

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PAMPA
CAMPUS URUGUAIANA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**AVALIAÇÃO PRELIMINAR *in vitro* DO POTENCIAL ANTIOXIDANTE E DA
TOXICIDADE DE *Ceiba speciosa* (A. St.-Hill) Ravenna (PAINEIRA)**

AUTOR:

CAMILA KRÜGER CARDOSO MALHEIROS

ORIENTADORA:

PROF^a. DR^a. FABIANE MOREIRA FARIAS

URUGUAIANA, AGOSTO DE 2014.

CAMILA KRÜGER CARDOSO MALHEIROS

AVALIAÇÃO PRELIMINAR *in vitro* DO POTENCIAL ANTIOXIDANTE E DA
TOXICIDADE DE *Ceiba speciosa* (A. St.-Hill) Ravenna (PAINEIRA)

Dissertação de Mestrado apresentado junto ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Pampa, como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Fabiane Moreira Farias

Uruguiana, 2014

MALHEIROS, CAMILA KRÜGER CARDOSO.
AVALIAÇÃO PRELIMINAR DO POTENCIAL ANTIOXIDANTE E
DA TOXICIDADE *in vitro* DE *Ceiba Speciosa* (A. ST.-HILL)
RAVENNA (PAINEIRA)
40 páginas

Dissertação (Mestrado)
Universidade Federal do Pampa,
Agosto de 2014. Orientação:
Professora Doutora Fabiane Moreira
Farias

1. Antioxidante. 2. *Ceiba speciosa*.
3. Antioxidante. I. FARIAS,

CAMILA KRÜGER CARDOSO MALHEIROS

AVALIAÇÃO PRELIMINAR DO POTENCIAL ANTIOXIDANTE E DE TOXICIDADE DE
Ceiba speciosa (A. St.-Hill) Ravenna (PAINEIRA)

Dissertação de Mestrado apresentado junto ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Pampa, como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Dissertação defendida e aprovada em: 07 de agosto de 2014.

Banca examinadora:

Prof^a. Dr^a. Fabiane Moreira Farias

Orientadora

UNIPAMPA

Prof. Dr. Claiton Leonetti Lencina

UFPel

Prof^a. Dra^a. Jacqueline da Costa Escobar Piccoli

UNIPAMPA

Dedico este trabalho à minha família, meus maiores exemplos de virtude e eternos incentivadores de todas as minhas conquistas. Em especial, ao meu esposo Rafael, por toda a compreensão, apoio e amor de cada dia.

AGRADECIMENTO

Primeiramente, agradeço a Deus por estar sempre amparando meus passos e guiando meu caminho. Agradeço a Ele, principalmente, por ter juntado a mim nessa jornada pessoas maravilhosas com quem eu sempre poderei contar e confiar.

Agradeço ainda, com todo amor de meu coração, aos meus pais, Raimundo e Viviani, por me proporcionar a melhor família que alguém poderia ter. Por serem, sempre, os maiores exemplos que eu tive. Por todo o esforço, dedicação, e amor. Por serem os pais que um dia eu pretendo ser para os meus filhos. Não importa quantos agradecimentos eu faça, nunca chegarei próximo ao tanto que vocês merecem. Amo muito vocês!

À minha irmã, Carolina e meu cunhado Matheus: obrigada por serem nossos melhores amigos. O laço fraterno que nos une está muito além desta vida. Por ser a maior prova de que, muito mais que um amigo, um irmão é a certeza de que nunca estamos sozinhos, e por isso teremos alguém para contar em todas as horas. Amo vocês!

Ao meu esposo Rafael: eu nunca encontrarei palavras que descrevam suficientemente o que tu representas em minha vida. Meu companheiro, meu melhor amigo, meu porto seguro. Obrigada por estar ao meu lado “na alegria e na tristeza, na saúde e na doença”. Por compreender todas as minhas ausências, todas as variações de humor, e todas as subjetividades que envolvem o desenvolvimento de uma dissertação de mestrado. Obrigada por iluminar meu caminho e compartilhar mais esta existência de crescimento e aprendizado ao meu lado. Te amo para “todos os sempre”!

À minha orientadora, Prof^ª. Dr^ª. Fabiane Farias, por ter construído comigo muito mais do que uma dissertação de mestrado. Por ter construído uma relação de carinho, amizade e admiração que levarei comigo eternamente! Obrigada pela paciência e pela dedicação no desenvolvimento desta tarefa. Ao final desta atividade, tenho a certeza de que a nossa construção irá muito além deste trabalho.

Às minhas queridas colegas de mestrado, por tornar prazerosa cada atividade de sala de aula, e pela construção da amizade que levaremos conosco por toda a vida. Obrigada por estes dois anos de amizade e convivência!

Ao grupo de pesquisa NUBIOTOXIM, especialmente à colega Camila, por todo o auxílio na prática do laboratório, e aos professores Michel e Luis Flavio. Aos professores, mais uma vez repito que todo o agradecimento que eu posso fazer não seria o suficiente. Muito mais do que por abrir as portas do seu laboratório, eu gostaria de agradecer por todo o tempo dispensado em meu auxílio, na solução não só dos experimentos realizados em parceria, mas de forma direta na construção e finalização deste trabalho. Muito obrigada, por tudo!

Ao Laboratório BIOTECH, em especial à colega Aryele pelo auxílio prático e teórico, e a professora Francielli Cibir. Obrigada por toda a disponibilidade e, principalmente, pelo inesquecível acolhimento com que fui recebida.

Finalizando, agradeço à Fundação de Amparo à Pesquisa do Rio Grande do Sul (FAPERGS) pelo apoio financeiro durante este período.

O mundo é a oficina. O corpo é a ferramenta.
A existência é a oportunidade. O dever a
executar é a missão a cumprir.

Emmanuel

RESUMO

As pesquisas no desenvolvimento de fármacos a partir de plantas têm apresentado resultados promissores para as mais diversas doenças. *Ceiba speciosa* A. St. Hill (paineira) é uma espécie arbórea tropical pertencente à família Malvaceae, que no Rio Grande do Sul ocorre principalmente na região de floresta do Alto Uruguai. Existem relatos populares de utilização do chá das cascas desta espécie na região noroeste do Rio Grande do Sul – Brasil, para a redução dos níveis sanguíneos de colesterol. Contudo, ainda não foram encontrados dados científicos sobre a confirmação da eficácia e segurança de seus efeitos, tampouco dados fitoquímicos acerca da espécie. A literatura apresenta estudos sobre outras espécies do gênero *Ceiba*, sendo que *Ceiba pentandra*, empregada como agente hipoglicêmico, representa a espécie mais investigada. Dessa forma, este trabalho teve por objetivo realizar uma avaliação preliminar do potencial antioxidante e da toxicidade de *Ceiba speciosa* (A. St.-Hill). Para tanto, o extrato aquoso de *C. speciosa* foi preparado conforme o método de uso popular e seco por liofilização (denominado EALCs), para utilização na realização dos testes *in vitro*. O precipitado obtido a partir do extrato etanólico bruto (Cs1) também foi utilizado nos testes. Dando sequência às análises, foram realizadas: a análise fitoquímica da espécie; determinação do dano oxidativo e do potencial antioxidante e avaliação da genotoxicidade. Os resultados obtidos neste estudo foram analisados através do software estatístico Graph Pad Prism 5.0. O extrato aquoso de *Ceiba speciosa* e de Cs1 demonstraram potencial antioxidante *in vitro* frente a lipídeos e proteínas nas concentrações de 50 e 10 µg/mL. Nestas concentrações ainda foi observada uma atividade superior a 50% na avaliação da captação do radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH). Além disso, concentrações de 10, 5 e 2 µg/mL não apresentaram toxicidade nos parâmetros avaliados, sugerindo a relativa segurança na sua utilização popular. Desta forma, é possível indicar que a dose de 10 µg/mL é a dose que teve melhores resultados de forma geral, uma vez que não apresentou toxicidade e demonstrou potencial antioxidante. Por se tratar de uma planta de ampla utilização no noroeste do estado do Rio Grande do Sul, o presente estudo representa a primeira avaliação a respeito da caracterização da espécie, e da segurança de sua utilização, uma vez que as doses que não apresentaram toxicidade estão dentro do parâmetro de ação biológica, em humanos.

Palavras-chave: Antioxidante; *Ceiba speciosa*; Toxicidade

ABSTRACT

The research in developing drugs from plants have shown promising results for many different diseases. *Ceiba speciosa* (A. St. Hill) is a tropical tree species of the Malvaceae family, which in Rio Grande do Sul occurs mainly in the region of the Upper Uruguay Forest. There are reports of popular use of the bark tea of this species in the Northwestern region of Rio Grande do Sul - Brazil, to reduce blood cholesterol levels. However, both no scientific data to confirm the efficacy and safety of its effects found, or phytochemicals data about the species yet. The literature presents studies on others species of the genus *Ceiba*; and *Ceiba pentandra*, employed as a hypoglycemic agent, is the most investigated species. Thus, this study aimed to conduct a preliminary assessment on antioxidant potential and toxicity of *Ceiba speciosa*. Thus, *Ceiba speciosa* aqueous extract was prepared according to popular method, and concentrated by freeze-drying use (called EALCs), for use in testing *in vitro*. The precipitate obtained from crude ethanol extract (Cs1) was also used in these tests. Continuing the analyzis were performed: a phytochemical analysis of the species, determination of oxidative damage and antioxidant potential, and assessment of genotoxicity. The results obtained in this study were analyzed using the statistical software Graph Pad Prism 5.0. The aqueous extract of *Ceiba speciosa* and Cs1 demonstrated *in vitro* antioxidant potential against lipid and protein concentrations of 50 and 10 $\mu\text{g/mL}$. At these concentrations a higher activity and 50% was observed in the evaluation of the capture of the radical 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH). Furthermore, concentrations of 10, 5 and 2 $\mu\text{g/mL}$ showed no toxicity in the evaluated parameters, suggesting the relative safety of their popular use. Thus, it is possible to indicate that dose of 10 $\mu\text{g/mL}$ is which had better results overall, since it does not present toxicity, and showed potential antioxidant. Because it is a plant of wide use in the Northwest of the state of Rio Grande do Sul, the present study is the first evaluation regarding the characterization of the species and the safety of their use, since the doses showed no toxicity, being within parameter of biological action in humans.

Keywords: Antioxidant; *Ceiba speciosa*; toxicity

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Ceiba speciosa (Paineira).....	8
Figura 2- Estrutura Química da Quercetina, Rutina e Canferol.	12
Figura 3 - Estrutura Química dos Ácidos Gálico, Clorogênico, Cafeico e Elágico.	12
Figura 4 - Representação ilustrativa de imagens do ensaio cometa em leucócitos humanos...	18
Figura 5 - Perfil representativo da cromatografia líquida de alta eficiência de EALCs e Cs1, com detecção de UV a 325 nm.....	19
Figura 6 – Resultado do Teste de Viabilidade Celular em leucócitos humanos após a adição de EALCs (A) e Cs1 (B)	21
Figura 7 – Resultado da Determinação da Atividade Sequestradora do radical DPPH	22
Figura 8 – Resultado do Teste de Peroxidação Lipídica em plasma com dano induzido por H ₂ O ₂ 100µM, após adição de EALCs (A) e Cs1 (B).....	23
Figura 9 – Resultado da Dosagem de Proteína Carbonilada no plasma com dano induzido por H ₂ O ₂ 100µM, após adição de EALCs (A) e Cs1 (B).....	24
Figura 10 – Resultado do Ensaio Cometa em leucócitos humanos após a adição de EALCs (A) e Cs1 (B)	25

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Gradiente cromatográfico utilizado para a avaliação do EALCs e de Cs1.....	11
Tabela 2 – Comprimentos de onda de detecção dos compostos fenólicos analisados por CLAE.....	12
Tabela 3 – Procedimento inicial para a realização da avaliação da atividade sequestradora do radical DPPH.....	14
Tabela 4 – Procedimento para a realização do teste de quantificação de Espécies Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico (TBARS).....	15
Tabela 5 – Composição do EALCs e de Cs1.....	20
Tabela 6 – Composição do EALCs e de Cs1, considerando as concentrações utilizadas nos testes in vitro.....	20

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	2
2.1 Plantas Medicinais: Considerações Históricas e Uso Popular	2
2.2 Radicais Livres, Estresse Oxidativo e Atividade Antioxidante	5
2.3 <i>Ceiba speciosa</i>	7
3. OBJETIVOS	9
3.1 Objetivo Geral.....	9
3.2 Objetivos Específicos	9
4. MÉTODO.....	10
4.1 Material Vegetal.....	10
4.1.1 Obtenção do material vegetal	10
4.1.2 Obtenção dos extratos	10
4.1.3 Análise Fitoquímica	11
4.2 Avaliação Toxicológica e do Potencial Antioxidante <i>in vitro</i>	13
4.2.1 Determinação das Concentrações utilizadas	13
4.2.2 Avaliação do dano oxidativo e do potencial antioxidante	14
4.2.3 Avaliação da Genotoxicidade	17
4.3 Análise Estatística	18
5. RESULTADOS.....	19
5.1 Material Vegetal.....	19
5.1.1 Rendimento do extrato aquoso de <i>Ceiba speciosa</i>	19
5.1.2 Análise Fitoquímica	19
5.2 Avaliação Toxicológica e do Potencial Antioxidante <i>in vitro</i>	21
5.2.1 Determinação das concentrações utilizadas	21
5.2.2 Avaliação do Dano Oxidativo e do Potencial Antioxidante	22
5.2.3 Avaliação da Genotoxicidade	24
6. DISCUSSÃO	26
7. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	32
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	33

1. INTRODUÇÃO

A história da humanidade descreve uma íntima ligação ao seu ambiente natural, uma vez que o homem sempre utilizou as plantas como alternativa para alguns recursos essenciais a sua sobrevivência, como, por exemplo, a busca de alimentos e o tratamento das mais variadas doenças (LEITE, 2009).

