

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA  
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

CAMILA DIAS MACHADO

PADRONIZAÇÃO BOTÂNICA E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE CARDIOVASCULAR  
DE FOLHAS DE *Cecropia pachystachya* Trécul, URTICACEAE

PONTA GROSSA  
2020

CAMILA DIAS MACHADO

PADRONIZAÇÃO BOTÂNICA E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE CARDIOVASCULAR  
DE FOLHAS DE *Cecropia pachystachya* Trécul, URTICACEAE

Dissertação apresentada para obtenção do título de mestre na Universidade Estadual de Ponta Grossa, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Mestrado em Ciências Farmacêuticas, Área de Fármacos, Medicamentos e Biotecnologias Aplicadas à Farmácia.

Orientadora: Profa. Dra. Jane Manfron Budel.  
Coorientador: Prof. Dr. Arquimedes Gasparotto Junior.

PONTA GROSSA

2020

Machado, Camila Dias  
M149 Padronização botânica e avaliação da atividade cardiovascular de folhas de *Cecropia pachystachya* Trécul, Urticaceae / Camila Dias Machado. Ponta Grossa, 2020.  
93 f.

Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas - Área de Concentração: Fármacos, Medicamentos e Biociências Aplicadas à Farmácia), Universidade Estadual de Ponta Grossa.

Orientadora: Profa. Dra. Jane Manfron Budel.

Coorientador: Prof. Dr. Arquimedes Gasparotto Junior.

1. Controle da qualidade. 2. Diurético. 3. Embaúba. 4. Hipotensivo. 5. Microscopia. I. Budel, Jane Manfron. II. Gasparotto Junior, Arquimedes. III. Universidade Estadual de Ponta Grossa. Fármacos, Medicamentos e Biociências Aplicadas à Farmácia. IV.T.

CDD: 615.321

Ponta Grossa, 20 de fevereiro de 2020.

ATA DE EXAME DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS-ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: FÁRMACOS, MEDICAMENTOS E BIOCÊNCIAS APLICADAS À FARMÁCIA NÚMERO 04/2020 DA MESTRANDA **CAMILA DIAS MACHADO** REALIZADA NO DIA 20 DE FEVEREIRO DE 2020, NA UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA.

Aos vinte dias de fevereiro de dois mil e vinte, às 14h00min, no Auditório do NUTEAD, da Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG) em sessão pública sob a presidência da Professora Doutora Jane Manfon Budel reuniu-se a Banca Examinadora de exame de defesa de dissertação de Mestrado em Ciências Farmacêuticas da mestranda Camila Dias Machado, na linha de pesquisa: Avaliação Química e Biológica de Produtos Naturais, constituída pela Professora Doutora Jane Manfon Budel (UEPG/PR), demais Doutores (membros titulares): Professor Doutor Sinvaldo Baglie (UEPG/PR), Professora Doutora Juliane Nadal Dias Swiech (UNICESUMAR/PR) e Professora Doutora Lorene Armstrong (UEPG/PR). Iniciados os trabalhos, a presidência deu conhecimento aos membros da banca e ao candidato das normas que regem o exame de defesa de dissertação de Mestrado e definiu - se a ordem a ser seguida pelos examinadores para arguição.

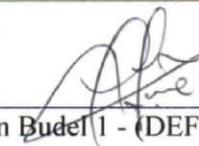
O título do trabalho foi: "**PADRONIZAÇÃO BOTÂNICA E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE CARDIOVASCULAR DE FOLHAS DE *Cecropia pachystachya* TRECUL, URTICACEAE**"

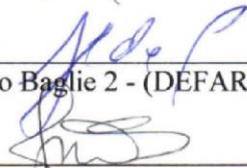
Encerrado a defesa, a banca pronunciou-se APROVADA a dissertação, considerado como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas. O aluno deverá entregar, no prazo de até 30 dias, a versão definitiva da dissertação de Mestrado, com as modificações sugeridas pelos membros da banca examinadora. Nada mais havendo a ser tratado, lavrou-se a presente ata que vai assinada pelos membros da Banca Examinadora.

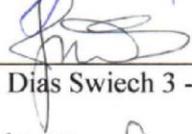
Observações (se necessário): \_\_\_\_\_

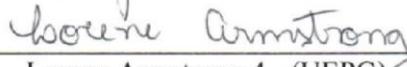
Alteração de título: sim  não

Novo título: \_\_\_\_\_

  
Jane Manfon Budel 1 - (DEFAR-UEPG) - Presidente

  
Sinvaldo Baglie 2 - (DEFAR-UEPG) – Titular

  
Juliane Nadal Dias Swiech 3 - (UNICESUMAR) – Titular

  
Lorene Armstrong 4 - (UEPG) Titular

Dedico esta dissertação aos meus pais, Isaac e Cristina, que sempre me incentivaram e me apoiaram em todas as escolhas da minha vida.

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, por sempre me dar forças para encarar todas as dificuldades da vida.

Ao Prof. Dr. Flávio Luís Beltrame, ex-coordenador do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da UEPG, pelo incentivo e pela oportunidade concedida a mim, para que eu pudesse entrar no Mestrado.

À minha orientadora querida, Profa. Dra. Jane Manfron Budel, que sempre me incentiva desde a época da graduação, a buscar o conhecimento, além de me apoiar nas escolhas acadêmicas e pessoais.

Ao Prof. Dr. Arquimedes Gasparotto Junior, coorientador, pela oportunidade de realizar os experimentos farmacológicos em seu laboratório de Farmacologia e Cardiologia Vasculard da Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD), em Mato Grosso do Sul (MS). Agradeço também por me auxiliar no aprimoramento dos meus conhecimentos.

À Profa. Dra. Inês Janete Matozzo Takeda e ao seu esposo, Prof. Adalberto Takeda (*in memoriam*) pela coleta e identificação de *Cecropia pachystachya*.

Às técnicas do Complexo de Laboratórios Multiusuários da UEPG (C-LABMU), Vanessa Chagury e Ana Mery de Oliveira, pelas análises de microscopia eletrônica de varredura e pelo processo de liofilização.

À técnica do laboratório de Farmacognosia da UEPG, Luciane Mendes Monteiro, pelo auxílio no preparo das amostras para os experimentos farmacológicos.

À equipe do laboratório de farmacologia da UFGD, Cleide Tirloni, Aline Marques, Bethânia Lorençone, Lorena Batista, Paulo Romão, Rhanany Palozi, Lucas Guarnier, Caio Campelo e Maysa Schaedler, além do intercambista Roman Romi Kic, por toda grande ajuda no desenvolvimento dos experimentos.

Ao supervisor de Pós-Doutorado da minha orientadora, Dr. Vijayasankar Raman, do National Center for Natural Products Research (Universidade do Mississippi, MS, EUA), pelas fotos de *C. pachystachya* no hábito e por todo o auxílio.

À minha querida amiga Lislaine Klider, pelos conselhos e pelas colaborações no desenvolvimento deste trabalho.

Ao meu amigo Valter Paes de Almeida, pelas fotografias da análise histoquímica.

Ao meu amigo Robson Schimandeiro Novak, pelo auxílio na execução dos programas de informática para as análises estatísticas e na elaboração das pranchas morfoanatômicas.

Aos meus amigos, Ana Beatriz Klosowski, Felipe Mendonça, Bianca Drewnowski e Lorene Armstrong pelo incentivo e amizade.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da UEPG, que tornaram possível a realização desta dissertação.

Ao meu pai, Isaac Dias Machado Filho pela coleta de amostras adicionais de folhas e infrutescências de *C. pachystachya*, para auxiliar na contribuição de amostras de plantas no herbário da UEPG.

Aos meus pais, Isaac e Ana Cristina Dias Machado, pelo apoio e incentivo em sempre estudar.

Aos professores e técnicos de outros laboratórios da UEPG, pelo auxílio nos processos experimentais.

Ao pessoal do herbário da UEPG, principalmente a Profa. Dra Rosângela Tardivo e a técnica Cristina, por me auxiliarem na preparação das exsiccatas.

E a todos que de alguma forma colaboraram direta e indiretamente para a execução deste trabalho, muito obrigada.

Não são os salões de mármore que dão a grandeza intelectual,  
mas sim a alma e o cérebro de um investigador.

(Alexander Fleming)

## RESUMO

*Cecropia pachystachya* Trécul é conhecida popularmente como embaúba, árvore-da-preguiça, pau-de-lixia e ambaí. É uma espécie medicinal encontrada na América Latina, especialmente no Brasil e na Argentina. *Cecropia pachystachya* é utilizada na medicina tradicional como anti-inflamatória, antitussígena, broncodilatadora, mucolítica e para tratar problemas cardiovasculares. Essa planta medicinal é comercializada fragmentada e é frequentemente confundida com outras espécies de *Cecropia* e até mesmo com espécies de outras famílias botânicas, a exemplo de *Tetrapanax papyrifer*, devido à mesma denominação popular e morfologia similar. Considerando as propriedades cardiovasculares, a nomenclatura vulgar e as similaridades morfológicas, objetivou-se analisar botanicamente e quimicamente as folhas de *C. pachystachya*, além de realizar estudo farmacológico, a fim de fornecer características anatômicas e fitoquímicas para auxiliar na identificação e caracterização da espécie vegetal, e avaliar a efetividade e a segurança de uso de extratos aquosos obtidos das folhas desse taxon. Foram utilizados métodos usuais em microscopia de luz e eletrônica de varredura para a descrição morfoanatômica. Para a avaliação farmacológica, a fração solúvel em etanol (FSE) originado a partir do extrato aquoso das folhas de *Cecropia pachystachya* foi caracterizado quimicamente por CLAE-DAD-EM e EM/EM e submetido à estudos de toxicidade, diurese aguda e prolongada, hipotensor e efeitos antioxidantes nas doses de FSE (30, 100 e 300 mg/kg) em ratos Wistar. Os principais marcadores anatômicos encontrados foram, folha hipostomática, mesófilo dorsiventral, tricomas filariformes, cônicos e pluricelulares, nervura central biconvexa com feixes vasculares colaterais desorganizados, pecíolo circular, presença de cristais de oxalato de cálcio, grãos de amido, compostos lipofílicos, lignificados e fenólicos. Os principais metabólitos secundários encontrados foram ácidos fenólicos e flavonoides, dentre eles: ácido quínico, ácido hexônico, ácido cítrico, ácido 5-*O-E*-caffeoil quínico, dímero de procianidina, C-hexosil C-pentosil luteolina, C-hexosil luteolina, C-hexosil apigenina, C-hexosil O-pentosil apigenina, O-deoxihexosil-hexosil quercetina e O-hexosil quercetina. FSE não demonstrou efeitos tóxicos na dose máxima de 2000 mg/kg e apresentou atividade diurética aguda de 8 h em todas as doses (30, 100 e 300 mg/kg). Ação vasodilatadora não foi verificada em estudo de leito mesentérico e efeitos antioxidantes foram identificados, principalmente para a atividade da superóxido dismutase. Os resultados obtidos na caracterização morfoanatômica fornecem subsídios para a identificação de *C. pachystachya*, bem como a diferenciação das demais embaúbas. Os estudos histoquímico e químico evidenciaram a presença de ácidos fenólicos. O estudo farmacológico evidenciou atividade diurética e antioxidante. **Palavras-chave:** Controle da qualidade. Diurético. Embaúba. Hipotensivo. Microscopia.

