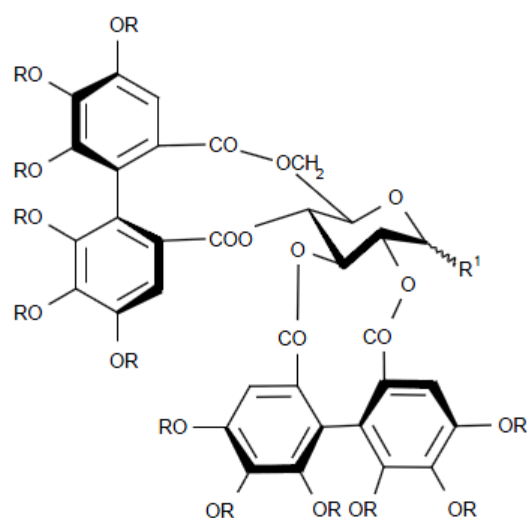
32 Nobotanino D
 $R_1 = O\text{-galloil}$
 $R_2 = H$
 $R_3 = \text{Galloil}$

Tibouchina semidecandra Cogn.

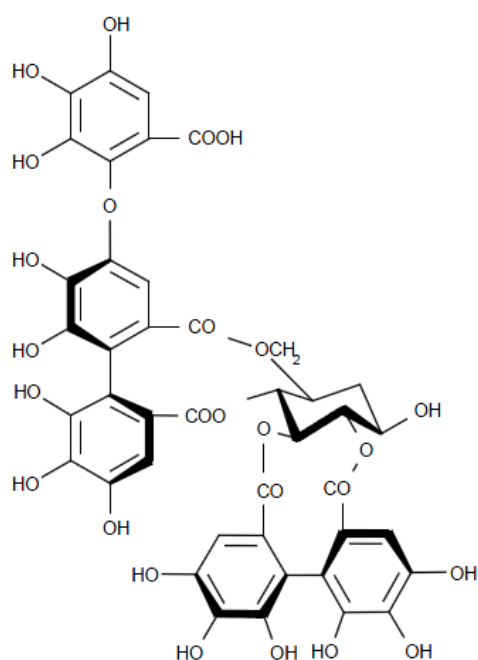
(Yoshida *et al.*, 1991_a)



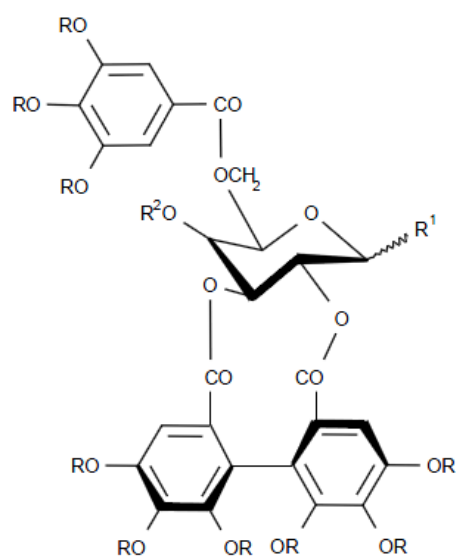
34	R = Galoil-Galactose	Quercetina 3-O-(6''-galoil) – galactosídeo
35	R = arabinose	Quercetina 3-O-arabinosídeo



36	R = H	R¹ = OH	Pedunculagina
37	R = H	R¹ = (β)-O-Galoil	Casuarictina



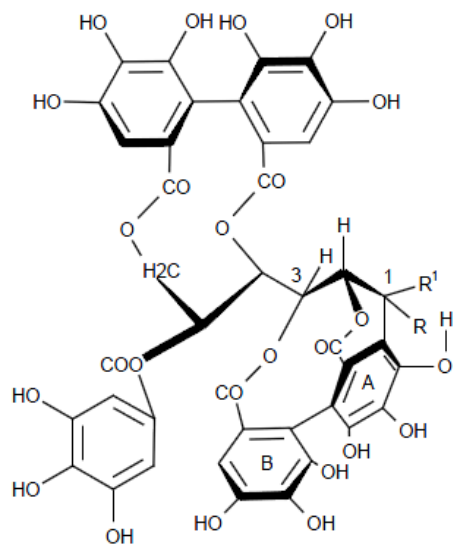
38 Praeconxina A



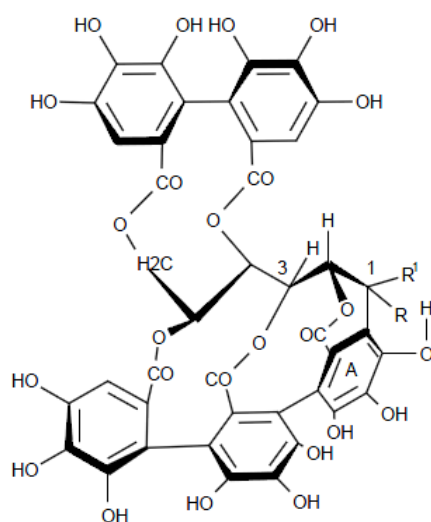
39	R = H	R¹ = OH	R² = Galoil	Praenconxina B
40	R = H	R¹ = OH	R² = H	6-O-galoil-2,3-O-(S)-hexahidroxidifenoil-D-glicose

Tibouchina semidecandra Cogn.