O uso popular de plantas medicinais, através das mais variadas formas de preparo e razões de uso, é amplamente difundido. Porém, a popularização da utilização, somada à facilidade de acesso, leva ao surgimento de alguns problemas, tais como: falta de informações adequadas sobre as propriedades das ervas medicinais, possibilidade de interações medicamentosas no consumo concomitante com medicamentos e outras espécies vegetais, problemas na identificação botânica e desconhecimento sobre os possíveis efeitos adversos (MACEDO *et al.*, 2007; VEIGA Jr., 2008). Assim, estudos direcionados para a investigação da eficácia e segurança das espécies relatadas pelo uso popular proporcionam não somente a descoberta de novos compostos farmacologicamente ativos, mas também busca informações necessárias para a garantia do uso correto, proporcionando maior eficácia e segurança de sua utilização.

Considerando a relevância do uso de plantas medicinais como fontes de novos fármacos, que a etnofarmacologia pode constituir uma importante ferramenta para a descoberta de espécies com potencial atividade no tratamento de doenças, o uso popular de *Ceiba speciosa* no Noroeste do Rio Grande do Sul – Brasil e, principalmente, o fato de que não são encontrados relatos científicos acerca da segurança e eficácia desta espécie, o presente estudo teve como foco a avaliação *in vitro* da toxicidade e do potencial antioxidante desta espécie vegetal com potencial atividade em patologias relacionadas ao aumento da glicemia e dos níveis de colesterol.

2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 Plantas Medicinais: Considerações Históricas e Uso Popular

Desde a era paleolítica, existem relatos do uso de plantas e derivados de produtos naturais para as mais diversas finalidades, inclusive medicinais. (PHILLIPSON, 2001; PATWARDHAN, 2005). Com o desenvolvimento dos povos, foi possível a diferenciação intuitiva entre as plantas tóxicas e atóxicas, além de proporcionar o início da construção de uma base de informações sobre o uso terapêutico de plantas, sua eficácia e segurança (LEITE, 2009). Existem antigos registros escritos, oriundos de civilizações como a da China, Índia, Egito e Peru, que construíram e documentaram seu próprio acervo de conhecimento médico e terapêutico (ELDIN e DUNFORD, 2001).

O uso de plantas com finalidade terapêutica esteve em evidência até a metade do século XIX, onde pelo menos 80% dos tratamentos e medicamentos eram derivados de plantas. A popularidade de uso das fontes naturais sofreu uma considerável redução de interesse por parte da comunidade científica após a Revolução Industrial, quando houve grandes avanços na área da síntese química (SCHULZ *et al.*, 2002; GILANI e RAHMAN, 2005). Neste ínterim, o crescimento e desenvolvimento das indústrias farmacêuticas durante o século XX possibilitaram a descoberta e disponibilização de muitos fármacos empregados no tratamento e cura das mais diversas doenças, como a tuberculose, a sífilis, o câncer, a depressão e as cardiopatias (VEIGA Jr, 2008). Mesmo com os inúmeros fármacos e medicamentos disponibilizados neste período e até os dias atuais, existe uma grande demanda por novos medicamentos e, por este motivo, as pesquisas estão direcionadas na identificação de novos fármacos com melhor ação terapêutica e menor toxicidade. Ao final do século XX ocorreu o desenvolvimento de novos métodos analíticos e de modelos para ensaios farmacológicos, o que novamente aumentou o interesse pela pesquisa de plantas (LEITE, 2009).

As plantas utilizadas para fins medicinais representam ainda uma importante alternativa terapêutica. Segundo a última estimativa da Organização Mundial de Saúde (OMS), cerca de 80% da população mundial utiliza recursos das medicinas populares para suprir necessidades de assistência médica, destacando-se, entre elas, o uso de plantas (MACEDO *et al.*, 2007). Esse fato pode ser justificado principalmente pelo baixo custo e a facilidade de acesso que a terapia a base de plantas medicinais representa. Contudo, uma grande parte dos profissionais da área de saúde ainda desaprova esta opção como alternativa

de tratamento, principalmente pela ausência de bases científicas sólidas a respeito da segurança e eficácia de seus efeitos. Entretanto, esta resistência não diminui o uso popular de plantas medicinais, fazendo com que cresça cada vez mais a ocorrência de automedicação, ou autoadministração das ervas, que, somada ao desconhecimento sobre a toxicidade dos vegetais, representam os maiores fatores de risco à população. Além disso, é possível citar a ocorrência de interações entre os medicamentos prescritos e as plantas medicinais utilizadas sem orientação como um dos fatores de maior preocupação. Sem orientação profissional capacitado, não há garantia de que as propriedades farmacológicas esperadas sejam realmente obtidas, sem efeitos colaterais ou adversos perigosos para a saúde (MACEDO *et al.*, 2007; VEIGA Jr., 2008).

A busca por novas substâncias de origem vegetal tem sido impulsionada por diversos fatores: maior eficácia no tratamento de diferentes doenças, estudos sobre a biodiversidade e preservação das espécies e a falta de acesso da maioria da população aos medicamentos modernos, devido ao alto custo que eles representam (CARVALHO, 2006). Neste sentido, as pesquisas têm apresentado resultados promissores para as mais variadas doenças (PIZZIOLO *et al.*, 2011).

Um exemplo da importância dos estudos das plantas está descrito na revisão realizada por BRANDÃO e colaboradores (2010), onde os autores descrevem o uso de antineoplásicos derivados de plantas. Uma das espécies citadas no estudo é *Vitis vinifera*, usada com agente quimiopreventivo e quimioterapêutico na inibição da carcinogênese mamária. Por possuir estrutura fenólica, o resveratrol presente em sua constituição química exerce atividade antioxidante através da inibição de radicais livres, justificando seu efeito na redução do estresse oxidativo e potencial mutagênico (BRANDÃO *et al.*, 2010).

Outro estudo, realizado por PIZZIOLO e colaboradores (2011), traz uma revisão a respeito de plantas com efeito hipolipidêmico. Os autores descrevem a espécie *Allium sativum* como uma das espécies de atividade hipolipidêmicas mais citadas pelos estudos científicos, principalmente por seu efeito antiaterosclerótico e de redução de lipídeos. Além destes efeitos, foram comprovadas outras ações farmacológicas, como antiaterogênica, redutora de gordura, anti-hipertensiva, inibidora da síntese de colesterol, vasodilatadora e antioxidante. Este último é apontado como um dos principais fatores responsáveis pela ação antiaterosclerótica da espécie.

Dentre as várias finalidades para o uso de plantas medicinais, é possível citar como uma das principais o tratamento da hiperglicemia. Várias plantas possuem atividade comprovada para esta finalidade, sendo que uma das espécies de uso mais difundido entre a

população a *Eugenia jambolana*. Além da comprovada ação hipoglicêmica, seus efeitos incluem proteção dos glomérulos renais contra os efeitos prejudiciais do diabetes e redução da poliúria, excreção de albumina na urina e hipertrofia renal. Existem vários mecanismos de ação responsáveis pelo efeito hipoglicemiante, incluindo a eliminação de radicais livres e a resistência à peroxidação de lipídios, através do efeito antioxidante presente em algumas plantas (NEGRI, 2005).

Além dos efeitos benéficos das plantas medicinais no tratamento das doenças, é possível encontrar estudos científicos e relatos populares acerca de seus efeitos adversos, toxicidade e contraindicações de uso. Esse fator pode ser explicado no fato de que a maioria das plantas não possui a definição dos componentes químicos responsáveis por seus efeitos. Logo, como são constituídas de misturas complexas de muitos compostos químicos, além de gerar o efeito esperado pela sua ingestão, elas podem interferir entre si e com outras substâncias administradas concomitantemente, contribuindo para a ocorrência de efeitos aditivos, antagônicos e/ou sinérgicos (ALEXANDRE *et al.*, 2012).

Neste contexto, ainda é possível considerar que a planta medicinal é um xenobiótico e, desta forma, os produtos de sua biotransformação são potencialmente tóxicos. Com relação à toxicologia, é necessário levar em consideração não somente os efeitos esperados logo após a sua ingestão, mas principalmente aqueles efeitos associados a ingestão contínua, como o dano oxidativo, carcinogênicos, hepatotoxicidade e nefrotoxicidade (SIMÕES *et al.*, 2002).

O uso concomitante de plantas medicinais e medicamentos sintéticos representa um risco à saúde, quando não é feito sob correta orientação. Um exemplo disso é o *Ginkgo biloba*, uma espécie amplamente utilizada popularmente para transtornos cognitivos, pode potencializar a ação de agentes anticoagulantes, como a heparina e varfarina, aumentando o risco de hemorragia intracerebral (SILVA *et al.*, 2010).

A relevância das plantas medicinais no tratamento das doenças é evidente e acompanha a humanidade desde seus primórdios. Contudo, a crescente ocorrência da automedicação somada a falta de informações científicas a respeito das espécies utilizadas popularmente são fatores que aumentam a incidência de toxicidade e efeitos adversos. Desta forma, é imprescindível a conscientização da comunidade científica, dos profissionais da saúde e da própria população quanto a importância dos estudos direcionados a investigação a respeito da segurança e eficácia das plantas medicinais.

2.2 Radicais Livres, Estresse Oxidativo e Atividade Antioxidante

Os radicais livres são fundamentais para qualquer processo bioquímico e representam uma parte essencial da vida aeróbica e do metabolismo. Em condições normais participam destes processos, no corpo humano as espécies reativas de oxigênio (ROS), sendo que as mais comumente encontradas incluem o ânion superóxido (O_2^-), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), radicais peroxil ($ROO\cdot$) e radicais hidroxila reativos ($OH\cdot$) (BENHAMMOU *et al.*, 2009; GAUR *et al.*, 2009).

O desequilíbrio entre a produção de espécies de radicais e a ação dos sistemas endógenos de desintoxicação (representados pelos antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos), podem levar do chamado “estresse oxidativo”. Os danos mais comuns causados por este desequilíbrio ocorrem através da interação destas espécies radicais com macromoléculas (lipídeos, proteínas, e ácido desoxirribonucleico) (BENHAMMOU *et al.*, 2009). Desta forma, é possível sugerir radicais livres podem interferir com o ácido desoxirribonucleico (DNA), que promove a carcinogênese, e acentuar o processo de aterosclerose, artrite e isquemia. Os sistemas biológicos de controle das ROS abrangem sistemas enzimáticos e não enzimáticos. Sistemas enzimáticos incluem enzimas como SOD (superóxido dismutase), catalase, glutathione peroxidase, entre outras que agem especificamente contra ROS (DORNAS *et al.*, 2007). Já o sistema não enzimático, além da possibilidade de origem endógena, também pode ser obtido através da dieta, abrangendo GSH, vitamina C, indóis, catecóis e polifenóis (antioxidantes hidrofílicos) e as bioflavonas, vitamina E e carotenoides (antioxidantes lipofílicos) (NOZAL, *et al.* 1997).

A oxidação dos lipídeos, principalmente a lipoproteína de baixa densidade (*Low Density Lipoprotein* - LDL), nas paredes dos vasos sanguíneos está envolvida com a formação das placas ateroscleróticas (AFONSO *et al.*, 2010). O estresse oxidativo faz parte da etiologia de inúmeras doenças tratadas popularmente com preparações a base de plantas medicinais, como é o caso da cirrose hepática, das doenças cardiovasculares, do diabetes mellitus e de alguns tipos de câncer (AFONSO *et al.*, 2010; WAYHS *et al.*, 2010).

É conhecido que as ROS são capazes de oxidar proteínas celulares, ácidos nucléicos e lipídios. Além disso, é possível definir a peroxidação lipídica como uma propagação de dano oxidativo aos ácidos graxos poli-insaturados mediada por radicais livres, envolvendo vários tipos de ROS. Seus efeitos são minimizados por meios enzimáticos ou pela neutralização de radicais livres através da terapia antioxidante. Várias ações patológicas são atribuídas as ROS, sendo as mais popularmente conhecidas o envelhecimento celular, a

mutagênese, a carcinogênese, e a Doença Arterial Coronariana (DAC). Os mecanismos de ação ligados a estes efeitos estão na desestabilização de membranas, danos no DNA e a oxidação de LDL (HEIM *et al.*, 2002). Desta forma, é possível citar que a LDL oxidada (Ox-LDL) parece desempenhar um papel importante no desenvolvimento da aterosclerose, causado pelo excesso de LDL na parede arterial devido à hipercolesterolemia. A Ox-LDL possui potencial de atividade pró-aterogênica, contribuindo para as manifestações clínicas importantes da DCA, tais como a disfunção endotelial e ruptura da placa (HIRUNPANICH *et al.*, 2006)

Outro distúrbio que causa dano tecidual é a hiperglicemia, provocando danos nos tecidos por meio de cinco mecanismos principais: aumento do fluxo de glicose e outros açúcares, através da via do poliol; aumento da formação intracelular dos produtos finais da glicação avançada (PFGA); aumento da expressão do receptor para PFGA e seus ligantes de ativação; ativação de isoformas da proteína quinase C; e a hiperatividade da via hexosamina. Contudo, há evidências de que esses cinco mecanismos são desencadeados por um fator em comum: a superprodução mitocondrial de ROS. Muitas evidências sugerem que o estresse oxidativo tem um papel fundamental na patogênese da diabetes e suas complicações (GIACCO e BROWNLEE, 2010).