## ABSTRACT

*Cecropia pachystachya* Trécul is popularly known as embaúba, árvore-da-preguiça, pau-de-lixia and ambaí. It is a medicinal species found in Latin America, especially in Brazil and Argentina. *Cecropia pachystachya* is used in traditional medicine as anti-inflammatory, antitussive, bronchodilator, mucolytic and to treat cardiovascular problems. This medicinal plant is sold fragmented and is often confused with other species of *Cecropia* and even with species from other botanical families, such as *Tetrapanax papyrifer*, due to the same popular name and similar morphology. Considering the cardiovascular properties, the common nomenclature and the morphological similarities, the objective was to botanically and chemically analyze the leaves of *C. pachystachya*, in addition to conducting a pharmacological study, in order to provide anatomical and phytochemical characteristics to assist in the identification and characterization of the plant species, and evaluate the effectiveness and safety of using aqueous extracts obtained from the leaves of this taxon. Usual methods in light and scanning electron microscopy were used for the morphoanatomical description. For pharmacological evaluation, the fraction soluble in ethanol (FSE) originated from the aqueous extract of the leaves of *Cecropia pachystachya* was chemically characterized by CLAE-DAD-EM and EM/EM and subjected to toxicity studies, acute and prolonged diuresis, hypotensive and antioxidant effects in doses of FSE (30, 100 and 300 mg/kg) in Wistar rats. The main anatomical markers found were hypostomatic leaf, dorsiventral mesophyll, filariform, conical and pluricellular trichomes, biconvex midrib with disorganized collateral vascular bundles, circular petiole, presence of calcium oxalate crystals, starch grains, lipophilic, lignified and phenolic compounds. The main secondary metabolites found were phenolic acids and flavonoids, such as: quinic acid, hexonic acid, citric acid, 5-*O-E*-caffeoyl quinic acid, procyanidin dimer, *C*-hexosyl *C*-pentosyl luteolin, *C*-hexosyl luteolin, *C*-hexosyl apigenin, *C*-hexosyl *O*-pentosyl apigenin, *O*-deoxyhexosyl-hexosyl quercetin and *O*-hexosyl quercetin. FSE did not demonstrate toxic effects at the maximum dose of 2000 mg/kg and showed acute diuretic activity of 8 h at all doses (30, 100 and 300 mg/kg). Vasodilator action was not verified in a study of mesenteric bed and antioxidant effects were identified, mainly to the activity of superoxide dismutase. The results obtained in the morphoanatomical characterization provide subsidies for the identification of *C. pachystachya*, as well as the differentiation of the other embaúbas. Histochemical and chemical studies have shown the presence of phenolic acids and flavonoids. The pharmacological study showed diuretic and antioxidant activity.

**Keywords:** Quality control. Diuretic. Embaúba. Hipotensive. Microscopy.

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	11
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	14
2.1 OBJETIVO GERAL .....	14
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	14
<b>3 REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	15
3.1 PLANTAS MEDICINAIS .....	15
3.2 PADRONIZAÇÃO BOTÂNICA .....	16
3.3 FAMÍLIA URTICACEAE JUSS .....	17
3.4 GÊNERO E ESPÉCIES DE <i>Cecropia</i> .....	18
3.5 <i>Cecropia pachystachya</i> TRÉCUL.....	19
3.6 HIPERTENSÃO ARTERIAL SISTÊMICA (HAS).....	21
<b>4 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	23
4.1 MATERIAL BOTÂNICO.....	23
4.2 ESTUDO FARMACOBOTÂNICO .....	24
4.2.1 Estudo anatômico .....	24
4.2.2 Análise histoquímica .....	24
4.2.3 Microscopia eletrônica de varredura por efeito de campo (FEG) e espectroscopia de energia dispersiva de raios X (EDS) .....	25
4.3 ESTUDO ETNOFARMACOLÓGICO .....	25
4.3.1 Preparação de extratos aquosos purificados.....	25
4.3.2 Caracterização fitoquímica dos extratos de <i>C. pachystachya</i> por cromatografia líquida com detecção por arranjo de diodos, acoplada à espectrometria de massas <i>tandem</i> (CLAE-DAD-EM/EM) .....	26
4.3.3 Avaliação de segurança e eficácia .....	27
4.3.3.1 Animais .....	27
4.3.3.2 Estudo de toxicidade aguda .....	27
4.3.3.3 Estudo da atividade diurética aguda.....	28
4.3.3.4 Estudo da atividade diurética prolongada.....	30
4.3.3.5 Avaliação da atividade antioxidante .....	31
4.3.3.6 Efeitos sobre a pressão arterial e frequência cardíaca .....	31
4.3.3.7 Avaliação bioquímica .....	31
4.3.3.8 Investigação dos efeitos vasodilatadores do ESCP em leito mesentérico isolado e perfundido.....	32

4.3.4. Análises estatísticas.....	33
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>34</b>
5.1 ESTUDO FARMACOBOTÂNICO .....	34
5.1.1 Estudo anatômico .....	34
5.1.2 Análise histoquímica .....	51
5.2 ESTUDO ETNOFARMACOLÓGICO.....	55
5.2.1 Análise fitoquímica dos extratos de <i>C. pachystachya</i> .....	55
5.2.2 Avaliação de segurança .....	57
5.2.2.1 <i>Estudo da toxicidade aguda</i> .....	57
5.2.3 Efeitos diuréticos .....	62
5.2.3.1 <i>Estudo da atividade diurética aguda</i> .....	62
5.2.3.2 <i>Estudo da atividade diurética prolongada</i> .....	65
5.2.4 Avaliação da atividade antioxidante .....	71
5.2.5 Efeitos sobre a pressão arterial e frequência cardíaca .....	74
5.2.6 Avaliação bioquímica .....	78
5.3 INVESTIGAÇÃO DOS EFEITOS VASODILATADORES DO FSE EM LEITO MESENTÉRICO ISOLADO E PERFUNDIDO .....	81
<b>6 CONCLUSÃO .....</b>	<b>82</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>83</b>
<b>ANEXO A – Documento de aprovação do uso de animais pelo Comitê de Ética</b> .....	<b>92</b>

## 1 INTRODUÇÃO

O uso de plantas medicinais pela população brasileira no tratamento de doenças é considerado uma questão histórica, onde o conhecimento popular é transmitido por meio de gerações (NUNES; BERNARDINO; MARTINS, 2015). Plantas medicinais possuem princípios ativos com ação profilática ou terapêutica no tratamento de doenças ou sintomas (FLOR; BARBOSA, 2015; RIVERA-MONDRAGÓN *et al.*, 2017). Nesse sentido, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), regulamentou o uso de plantas medicinais por meio de resoluções, indicando a utilização de estruturas vegetativas e reprodutivas como: folhas, flores, cascas, raízes, sementes e caules, em algumas preparações como infusões com ação terapêutica para utilização no Sistema Único de Saúde (SUS) (FLOR; BARBOSA, 2015; RIVERA-MONDRAGÓN *et al.*, 2017).

Desta forma, o Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos implantada em 2006, propõe: promover e reconhecer as práticas populares e tradicionais de uso de plantas medicinais e remédios caseiros, além de desenvolver instrumentos de fomento à pesquisa, desenvolvimento de tecnologias e inovações em plantas medicinais e fitoterápicos, nas diversas fases da cadeia produtiva (BRASIL, 2016).

Considerando a comercialização de plantas medicinais e drogas vegetais, a adulteração é um aspecto negativo de destaque. É comum a prática de adulterar e/ou substituir as espécies vegetais com o objetivo de aumentar o lucro. Desde tempos remotos, esses procedimentos anômalos preocupam aqueles que assumem como prioridade garantir o efeito terapêutico e preservar a saúde pública (BATTISTI *et al.*, 2013; SARAIVA *et al.*, 2015).

Nesse contexto, o controle da qualidade de drogas vegetais, plantas medicinais e fitoterápicos tem como um dos objetivos identificar corretamente a espécie medicinal utilizada, para que os efeitos farmacológicos não sejam reduzidos ou exacerbados, acarretando em malefícios à população (DE BOER; ICHIM; NEWMMASTER, 2015).

Espécies de *Cecropia* (Urticaceae) são comercializadas na América do Sul, na forma rasurada, triturada e pulverizada (RIVERA-MONDRAGÓN *et al.*, 2017). Entretanto, a principal espécie utilizada *C. pachystachya* possui poucos estudos

morfoanatômicos, que visam a identificação da espécie medicinal, bem como poucos estudos cardiovasculares com enfoque na atividade diurética ou hipotensora. E em decorrência do nome popular, são confundidas com outras do gênero ou até mesmo com espécies de outras famílias botânicas, como ocorre com *Tetrapanax papyrifer* (Hook.) K. Koch. Uma espécie de outro gênero semelhante à *C. pachystachya*, está *Macaranga gigantea* (Rchb.f e Zoll.) Müll. Arg. (Euphorbiaceae) por ambas possuírem folhas lobadas atingindo comprimento máximo de 60 cm, por alcançarem em média 15 cm de comprimento e por suas sementes serem dispersadas pelos pássaros e morcegos (RAPHAEL *et al.*, 2015).

Nesse contexto, várias espécies são conhecidas pela denominação vulgar de embaúba e são utilizadas popularmente para a mesma finalidade terapêutica (PETENATTI; PETENATTI; DEL VITO, 1998), o que “facilita” a adulteração e/ou substituição dessas espécies.

E muitas vezes a denominação comum de embaúba-vermelha, pau-de-formiga, ambaíba-tinga, árvore-da-preguiça, pau-de-lixia entre outras, são designadas para *C. pachystachya*, e para as espécies *Cecropia glaziovii* e *Cecropia hololeuca* (BERG; ROSSELLI; DAVIDSON, 2005).

O gênero *Cecropia* (Urticaceae) apresenta cerca de 70 espécies, com distribuição pantropical e em regiões montanhosas da Bolívia até a Venezuela. São representadas por árvores que vivem em locais úmidos ou semiúmidos da região neotropical.

Este gênero difere de outros na família, por possuir folhas largas, cerca de 30 cm de comprimento e palmatilobadas/peltadas de coloração verde-escura (variando de 5 a mais de 20 lobos maiores e menores), onde os lobos são estreitamente obovados e de ápice agudo, lâminas foliares coriáceas ou subcoriáceas, conectadas a partir da região central ao pecíolo, com venação irradiada, no entanto, os detalhes dessa venação podem diferenciar-se entre as espécies de *Cecropia* (BERG; ROSSELLI, 2005). O pecíolo é longo e circular, alargado na base, podendo chegar em até 40 cm de comprimento em espécimes adultas e o gênero possui inflorescências formadas em até 20 espigas protegidas por espata (BERG; ROSSELLI, 2005; ROMANIUC-NETO; GAGLIOTI; GUIDO,

2009). Essas infrutescências são caracterizadas por espigas cilíndricas axilares, pedunculadas, carnosas e aromáticas (SATO; PASSOS; NOGUEIRA, 2008).