(Yoshida *et al.*, 1991_a)



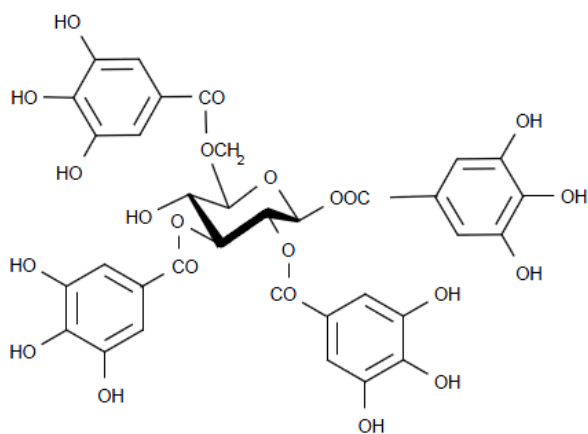
41 R = H R¹ = OH **Casuarinina**



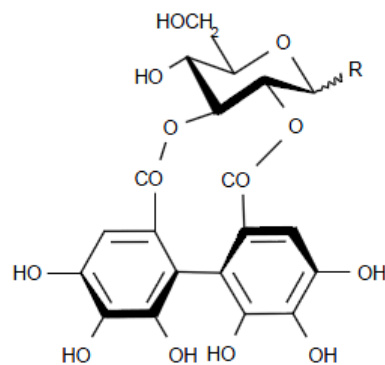
42 R = OMe R¹ = H **Metilvescalagina**

45 R = H R¹ = OH **Castalagina**