Além da aterosclerose e da hiperglicemia, as doenças de Alzheimer e Parkinson também estão ligadas ao estresse oxidativo causado pelos radicais livres. Neste contexto, a terapia antioxidante desempenha um papel fundamental para o tratamento dessas doenças, tornando necessária a ingestão periódica de substâncias ricas em compostos antioxidantes naturais como o ácido ascórbico, carotenoides e polifenóis (BENHAMMOU *et al.*, 2009). A ação antioxidante de compostos fenólicos em geral, é determinada por sua estrutura. As hidroxilas desempenham um papel doador de elétrons, além de suportar o resultado da deslocalização em torno de seu sistema aromático. Outro determinante estrutural importante é a capacidade antioxidante de flavonoides atribuídas às hidroxilas em C4 e C3, que atuam no aumento do potencial antioxidante (DORNAS *et al.*, 2007; BENHAMMOU *et al.*, 2009; KRISHNAVENI *et al.*, 2013).

Em virtude de sua conhecida atividade antioxidante, os flavonoides e os outros compostos fenólicos desempenham uma grande variedade de efeitos biológicos, incluindo cardioprotetor e vasodilatador. Estes efeitos antioxidantes se dão através de vários mecanismos, tais como a remoção de radicais livres, a ação como agente redutor e complexante de metais pró-oxidantes e estimulantes da atividade biológica de enzimas antioxidantes. Algumas fontes específicas de flavonoides são o vinho tinto, chá preto,

cerveja, frutas (maçã, uva, morango), vegetais (cebola, couve, vagem, brócolis), grãos, nozes, sementes e especiarias. A quercetina, o mais abundante flavonoide presente na dieta humana, possui potente e bem delineada ação antioxidante e representa cerca de 95% do total dos flavonoides ingeridos. Desta forma, é possível destacar a dieta como uma das principais fontes de antioxidantes naturais. (BEHLING *et al.*, 2004)

A demanda por agentes antioxidantes mantém os materiais vegetais como um dos maiores recursos na pesquisa de combate às doenças relacionadas ao estresse oxidativo, sendo que muitas plantas têm sido investigadas como fonte de medicamentos ou modelos para o desenvolvimento de agentes terapêuticos. Neste sentido, várias espécies têm demonstrado resultados promissores com relação à atividade antioxidante, como por exemplo, o alecrim (*Rosmarinus officinalis*) a pimenta preta (*Piper nigrum*) e o chá verde (*Camelia sinerensis*), e diferentes classes fitoquímicas como os compostos fenólicos e flavonoides têm sido relacionadas com esta, demonstrando responsável propriedade (KRISHNAVENI *et al.*, 2013).

2.3 *Ceiba speciosa*

As árvores do gênero *Ceiba*, conhecidas popularmente como árvore da seda, paineira e barriguda, pertencem à família Malvaceae são encontradas principalmente em zonas de floresta tropical. Estas espécies possuem uso medicinal popular descrito para as mais diversas finalidades e são amplamente utilizadas na América do Sul (SAID *et al.*, 2003). No Brasil são encontradas em maior abundância nos estados do Rio de Janeiro e Minas Gerais (BELESKI-CARNEIRO *et al.*, 1996).

Entre as espécies do gênero *Ceiba*, *Ceiba pentandra* é uma das mais amplamente utilizadas na medicina tradicional da América do Sul, onde suas folhas, raízes e cascas são empregadas no tratamento da Diabetes (LADEJI *et al.*, 2003). Assim sendo, LADEJI e colaboradores (2003) realizaram um estudo para avaliar a atividade hipoglicemiante desta espécie em ratos, obtendo como resultados a confirmação de sua atividade hipoglicemiante, sem apresentar toxicidade hepática. No Brasil, especificamente no estado do Ceará, é difundido o uso das folhas de outra espécie do gênero, *Ceiba graziiovii*, para o tratamento de anemia (CARTAXO *et al.*, 2010). Além dessa espécie, decoctos ou macerados das cascas e raízes de *Ceiba insignis* e *Ceiba samuama* são empregados na Amazônia peruana para o tratamento de reumatismo (SANZ-BISET *et al.*, 2009).

Ceiba speciosa A. St. Hill é uma espécie arbórea tropical, com ampla distribuição geográfica. Sua área de abrangência envolve, principalmente, as florestas mesófilas semidecíduas do Paraguai, Argentina e Brasil. No Rio Grande do Sul, a planta é encontrada prevalentemente na região da floresta do Alto Uruguai. Devido a sua pouca exigência quanto ao solo, podendo atingir desenvolvimento satisfatório até em solos de baixa fertilidade química, secos e arenosos, esta espécie é frequentemente utilizada para ornamentação, sendo cultivada em parques e jardins (VELOSO *et al.*, 1997; CAPPELATTI e SCHMITT, 2009).

A literatura científica descreve diversas atividades medicinais para várias espécies do gênero *Ceiba*, porém pouco se sabe sobre os aspectos fitoquímicos, farmacológicos e toxicológicos de *Ceiba speciosa*. Existem relatos populares do uso desta planta na região noroeste do Estado do Rio Grande do Sul para a redução dos níveis séricos de colesterol, triglicerídeos e glicose, porém ainda não foram encontradas referências científicas sobre esta espécie. Desta forma, estudo vem avaliar os primeiros aspectos referentes à segurança do uso de *Ceiba speciosa*, de modo a trazer a população informações a respeito de sua eficácia e toxicidade.

Figura 1 - *Ceiba speciosa* (Paineira). À esquerda, a visão completa da árvore. À direita (acima), as partes aéreas apresentando a paina, característica das árvores desta espécie. A direita (abaixo), os espinhos presentes no caule, o que também é característico da espécie.



Fonte: Google Imagens

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

O objetivo deste trabalho foi avaliar o potencial antioxidante e a toxicidade *in vitro* de *Ceiba speciosa* (A. St.-Hill).

3.2 Objetivos Específicos

- Preparar extratos a partir de cascas de *Ceiba speciosa*;
- Determinar os rendimentos dos extratos preparados a partir de *Ceiba speciosa*
- Realizar a análise fitoquímica preliminar por CLAE/DAD dos extratos de *Ceiba speciosa*;
- Determinar as concentrações mais adequadas para realização dos testes *in vitro*, utilizando como parâmetro o teste de viabilidade celular em leucócitos humanos;
- Avaliar, *in vitro*, a genotoxicidade dos extratos de *Ceiba speciosa*;
- Verificar, *in vitro*, a toxicidade dos extratos de *Ceiba speciosa* frente a lipídeos e proteínas;
- Estimar, *in vitro*, do potencial antioxidante dos extratos de *Ceiba speciosa* frente a lipídeos e proteínas;
- Avaliar, *in vitro*, a atividade sequestradora de radicais livres dos extratos de *Ceiba speciosa*.

4. MÉTODO

4.1 Material Vegetal

4.1.1 Obtenção do material vegetal

O material vegetal foi coletado em maio de 2012 (05/2012) no município de Santo Antônio das Missões - RS. A espécie foi identificada pelo botânico responsável e uma excisada foi depositada no Herbário da Universidade Federal de Passo Fundo - RS (RSPF 12367).

4.1.2 Obtenção dos extratos

4.1.2.1 Extrato Aquoso

O extrato aquoso foi preparado por decocção das cascas de *C. speciosa* em água destilada. O material foi submetido ao aquecimento, com agitação periódica, até atingir a fervura e foi mantido nessas condições por 30 minutos. Este procedimento foi adotado para simular o procedimento popular para obtenção do chá. Os extratos foram filtrados e os líquidos coletados foram secos por liofilização, resultando no extrato aquoso liofilizado de *Ceiba speciosa* (EALCs), a ser utilizado neste estudo.

4.1.2.2. Extrato etanólico

O extrato etanólico bruto de *C. speciosa* foi obtido por maceração em temperatura ambiente até o esgotamento, com posterior eliminação do solvente em evaporador rotatório à pressão reduzida. Contudo, durante o processo de eliminação do solvente do extrato etanólico bruto da casca, foi observada a formação de um precipitado castanho, o qual foi removido e analisado separadamente, sendo denominado Cs1 e utilizado para realização dos testes *in vitro*. O extrato etanólico total não foi utilizado neste estudo.

4.1.3 Análise Fitoquímica

4.1.3.1 Análise por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência Acoplada a Detector de Arranjo de Diodos (CLAE/DAD)

EALCs e Cs1 foram submetidos à análise cromatográfica preliminar para observação de seus perfis cromatográficos e dos espectros na região do ultravioleta dos compostos majoritários, com ênfase na quantificação de compostos fenólicos e flavonoides de conhecidas atividades antioxidantes e anti-inflamatórias, como quercetina, rutina, ácido caféico, ácido gálico, ácido clorogênico, e o canferol. EALCs e Cs1 foram analisados em cromatógrafo líquido acoplado a detector de arranjo de diodos com acumulação de 200 a 400 nm, utilizando uma coluna analítica C18 (5 µm; 4,6 x 250 mm), submetida a gradiente linear de água contendo 1% de ácido fórmico (A) e acetonitrila (B), com fluxo de 0,7mL/min (Tabela 1), de acordo com método descrito por BOLIGON e colaboradores(2012) com modificações. A Tabela 2 descreve os comprimentos de onda de detecção dos compostos fenólicos analisados por CLAE.

Tabela 1 – Gradiente cromatográfico utilizado para a avaliação do EALCs e de Cs1. A – Água contendo 1% de ácido fórmico; B –Acetonitrila.

Tempo (min)	Fluxo (mL/min)	B (%)	A (%)
10	0,7	87	13
20	0,7	80	20
30	0,7	70	30
40	0,7	50	50
50	0,7	40	60
60	0,7	30	70
70	0,7	80	20
80	0,7	90	10

Tabela 2 – Comprimentos de onda de detecção dos compostos fenólicos analisados por CLAE.

Composto Fenólico	Comprimento de Onda (nm)
Ácido Gálico	254
Ácidos Caféico, Elágico e Clorogênico	325
Quercetina, Rutina e Canferol	365

Figura 2- Estrutura Química da Quercetina, Rutina e Canferol.

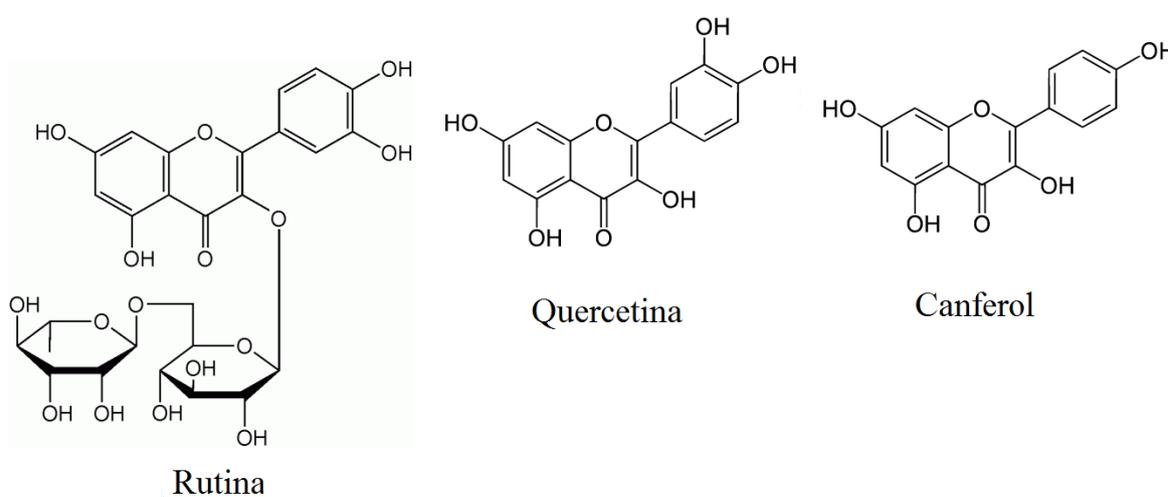
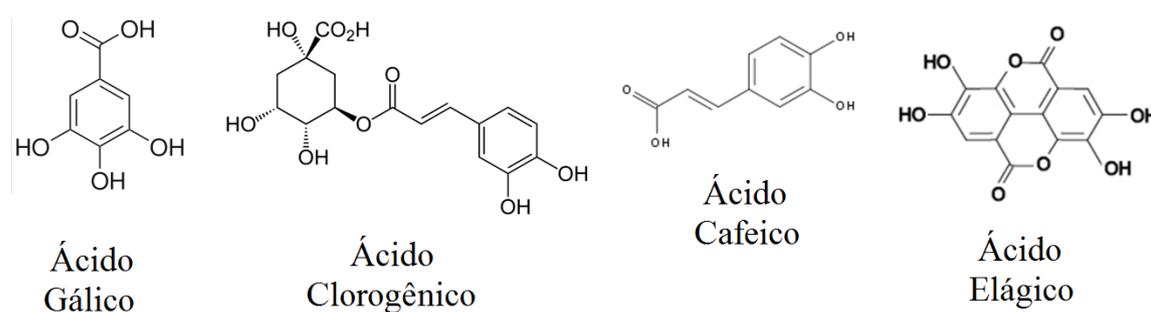


Figura 3 - Estrutura Química dos Ácidos Gálico, Clorogênico, Caféico e Elágico.