A maioria das espécies, incluindo *C. pachystachya*, vivem em associação com formigas (mirmecófilas), devido a presença de corpos Müllerianos na base do pecíolo e em outras regiões da folha, das quais armazenam proteína, lipídios e carboidratos, atraindo formigas do gênero *Azteca* (GONÇALVES-SOUZA; PAIVA, 2016).

Na medicina tradicional, espécies de *Cecropia* são utilizadas popularmente no Brasil e na Argentina, no tratamento de afecções respiratórias, renais e cardiovasculares (DUQUE *et al.*, 2016). Quimicamente, ácido clorogênico, orientina, isoorientina, vitexina, isovitexina e catequina estão presentes em diferentes espécies do gênero, a exemplo de *Cecropia obtusifolia* Bertol, *C. peltata* L., *C. glaziovii* Snethl e *C. pachystachya* Trécul (RIVERA-MONDRAGÓN *et al.*, 2017).

*Cecropia pachystachya* é uma árvore nativa do Brasil, com distribuição geográfica em todo território nacional (GAGLIOTI, AGUIAR, 2019), habita a América Central e do Sul (LIMA, 2008; LIU; HUANG, 2016; PACHECO *et al.*, 2014). É conhecida na medicina tradicional como embaúba, umbaúba, árvore-da-preguiça, pau-de-lixia e ambaí (LIMA, 2008; PACHECO *et al.*, 2014). Farmacologicamente, *C. pachystachya* evidenciou atividades como hipoglicemiante (ARAGÃO *et al.*, 2010), hipotensor (CONSOLINI; MIGLIORI, 2005), anti-inflamatória (PACHECO *et al.*, 2014) e antidepressiva (GAZAL *et al.*, 2014).

Considerando que espécies de *Cecropia* são conhecidas popularmente como embaúba e utilizadas na medicina tradicional como antihipertensivo e cardioprotetor, o objetivo do presente trabalho é fornecer dados botânicos e químicos para a identificação e caracterização da planta medicinal e da droga vegetal, fornecendo subsídios farmacobotânicos e fitoquímicos para o controle da qualidade, além de verificar os efeitos cardiovasculares e toxicológicos de *C. pachystachya*, garantindo o uso efetivo e seguro de preparações farmacêuticas provenientes desse material vegetal.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Investigar as características anatômicas e químicas de folhas de *Cecropia pachystachya* Trécul, bem como avaliar a toxicidade aguda, atividade antioxidante e a atividade cardiovascular da fração solúvel em etanol (FSE).

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterizar anatomicamente as folhas de *C. pachystachya* por microscopia de luz;
- Determinar as características histoquímicas das folhas de *C. pachystachya*;
- Fornecer dados micromorfológicos de folhas de *C. pachystachya* por Microscopia Eletrônica de Varredura por Efeito de Campo (FEG);
- Determinar a composição química elementar dos cristais presentes nas folhas de *C. pachystachya*;
- Obter FSE e realizar sua caracterização fitoquímica por LC-MS;
- Analisar a toxicidade aguda do FSE;
- Avaliar o efeito diurético do FSE após uma administração aguda e prolongada em ratos;
- Verificar a excreção de eletrólitos e os parâmetros bioquímicos em consequência da administração do FSE;
- Identificar o efeito antioxidante do FSE;
- Verificar o efeito hipotensor do FSE através da medida direta da pressão arterial;
- Investigar os possíveis efeitos vasodilatadores do FSE em leito mesentérico isolado e perfundido.

### 3 REVISÃO DE LITERATURA

#### 3.1 PLANTAS MEDICINAIS

O conhecimento sobre as plantas medicinais surgiu na época das primeiras civilizações, com o objetivo de suprir as necessidades básicas de cada indivíduo, curar ou prevenir problemas de saúde (ALMEIDA, 2011). Atualmente, este saber popular sobre as espécies medicinais ainda persiste entre os grupos étnicos e as comunidades. Muitas vezes essas são consideradas como o único recurso terapêutico, sendo, portanto, uma prática que favorece a disseminação do saber popular por meio da medicina tradicional (LINHARES *et al.*, 2014).

Atualmente essa prática constitui uma forma alternativa ou complementar de tratamentos terapêuticos em usuários do Sistema Único de Saúde (SUS) (BATTISTI *et al.*, 2013), que é resultante da Política e Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos implantada em 2006, sendo que o Decreto nº 5.813, do Ministério da Saúde (MS) preconiza: garantir à população brasileira o acesso seguro e o uso racional de plantas medicinais e fitoterápicos, promovendo o uso sustentável da biodiversidade, do desenvolvimento da cadeia produtiva e da indústria nacional (BRASIL, 2016).

Essa política tem sido implantada no Brasil devido as questões econômicas, tais como o elevado custo dos medicamentos e a tendência de moradores de áreas rurais utilizarem recursos naturais, ao invés de medicamentos sintéticos (BATTISTI *et al.*, 2013).

Além das plantas medicinais, existem os medicamentos produzidos a partir de espécies vegetais, os denominados fitoterápicos e produto tradicional fitoterápico (PTF). Estes medicamentos são preparados a partir do uso exclusivo de matérias-primas vegetais, segundo a Resolução da Diretoria Colegiada da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), RDC nº 26, de 13 de maio de 2014 (ANVISA, 2014).

No Brasil, a partir da década de 1980, o uso de medicamentos fitoterápicos, drogas vegetais e plantas medicinais foram incorporados à rede pública de saúde, na atenção primária à saúde, visando a prevenção de agravos da condição de saúde de pacientes (FLOR; BARBOSA, 2015; NUNES; BERNARDINO; MARTINS, 2015). Na medicina complementar e alternativa, o uso de espécies medicinais são opções de baixo custo e contribuem para que a população possa utilizar o conhecimento

transmitido ao longo das gerações, fazendo-se necessário que as informações desse conhecimento sejam incorporadas em compêndios científicos, visando o uso responsável e eficaz para a prevenção ou o tratamento de doenças (JÚNIOR *et al.*, 2016).

### 3.2 PADRONIZAÇÃO BOTÂNICA

A garantia da qualidade de uma espécie medicinal ocorre desde o momento da coleta do material vegetal até o processo do consumo pela população e todo esse processo é respeitado por indústrias de fitoterápicos. Nesse contexto, o Controle da Qualidade é estabelecido por critérios preconizados em farmacopeias ou RDCs (Resolução da Diretoria Colegiada) (SOUZA-MOREIRA; SALGADO; PIETRO, 2010).

Diante de conceito, as Farmacopeias estabelecem as normas ou regras necessárias para o Controle da Qualidade, principalmente no que tange a qualidade do material vegetal. Com isso, a Farmacopeia é o compêndio farmacêutico oficial que estabelece os requisitos mínimos de qualidade para drogas vegetais, além de fármacos, insumos, medicamentos e produtos para a saúde. Portanto, a Farmacopeia tem como objetivo estabelecer os requisitos de qualidade e segurança de medicamentos e afins, para promover a saúde da população (ANVISA, 2019).

Plantas medicinais são usadas no tratamento de enfermidades pela população e apesar disso, efeitos adversos podem ocorrer pela contaminação e/ou pela adulteração (falsificação e/ou substituição) com outras espécies de vegetais, comprometendo desta forma a qualidade, a eficácia e a segurança. Nesse sentido, a pesquisa dos marcadores anatômicos e químicos da espécie vegetal, fornecem subsídios para o controle da qualidade da planta medicinal, da droga vegetal e de fitoterápicos (FLOR; BARBOSA, 2015; RIVERA-MONDRAGÓN *et al.*, 2017).

A pesquisa por marcadores morfoanatômicos ainda auxiliam na identificação da espécie vegetal e é considerada a primeira análise inserida na Farmacopeia Brasileira, sendo caracterizada como análise, macroscópica e microscópica do material vegetal e, em algumas monografias, são indicadas também as características do pó e de adulterantes (ANVISA, 2019).

Outro fato importante a se considerar são os nomes populares, pois uma planta pode ser conhecida por muitos nomes comuns e ainda, um nome popular pode designar várias espécies diferentes. Nesse sentido, espécies de *Cecropia* são conhecidas pela mesma denominação comum de embaúba e utilizadas popularmente

para a mesma finalidade terapêutica, como é o caso de *Cecropia glaziovii* Snethl (LIMA *et al.*, 2016).

*Cecropia pachystachya* é utilizada na medicina tradicional para tratar problemas respiratórios, como bronquite e asma, evidenciando ação expectorante, broncodilatadora e mucolítica. Adicionalmente, Petenatti; Petenatti e Del Vito (1998) relatam que desde os anos 90, *C. pachystachya* é comercializada na Argentina nas formas de comprimido e em extrato com ação antitussígena ou afins e por esse motivo são adulteradas com *T. papyrifera* devido ambas possuírem propriedades análogas.

### 3.3 FAMÍLIA URTICACEAE JUSS.

Urticaceae é conhecida como a família das urtigas e das embaúbas (ROMANIUC-NETO *et al.*, 2013), e está inserida no grupo das Angiospermas. Inclui cerca de 54 gêneros e 4918 espécies (THE PLANT LIST, 2019), sendo que no Brasil ocorrem 13 gêneros e 102 espécies onde 25 espécies são consideradas endêmicas (GAGLIOTI; ALMEIDA-SCABBIA; ROMANIUC-NETO, 2016). Pelo fato de ocorrer a distribuição em todo território nacional, a família Urticaceae habita em diferentes tipos de vegetação, dentre elas, regiões de cerrado, floresta ciliar, floresta ombrófila e restinga (GAGLIOTI *et al.*, 2019). Além do mais, o centro de diversidade desta família, encontra-se na região tropical (GAGLIOTI; ALMEIDA-SCABBIA; ROMANIUC-NETO, 2016), locais como a Amazônia e a Mata Atlântica, correspondendo à lugares úmidos (ROMANIUC-NETO *et al.*, 2013).

As espécies da família podem ser árvores, subarbustos ou ervas; monoicas ou dioicas (GAGLIOTI *et al.*, 2019). As flores são pequenas – inflorescências (diversificadas em cachos ou espigas; díclinas, actinomorfas ou monoclamídeas, com até 5 tépalas), estípulas, estames curvos ou retos e fruto pequeno, avermelhado do tipo aquênio. Alguns gêneros apresentam tricomas urticantes. Dentre as características intrínsecas do gênero *Cecropia*, ocorre o aparecimento de látex translúcido (laticíferos) com aspecto mucilaginoso (GAGLIOTI; ALMEIDA-SCABBIA; ROMANIUC-NETO, 2016; ROMANIUC-NETO *et al.*, 2013).