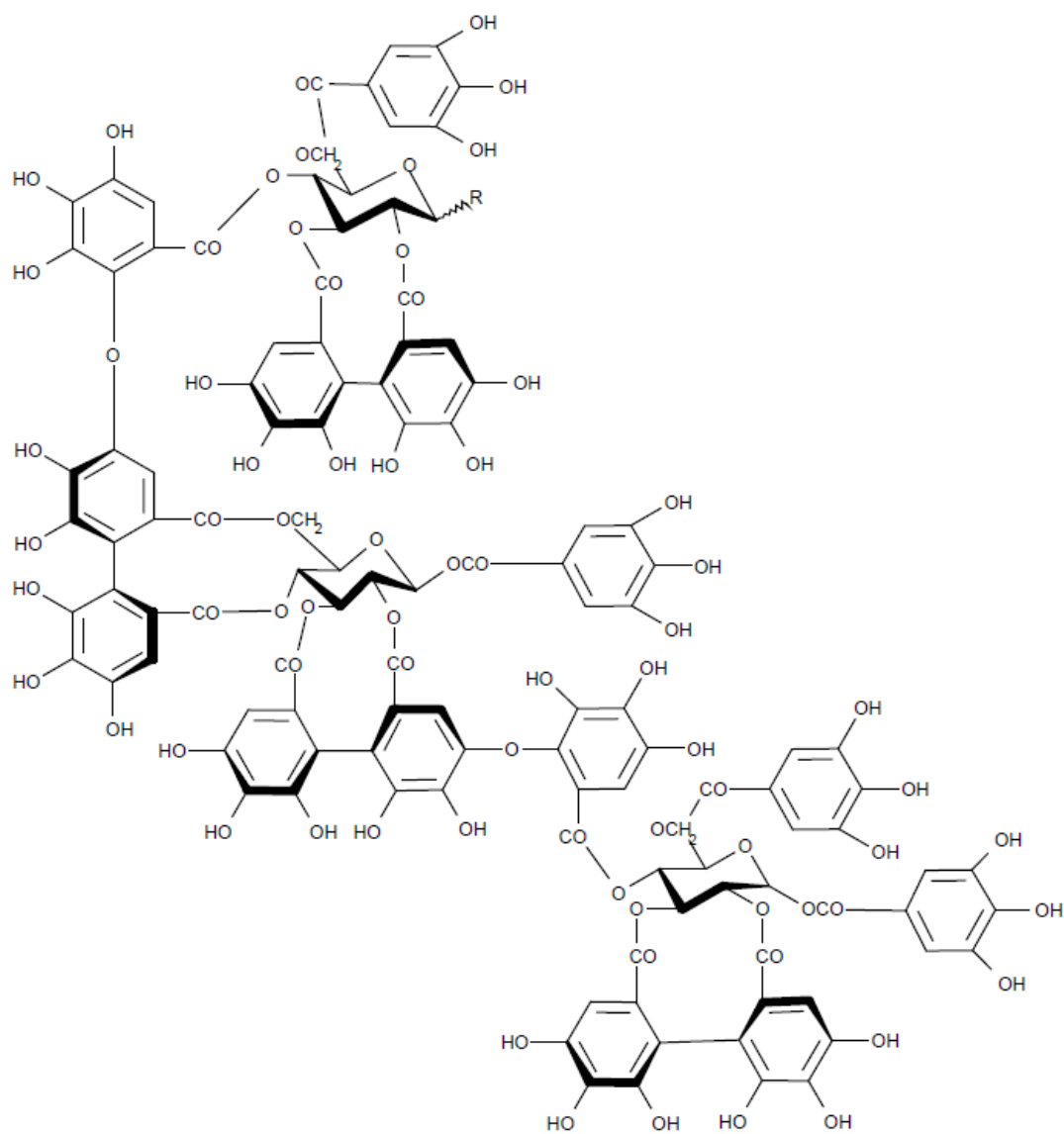
46 R = OH R¹ = H **Vescalagina**



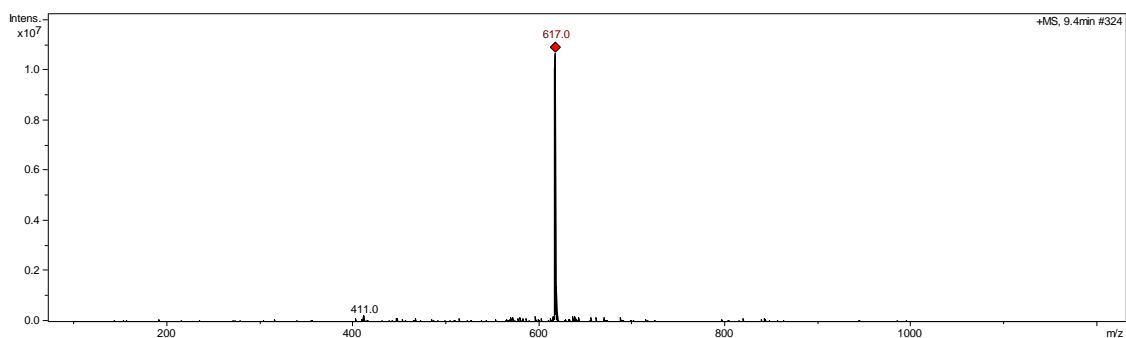
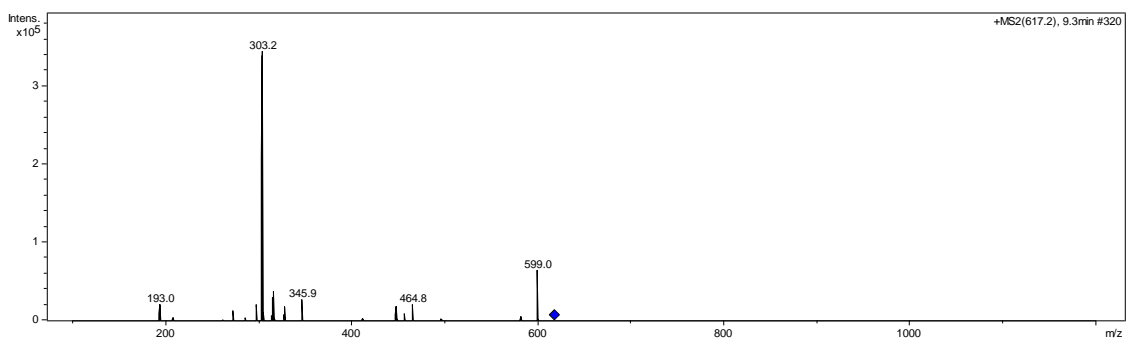
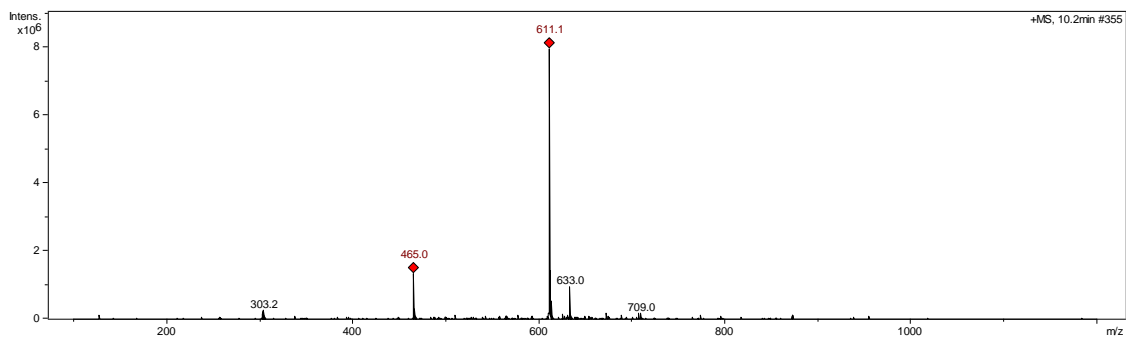
43 1,2,3,6-tetra-O-galloyl-β-D-glucose