4.1.3.2 Determinação de Flavonoides Totais

Os teores de flavonoides totais foram determinados de acordo com ZHISHEN e colaboradores (1999), com uma concentração de amostra de 1 mg/mL. EALCs foi diluído em metanol, enquanto que Cs1 foi feita uma suspensão também em metanol, ambos às

concentrações 1/10, 1/100, 1/1000 e 1/10000. Posteriormente, 500 µL da diluição foram transferidos para um tubo de ensaio, onde foram adicionados 500 µL de cloreto de alumínio 2% em metanol e 2500 µL de etanol absoluto. Ao tubo branco foram transferidas somente as referidas quantidades de cloreto de alumínio 2% em metanol e etanol absoluto. Após 60 minutos, foi realizada a leitura das absorvâncias em espectrofotômetro (420 nm), zerando com o branco. Para a realização dos cálculos, foi preparada previamente uma curva de calibração utilizando rutina como padrão.

4.1.3.3 Determinação de Polifenóis Totais

A determinação de polifenóis totais foi realizada de acordo com o método estabelecido por CHANDRA e MEJIA (2004), com uma concentração de amostra de 0,150 mg/mL. As soluções iniciais de EALCs e Cs1 foram diluídas em água destilada às concentrações de 1/10, 1/100, 1/1000 e 1/10000. Posteriormente, 500 µL de cada diluição foram transferidos para um tubo de ensaio, onde foram adicionados 250µL de Folin-Ciocalteu (Phenol reagente 2N), e incubados por 5 minutos a temperatura ambiente. Após, foram adicionados 1000 µL de carbonato de sódio 20% e deixado em repouso por 10 minutos. Foi realizada a leitura das absorvâncias em espectrofotômetro (730 nm), zerando com água destilada. Para a realização dos cálculos, foi preparada previamente uma curva de calibração, empregando ácido gálico como padrão.

4.2 Avaliação Toxicológica e do Potencial Antioxidante *in vitro*

4.2.1 Determinação das Concentrações utilizadas

4.2.1.1 Teste de Viabilidade Celular

A partir dos extratos obtidos, a viabilidade celular foi avaliada através da perda da integridade da membrana, utilizando o método do Azul de Tripam (BUROW *et al.*, 1998), para determinação das concentrações a serem utilizadas nos testes *in vitro*. Primeiramente, foi realizada coleta de sangue de sujeitos adultos, saudáveis, com idade entre 20-30 anos. (aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UNIPAMPA sob o parecer número 284.295) para o preparo da suspensão de leucócitos. O sangue foi centrifugado por 10 minutos a 3000 rpm, sendo o *pellet* transferido para outro tubo de ensaio onde foram

adicionados 10 mL de tampão PBS e a mistura foi dissolvida com auxílio de agitador tipo vórtex. Para a realização do teste, foram preparadas soluções-mãe de 2mg/mL de EALCs e de Cs1. A partir destas, foram transferidas alíquotas para um tubo tipo eppendorf, onde foram diluídas na suspensão de leucócitos até atingirem as concentrações de 1000, 750, 500, 250, 100, 50, 10, 5 e 2 µg/mL. Como controle positivo, foi utilizado tampão PBS e peróxido de hidrogênio no lugar da amostra. O controle negativo foi constituído de tampão PBS e suspensão de leucócitos. Todos os tubos foram incubados a temperatura ambiente durante uma hora e quinze minutos, ao abrigo da luz. Ao final da incubação, 100 µL de cada amostra e controles foram transferidos para o segundo tubo, onde foram adicionados 100 µL de azul de tripam. Após 3 minutos, 20 µL destas últimas soluções foram adicionadas a uma câmara de Neubauer e foi realizada a leitura microscópica em aumento de 40 vezes. Foram lidas 300 células por lâmina, sendo consideradas viáveis as células incolores, e inviáveis as células coradas pelo Azul de Tripam. As concentrações que mantiveram a viabilidade celular acima de 85% foram escolhidas para realização dos testes *in vitro*.

4.2.2 Avaliação do dano oxidativo e do potencial antioxidante

4.2.2.1 Avaliação da Atividade Sequestradora do Radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH)

A avaliação do potencial antioxidante *in vitro* foi realizada através da determinação da atividade sequestradora do radical DPPH, segundo o método de SHARMA & BHAT, 2009. Inicialmente foram preparadas soluções de EALCs e Cs1 com as concentrações determinadas pelo teste de viabilidade celular. O início do procedimento é descrito na Tabela 3.

Tabela 3 – Procedimento inicial para a realização da avaliação da atividade sequestradora do radical DPPH.

Tubos	Água destilada (µL)	Amostra (µL)	DPPH (µL)
Controle Negativo	10	-----	1000
Veículo	-----	-----	1000
Amostra	-----	10	1000

Para a realização do ensaio, a água destilada e a amostra foram pipetadas em seus respectivos tubos. Todos os procedimentos em seguida foram realizados em ambiente ao abrigo da luz. O DPPH foi pipetado em todos os tubos, com intervalos de 30 segundos entre cada tubo. Os tubos foram incubados em banho-maria a 30°C por 30 minutos e as absorvâncias foram lidas em espectrofotômetro a 517 nm, sendo que água destilada foi empregada como branco.

4.2.2.2 Teste de Peroxidação Lipídica

A avaliação deste parâmetro foi realizada através do método clássico da quantificação de espécies reativas do ácido tiobarbitúrico (TBARS) (OHKAWA *et al.*, 1979). As concentrações EALCs e de Cs1 utilizadas neste experimento foram definidas pelo método de Viabilidade Celular.

Inicialmente foram preparadas soluções-mãe de EALCs e de Cs1. Foram adicionados 200 µL de plasma sanguíneo, 100 µL de solução de peróxido de hidrogênio 100 µM (diluição 1:10) e 200 µL da solução de EALCs ou de Cs1 para o teste. Para o controle positivo foram empregados 200 µL de peróxido de hidrogênio no lugar amostra. No controle negativo a amostra foi substituída por solução salina., Foram transferidos 200 µL do conteúdo do primeiro tubo, adicionados de 100 µL de butilhidroxitolueno (BHT) 10 mM e 500 µL de Ácido Tricloroacético (TCA) 20%. A mistura foi homogeneizada e centrifugada por 5 minutos a 2000 rpm. A solução resultante foi usada como amostra e transferida para um tubo de ensaio segundo o procedimento descrito na Tabela 4.

Tabela 4 – Procedimento para a realização do teste de quantificação de Espécies Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico (TBARS)

Tubo	Água destilada (µL)	Ácido ortofosfórico 10% (µL)	Ácido tiobarbitúrico 1,2% (µL)	Amostra (µL)	Ácido Tricloroacético 20% (µL)
Branco	140	60	300	-----	900
Amostra	140	60	300	900	-----

Todos os tubos foram levados ao banho-maria a 95°C, durante 1 hora. Após o resfriamento dos tubos, foi realizada a leitura das absorvâncias em espectrofotômetro a 532

nm. Uma curva de calibração de Malondialdeído (MDA) foi previamente preparada para a realização dos cálculos.

4.2.2.3 Determinação de Proteína Carbonilada

A determinação de proteína carbonilada foi realizada de acordo com MORABITO *et al.* (2004). As concentrações de EALCs e de Cs1 utilizadas nestes experimentos foram definidas pelo método de Viabilidade Celular.

Inicialmente foi preparada uma solução-mãe das amostras para posterior preparo das demais concentrações escolhidas pelo teste de viabilidade celular. Para a realização do teste, 200 µL de plasma sanguíneo foram adicionados a um tubo de eppendorf e adicionados de 100 µL de solução de peróxido de hidrogênio 100 µM (diluição 1:10) e 200 µL de EALCs ou de Cs1. O controle positivo foi composto somente por 200 µL plasma e 100 µL de solução de peróxido de hidrogênio 100 µM (diluição 1:10). Para o controle negativo, foram adicionados 200 µL de Tampão PBS ao invés das amostras os extratos. Uma alíquota de 50 µL foi retirada de cada uma das soluções e adicionada a 4mL de Tampão Tris HCl (diluição 1:80). A partir das etapas subsequentes, um tubo de ensaio contendo a amostra e outro a ser usado como branco foram preparados para cada concentração ou controle. Na primeira etapa, para ambos os tubos foram adicionados 1000 µL das concentrações ou controles previamente preparados. Ao tubo amostra foram adicionados 200 µL de 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH) e ao seu respectivo tubo branco foram adicionados 200 µL de ácido clorídrico (HCl) 2N. Todos os tubos foram incubados por 1 hora à temperatura ambiente, sendo agitados a cada 15 minutos.

A partir desta etapa, os passos são idênticos tanto para o tubo amostra quanto para o seu respectivo branco. Foram adicionados 500 µL de tampão de desnaturação e 2000 µL de hexano. Todos os tubos foram agitados por 30 segundos e centrifugados a 3000 rpm por 15 minutos. Os sobrenadantes foram retirados e os *pellets* mantidos na borda do tubo, para posterior ressuspensão em 1mL de tampão de desnaturação.

Todos os tubos foram levados ao banho-maria a 50°C por 20 minutos, até a dissolução dos *pellets*. Foi realizada a leitura das absorvâncias em espectrofotômetro a 370 nm, zerando o aparelho com o respectivo branco de cada amostra.

4.2.3 Avaliação da Genotoxicidade

4.2.3.1 Ensaio Cometa

A verificação da quebra de fitas simples e dupla no ácido desoxirribonucléico (DNA) foi realizada através do ensaio cometa (SINGH *et al.*, 1995). Foi realizada uma coleta de sangue para o preparo da solução de leucócitos. O sangue foi centrifugado por 10 minutos a 3000 rpm, o *pellet* foi transferido a outro tubo de ensaio onde as células foram tratadas com 50 µL de tripsina 0,48% por 60 segundos. Para cada concentração de EALCs ou Cs1, foi preparado um tubo de eppendorf contendo 200 µL de extrato, e 200 µL da suspensão de leucócitos.

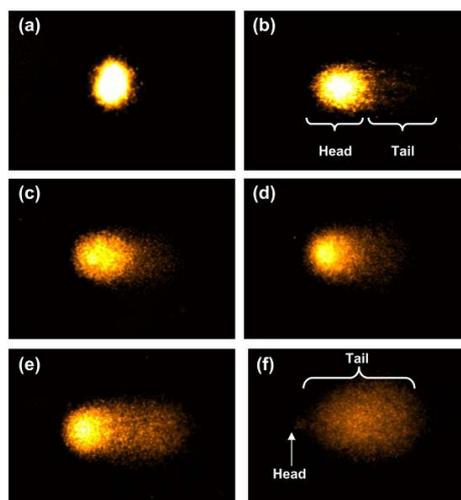
Para a pré-cobertura da lâmina com agarose 1,5%, a mesma foi fervida e colocada em banho-maria (60°C). As lâminas foram mergulhadas, deixando a ponta fosca fora do frasco. Em seguida, as lâminas foram escurridas e deixadas secar a temperatura ambiente por 2 horas. Concomitantemente, a agarose de baixo ponto de fusão (LMP) foi fervida e colocada no banho-maria a uma temperatura de 37°C. Do tubo de eppendorf preparado com a suspensão de leucócitos e EALCs ou Cs1 previamente preparada, 10 µL foram adicionados a 90 µL de agarose LMP e espalhados, imediatamente, sobre a lâmina com a pré-cobertura. Rapidamente uma lamínula foi disposta sobre o conteúdo, e foram mantidas sob refrigeração até a solidificação do conteúdo (5 minutos aproximadamente). Posteriormente, as lamínulas foram removidas, e as lâminas imergidas em tampão de lise gelado (preparado com uma hora de antecedência pela adição de 89 mL de solução de lise, a 10 mL de DMSO e 1 mL de Triton X-100). Foram mantidas nesta solução por 1 hora, para a remoção das membranas e citoplasma das células. As lâminas foram retiradas da solução de lise, uma a uma, removendo com papel toalha o excesso de solução e dispostas, imediatamente, na cuba de eletroforese, que estava dentro de um recipiente com gelo (4°C). Foi adicionado tampão de eletroforese (preparado na hora) e incubado por 20 minutos. Em seguida, foram submetidas à eletroforese por 20 minutos a 25 V e 300 mA (corrente controlada com o volume do tampão).

Para a neutralização, as lâminas foram retiradas da cuba de eletroforese e foi adicionado tampão de neutralização Tris 0,4M (pH 7,5) com repouso de 5 minutos. O tampão foi então retirado e o processo foi repetido por mais 2 vezes. As lâminas foram lavadas 2 vezes com água destilada e secas. Para a fixação, as lâminas deixadas em repouso por 10 minutos sem uma cubeta contendo 100 mL de solução. Posteriormente, as lâminas

foram lavadas 3 vezes com água destilada e secas por 2 horas a 37°C. Para a coloração, foram hidratadas por 5 minutos com água destilada e coradas por aproximadamente 30 minutos na solução de coloração a 37°C (até a solução começar a escurecer). Após lavagem com água destilada (3 vezes) as lâminas foram imersas em solução STOP por 5 minutos e novamente lavadas destilada. As lâminas foram secas a temperatura ambiente. Todo o procedimento, desde a preparação da suspensão celular, foi executado em ambiente escuro ou sob lâmpada de cor vermelha de baixa intensidade, para evitar dano adicional no DNA.

Para o resultado, 100 células foram analisadas microscopicamente em aumento de 40x e classificadas de acordo com o formato da imagem em quatro classes de dano, variando de 0 (nenhum dano) a 4 (dano máximo) (Figura 1), onde a classificação entre 1-4 representa o aumento do dano em relação a cauda. A soma desses valores forneceu um índice de dano único para cada tratamento, variando de 0 a 400.