Urticaceae está representada por 13 gêneros: *Boehmeria* Jacq., *Cecropia* Loefl., *Coussapoa* Aubl., *Hemistylus* Benth., *Laportea* Gaudich., *Myriocarpa* Benth., *Parietaria* L., *Phenax* Wedd., *Pilea* Lindl., *Pourouma* Aubl., *Pouzolzia* Gaudich., *Urera* Gaudich. e *Urtica* L. (GAGLIOTI *et al.*, 2019).

Alguns gêneros podem ser caracterizados por determinados marcadores morfoanatômicos, a exemplo de tricomas simples ou glandulares urentes, no gênero *Urera* sp. e *Laportea* sp., inflorescências do tipo espiga nos gêneros *Cecropia* sp. e *Myriocarpa* sp., além de flores sésseis em espécies do gênero *Parietaria* sp. (GAGLIOTI *et al.*, 2019).

Nesse contexto, muitos trabalhos têm relatado a identificação e diferenciação de espécies de morfologia similar como é o caso dos gêneros *Baccharis* (BUDEL *et al.*, 2018; BOBEK *et al.*, 2016), *Eucalyptus* (MIGACZ *et al.*, 2018), *Mikania* (ALMEIDA *et al.*, 2017), *Passiflora* (WOSCH *et al.*, 2015), *Piper* (BERTOCCO *et al.*, 2017; SANTOS *et al.*, 2018) e *Schinus* (MACHADO *et al.*, 2019).

Adicionalmente, outros estudos abordam a morfoanatomia de espécies medicinais e seus adulterantes (DE BOER; ICHIM; NEWMASER, 2015; PETENATTI; PETENATTI; DEL VITO, 1998; RAMAN *et al.*, 2018).

### 3.4 GÊNERO E ESPÉCIES DE *Cecropia*

O gênero *Cecropia* Loefl. pertence à tribo Cecropieae Dumort. e inclui 70 espécies, sendo que 20 delas estão distribuídas em todo território nacional e com maior diversidade na região Norte. Espécies de *Cecropia* são encontradas em diversos tipos de vegetação no Brasil: Floresta úmida da Amazônia, Mata Atlântica, Pantanal, caatinga e cerrado (GAGLIOTI; AGUIAR, 2020).

Uma característica marcante desse gênero é a presença de látex aquoso (laticíferos restritos à casca), translúcido e que em contato com o ar, torna-se escuro. O pecíolo possui triquílios localizados na base; presença de estípulas de coloração alva ou creme-esverdeada. As inflorescências são axilares em formato de espigas, geralmente aos pares, frequentemente estipitadas, protegidas por espata decídua. O gênero possui flores sésseis ou subsésseis, além da presença de duas a três tépalas; flores pistiladas com perigônio delgado, indumento de tricomas aracnóides. Os frutos são do tipo aquênios (menores que 5 mm de comprimento) (TREIBER *et al.*, 2016) com perigônios crescentes e carnosos quando maduros e endosperma presente. Anatomicamente, *Cecropia* apresenta tricomas simples não urticantes e não possuem cristólitos (GAGLIOTI; AGUIAR, 2019).

Características como folhas palmatilobadas e inflorescências protegidas por espatas, são aspectos diferenciais dentre outros gêneros da família Urticaceae (ROMANIUC-NETO; GAGLIOTI; GUIDO, 2009).

Além dessas características gerais, Treiber *et al.* (2016) destacaram similaridades morfológicas, ecológicas e reprodutivas entre as espécies de *Cecropia* e de *Musanga* R. Br., uma espécie vegetal afrotropical e pertencente à Urticaceae. Dentre as características morfológicas similares estão folhas peltadas, venação radial, ausência de cristólitos, presença de estípulas, flores em forma de espigas e frutos menores que 5 mm de comprimento.

*Cecropia* é membro da tribo Cecropieae (Urticaceae), que também inclui outros gêneros como, *Coussapoa* Aubl., *Musanga* R. Br., *Myrianthus* P. Beauv., *Poikilospermum* Zipp. ex Miq., e *Pourouma* Aubl (TREIBER *et al.*, 2016). Nesse contexto, é importante destacar que *Urticaceae* inclui 6 tribos (GAGLIOTI; ALMEIDA-SCABBIA; ROMANIUC-NETO, 2016).

No Brasil, o gênero inclui as seguintes espécies: *Cecropia albicans* Trécul, *C. angustifolia* Trécul, *C. concolor* Willd., *C. distachya* Huber, *C. engleriana* Snethl., *C. ficifolia* Warb. ex Snethl., *C. glaziovii* Snethl., *C. goudotiana* Trécul, *C. hololeuca* Miq., *C. kavanayensis* Cuatrec., *C. latiloba* Miq., *C. membranacea* Trécul, *C. metensis* Cuatrec., *C. obtusa* Trécul, *C. obtusifolia* Bertol., *C. pachystachya* Trécul, *C. palmata* Willd., *C. peltata* L., *C. polystachya* Trécul, *C. purpurascens* C. C. Berg, *C. saxatilis* Snethl., *C. schreberiana* Miquel, *C. sciadophylla* Mart., *C. silvae* C. C. Berg, *C. strigosa* Trécul, *C. ulei* Snethl. (GAGLIOTI; AGUIAR, 2019).

### 3.5 *Cecropia pachystachya* TRÉCUL

*Cecropia pachystachya* Trécul (Urticaceae) possui sinonímias científicas, dentre elas: *Cecropia adenopus* Martius, *C. carbonaria* Mart. Ex Miq., *C. catarinensis* Cuatrec., *C. cinerea* Miquel, *C. cyrtostachya* Miq., *C. digitata* Tenore, *C. francisci* Snethl., *C. leucophaea* Poepp. ex Miq., *C. lyratiloba* Miq., *C. nivea* Poepp. ex Klotzsch (GAGLIOTI; AGUIAR, 2019).

*Cecropia pachystachya* é conhecida popularmente como ambahu, ambaíba, ambaigba, ambaitinga, ambaúba, embaíba, caixeta-do-campo, figueira-de-sururina, ibaíba, ibaítuga, imbaução, pau-de-preguiça, umbaubeira, umbaúba-do-brejo (LORENZI; MATOS, 2008), embaúba, embaúbeira, ambaíba, árvore-da-preguiça (DUQUE *et al.*, 2016; LIMA *et al.*, 2016), imbaúba-vermelha na Bahia, torém no Ceará e Piauí, ambaíba-tinga, ambaí, ambati, ibaíba, imbaúba branca, imbaubão, pau-de-lixia, pau-de-formiga, embaúba-branca em Pernambuco. É uma árvore que atinge até 12 m de altura (BERG; ROSSELLI, 2005) e apresenta caule medindo entre 15-25 cm

de diâmetro e flores unissexuadas. Suas folhas são ásperas e longas e os pecíolos são esbranquiçados (LIMA *et al.*, 2016). Em campo pode ser reconhecida pelas folhas descolores, face inferior esbranquiçada, estípula cinérea envolvendo a gema apical (RAMOS *et al.*, 2008).

As folhas são utilizadas na medicina tradicional com propriedades antitussígena, expectorante, antiasmática (YURQUINA *et al.*, 2008), hipoglicemiante (ARAGÃO *et al.*, 2010), antihipertensiva, diurética, anti-inflamatória, além de serem utilizadas no tratamento de infecções pulmonares (PACHECO *et al.*, 2014). E vários estudos farmacológicos relataram atividades biológicas de folhas de *C. pachystachya*, a exemplo de antioxidante, cardiotônica (CONSOLINI; MIGLIORI, 2005), citotóxica, (DUQUE *et al.*, 2016), neuroprotetor (GAZAL *et al.*, 2014) e sedativa (DUQUE *et al.*, 2016).

Dentre as atividades biológicas, destacam-se a hipotensora, observada pela redução da enzima conversora da angiotensina (ECA) (MAQUIAVELI *et al.* 2014) e pela inibição colinérgica no coração (RIVERA-MONDRAGÓN *et al.*, 2017). E também foi observado que a ação hipotensora era mais intensa em extratos provenientes de espécimes originadas da zona tropical, em comparação com os extratos de origem temperada (MATERA *et al.*, 2016). *Cecropia pachystachya* também é utilizada em preparações homeopáticas em países como Brasil e França (COSTA *et al.*, 2011).

Quimicamente, extratos de folhas de *C. pachystachya* revelaram a presença de compostos fenólicos, a exemplo de orientina, ácido clorogênico, isoorientina, catequina, epicatequina, isoquercitina, isovitexina, vitexina, rutina, além de procianidina B2 e sitosterol (DUQUE *et al.*, 2016; LIMA *et al.*, 2016).

Em se tratando dos compostos químicos de *C. pachystachya*, os flavonoides vitexina, isovitexina e rutina são os responsáveis pelo efeito antipasmódico da espécie. A vitexina e a isovitexina inibiram a contração colinérgica, sendo que a vitexina bloqueou os canais de cálcio, promovendo efeito hipotensor. Adicionalmente, o efeito anti-inflamatório observado foi relacionado à presença do ácido clorogênico no extrato (MATERA *et al.*, 2016). Extratos metanólicos de folhas de *C. pachystachya* evidenciaram atividades hipoglicemiante e anti-inflamatória; extratos hexânicos mostraram apenas atividade anti-inflamatória, enquanto que os extratos aquosos apresentaram efeito hipotensor, cardiotônico e sedativo em estudo de PACHECO *et al.* (2014). Atividades cardiovasculares e anti-inflamatórias observadas em *C. pachystachya* e *C. glaziovii* estão relacionadas à presença de flavonoides como

catequinas e proantocianidinas, terpenos, além de compostos esteroidais (RIVERA-MONDRAGÓN *et al.*, 2017).

### 3.6 HIPERTENSÃO ARTERIAL SISTÊMICA (HAS)

A hipertensão arterial sistêmica é uma doença crônica e é considerada um dos principais problemas de saúde pública no Brasil (SILVA; OLIVEIRA; PIERIN, 2016). A HAS é multifatorial, sendo caracterizada por níveis altos da pressão arterial. Está relacionada às alterações de alguns órgãos como coração, rins e vasos sanguíneos e disfunções metabólicas (BRASIL, 2010). A hipertensão contribui para os riscos cardiovasculares, sendo considerada uma das principais causas de mortalidade na população. Além disso, favorece a elevação de risco de acidente vascular encefálico (SILVA; OLIVEIRA; PIERIN, 2016). Nesse contexto, devido as complicações que essa doença pode desenvolver, observa-se que a hipertensão arterial é um tema que apresenta bastante relevância na sociedade (LOPES, 2014).