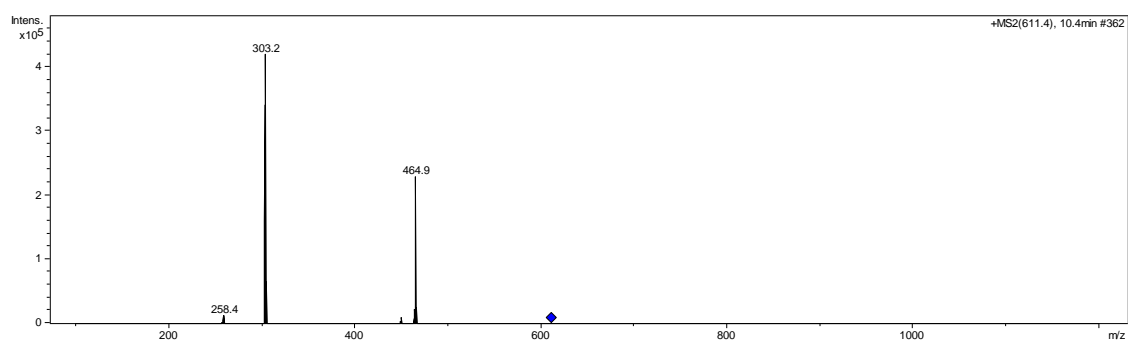
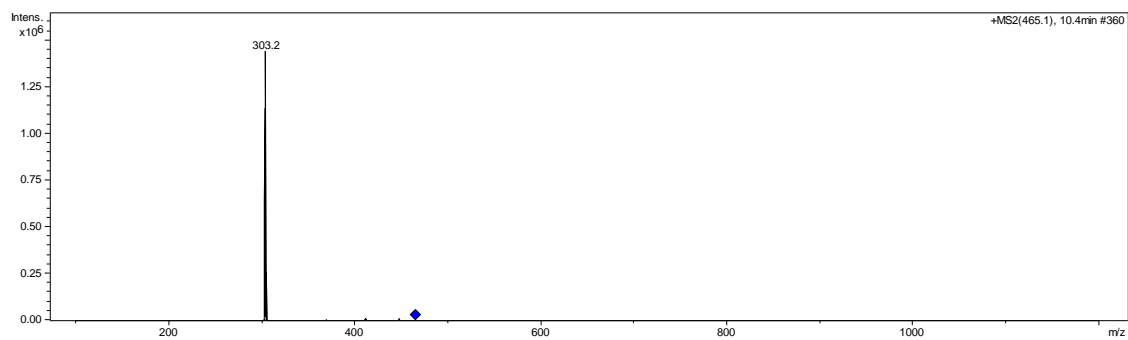
44 R = OH 2,3-O-(S)-hexahidroxidifenil
-D-glucose

Tibouchina semidecandra Cogn.(Yoshida *et al.*, 1991_b)

47	R = OH	Nobotanino C
48	R = (β)-O-Galoil	Nobotanino E

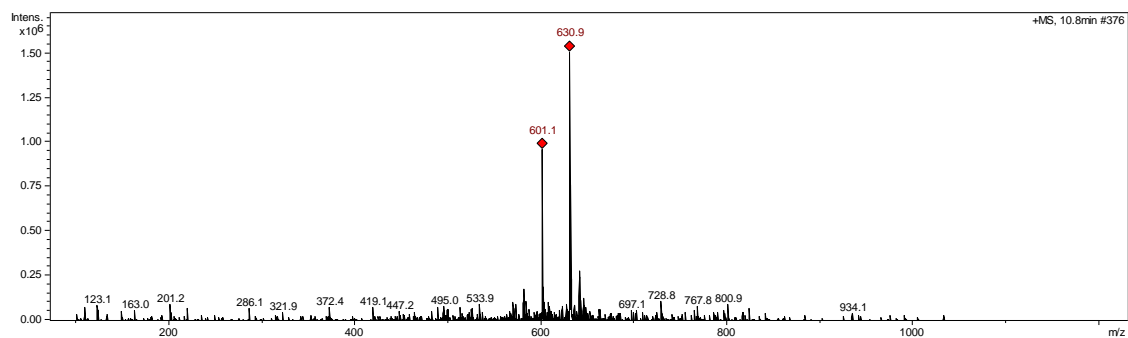
ANEXO 2**ESPECTRO DE MASSAS DA FRAÇÃO FFTP****1. ESPECTRO DE MASSAS DO PICO 1 ($T_{RET}= 9,4$ MIN)****1.1. Espectro de massas de primeira ordem (EM)****1.2. Espectro de massas de segunda ordem (EM/EM)****2. ESPECTRO DE MASSAS DO PICO 2 ($T_{RET}= 10,2$ MIN)****2.1. Espectro de massas de primeira ordem (EM)**