Figura 4 - Representação ilustrativa de imagens do ensaio cometa em leucócitos humanos. Figura (a) - célula intacta; (b) a (f) - célula com crescentes graus de dano ao DNA, onde (f) mostra o dano mais grave, com a cabeça e a cauda bem separadas.



Fonte: Wan-Ibrahim (2010)

4.3 Análise Estatística

Os resultados foram expressos como médias \pm desvio padrão. As concentrações dos flavonoides e compostos fenólicos obtidos pela cromatografia líquida foram analisadas utilizando ANOVA de uma via com posterior teste de Tukey. Os demais resultados foram obtidos utilizando ANOVA de uma via com posterior teste de Bonferroni, sendo considerados estatisticamente significativos valores de $p < 0,05$. Os resultados obtidos neste estudo foram analisados através do software estatístico Graph Pad Prism 5.0.

5. RESULTADOS

5.1 Material Vegetal

5.1.1 Rendimento do extrato aquoso de *Ceiba speciosa*

O extrato aquoso liofilizado de *Ceiba speciosa* (EALCs) apresentou um rendimento de 1,5%, enquanto que Cs1 apresentou rendimento de 28,2%, em relação à quantidade inicial de material vegetal seco.

5.1.2 Análise Fitoquímica

5.1.2.1 CLAE

A análise por CLAE/DAD de EALCs e de Cs1 revelou que os flavonoides (quercetina, rutina e canferol) e ácidos fenólicos (gálico, clorogênico, elágico e caféico) estão presentes tanto em EALCs quanto em Cs1, e suas quantidades estão descritas na Tabela 5. Os tempos de retenção para as substâncias identificadas foram: ácido gálico (tR = 9,93 min; pico 1), ácido clorogênico (tR = 19,36 min; pico 2), ácido caféico (tR = 24,57 min; pico 3), ácido elágico (tR = 30,19 min; pico 4), rutina (tR = 37,41 min; pico 5), quercetina (tR = 46,23 min; pico 6) e o canferol (tR = 54,13 min; pico 6) (Figura 2). A Tabela 6 demonstra a quantidade destes compostos para cada concentração que foi utilizada nos testes *in vitro*, onde é possível verificar que a maioria encontra-se em maior concentração em EALCs, com exceção apenas da quercetina.

Figura 5 - Perfil representativo da cromatografia líquida de alta eficiência de EALCs e Cs1, com detecção de UV a 325 nm. Ácido gálico (1), ácido clorogênico (2), ácido caféico (3), ácido elágico (4), rutina (5), quercetina (6) e canferol (7).

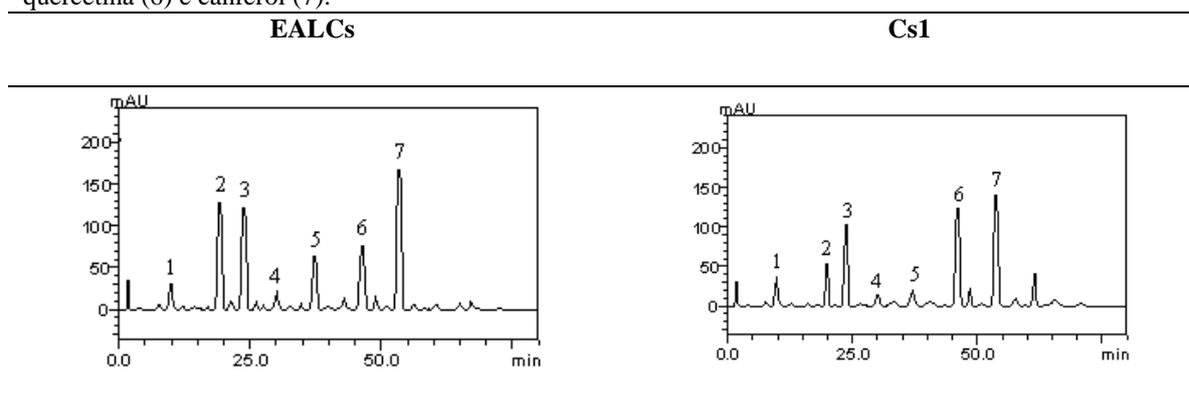


Tabela 5 – Composição do EALCs e de Cs1. Resultados expressos como média \pm desvio padrão de três determinações. Médias seguidas de diferentes letras diferem a partir do teste de Tukey, com valor de $p < 0.05$. LD – Limite de Detecção; LQ - Limite de Quantificação.

Compostos	EALCs		Cs1		LD $\mu\text{g/mL}$	LQ $\mu\text{g/mL}$
	mg/g	%	mg/g	%		
Ácido Gálico	8.67 ± 0.03^a	0.86	9.37 ± 0.01^a	0.93	0.015	0.049
Ácido Clorogênico	43.19 ± 0.01^b	4.31	16.43 ± 0.02^b	1.54	0.009	0.029
Ácido Caféico	41.70 ± 0.02^b	4.17	30.28 ± 0.02^c	3.02	0.024	0.078
Ácido Elágico	6.53 ± 0.02^c	0.65	3.56 ± 0.03^d	0.35	0.013	0.042
Rutina	19.82 ± 0.01^d	1.98	3.91 ± 0.01^d	0.39	0.027	0.090
Quercetina	22.39 ± 0.03^e	2.23	41.80 ± 0.01^e	4.18	0.019	0.063
Canferol	65.41 ± 0.02^f	6.54	46.32 ± 0.03^f	4.63	0.026	0.085

Tabela 6 – Composição do EALCs e de Cs1, considerando as concentrações utilizadas nos testes *in vitro*.

Compostos	EALCs				Cs1			
	$\mu\text{g}/50\mu\text{g}$	$\mu\text{g}/10\mu\text{g}$	$\mu\text{g}/5\mu\text{g}$	$\mu\text{g}/2\mu\text{g}$	$\mu\text{g}/50\mu\text{g}$	$\mu\text{g}/10\mu\text{g}$	$\mu\text{g}/5\mu\text{g}$	$\mu\text{g}/2\mu\text{g}$
Ácido Gálico	0,43	0,09	0,043	0,02	0,47	0,09	0,05	0,02
Ácido Clorogênico	2,16	0,43	0,21	0,09	0,82	0,16	0,08	0,03
Ácido Caféico	2,08	0,42	0,21	0,08	1,51	0,30	0,15	0,06
Ácido Elágico	0,33	0,06	0,03	0,01	0,18	0,03	0,02	0,01
Rutina	0,99	0,20	0,09	0,04	0,19	0,04	0,02	0,01
Quercetina	1,12	0,22	0,11	0,04	2,09	0,42	0,20	0,08
Canferol	3,27	0,65	0,33	0,13	2,32	0,46	0,23	0,09

5.1.2.2 Polifenóis Totais

A dosagem de polifenóis totais foi expressa em mg de ácido gálico / g de extrato, e determinou 425 mg de ácido gálico / g de EALCs e 470 mg de ácido gálico / g de Cs1.

5.1.2.3 Flavonoides Totais

A concentração de flavonoides foi expressa em mg de quercetina / g de extrato, e foi determinado 240 mg de quercetina / g de EALCs e 229 mg de quercetina / g de Cs1.

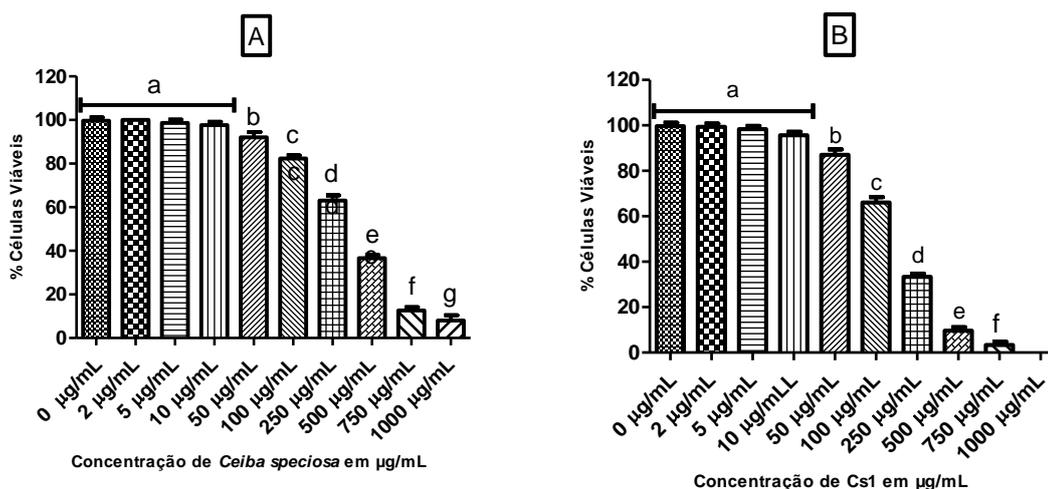
5.2 Avaliação Toxicológica e do Potencial Antioxidante *in vitro*

5.2.1 Determinação das concentrações utilizadas

5.2.1.1 Teste de Viabilidade Celular

O teste de viabilidade celular (Figura 3) foi realizado com o intuito de escolher as concentrações para a realização dos testes *in vitro*. Foram selecionadas as concentrações que mantiveram a viabilidade celular acima de 85%. Para o EALCs, as concentrações selecionadas foram: 50 $\mu\text{g/mL}$ (92%), 10 $\mu\text{g/mL}$ (98%), 5 $\mu\text{g/mL}$ (99%) e 2 $\mu\text{g/mL}$ (100%). Para Cs1, as concentrações de 50 $\mu\text{g/mL}$ (87%), 10 $\mu\text{g/mL}$ (96%), 5 $\mu\text{g/mL}$ (98%) e 2 $\mu\text{g/mL}$ (99%) foram selecionadas.

Figura 6 – Resultado do Teste de Viabilidade Celular em leucócitos humanos após a adição de EALCs (A) e Cs1 (B). 0 $\mu\text{g/mL}$ - Controle Negativo (tampão PBS); 1000, 750, 500, 250, 100, 50, 10, 5 e 2 $\mu\text{g/mL}$. Colunas representadas pelas mesmas letras (a, b, c, etc.) não apresentam diferença estatisticamente significativas entre si.

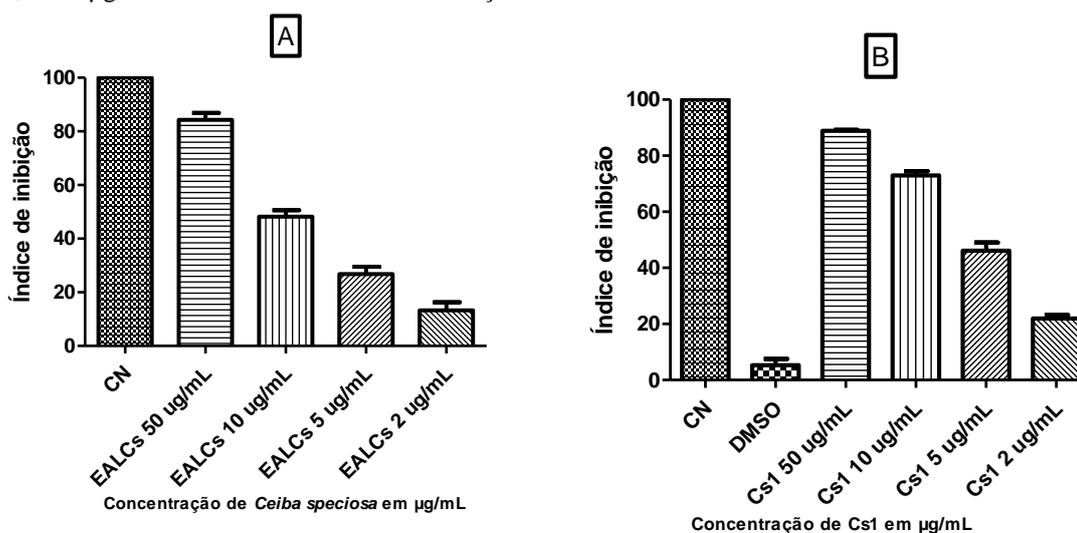


5.2.2 Avaliação do Dano Oxidativo e do Potencial Antioxidante

5.2.2.1 Avaliação da atividade sequestradora do Radical DPPH

A atividade sequestradora (*Scavenger*) do radical DPPH (Figura 4) demonstrou uma considerável reversão da oxidação na concentração de 50 $\mu\text{g/mL}$ de ambas as amostras, sendo de 85,13% para o EALCs, e 88,95% para Cs1. A reversão foi dependente da concentração, apresentando 49,12% para 10 $\mu\text{g/mL}$, 27,52% para 5 $\mu\text{g/mL}$ e 13,32% para 2 $\mu\text{g/mL}$ para o EALCs, e 73,12%, 45,35% e 21,36% para as mesmas concentrações de Cs1, respectivamente. O DMSO foi demonstrado apenas para Cs1, uma vez que foi utilizado somente neste caso para auxílio da dissolução.