Por se tratar de uma doença crônica, a HAS necessita de um acompanhamento para a vida toda, sendo que requer medidas farmacológicas e não farmacológicas a fim de manter a pressão arterial controlada (RADOVANOVIC *et al.*, 2014). Um fator considerado importante que esteja envolvido na hipertensão arterial é a hiperatividade do sistema renina-angiotensina-aldosterona e a disfunção endotelial (PIRES *et al.*, 2014). Para ocorrer uma redução da pressão arterial existem fármacos que atuam nesse sistema, os denominados inibidores da enzima de conversão da angiotensina (IECA), os quais inibem a conversão da angiotensina I em angiotensina II (substância vasoconstritora) e conseqüentemente, ocorre uma atividade hipotensora (MENDES; CARDOSO, 2016), e os diuréticos, sendo a hidroclorotiazida o medicamento mais prescrito para o tratamento farmacológico da doença (OLIVEIRA *et al.*, 2017).

O sistema renina-angiotensina-aldosterona também pode aumentar a atividade do Sistema Nervoso Simpático resultando numa vasoconstrição dos vasos sanguíneos. Além disso, a vasopressina pode estar envolvida no quadro da hipertensão, sendo considerada um hormônio que atua na reabsorção de água nos rins (SEMIONATTO *et al.*, 2017).

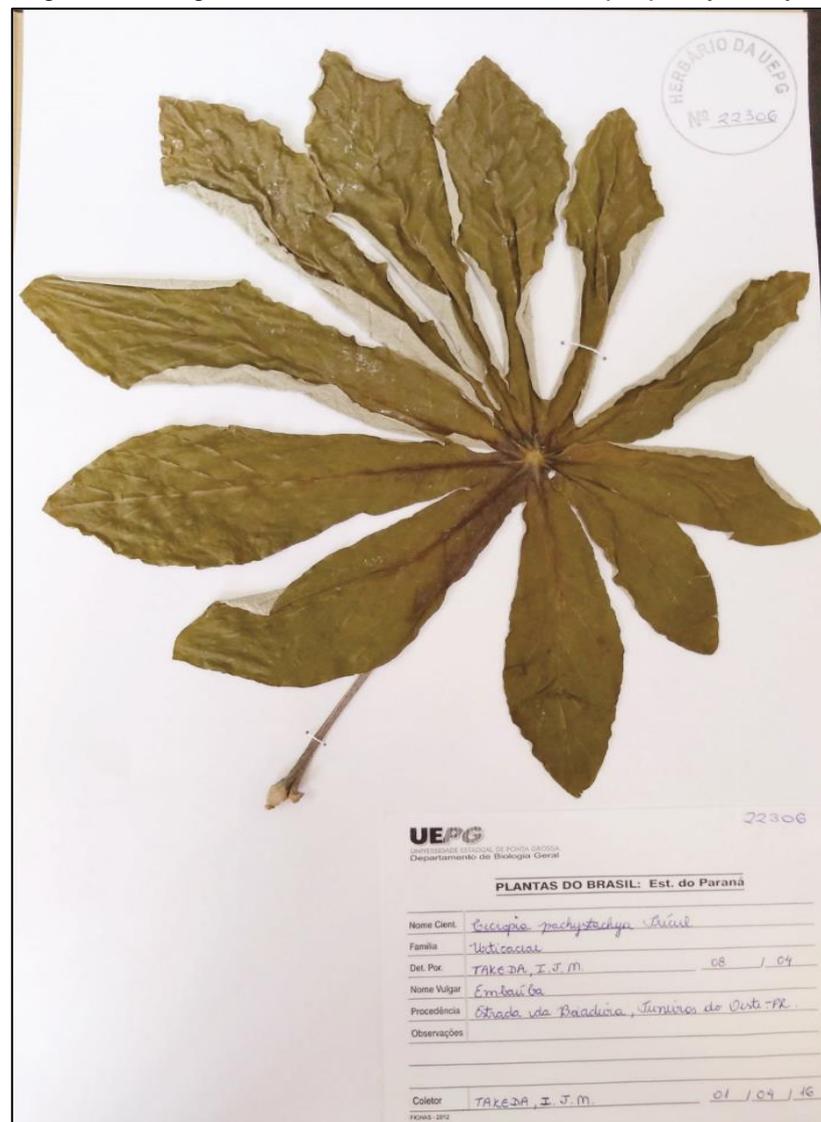
Nesse sentido, considera-se importante o estudo de novas alternativas para o tratamento medicamentoso, principalmente com base na etnofarmacologia de plantas medicinais que possuem efeitos anti-hipertensivos.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 MATERIAL BOTÂNICO

Folhas de *Cecropia pachystachya* Trécul foram coletadas no município de Tuneiras do Oeste, Paraná, Brasil, num trecho da BR-487 (Estrada Boiadeira), sob coordenadas (23° 52' 14" S e 52° 52' 34" W), em abril de 2016. Uma amostra da espécie foi identificada pela taxonomista Dra. Inês Janete Matozzo Takeda e depositada no Herbário da Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG), sob número de registro 22306 (Figura 1). O acesso ao material vegetal foi autorizado pelo Conselho de Gestão do Patrimônio Genético (CGEN / SISGEN) de acordo com o registro AE93A56.

Figura 1 – Imagem da exsicata da folha de *Cecropia pachystachya*



Fonte: A autora

## 4.2 ESTUDO FARMACOBOTÂNICO

### 4.2.1 Estudo anatômico

Folhas de *C. pachystachya* foram fixadas em solução de FAA 70 (formaldeído 37%, ácido acético glacial e etanol 70%) (JOHANSEN, 1940) por cinco dias e conservadas em solução etanólica 70% (v/v) (BERLYN; MIKSCHE, 1976). Secções transversais de folhas da espécie foram feitas à mão livre e submetidas à dupla coloração com azul de astra e fucsina básica (ROESER, 1962), para a visualização das estruturas anatômicas. A nervura central foi seccionada transversalmente na porção proximal, medial e distal do lobo de menor comprimento e do lobo de maior comprimento. Lâminas semipermanentes foram montadas com uma gota de glicerina 50%, lamínula de vidro e vedadas com esmalte incolor (lutagem) (KRAUS; ARDUIN, 1997).

A diafanização das folhas foi realizada conforme técnicas descritas por Kraus e Arduin (1997), e também foram feitas secções transversais para a visualização das estruturas em vista frontal (epiderme e anexos).

Fotomicrografias das lâminas semipermanentes foram capturadas através do microscópio óptico Olympus CX31 acoplado à uma câmera digital Olympus C-7070, do laboratório de Farmacognosia da Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG).

### 4.2.2 Análise histoquímica

Foi utilizado material fixado para a análise histoquímica, sendo testados as seguintes soluções reagentes: Sudam III para verificar compostos lipofílicos (FOSTER, 1949), cloreto férrico (1%) (JOHANSEN, 1940) e dicromato de potássio (10%) (GABE, 1968) para detectar substâncias fenólicas, floroglucina clorídrica para evidenciar estruturas lignificadas (SASS, 1951), solução de iodo (2%) para identificar grãos de amido (BERLYN; MIKSCHE, 1976) e azul de metileno (0,1%) para revelar compostos mucilaginosos (JOHANSEN, 1940).

Fotomicrografias das lâminas semipermanentes dos testes histoquímicos foram capturadas pelo microscópio previamente descrito.

#### 4.2.3 Microscopia eletrônica de varredura por efeito de campo (FEG) e espectroscopia de energia dispersiva de raios X (EDS)

Para a análise das ultraestruturas de folhas de *C. pachystachya*, foram utilizadas as amostras armazenadas em etanol 70%. A partir dessas soluções, as amostras foram desidratadas em série etanólica crescente (álcool 80%, álcool 90%, sendo em álcool PA duas vezes). O material foi colocado em stubs de alumínio, recoberto por ouro em aparelho Sputter Coater SC7620. A análise das amostras foi realizada em microscópio eletrônico de varredura por meio efeito de campo (Mira 3 Tescan – Oxford Instruments, Oxford, UK).

Microanálises quantitativas e qualitativas dos cristais foram feitas no mesmo instrumento acoplado ao detector de EDS, localizado no Complexo de Laboratórios Multiusuários (C-labmu), da Universidade Estadual de Ponta Grossa - UEPG.

### 4.3 ESTUDO ETNOFARMACOLÓGICO

#### 4.3.1 Preparação de extratos aquosos purificados

Folhas de *C. pachystachya* foram secas em estufa a 40 °C por sete dias, no laboratório de Farmacognosia da UEPG. O material foi cortado, pulverizado e os extratos foram obtidos através da infusão das folhas. A infusão foi preparada com a utilização de 100 g da planta pulverizada e 1 L de água em ebulição (95 °C). A extração dos metabólitos secundários ocorreu num intervalo de 5-6 h, até atingir a temperatura ambiente (25 °C). Em seguida, a infusão foi tratada com três volumes de etanol, da qual originou um precipitado e uma fração solúvel em etanol (FSE). Esta fração foi filtrada, concentrada e liofilizada. O processo de liofilização foi realizado por um liofilizador (Terroni LD 1500) no Complexo de Laboratórios Multiusuários (C-labmu) da UEPG. Posteriormente, FSE foi mantida sob congelamento (-20 °C) até o momento das análises farmacológicas e da caracterização fitoquímica.

#### 4.3.2 Caracterização fitoquímica dos extratos de *C. pachystachya* por cromatografia líquida com detecção por arranjo de diodos, acoplada à espectrometria de massas *tandem* (CLAE-DAD-EM/EM)

Para a identificação dos constituintes presentes em FSE, amostras dos extratos foram preparadas a uma concentração de 1 mg/mL (em metanol e água deionizada 7:3, v/v), filtradas em filtros de PTFE (Millex 0,22 mm x 13 mm, Millipore) e injetadas (1 µL) no cromatógrafo líquido de alta eficiência (CLAE) via autoinjeter. As análises foram realizadas em cromatógrafo UFLC Shimadzu LC-20AD com injetor automático e forno, o qual estava acoplado a um detector de arranjo de diodos (DAD) e a um espectrômetro de massas (MicroTOF-QIII, Bruker Daltonics, Billerica, MA, USA) com fonte de ionização por eletrospray (IES) e analisador do tipo quadruplo e de tempo de voo. A cromatografia foi desenvolvida em uma coluna Kinetex C18 (2,6 µm, 150 x 2,1 mm, 100A) acoplada a uma pré-coluna de mesmo material, ambas da marca Phenomenex. A temperatura da coluna foi mantida a 50 °C com uma vazão de 0,3 mL/minuto. A fase móvel utilizada foi composta por água deionizada e acetronitrila, ambos contendo 0,1% de ácido fórmico. O gradiente de eluição aplicado teve o aumento do conteúdo de acetronitrila injetado, sendo que 3% em 2 minutos, de 3% a 25% em 23 minutos, de 25% a 80% em 15 minutos e 80% em 3 minutos. Todas as amostras foram monitoradas entre 240-800 nm e analisadas em modos de ionização positiva e negativa, com intervalo de (120 – 1200 m/z e energia de colisão 30-65 eV por aquisição automática).