2.2. Espectro de massas de segunda ordem (EM/EM)

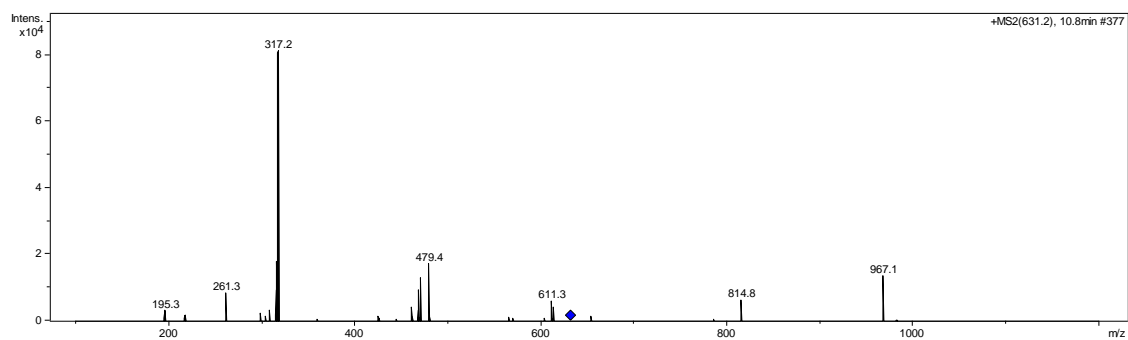


3. ESPECTRO DE MASSAS DO PICO 3 ($T_{RET} = 10,8$ MIN)

3.1. Espectro de massas de primeira ordem (EM)

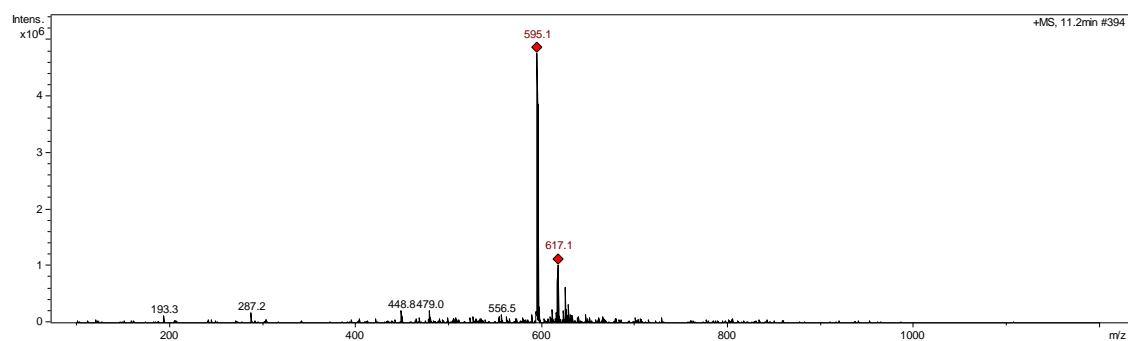


3.2. Espectro de massas de segunda ordem (EM/EM)

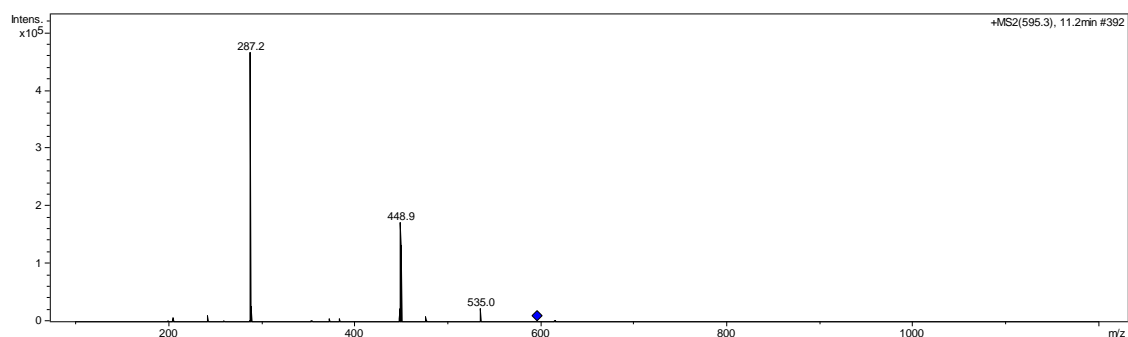


4. ESPECTRO DE MASSAS DO PICO 4 ($T_{\text{RET}} = 11,2$ MIN)

4.1. Espectro de massas de primeira ordem (EM)