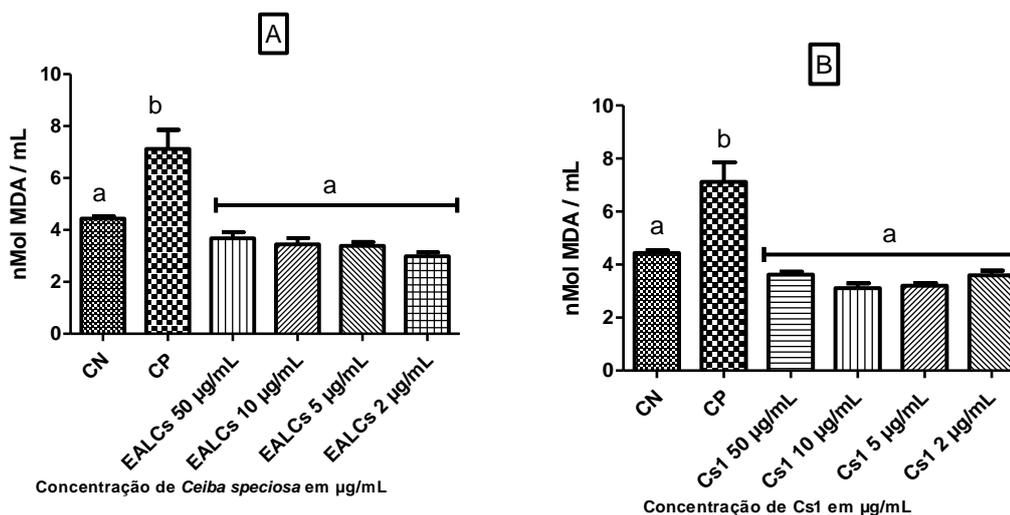
Figura 7 – Resultado da Determinação da Atividade Sequestradora do radical DPPH . (A)EALCs;(B)Cs1; NC – Controle Negativo (Água destilada); EALCs 50, 10, 5 e 2 $\mu\text{g/mL}$ – EALCs nas referidas concentrações. Cs1 50, 10, 5 e 2 $\mu\text{g/mL}$ – Cs1 nas referidas concentrações.



5.2.2.2 Teste de Peroxidação Lipídica

O teste de peroxidação lipídica (Figura 5) demonstrou que todas as concentrações, de ambas as amostras, apresentaram resultados estatisticamente semelhantes ao controle negativo, sugerindo que não houve de estresse oxidativo, além de demonstrar potencial antioxidante para este parâmetro, nestas concentrações.

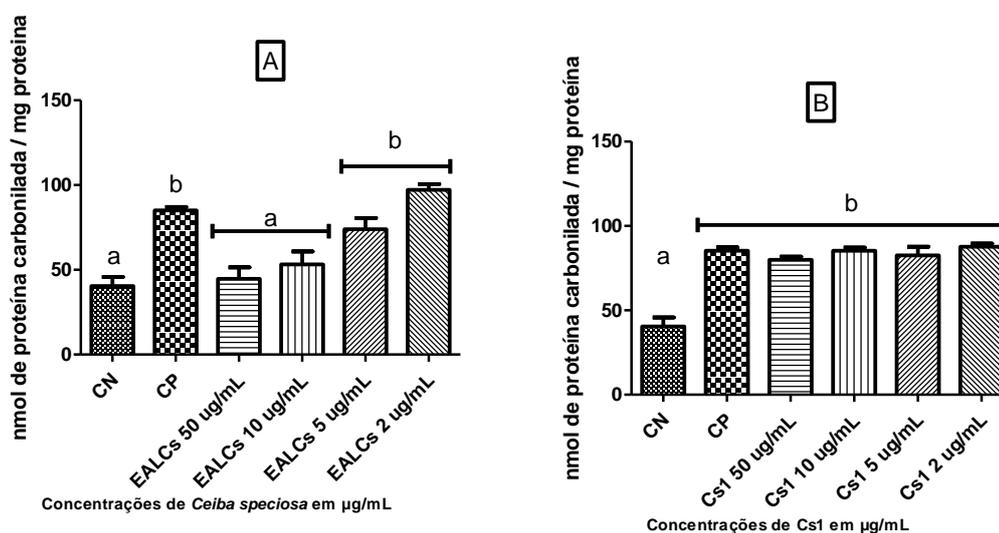
Figura 8 – Resultado do Teste de Peroxidação Lipídica em plasma com dano induzido por H_2O_2 100 μ M, após adição de EALCs (A) e Cs1 (B). CN – Controle negativo (Tampão PBS); CP – Controle Positivo (H_2O_2 100 μ M); EALCs 50, 10, 5 e 2 μ g/mL – EALCs nas referidas concentrações. Cs1 50, 10, 5 e 2 μ g/mL – Cs1 nas referidas concentrações. Colunas representadas pelas mesmas letras (a, b, c, etc.) não apresentam diferença estatisticamente significativa entre si.



5.2.2.3 Determinação de Proteína Carbonilada

A dosagem de proteína carbonilada (Figura 6) demonstrou que as concentrações de 50 e 10 μ g/mL de EALCs apresentaram índice de carbonilação estatisticamente semelhante ao controle negativo, ou seja, não sugerem a ocorrência de estresse oxidativo, além de demonstrar potencial antioxidante frente a proteínas para estas concentrações. Entretanto, os resultados com 5 e 2 μ g/mL de EALCs e com todas as concentrações de Cs1 foram estatisticamente semelhantes ao controle positivo, sugerindo a ocorrência dano oxidativo frente a proteínas.

Figura 9 – Resultado da Dosagem de Proteína Carbonilada no plasma com dano induzido por H_2O_2 100 μ M, após adição de EALCs (A) e Cs1 (B). CN – Controle negativo (Tampão PBS); CP – Controle Positivo (H_2O_2 100 μ M); EALCs 50, 10, 5 e 2 μ g/mL –EALCs nas referidas concentrações.Cs1 50, 10, 5 e 2 μ g/mL - Cs1 nas referidas concentrações. Colunas representadas pelas mesmas letras (a, b, c, etc.) não apresentam diferença estatisticamente significativas entre si.

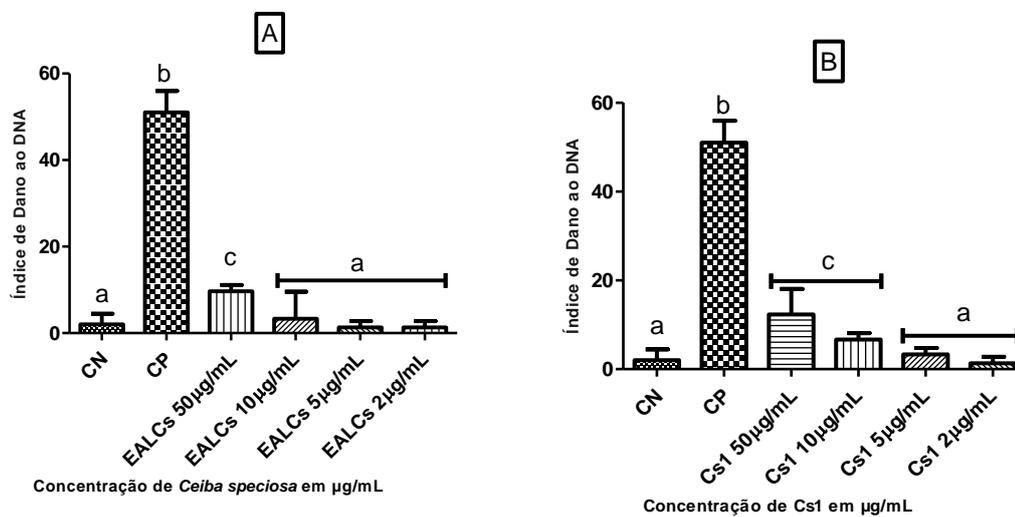


5.2.3 Avaliação da Genotoxicidade

5.2.3.1 Ensaio Cometa

O ensaio cometa (Figura 7) demonstrou que a concentração de 50 μ g/mL de EALCs e as concentrações de 50 e 10 μ g/mL de Cs1 não mantiveram relação estatística com o controle negativo, sugerindo dano de Grau 1 ao DNA. Já as concentrações de 10, 5 e 2 μ g/mL de EALCs e as concentrações 5 e 2 μ g/mL de Cs1 demonstraram semelhança estatística ao controle negativo, sugerindo que não houve dano significativo ao DNA.

Figura 10 – Resultado do Ensaio Cometa em leucócitos humanos após a adição de EALCs (A) e Cs1 (B). Controle Negativo - Tampão PBS; Controle Positivo - H_2O_2 100 μM ; EALCs 50, 10, 5 e 2 $\mu g/mL$ – EALCs nas concentrações de 50, 10, 5 e 2 $\mu g/mL$. Cs1 50, 10, 5 e 2 $\mu g/mL$ – Cs1 nas concentrações de 50, 10, 5 e 2 $\mu g/mL$. Colunas representadas pelas mesmas letras (a, b, c, etc.) não apresentam diferença estatística



6. DISCUSSÃO

Os avanços tecnológicos na área da saúde como um todo e, conseqüentemente, dos tratamentos e medicamentos disponíveis, não representou o fim do uso de plantas medicinais como alternativa de terapêutica para grande parcela da população. É estimado que, nas últimas décadas, além do crescente uso popular das plantas, cerca de 30% de todas as drogas avaliadas como agentes terapêuticos são derivados de produtos naturais (SOUSA *et al.*, 2008).

Em função desta grande demanda, foi necessária a criação de instrumentos regulatórios e informativos a respeito do uso de plantas medicinais. Com isso, em 2006, o Ministério da Saúde elaborou a Política Nacional de Plantas Mediciniais e Fitoterápicos (BRASIL, 2007), visando a implantação do uso de plantas medicinais como terapia no Sistema Único de Saúde e o incentivo às pesquisas voltadas ao seu uso, na intenção de garantir o emprego correto e seguro destas espécies. Além disso, foi criada a Relação de Plantas de Interesse ao SUS (RENISUS), com a finalidade de orientar estudos e pesquisas que subsidiem a relação de fitoterápicos disponíveis para uso da população. A lista dispõe de 71 plantas medicinais com finalidade terapêutica (FEIJÓ *et al.*, 2012).

Baseado nisso, é necessário ressaltar a importância de estudos a respeito das plantas utilizadas pela população, uma vez que muitas delas apresentam relato de uso estritamente local e podem oferecer uma alternativa de tratamento para diversas doenças, ou representar um severo fator de toxicidade e interação medicamentosa para seus usuários. Por isso, uma das maneiras mais comuns de seleção de uma espécie para realização de um estudo é a etnofarmacologia, ou seja, baseado em seu uso na medicina popular (CARLINI *et al.*, 2006). Neste sentido, *Ceiba speciosa*, objeto do presente estudo, foi escolhida a partir do relato de sua utilização popular por uma parcela da população do Rio Grande do Sul-Brasil. Não havendo dados científicos que confirmem a segurança e orientem o uso correto desta espécie, é de fundamental importância que a avaliação destes parâmetros seja feita.

O presente estudo foi iniciado pela determinação das concentrações a serem utilizadas nos testes *in vitro*. Assim como no estudo realizado por PRESIBELLA e colaboradores (2003), o teste de viabilidade celular foi realizado com este intuito, sendo escolhidas aquelas que mantiveram a viabilidade celular acima de 85%. As concentrações que mantiveram este índice de viabilidade para EALCs e Cs1 foram: 50, 10, 5 e 2 µg/mL. Estes dados revelam o baixo potencial tóxico de *Ceiba speciosa*, mantendo a viabilidade de leucócitos humanos até mesmo em concentrações mais elevadas.

Dando sequencia as análises, foi realizada a análise por CLAE/DAD, visando a quantificação das principais substâncias fenólicas e flavonoides. Estes compostos representam uma das classes fitoquímicas de maior ocorrência em plantas, uma vez que desempenham papel protetor contra patógenos e predadores. Nos humanos, são conhecidos por desempenhar diversas ações fisiológicas como antifúngica e anti-inflamatória, sendo a atividade antioxidante uma das principais (AYALA-ZAVALA *et al.*, 2012). A análise por CLAE revelou que os flavonoides (quercetina, rutina e canferol) e os ácidos fenólicos (gálico, clorogênico, elágico e caféico) estão presentes tanto em EALCs quanto em Cs1. As concentrações encontradas para cada um dos compostos fenólicos revela que a maioria está em maiores concentrações em EALCs. A única exceção é a quercetina, encontrada em maior quantidade em Cs1.

Na determinação de polifenóis e flavonoides totais do EALCs e Cs1, em consonância com a análise realizada por CLAE, foi demonstrado que as cascas preparadas conforme o método de uso popular contêm grandes quantidades de polifenóis e flavonoides totais, o que valoriza o potencial antioxidante desta espécie. KRISHNAVENI e colaboradores (2013) buscaram determinar os teores de flavonoides e fenóis totais do extrato aquoso da folha de diversas plantas, dentre elas *Ceiba speciosa*. Os autores demonstram, dentre as plantas de seu estudo, que *Ceiba speciosa* é rica em flavonoides (7,7 mg de quercetina/g de extrato) e compostos fenólicos (3,3 mg de ácido gálico/g de extrato).

Iniciando a avaliação da atividade antioxidante, foi realizada a determinação da atividade sequestradora do radical DPPH, que tem sido amplamente aceita como recurso para estimativa da atividade antioxidante (AYALA-ZAVALA *et al.*, 2012; BENHAMMOU *et al.*, 2009; MOHSIN *et al.*, 2014; WAN-IBRAHIM *et al.*, 2010). Neste contexto, o teste que determinou a atividade sequestradora do radical DPPH demonstrou uma considerável reversão da oxidação nas concentrações de 50 µg/mL e 10 µg/mL, tanto para EALCs quanto para Cs1, ficando em torno ou acima de 50%. GAUR e colaboradores (2009) avaliaram a atividade antioxidante do extrato metanólico das folhas de *Ipomoea fistulosa* e descrevem uma reversão de até 86,44% na concentração de 100 µg/mL. No resultado apresentado neste estudo, esta porcentagem de reversão foi observada na concentração que representa a metade da que foi testada pelos autores (85,13% para EALCs e 88,95% para Cs1), indicando que há um considerável potencial sequestrador de radical livre de *Ceiba speciosa*. Além disso, o autor compara esta reversão ao resultado apresentado pelo butilhidroxitolueno (BHT), que tem conhecida atividade antioxidante, e descreve uma reversão de 86,94% para 50 µg/mL. Desta forma, é possível supor que a inibição apresentada por EALCs e Cs1, pode ser

relacionada à potente reversão observada no BHT. Apesar de mais estudos serem necessários para classificar a atividade antioxidante de *Ceiba speciosa*, esta avaliação preliminar realizada pelo teste do DPPH revelou uma reversão de oxidação similar a um antioxidante de elevado potencial conhecido, o que somado ao alto teor de polifenóis e flavonoides totais demonstrados por este estudo, sugere uma promissora atividade antioxidante desta espécie.