Os resultados foram registrados por Data Analysis software versão 4.2 (Bruker) e compostos foram identificados com base no tempo de retenção e fragmentação, comparados à literatura e ao espectro ultravioleta. Alguns compostos poderiam ser confirmados pelos padrões. As fórmulas moleculares foram determinadas com base em massas, dos quais foram considerados erros de no máximo  $\pm 10$  ppm.

### 4.3.3 Avaliação de segurança e eficácia

#### 4.3.3.1 Animais

Ratos Wistar de ambos os sexos (316 – 480 g) foram adquiridos da Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD), Dourados, Mato Grosso do Sul, Brasil e mantidos sob condições controladas de temperatura  $22 \pm 2$  °C; 12 h de ciclo de luz/escuro; e acesso livre de ração e água. Todos os procedimentos foram previamente aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da UFGD (CEUA/UFGD; protocolo nº 40/2017) e seguiram as diretrizes do Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA).

#### 4.3.3.2 Estudo de toxicidade aguda

A avaliação da toxicidade oral aguda foi realizada em ratos fêmeas de acordo com o protocolo n. 425 estabelecido pela *Organization for Economic Co-operation and Development* (OECD) de 2008. Após 8 h de jejum, uma dose de 2000 mg/kg de FSE foi administrada em ratos ( $n = 5$ ) por gavagem (Figura 2). O grupo controle ( $n = 5$ ) foi tratado com água filtrada (1 mL/100 g). Após 1 h dos tratamentos os ratos foram alimentados. Parâmetros comportamentais e clínicos que evidenciam sinais de toxicidade ou morte foram monitorados durante as primeiras 8 h após a administração de FSE, e diariamente por 14 dias. O ganho de peso corporal e o consumo de água e ração foram monitorados e registrados diariamente. Além disso, possíveis mudanças de comportamento induzidos pelo FSE, segundo os parâmetros do *screening* hipocrático foram observados, sendo: estado de consciência, atividade e coordenação do sistema motor, tônus muscular, atividades do sistema nervoso central, reflexos corneal e acústico e atividades do sistema nervoso autônomo (MALONE; ROBICHAUD, 1962).

Na noite anterior ao dia da eutanásia, os ratos ficaram em jejum alimentar e com acesso livre a água. No 15º dia os animais foram eutanaziados através da inalação de isoflurano (acima de 20% em câmara de saturação), seguido do processo de exsanguinação. Órgãos reprodutivos (ovários e útero) e órgãos vitais (coração, pulmão, fígado, baço e rins) foram removidos para a determinação do peso relativo de cada órgão (peso absoluto do órgão x 100/ peso corporal de cada animal) e

examinados macroscopicamente. Somente os órgãos vitais foram enviados para análise histopatológica, a qual foi realizada por veterinários patologistas da UFGD.

Figura 2 – Gavagem oral (administração de FSE) em ratos Wistar



Fonte: A autora

#### 4.3.3.3 Estudo da atividade diurética aguda

A atividade diurética aguda foi avaliada de acordo com a metodologia descrita por Gasparotto Junior *et al.* (2009). Ratos machos em jejum foram divididos em cinco grupos ( $n = 6$ ) e receberam uma dose de 5 mL/100 g de solução salina isotônica (0,9% NaCl) para impor uniformidade corporal de sal e água. Após 1 h, cada grupo foi

tratado, pela via oral (gavagem), com o FSE em diferentes doses (30, 100 e 300 mg/kg), hidroclorotiazida (HCTZ; 25 mg/kg – grupo controle positivo) ou veículo (água filtrada 1 mL/100 g - grupo controle negativo) (Figura 2). Imediatamente após os tratamentos, os ratos foram colocados em gaiolas metabólicas (Figura 3), com livre acesso a ração e a água. Amostras de urina foram coletadas em cilindros graduados (Figura 4) e os volumes registrados nas primeiras 4 h e 8 h (todos os resultados foram expressos em mL/100 g de peso corporal). O pH e a densidade das amostras de urina fresca foram determinadas com a utilização de um aparelho digital medidor de pH (Q400MT; Quimis Instruments, Brazil) e através de um refratômetro portátil (NO107; Nova Instruments, Brazil), respectivamente. Ao final dos experimentos, os níveis de sódio ( $\text{Na}^+$ ), potássio ( $\text{K}^+$ ) e cloreto ( $\text{Cl}^-$ ) foram quantificados nas amostras urinárias utilizando um analisador automatizado (Roche<sup>®</sup>; Cobas Integra 400 plus). A carga excretada (*excretion load* – EI) dos eletrólitos  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  e  $\text{Cl}^-$  foi obtida pela multiplicação da concentração do eletrólito (mEq/L) pelo fluxo urinário (mL/min). Esses resultados foram expressos em  $\mu\text{Eq}/\text{min}/100$  g de peso corporal.

Figura 3 – Gaiolas metabólicas dos experimentos da diurese

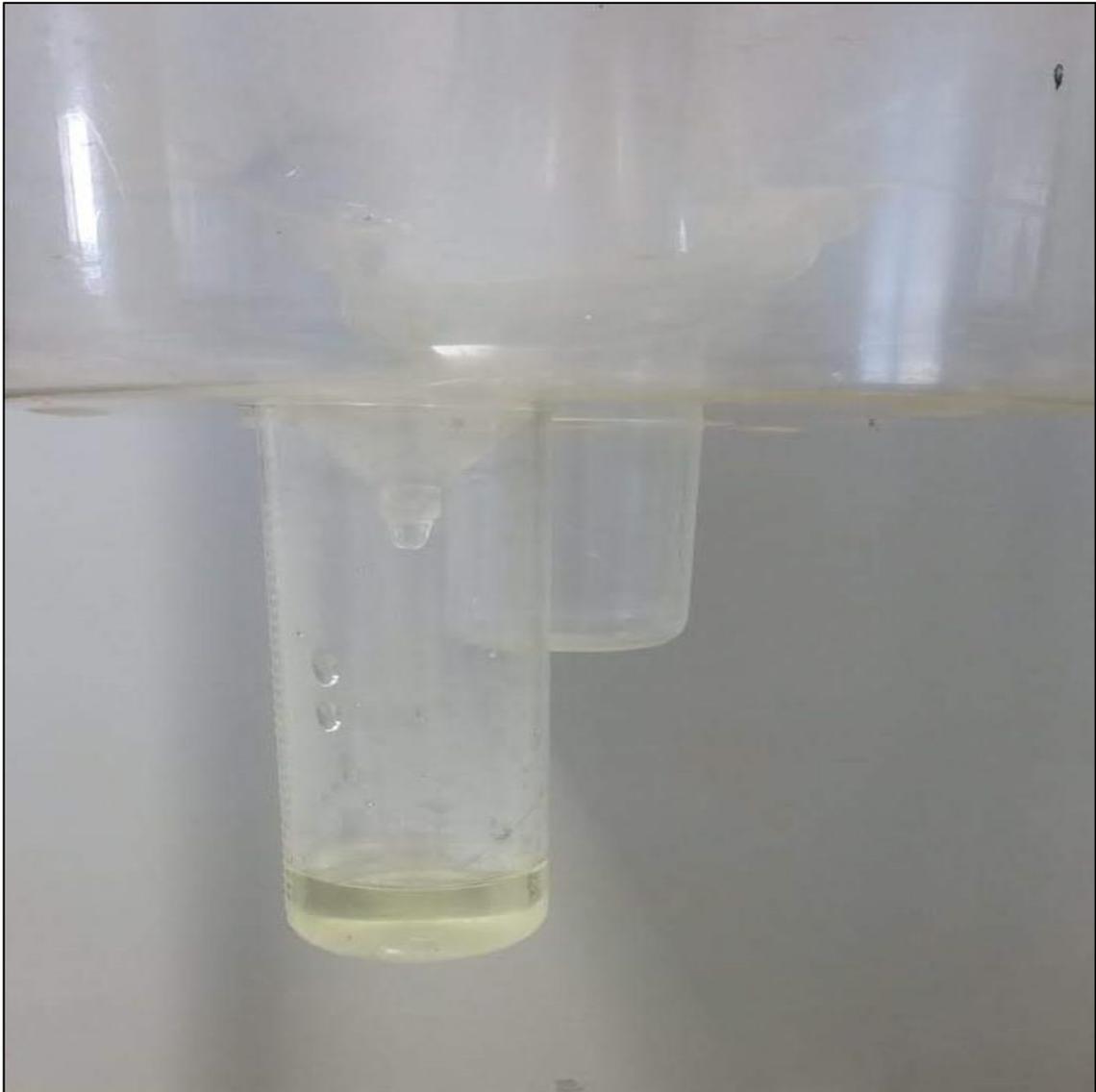


Fonte: A autora

#### 4.3.3.4 Estudo da atividade diurética prolongada

Diferentes doses de FSE (30,100 e 300 mg/kg), hidroclorotiazida (HCTZ; 25 mg/kg) ou veículo (água filtrada; 1 mL/100 g) foram administradas oralmente por gavagem em cinco grupos de ratos machos ( $n = 6$ ) por sete dias. Cada grupo de animais foi mantido em gaiolas metabólicas individuais (Figura 3) durante os sete dias de experimento. O volume urinário foi coletado em cilindros graduados (Figura 4) à cada 24 h. Parâmetros como pH, densidade, e a concentração de eletrólitos ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  e  $\text{Cl}^-$ ) foram analisados nas amostras urinárias.

Figura 4 – Cilindros volumétricos localizados em gaiolas metabólicas para a coleta das amostras urinárias



Fonte: A autora

#### 4.3.3.5 Avaliação da atividade antioxidante

Amostras de tecidos renais e cardíacos (ventrículo esquerdo) foram obtidas a partir de animais tratados com diferentes doses de FSE (30, 100 e 300 mg/kg) por sete dias e de animais tratados com hidroclorotiazida (HCTZ) ou veículo (água filtrada, 1 mL/100 g). Os tecidos foram homogeneizados em tampão fosfato (0,1 M; pH 6,5) diluído 1:10. A atividade da superóxido dismutase (SOD) foi analisada conforme métodos descritos por Gao *et al.* (1988). Os níveis de lipoperóxidos (LPO) foram avaliados segundo a metodologia descrita por Sedlak e Lindsay (1968). A atividade da catalase (CAT) foi analisada conforme métodos descritos por Beers e Sizer (1952). Os resultados foram expressos em unidades/mg de proteína, sendo que SOD/mg de proteína para superóxido dismutase (SOD), mmol de hidroperóxidos para níveis de lipoperóxidos (LPO) e mmol/min/mg de proteína para atividade da catalase (CAT).