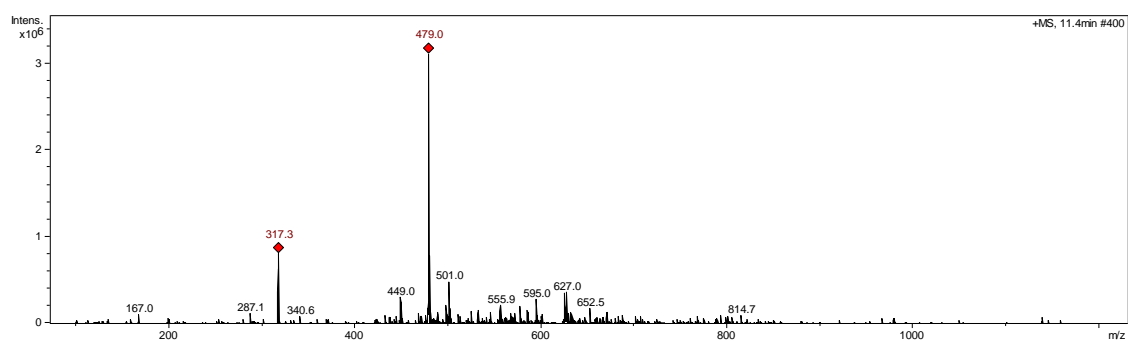


4.2. Espectro de massas de segunda ordem (EM/EM)

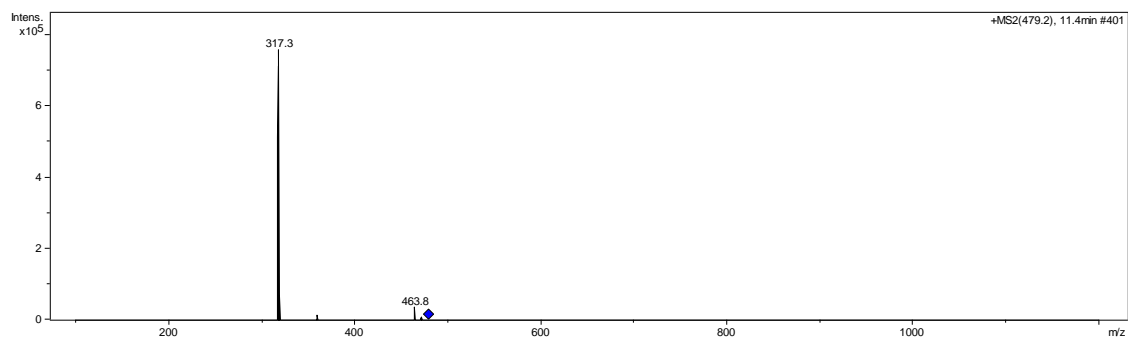


5. ESPECTRO DE MASSAS DO PICO 5 ($T_{\text{RET}} = 11,4$ MIN)

5.1. Espectro de massas de primeira ordem (EM)

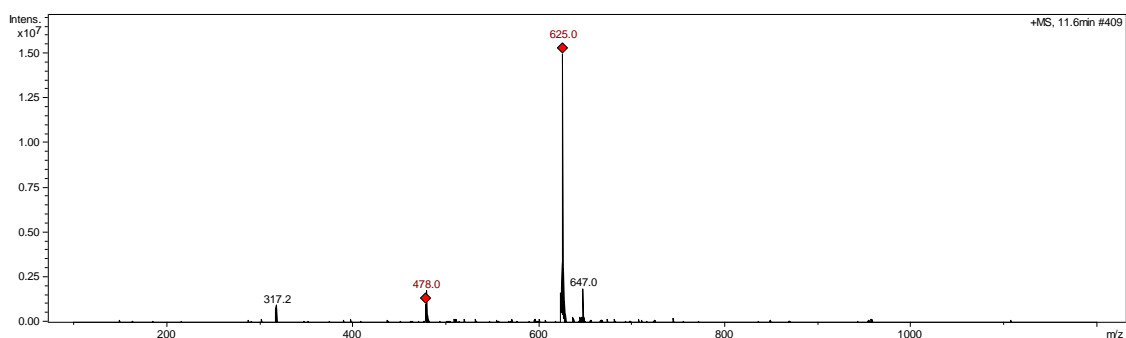


5.2. Espectro de massas de segunda ordem (EM/EM)

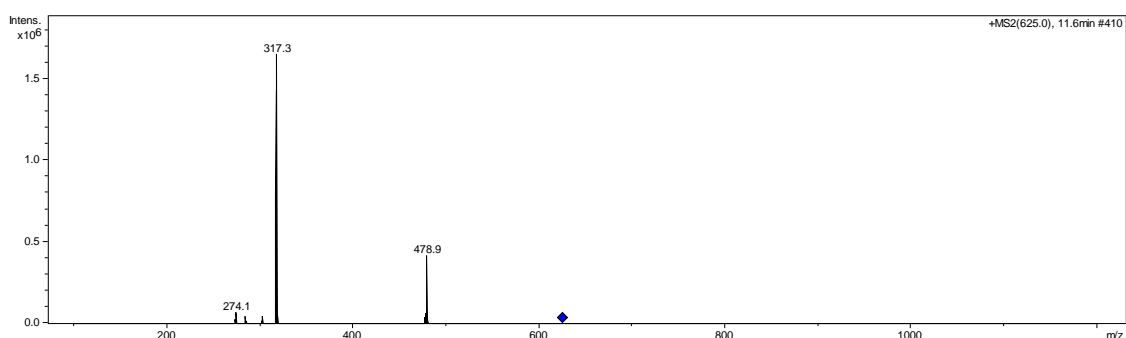


6. ESPECTRO DE MASSAS DO PICO 6 ($T_{\text{RET}} = 11,6$ MIN)