Em um estudo realizado por AYALA-ZAVALA e colaboradores (2012), os autores analisaram alguns parâmetros de avaliação da atividade antioxidante para *Phellinus gilvus*, *Phellinus rimosus*, e *Phellinus badius*. Dentre eles foi feita a correlação entre a quantidade de polifenóis totais e a atividade sequestradora do radical DPPH, revelando que, quanto maior a quantidade de polifenóis totais, maior será a atividade sequestradora do radical livre.

Dando seguimento à determinação do potencial antioxidante e do dano oxidativo de *Ceiba speciosa*, foi realizada a dosagem de proteína carbonilada. Foi demonstrado que as concentrações de 50 e 10 µg/mL de EALCs, apresentaram índice de proteína semelhante ao controle negativo, sugerindo que além de não ocorrer dano oxidativo nas proteínas, a espécie apresentou potencial antioxidante, uma vez que houve prévia indução de dano com H₂O₂ 100 µM na realização deste teste. Nas demais concentrações (5 e 2 µg/mL) de ambas as amostras foi observado resultado semelhante ao controle positivo, sugerindo, portanto, a ocorrência de dano oxidativo. Em contrapartida, todas as concentrações testadas para Cs1 demonstraram dose de proteína carbonilada relacionada ao controle positivo, indicando a ocorrência de dano frente a proteínas. Este fato pode estar associado à elevada concentração de quercetina em Cs1, uma vez que, apesar das descritas ações benéficas dos flavonoides, estudos têm demonstrado ação pró-oxidante *in vitro* (BEHLING *et al.*, 2004). Este é um teste que mensura o dano oxidativo frente a proteínas, responsável pela alteração de funções biológicas em função do dano celular em vários tecidos. Por este motivo, este teste é considerado uma avaliação que proporciona parâmetros confiáveis, no que diz respeito a marcadores de dano oxidativo (LEVINE, 1990). Já no teste de peroxidação lipídica, onde também houve prévia indução de dano com H₂O₂ 100 µM, foi demonstrado que todas as concentrações de EALCs e Cs1 apresentaram relação com o controle negativo, não sugerindo dano oxidativo neste parâmetro e, novamente, indicando potencial antioxidante de *Ceiba speciosa*. Este resultado representa mais um indicativo da segurança da espécie, uma vez que a ocorrência de peroxidação lipídica está diretamente ligada a diversos processos patológicos, como a carcinogênese.

Em um estudo realizado por SINGH e colaboradores (2009), os autores realizaram uma análise de várias frações de extratos de *Allium cepa*, uma espécie com ação antioxidante comprovada. Os autores verificaram que a fração etil acetato foi a que apresentou maiores teores de polifenóis totais (384,7 mg ácido gálico/g) e flavonoides totais (165 mg de quercetina/g). Contudo, foi observado neste estudo que os teores de polifenóis (425 mg/g EALCs e 470 mg/g de Cs1) e flavonoides totais (240 mg/g EALCs e 229 mg/g de Cs1) foram ainda maiores para *Ceiba speciosa*. Portanto, este fato pode ser considerado como mais uma evidência que sugere a ligação que ocorre entre as altas concentrações das substâncias fenólicas e o aumento do potencial antioxidante observado nos testes realizados.

Finalizando as análises de toxicidade, foi realizado o teste cometa, que é considerado um método sensível para a detecção de quebras duplas e simples no DNA (COLLINS *et al.*, 2008). Foi possível observar que apenas as maiores concentrações de cada amostra (50 µg/mL do EALCs e 50 e 10 µg/mL de Cs1) apresentaram dano de grau 1 ao DNA. Contudo, o dano de grau 1 representa a menor amplitude de dano possível ao DNA, ou seja, baixo potencial de toxicidade. As demais concentrações de ambas as amostras demonstraram ser estatisticamente semelhantes ao controle negativo, sugerindo que não houve dano significativo. WAN-IBRAHIM e colaboradores (2010) realizaram um estudo com o extrato aquoso de 20 plantas comestíveis da Malásia, e verificaram que apenas duas delas apresentaram dano ao DNA maior do que 50%, indicando dano severo. Desta forma, é importante destacar que, mesmo nas concentrações mais elevadas, o dano causado por EALCs e Cs1 caracteriza um dano de baixa amplitude, além do fato de que todas as demais concentrações testadas não demonstraram dano significativo ao DNA, o que sugere a segurança do uso para o parâmetro testado.

Através da correlação feita entre os resultados *in vitro* observados neste estudo, é possível observar que um promissor potencial antioxidante está presente nos extratos de *Ceiba speciosa*. Estas ações podem ser justificadas pelo alto teor de flavonoides e polifenóis totais demonstrado no resultado das análises deste estudo, uma vez que sabidamente os compostos fenólicos representam os constituintes responsáveis pelo potencial antioxidante de produtos naturais (KRISHNAVENI *et al.*, 2013; LOGANAYAKI *et al.*, 2013), como por exemplo as espécies do gênero *Passiflora* e *Citrus*, ricas em flavonoides e com atividade antioxidante bem estabelecida. Além disso, é possível indicar que a dose de 10 µg/mL foi a que obteve melhores resultados em termos de segurança e da obtenção do potencial efeito antioxidante *in vitro* desta espécie, pois apresentou resultados satisfatórios em todos os parâmetros testados, demonstrando potencial antioxidante e ausência de toxicidade. Além

disso, de acordo com COS e colaboradores (2006), a referida dose está dentro do limite considerado adequado e efetivo para ação no organismo, uma vez que este valor deve estar abaixo de 100 µg/mL (COS *et al.*, 2006).

O uso de plantas é amplamente aceito pelo público, e este fato está intimamente ligado à crença popular de que produtos naturais são livres de efeitos adversos. Contudo, a popularização do uso somada ao livre acesso e a falta de orientação profissional a respeito do uso correto, representam um risco à saúde (AL-ARIF, 2012; JEONG *et al.*, 2012). Neste sentido, os resultados deste estudo representam uma importante base para o uso popular, tendo em vista que até o presente momento não havia estudos que indicassem a segurança da utilização de *Ceiba speciosa*.

O estudo realizado por AL-ARIFI (2012) teve como principal objetivo avaliar a disponibilidade de bases confiáveis que orientem o uso de plantas medicinais. Em seu estudo, o autor relata que a maioria dos profissionais (59,7%) inicia a discussão sobre esse assunto com os seus pacientes, porém este índice ainda é considerado baixo. Dentre os principais motivos para não abordar o tema, os profissionais descrevem a falta de recursos confiáveis e a falta de evidências científicas a respeito dos efeitos e segurança do uso de plantas específicas. Este dado fortalece a importância de estudos que iniciem a avaliação de plantas amplamente utilizadas por determinada região, e forneçam ao profissional um embasamento científico para orientação a respeito da segurança e eficácia do uso da espécie.

Em outro artigo, publicado por JEONG e colaboradores (2012), os autores investigaram a ocorrência de efeito adverso hepático e renal em pacientes internados em um hospital, tratados com medicamentos sintéticos e plantas medicinais. Como resultado, os autores descrevem que nenhum dos pacientes que fazia uso somente de planta apresentou dano nos parâmetros testados. Estes dados fortalecem a evidência de que, quando usadas corretamente e segundo orientação especializada, as plantas medicinais representam uma alternativa segura e eficaz. Por este motivo se faz tão necessária a produção científica acerca das espécies utilizadas pela população, pois além de garantir sua segurança, fornece embasamento confiável para a orientação profissional.

Neste contexto, a farmacovigilância é uma ferramenta essencial para a obtenção de informações a respeito da segurança da utilização de plantas medicinais. Porém, os sistemas atuais desta prática estão direcionados, de maneira mais ampla, à medicamentos sintéticos (DEBBIE, *et al.*, 2012). Para resolução deste obstáculo, é necessária a cooperação entre a comunidade científica, no sentido de produção de dados acerca dos efeitos e toxicidade das espécies, e dos profissionais da saúde, a respeito da orientação e observação prática dos

efeitos adversos apresentados e descritos pelos usuários das plantas. Desta forma, este trabalho vem contribuir com esta construção, trazendo um estudo preliminar acerca de uma espécie utilizada popularmente, e que ainda não possuía relatos científicos acerca de sua constituição química, seus efeitos e toxicidade.

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Através da análise e comparação dos resultados obtidos nos testes *in vitro*, é possível observar que não houve toxicidade, em nenhum parâmetro testado, para as doses iguais ou abaixo de 10 µg/mL do extrato aquoso da casca de *Ceiba speciosa* e de Cs1. Além disso, a dose de 10µg/mL apresentou potencial antioxidante frente a lipídeos (para o EALCs e Cs1) e proteínas (somente EALCs), e um resultado em torno de 50% ou mais de atividade Sequestradora do radical DPPH. Desta forma, é possível sugerir que, além de atóxica, há um elevado potencial antioxidante para esta dose. Contudo, ainda há a necessidade de avaliação de seu efeito hipocolesterolêmico, motivo pelo qual se justifica o uso popular da espécie. Além disso, também é possível sugerir uma avaliação quanto a possíveis outras atividades farmacológicas, como por exemplo de atividade hipoglicemiante, uma vez que tal atividade já está comprovada para outra espécie do gênero (*Ceiba pentandra*). Desta forma, também se faz necessária uma análise fitoquímica mais aprofundada de *Ceiba speciosa*, a fim de investigar outras possíveis ações farmacológicas e até mesmo toxicológicas, tendo em vista que neste estudo foi verificada apenas a presença de compostos fenólicos. Este estudo caracteriza uma das primeiras avaliações da eficácia e segurança dos efeitos de *Ceiba speciosa*. Por se tratar de uma planta de ampla utilização no noroeste do estado do Rio Grande do Sul, o presente estudo vem indicar a segurança de sua utilização, uma vez que as doses que não apresentaram toxicidade estão dentro do parâmetro de ação biológica, em humanos. É importante ressaltar que até o presente momento não haviam estudos envolvendo a investigação dos parâmetros testados por esta pesquisa, o que a constitui como o primeiro passo para a caracterização desta espécie, de seus efeitos e da segurança de sua utilização.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AFONSO, M. S.; SANT'ANA, L. S.; MANCINI-FILHO, J. Interação entre antioxidantes naturais e espécies reativas do oxigênio nas doenças cardiovasculares: perspectivas para a contribuição do alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.). *Nutrire: Revista da Sociedade Brasileira de Alimentação Nutrição*, v. 35, p. 129-148, 2010.

AFROSE, S.; HOSSAIN, M.S.; MAKI, T.; TSUJII, H. Karaya root saponin exerts a hypocholesterolemic response in rats fed a high-cholesterol diet. *Nutrition Research* 29, 350–354, 2009.

AL-ARIFI, M. N. Availability and needs of herbal medicinal information resources at community pharmacy, Riyadh region, Saudi Arabia. *Saudi Pharmaceutical Journal* 21, 351–360, 2013.

ALEXANDRE, R. F.; BAGATINI, F.; SIMÕES C. M. O. Interações entre Fármacos e Medicamentos Fitoterápicos a Base de Ginkgo ou Ginseng. *Revista Brasileira de Farmacognosia*. 18(1): 117-126, Jan./Mar. 2008.

AYALA-ZAVALA, J. F.; SILVA-ESPINOZA, B. A.; CRUZ-VALENZUELA, M. R.; VILLEGAS-OCHOA, M. A.; ESQUEDA, M.; GONZÁLEZ-AGUILAR, G. A.; CALDERÓN-LÓPEZ, Y. Antioxidant and antifungal potential of methanol extracts of *Phellinus spp.* from Sonora, Mexico. *Rev Iberoam Micol.* 29(3):132–138, 2012.

BELESKI-CARNEIRO E.; SUQUI, J.; REICHER, F. Structural and biological features of a hydrogel from seed coats of *Chorisia speciosa*. *Phytochemistry*, v. 61, p. 157–163, 2002.

BEHLINGH, E. S.; SENDÃO, M. C.; FRANCESCATO, H. D. C.; ANTUNES, L. M. G.; BIANCHI, L. M. P. Flavonoide Quercetina: Aspectos Gerais e Ações Biológicas. *Alim. Nutr.*, Araraquara, v. 15, n. 3, p. 285-292, 2004.

BENHAMMOU, N.; BEKKARA, F. A.; PANOVSKA, T. K. Antioxidant activity of methanolic extracts and some bioactive compounds of *Atriplex halimus*. *C. R. Chimie* 12, 1259–1266, 2009.

BRANDT, A. P.; OLIVEIRA, L. F. S.; FERNANDES, F. B.; ALBA, J. Avaliação *in vivo* do efeito hipocolesterolêmico e toxicológico preliminar do extrato bruto hidroalcoólico e decocção da *Vitex megaptamica* (Spreng) Moldenke (*V. montevidensis* Cham.). *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 19, p. 388-393, 2008.