#### 4.3.3.6 Efeitos sobre a pressão arterial e frequência cardíaca

A atividade hipotensora aguda foi avaliada segundo métodos descritos previamente (GASPAROTTO JUNIOR *et al.*, 2011). Previamente, diferentes grupos de ratos machos foram anestesiados pela via intramuscular (IM) com uma associação de cetamina (100 mg/kg) e xilazina (20 mg/kg). Em seguida, uma injeção em bolus de heparina (50 UI) foi administrada pela via subcutânea. A artéria carótida esquerda foi isolada, canulada e conectada a um transdutor de pressão acoplado a um sistema de gravação PowerLab® (Chart, v 4.1; ADI Instruments; Castle Hill, Australia) para registrar a pressão sanguínea arterial sistólica (SBP), diastólica (DBP), média (MAP) e a frequência cardíaca (HR). Depois da estabilização hemodinâmica (15 min), diferentes grupos de ratos receberam o FSE (30, 100 ou 300 mg/kg), hidroclorotiazida (25 mg/kg) ou veículo (água filtrada; 1 mL/100 g) por via intraduodenal. Após um período de 25 minutos para absorção e estabilização hemodinâmica, as variações da SBP, DBP, MAP e HR foram registrados por mais 5 minutos.

#### 4.3.3.7 Avaliação bioquímica

As amostras sanguíneas (3 mL) foram coletadas a partir de uma cânula inserida na artéria carótida dos animais, após o processo de registro da pressão arterial e da frequência cardíaca. O soro foi separado das amostras sanguíneas pela centrifugação (10 minutos, 2000 x g) e destinado à mensuração dos níveis de

eletrólitos ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  e  $\text{Cl}^-$ ) através do eletrodo de íon-seletivo. Os níveis de aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT), ureia e creatinina foram quantificados pelo analisador bioquímico automático (COBAS INTEGRA 400 plus; Roche ®).

#### *4.3.3.8 Investigação dos efeitos vasodilatadores do ESCP em leito mesentérico isolado e perfundido*

Ratos machos normotensos foram anestesiados com cetamina (100 mg/kg) e xilazina (20 mg/kg) via intraperitoneal. Leitos vasculares mesentéricos foram isolados (LVM) e preparados conforme a metodologia descrita por McGregor (1965). LVM (n = 5) foram colocados em banho e perfundidos (4 mL/min) com solução salina fisiológica (composição em mM: NaCl 119; KCl 4,7;  $\text{CaCl}_2$  2,4;  $\text{MgSO}_4$  1,2;  $\text{NaHCO}_3$  25,0;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1,2; dextrose 11,1 e EDTA 0,03) à 37 °C e na presença de 95%  $\text{O}_2$ /5%  $\text{CO}_2$ . Mudanças na pressão de perfusão (PP, mm Hg) foram registradas por um transdutor de pressão acoplado a um sistema de gravação PowerLab®, e aplicado ao programa (Chart, v 4.1; ADI Instruments; Castle Hill, Australia). Após 45 minutos de estabilização, a integridade do leito foi verificada através da injeção em bolus de KCl (120 mmol). Para verificar a viabilidade endotelial das preparações, diferentes LVM foram continuamente perfundidas com solução salina fisiológica adicionada e fenilefrina (3  $\mu\text{M}$ ) para induzir o aumento prolongado da pressão de perfusão (PP). Sob essas condições, uma injeção em bolus de acetilcolina (1 nmol) foi administrada, e a redução da PP foi mensurada. Com o objetivo de remover o endotélio dos LVM, algumas preparações foram perfundidas com a solução salina contendo deoxicolato de sódio (1,8 mg/mL) por 30 segundos. Em seguida, para confirmar a perda da capacidade da resposta endotelial, preparações foram continuamente perfundidas com a solução salina adicionada à fenilefrina (3  $\mu\text{M}$ ), e quando foi sustentado o aumento da PP, uma dose de acetilcolina (1 nmol) foi diretamente aplicada no sistema de perfusão.

LVM com ou sem a função endotelial foram continuamente perfundidos com solução salina e fenilefrina (3  $\mu\text{M}$ ). Após o período de estabilização, diferentes preparações receberam injeções em bolus contendo FSE (0,003; 0,01; 0,03; 0,1; 0,3 e 1 mg), e a redução da PP foi mensurada. Cada dose foi somente administrada após a pressão de perfusão ter retornado ao mesmo valor registrado anteriormente à injeção, com um intervalo mínimo de 3 minutos entre as doses.

#### 4.3.4. Análises estatísticas

As análises estatísticas foram feitas através da Análise de Variância de uma via seguido pelo teste de Dunnett's ou pelo teste t de Student's quando aplicáveis. Os resultados foram expressos como a média  $\pm$  erro padrão da média (E.P.M) e os valores de  $p \leq 0,05$  foram considerados estatisticamente significativos. Os gráficos e as análises estatísticas foram realizadas com auxílio do software GraphPad Prism versão 7.0 (GraphPad® Software, San Diego, CA, USA).

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 ESTUDO FARMACOBOTÂNICO

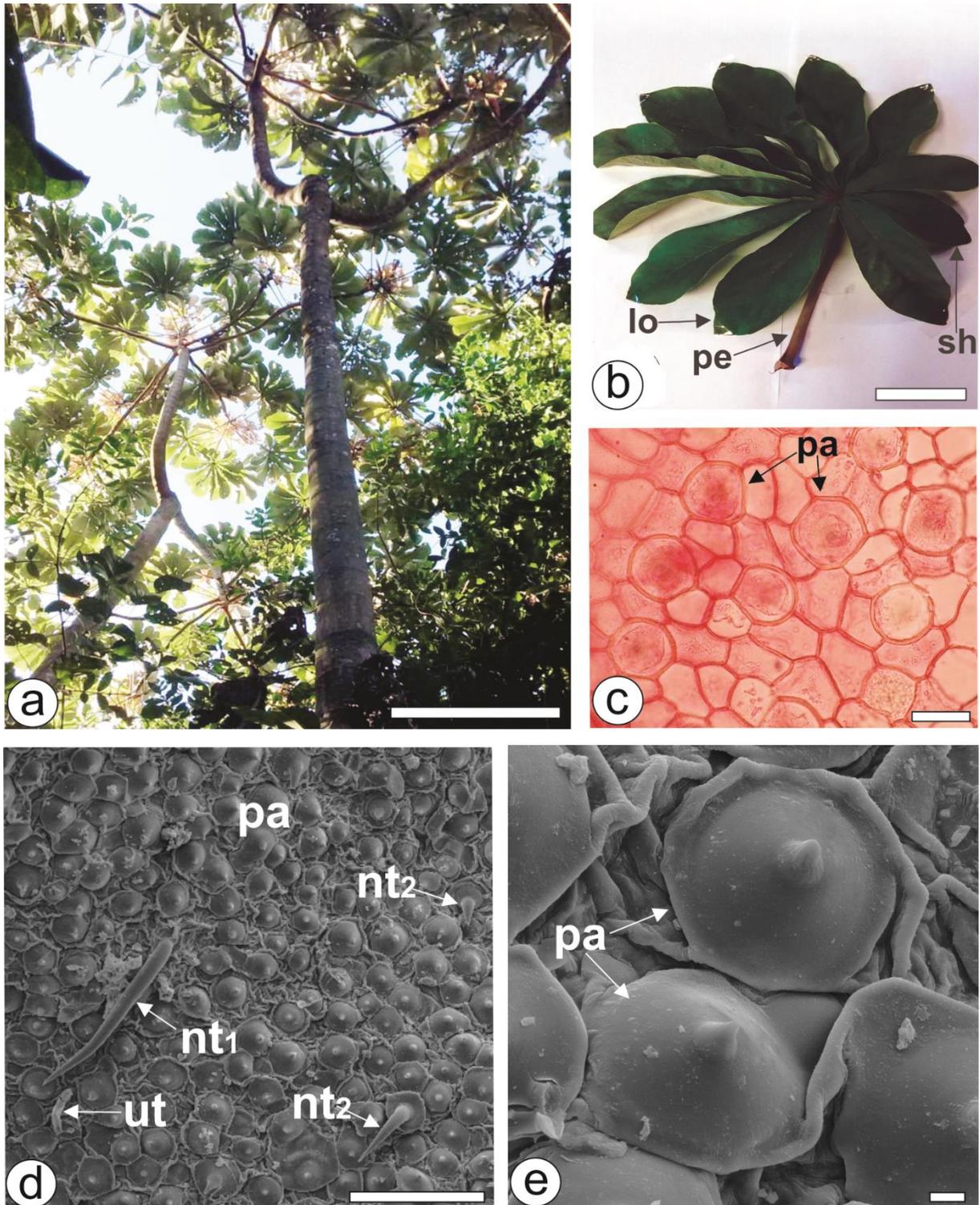
#### 5.1.1 Estudo anatômico

A folha de *C. pachystachya* (Figura 5a, b), em vista frontal, possui as paredes anticlinais das células epidérmicas ondeadas e delgadas (Figura 5c), enquanto que na face abaxial são sinuosas (Figura 6d). A epiderme é recoberta por cutícula estriada e delgada em ambas as faces. Inúmeras papilas evidentes são observadas apenas na face adaxial (Figura 5c-e) e (Figura 6b, c). Cutícula delgada também foi encontrada em *C. latiloba* (WALDHOFF; PAROLIN, 2010). E em *Cecropia longipes* Pittier e *Cecropia peltata* L. foram vistos em vista frontal paredes anticlinais sinuosas e delgadas na face adaxial, enquanto que em *C. membranacea* as paredes são retas e delgadas (GONZÁLEZ; VEGA, 2020).

A epiderme representa o sistema de revestimento do corpo vegetal geralmente em estrutura primária, e é formada usualmente por uma camada de células organizadas compactamente (FAHN, 1982; RUDALL, 1994). O formato das células pode ser isodiamétrico, alongado ou irregular. Em vista frontal, as paredes anticlinais das células epidérmicas podem ser retas, ondeadas ou sinuosas (UPTON *et al.*, 2011).

Todas as partes aéreas de plantas superiores possuem cutícula e esta pode se apresentar como um caráter diagnóstico na microscopia botânica (METCALFE CHALK, 1983, UPTON *et al.*, 2011). A cutícula pode ser delgada ou espessa e lisa, estriada ou papilada, sendo que as estrias podem ser curtas ou longas e apresentar orientação regular ou aleatória (RUDALL, 1994).

Figura 5 – Morfoanatomia de folhas de *Cecropia pachystachya*



Fonte: A autora

Escalas: a = 8 m, b = 27 cm, c = 50  $\mu$ m, d = 200  $\mu$ m, e = 20  $\mu$ m.

Legenda: [c: microscopia de luz; d, e: FEG]. a: Planta no hábito. b: Limbo foliar. c-e: Vista frontal da epiderme das folhas (face adaxial). [lo: lobo maior; sh: lobo menor; pe: pecíolo; pa: papila; nt<sub>1</sub>, nt<sub>2</sub>: tricoma não glandular; ut: tricoma unisseriado].