6.1. Espectro de massas de primeira ordem (EM)

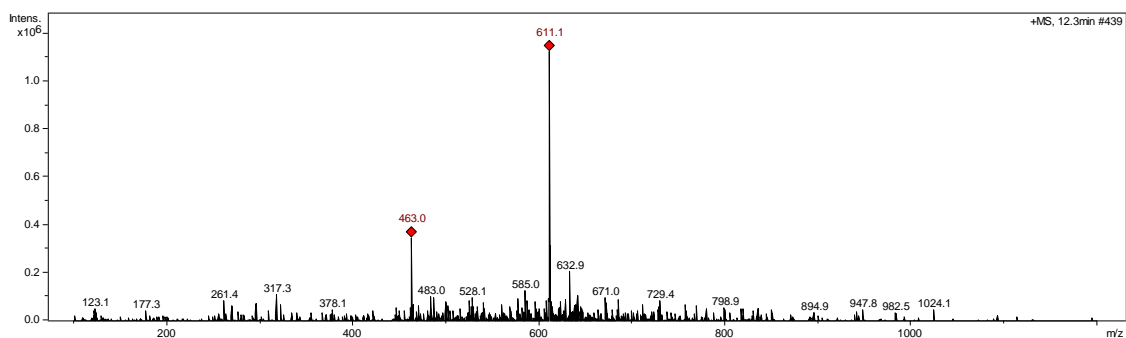


6.2. Espectro de massas de segunda ordem (EM/EM)

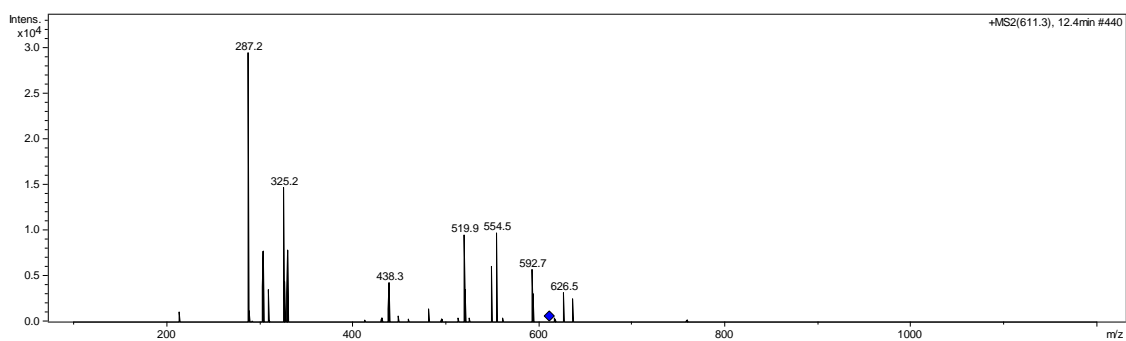


7. ESPECTRO DE MASSAS DO PICO 7 ($T_{\text{RET}} = 12,3$ MIN)

7.1. Espectro de massas de primeira ordem (EM)

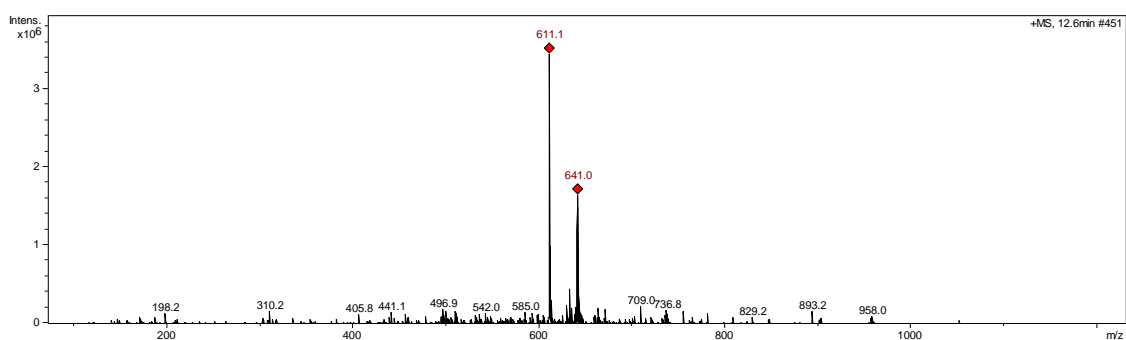


7.2. Espectro de massas de segunda ordem (EM/EM)

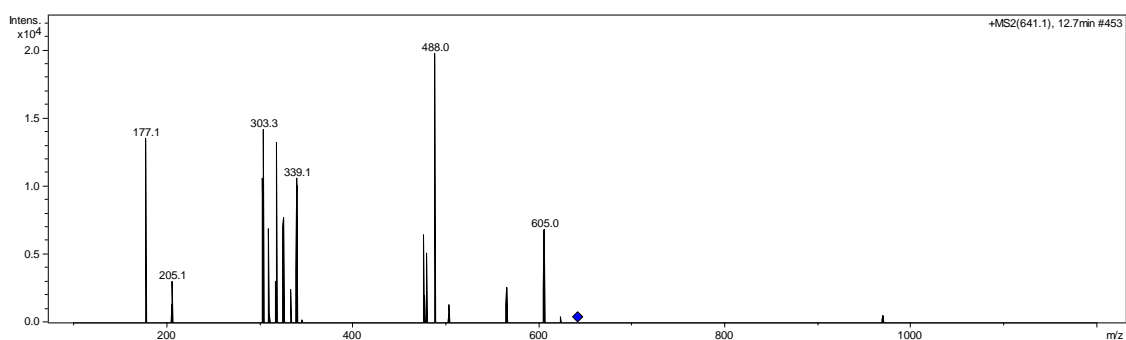
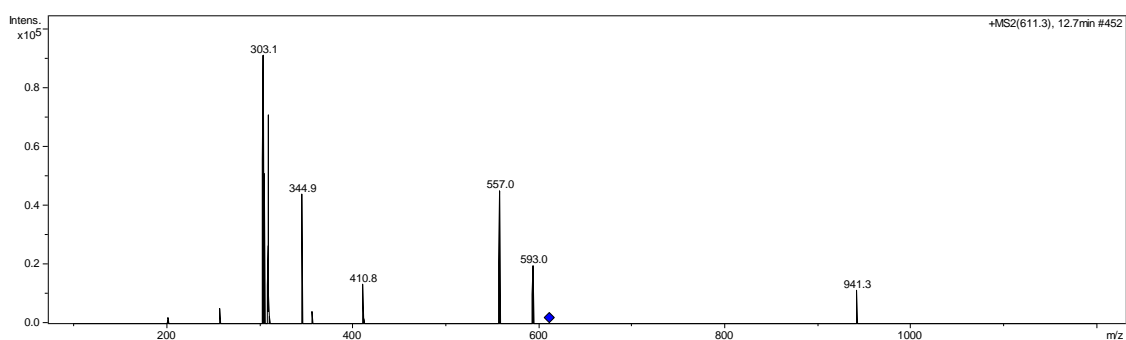