BRANDÃO, H. N.; DAVID, J. P.; COUTO, R. D.; NASCIMENTO, J. A. P. Química e Farmacologia de Quimioterápicos Antineoplásicos Derivados de Plantas. *Quim. Nova*, Vol. 33, No. 6, 1359-1369, 2010.

BOLIGON A.A., FELTRIN A.C., MACHADO M.M., JANONIK V. & ATHAYDE M.L. Hplc Analysis And Phytoconstituents Isolated From Ethyl Acetate Fraction Of *Scutia buxifolia* Reiss. Leaves. *Latin American Journal Of Pharmacy*, 28 (1): 121-4, 2009.

BUROW, M. E., WELDON, C. B., TANG, Y., NAVAR, G. L., KRAJEWSKI, S., REED, J. C., HAMMOND, T. G., CLEJAN, S., BACKMAN, B. S. Differences in susceptibility to tumor necrosis factor α -induced apoptosis among MCF-7 breast cancer cell variants. *Cancer Res.* 58, 4940-4946, 1998.

BRASIL. Ministério da Saúde. Política nacional de plantas medicinais e fitoterápicos. Brasília: Ministério da Saúde; 2007.

CAPPELATTI, L.; SCHMITT, L. J. ; Caracterização da flora arbórea de um fragmento urbano de floresta estacional semidecidual no Rio Grande do Sul, Brasil. *Pesquisas, Botânica* Nº 60:341-354 São Leopoldo: Instituto Anchieta de Pesquisas, 2009.

CARLINI, E.A.; RODRIGUES, E.; MENDES, F.R.; TABACH, R.; GIANFRATTI, B. Treatment of drug dependence with Brazilian herbal medicines. *Rev Bras Farmacogn* 16: 690-695. 2006.

CARTAXO, S. L.; SOUZA, M. M. A.; ALBUQUERQUE, U. P. Medicinal plants with bioprospecting potential used in semiarid northeastern Brazil. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 131, p. 326-342, 2010.

CARVALHO, J. E. Atividade antiulcerogênica e anticâncer de produtos naturais e de síntese.

Multiciência: Construindo a História dos Produtos Naturais, v. 7, p. 1-18, 2006.

CHANDRA, S.; MEJIA, E. G.; *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 3583, 2004

COLLINS, A.R.; OSCOZ, A.A.; BRUNBORG, G.; GAIVÃO, I.; GIOVANNELLI, L.; KRUSZEWSKI, M.; SMITH, C.C.; STETINA, R. The comet assay: topical issues. *Mutagenesis*. Vol. 23 no. 3 pp. 143-151, 2008.

COS, P.; VLIETINCKB, A.J.; BERGHEA, D.V.; MAES, L. Anti-infective potential of natural products: How to develop a stronger in vitro 'proof-of-concept'. *Journal of Ethnopharmacology*. 106, 290–302, 2006.

DORNAS, W.C.; OLIVEIRA, T.T.; RODRIGUES-DAS-DORES, R.G.; SANTOS, A.F.; NAGEM, T.J. Flavonoides: potencial terapêutico no estresse oxidativo. *Rev. Ciênc. Farm. Básica Apl.*, v. 28, n.3, p. 241- 249, 2007.

DRAPUR, H.H., HODLEY, M. Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation. *Methods Enzymol*. 186. 421–431, 1990.

ELDIN, S.; DUNFORD, A. *Fitoterapia na atenção primária à saúde*. 1 ed. São Paulo: Manole, 2001.

FEIJÓ, A.M.; BUENO, M.E.N.; CEOLIN, T.; LINCK, C.L.; SCHWARTZ, E.; LANGE, C.; MEINCKE, S.M.K.; HECK, R.M.; BARBIERI, R.L.; HEIDEN, G. Plantas medicinais utilizadas por idosos com diagnóstico de Diabetes mellitus no tratamento dos sintomas da doença. *Rev. Bras. Pl. Med.*, Botucatu, v.14, n.1, p.50-56, 2012.

FIETZ, V.R.; SALGADO, J.M. Efeito da pectina e da celulose nos níveis séricos de colesterol e triglicerídeos em ratos hiperlipidêmicos. *Ciênc.Tecnol.Aliment*. 19, 3. 1999.

FRIEDEWALD, W.T. Estimation of concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. *Clinical Chemistry* 18, 499–502, 1972.

GAUR, K.; KORI, M.L.; Tyagi, L.K.; Nema, R.K.; Sharma, C.S.; Tripathi, P. *In-Vitro* Antioxidant Activity of Leaves of *Ipomoea fistulosa* Linn. *Academic Journal of Plant Sciences* 2 (2): 60-64, 2009.

GIACCO, F.; BROWNLEE, M. Oxidative stress and diabetic complications. *Circ Res* 107, 1058-1070. 2010.

GILANI, A. H.; RAHMAN, A. U. Trends in ethnopharmacology. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 100, p. 43 -49, 2005.

HALLIWELL B, GUTTERIDGE JMC. *Free Radicals in Biology and Medicine*, 3rd Ed, Oxford University Press, NY, 2007.

HIRUNPANICH, V.; UTAIPAT, A.; MORALES, N.P.; BUNYAPRAPHATSARA, N.; SATO, H.; HERUNSALE, A.; SUTHISISANG, C. Hypocholesterolemic and antioxidant effects of aqueous extracts from the dried calyx of *Hibiscus sabdariffa* L. in hypercholesterolemic rats. *Journal of Ethnopharmacology* 103 (2006) 252–260, 2006.

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

JEONG, T. Y.; PARK, B. K.; CHO, J. H.; KIM, Y. I.; AHN, Y. C.; SON. A prospective study on the safety of herbal medicines, used alone or with conventional medicines. *Journal of Ethnopharmacology* 143, 884–888, 2012.

KRISHNAVENI, M.; AMSAVALLI, L.; CHANDRASEKAR, R.; MADHAIYAN, P.; DURAIRAJ, S. Antioxidant activity of Plants at Govt. College of Engineering Campus, Salem, Tamil nadu, India. *Int. J. Pharm. Sci. Rev. Res.*, 21(1), Jul – Aug 2013; n° 27, 160–163, 2013.

LADEJI O., OMEKARAH, I.; SOLOMON, M.. Hypoglycemic properties of aqueous bark extract of *Ceiba pentandra* in streptozotocin-induced diabetic rats. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 84, p. 139-142, 2003.

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

LEVINE, R. L.; GARLAND, D.; OLIVER, C. N.; AMICI, A.; CLIMENT, I.; LENZ, A.G. ALM, B.; SHALTIEL, S.; STADMAN, E. R. Damage to proteins and lipids tissues under oxidative stress. *Methods in Enzymology*, v. 186, p. 464-478, 1990.

LOGANAYAKI, N.; SIDDHURAJU, P.; MANIAN, S. Antioxidant activity and free radical scavenging capacity of phenolic extracts from *Helicteres isora* L. And *Ceiba pentandra* L. *J Food Sci Technol* (July–August 2013) 50(4):687–695. 2013.

LUO, Q.F.; SUN, L.; SI, J.Y.; CHEN, D.H. Hypocholesterolemic effect of stilbenes containing extract-fraction from *Cajanus cajan* L. on diet-induced hypercholesterolemia in mice. *Phytomedicine* 15 (2008) 932–939, 2008.

MACEDO, A.F.; OSHIWA, M.; GUARIDO, C.F. Ocorrência do uso de plantas medicinais por moradores de um bairro do município de Marília-SP. *Revista de Ciências Farmacêuticas Básica Aplicada*, v. 28, p.123-128, 2007.

MOHSIN, S.; MAHADEVAN, R.; KURUP, G. M. Free-radical-scavenging activity and antioxidant effect of ascophyllan from marine brown algae *Padina tetrastromatica*. *Biomedicine & Preventive Nutrition* 4, 75–79, 2014.

MORABITO, F., CRISTIANI, M., SAIJA, A., STELITANO, C., CALLEA, V., TOMAINO, A., MINCIULLO, P.L., GANGEMI, S. Lipid Peroxidation And Protein Oxidation In Patients Affected By Hodgkin's Lymphoma?. *Mediators of Inflammation*. 13, 381–383, 2004.

MORRISON, M. et al. Determination of Lignin and Tannin contents of cowpea seeds coats. *Annals of Botany*, v.76, n. 3, p. 287-290.1995

NEGRI, G. Diabetes melito: plantas e princípios ativos naturais hipoglicemiantes. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*. vol. 41, n. 2, abr./jun., 2005.

OHKAWA, H.; OHISHI, H.; YAGI, K. Assay for lipid peroxide in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Annals of Biochemistry*, v. 95, p. 351–358, 1979.

PATWARDHAN, B. Ethnopharmacology and drug discovery. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 100, p. 50 -52, 2005.

PHILLIPSON, J. D. Phytochemistry and Medicinal Plants. *Phytochemistry*, v. 56, p. 237-243, 2001.

PIZZIOLO, V. R.; BRASILEIRO, B. G.; OLIVEIRA, T. T.; NAGEM, T. J. Plantas com possível atividade hipolipidêmica: uma revisão bibliográfica de livros editados no Brasil entre 1998 e 2008. *Revista Brasileira de Plantas Medicinais*, v. 13, p. 98-109, 2011.

PRESIBELLA, M. M.; SANTOS, C. A. M.; WEFFORT-SANTOS, A. M. Influência de extratos hidroetanólicos de plantas medicinais sobre a quimiotaxia de leucócitos humanos. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, V. 13, n. 2, p.75-82, 2003.

RAMACHANDRAN, S.; RAJASEKARAN, A., MANISENTHILKUMAR, K.T. Investigation of hypoglycemic, hypolipidemic and antioxidant activities of aqueous extract of *Terminalia paniculata* bark in diabetic rats. Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine 262-268, 2012.

SAID, W.M.; NAHLA, O.M.; EHSAN, N.S.K. Comparative study of three species of Malvaceae (Bombacoideae) and Malvoideae (Malvaceae *sensu lato*) using Morphological, Anatomical and RAPD-PCR analyses. Advances in Environmental Biology, 7(2): 415-426, 2013.

SANZ-BISET, J.; CAMPOS DE LA CRUZ, J.; EPIQUIÉN-RIVERA, M. A.; CAÑIGUERAL, S. A first survey on the medicinal plants of the Chazuta valley (Peruvian Amazon). Journal of Ethnopharmacology, v. 122, p. 333-362, 2009.

SCHULZ, V.; HÄNSEL, R.; TYLER, V. E. Fitoterapia Racional. 1ed. São Paulo: Manole, 2002.

SHARMA, O.P.; BHAT, T.K. DPPH antioxidant assay revisited. Food Chemistry v. 113. 1202-05, 2009.

SILVA, T. F. O.; MARCELINO, C. E.; GOMEZ, A. J. P. S. Utilizações e Interações Medicamentosas de Produtos Contendo *Ginkgo biloba*. Colloquium Vitae, jan/jun, 2(1): 54-61. 2010.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G., de MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. Farmacognosia: da planta ao medicamento. 4.ed., Porto Alegre/Florianópolis: Ed. Universidade/UFRGS/Ed.UFSC, 2002. 833p.

SINGH, N., MCCOY, M., TICE, R., SCHNEIDER, E. A simple technique for quantification of low levels of DNA damage in individual cells. Experimental Cell Research. 175, 184-191, 1995.

SINGH, B. N.; SINGH, B. R.; SINGH, R. L.; PRAKASH, D.; SINGH, D. P.; SHARMA, B. K.; UPADHYAY, G.; SINGH, H. B. Polyphenolics from various extracts/fractions of red onion (*Allium cepa*) peel with potent antioxidant and antimutagenic activities. Food And Chemical Toxicology 47, 1161-1167, 2009.

SOUSA, F.C.F.; MELO, C.T.V.; CITÓ, M.C.O.; FÉLIX, F. H. C.; VASCONCELOS, S. M. M.; FONTELES, M. M. F.; BARBOSA FILHO, J. M.; VIANA, G. S. B. Plantas medicinais e seus constituintes bioativos: Uma revisão da bioatividade e potenciais benefícios nos distúrbios da ansiedade em modelos animais. *Rev. Bras. Farmacog.* 18(4): 642-654, Out./Dez. 2008.

SPEIT, G.; HANELT, S.; HEIBIG, R.; SEIDEL, A.; HARTMANN, A. A Detection of DNA effects in human cells with comet assay and their relevance for mutagenesis. *Toxicology Letters*, v. 88, p. 91-98, 1996.

TANIGUCHI, N.; GUTTERIDGE, J. M. C. Experimental protocols for reactive oxygen and nitrogen species. Oxford University press, oxford. ER, 2000.

VEIGA JUNIOR, V.F. Estudo do consumo de plantas medicinais na Região Centro-Norte do Estado do Rio de Janeiro: aceitação pelos profissionais de saúde e modo de uso pela população. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 18, p. 308-313, 2008.

VELOSO, D. P.; PAULA, V. F.; BARBOSA, L. C. A.; DEMUNER, A. J. A química da família Bombacaceae. *Química Nova*, v. 20, p. 627-630, 1997.

WAN-IBRAHIMA, W.I.; SIDIK, K.; KUPPUSAMYA, U.R. A high antioxidant level in edible plants is associated with genotoxic properties. *Food Chemistry*. 122 (2010) 1139–1144, 2010.

WAYHS, C. A. Y. et al. Protein and lipid oxidative damage in streptozotocin-induced diabetic rats submitted to forced swimming test: the insulin and clonazepam effect. *Metabolic Brain Disease*, v. 25, p. 297-304, 2010.

ZHISHEN, J.; MENGCHENG, T.; JIANMING, W.; *Food Chemistry* 64, 555p, 1999.