8. ESPECTRO DE MASSAS DO PICO 8 ($T_{\text{RET}} = 12,6$ MIN)

8.1. Espectro de massas de primeira ordem (EM)

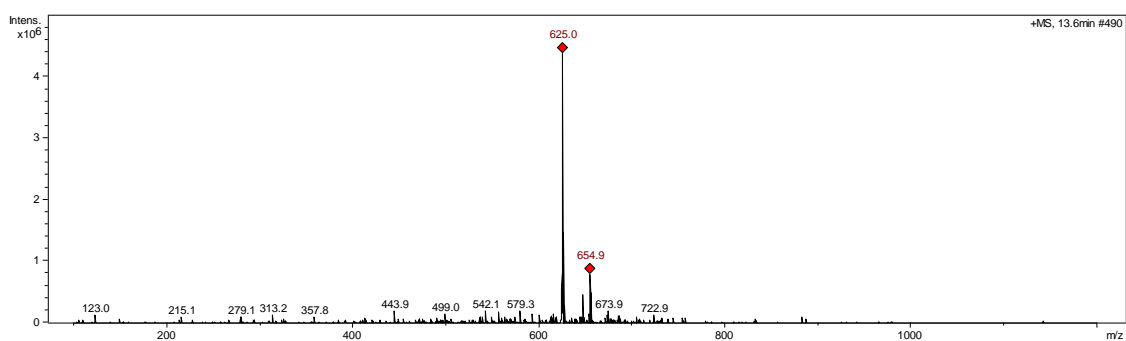


8.2. Espectro de massas de segunda ordem (EM/EM)

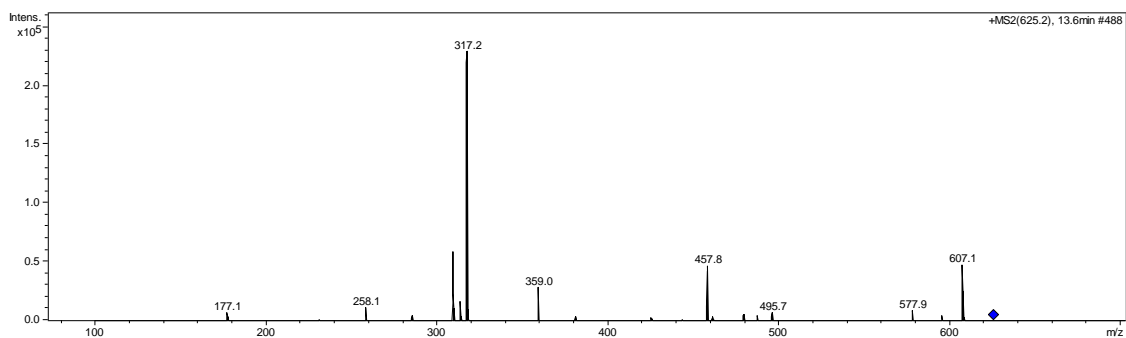


9. ESPECTRO DE MASSAS DO PICO 9 ($T_{\text{RET}} = 13,6$ MIN)

9.1. Espectro de massas de primeira ordem (EM)

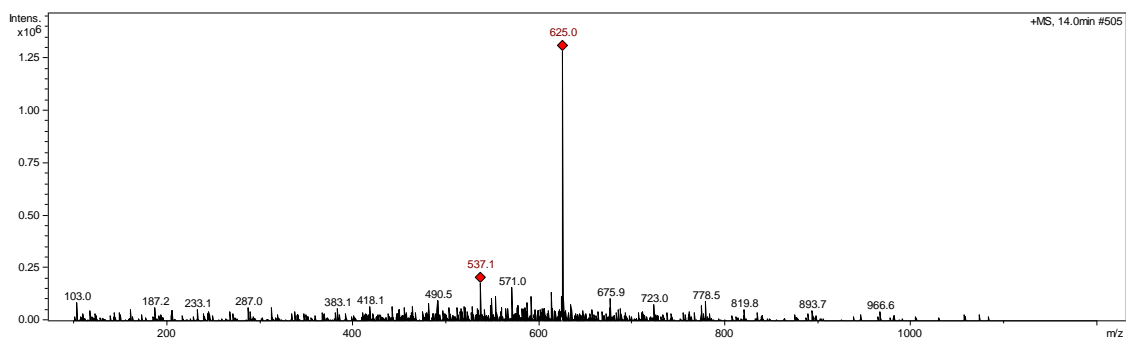


9.2. Espectro de massas de segunda ordem (EM/EM)



10. ESPECTRO DE MASSAS DO PICO 10 (T_{RET} = 14,0 MIN)

10.1. Espectro de massas de primeira ordem (EM)



10.2. Espectro de massas de segunda ordem (EM/EM)