Nesse estudo, a composição química elementar dos cristais foi determinada por EDS (espectroscopia de energia dispersiva de raios X). Cristais são formados pelas plantas, principalmente, para detoxificar ácido oxálico solúvel em sais de cálcio insolúveis, para manter o equilíbrio iônico e para a defesa contra o ataque de herbívoros (BOEGER; WISNIEWSKI, 2003). Não somente a presença, mas também a forma dos cristais é característica para determinada espécie e pode ser utilizado como marcador anatômico (HE *et al.*, 2014; UPTON *et al.*, 2011).

No atual trabalho, *C. pachystachya* possui cristais prismáticos de oxalato de cálcio sobre a superfície epidérmica, em ambas as faces (Figura 6c, e). Cristais sobre a epiderme também foram observados em espécies de diferentes gêneros, a exemplo de *Eucalyptus* (MIGACZ *et al.*, 2018), *Piper* (SANTOS *et al.*, 2018), Amaranthaceae (TOLOUEI *et al.*, 2019 a) e Violaceae (TOLOUEI *et al.*, 2019 b). Dessa forma, essa característica pode auxiliar na identificação da espécie.

Os estômatos estão localizados na maioria das vezes na epiderme foliar, podendo serem encontrados em menor quantidade em pecíolos e caules jovens. São responsáveis pelas trocas gasosas e pelas transpirações que ocorrem na espécie vegetal. Esses pequenos órgãos são formados por duas células-guarda e por um ostíolo (fenda estomática). Essas células-guarda são consideradas estruturas com formas diferenciadas, originárias das células epidérmicas. Além das células-guarda, existem as células subsidiárias que podem ser diferentes das demais células epidérmicas, classificando os estômatos em vários tipos (APPEZZATO-DA-GLÓRIA; GUERREIRO-CARMELLO, 2006).

Os estômatos são classificados quanto à origem, número e formas das células subsidiárias. Contudo, a classificação mais utilizada para os estômatos está relacionada com a forma das células subsidiárias, ocorrendo os seguintes tipos clássicos: anomocíticos, anisocíticos, paracíticos, diacíticos e actinocíticos. Quanto à localização na lâmina foliar, os estômatos podem estar presentes somente na face adaxial (epiestomática), exclusivamente na face abaxial (hipoestomática) ou em ambas as superfícies (anfiestomática) (APPEZZATO-DA-GLÓRIA; GUERREIRO-CARMELLO, 2006).

Nesse contexto, o presente trabalho evidenciou em *C. pachystachya* estômatos anomocíticos somente na face abaxial, caracterizando a folha como

hipoestomática (Figura 6d, e). Característica similar foi também observada para essa espécie por Jorge; Markman e Ferro (1998), contudo folhas epiestomáticas foram encontradas em *C. latiloba* (WALDHOFF; PAROLIN, 2010). Estômatos anomocíticos também foram encontrados em *C. membranacea*, *C. longipes* e *C. peltata*, entretanto nas duas últimas espécies aparecem estômatos isotricíticos na face adaxial. As folhas de *C. longipes* e *C. peltata* são anfiestomáticas, sendo características diferenciais de *C. pachystachya*, enquanto que *C. membranacea* é hipoestomática (GONZÁLEZ; VEGA, 2020).

Tricomas são anexos epidérmicos responsáveis pela proteção e equilíbrio hídrico do vegetal, e podem estar presentes em folhas, pecíolos, flores e frutos. De uma maneira geral, os tricomas se diferenciam em tectores e glandulares, sendo que os tricomas tectores possuem maior diversidade quanto à tamanho, número de células e formas do que os tricomas glandulares (CUTLER; BOTHA; STEVENSON, 2011).

A importância da identificação de tricomas de espécies vegetais está inserida no contexto do Controle da Qualidade, por serem considerados marcadores anatômicos que auxiliam na autenticação uma dada espécie, podendo diferenciar espécies de determinado gênero ou de famílias botânicas (CUTLER; BOTHA; STEVENSON, 2011).

No gênero *Cecropia* são encontrados seis tipos de tricomas, a saber:

a) Unicelulares, relativamente espessados, retos ou curvados e uncinados, encontrados em *Cecropia hispidissima* Cuatrec. e *Cecropia megastachya* Cuatrec., sendo considerados semelhantes aos tricomas de Urticaceae. Esses tricomas, geralmente, quebram na base, deixando a superfície epidérmica rugosa;

b) Unicelulares, delgados, entrelaçados, comumente esbranquiçado ou amarronzados. Este tipo é denominado aracnoide ou teia-de-aranha e é geralmente encontrado em brácteas, estípulas, pecíolo e em ambas as faces da lâmina foliar, além de estarem presentes em *C. glaziovii* e *C. palmata*;

c) Tricomas pluricelulares alongados, moniliformes e globulares. Eles são amarronzados, podendo ser avermelhados ou arrouxeados. São comuns em órgãos jovens;

d) Tricomas cistolíticos são encontrados na face adaxial foliar;

e) Tricomas glandulares pluricelulares em forma de clava estão presentes em praticamente todas as espécies de *Cecropia* e em outros gêneros de Urticaceae, como *Coussapoa* e *Myrianthus*;

f) Corpos Müllerianos ocorrem em grupos formando um indumento denso. Esses são elipsoides a oblongos e medem de 1-2 mm de comprimento e são geralmente esbranquiçados. Contudo, em *Cecropia chlorostachya* C. C. Berg e P. Franco são rosados e em *C. hispidissima* são rosa e medem cerca de 3 mm de comprimento (BERG; ROSSELLI; DAVIDSON, 2005).

Os corpos Müllerianos e os tricomas glandulares em forma de clava ou “pearl bodies” (corpúsculos em pérolas) produzem compostos para atrair formigas com o objetivo de garantir proteção contra herbívoros (OLIVEIRA; CORREA, 2015), além de fornecerem nitrogênio às plantas através das fezes (JANZEN 1969; LONGINO, 1989). Outra função desempenhada para essa interação entre as espécies de *Cecropia* e as formigas é evitar a destruição das folhas dessas espécies por formigas ou por outros artrópodes (BERG; ROSSELLI, 2005).

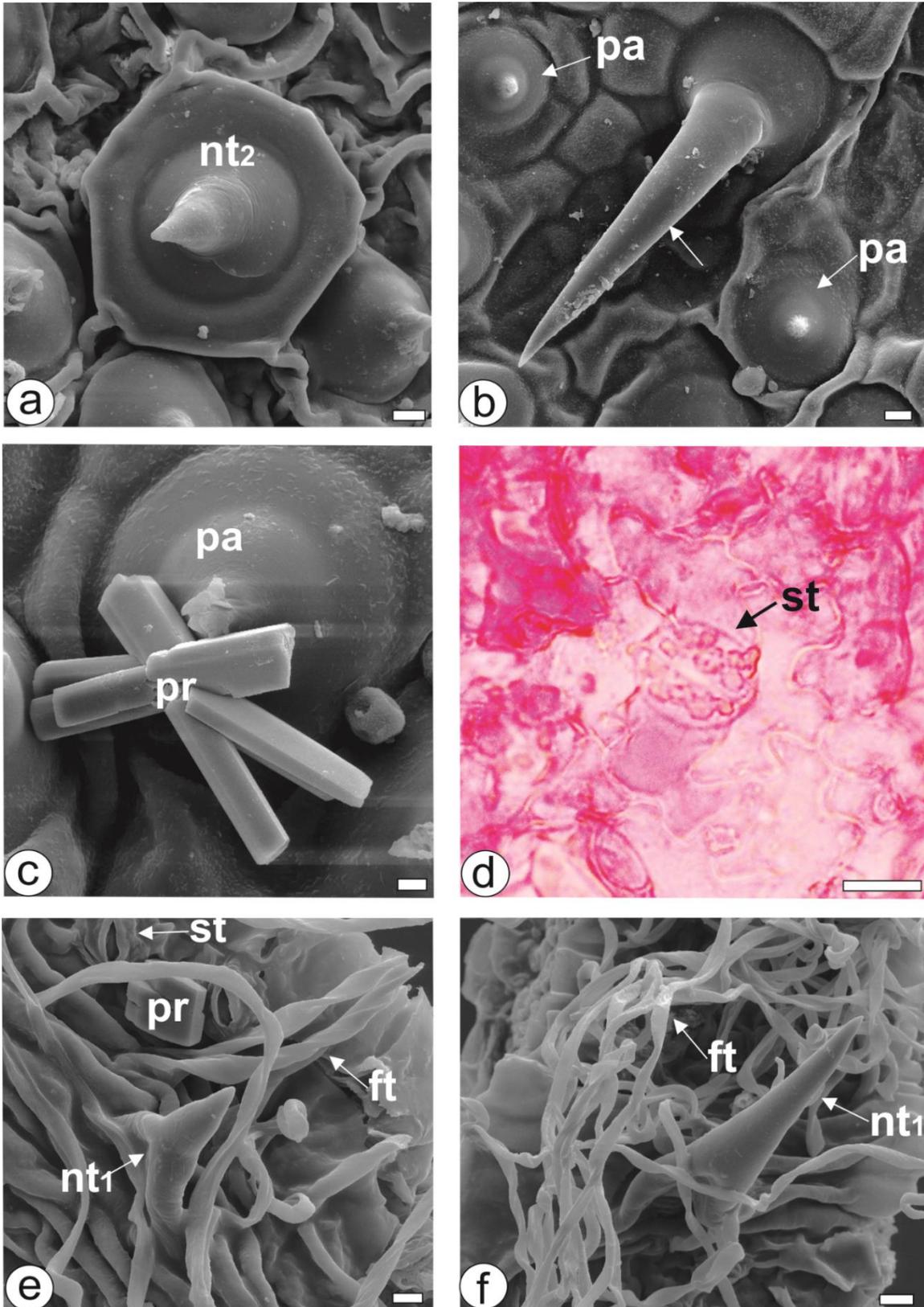
Os compostos presentes em corpos Müllerianos e em “pearl bodies” são formados basicamente por lipídios, glicogênio e proteínas que alimentam as formigas do gênero *Azteca*, sendo esses insetos presentes no interior de troncos ocos e em ramos fistulosos das espécies de *Cecropia* (GONÇALVES-SOUZA; PAIVA, 2016; OLIVEIRA; CORREA, 2015). Estruturalmente, corpos Müllerianos estão localizados entre uma porção aveludada na base do pecíolo, denominados de triquílios, que são tufo pardos de pêlos pluricelulares (BERG, 1978). Enquanto que, corpúsculos em pérolas ocorrem em algumas espécies de *Cecropia* e localizam-se na face abaxial da folha. No entanto, a presença de triquílios em *C. pachystachya* ocorre de forma tardia, devido as folhas serem de vida curta (OLIVEIRA; CORREA, 2015). Em algumas espécies de *Cecropia*, triquílios não são encontrados, como observado em *C. hololeuca*, *Cecropi pittieri* B. L. Rob. ex A. Stewart, *C. sciadophylla* e *Cecropia tacuna* C. C. Berg e P. Franco. É importante destacar que triquílios podem estar ausentes ou presentes em vários estágios do desenvolvimento do vegetal (BERG; ROSSELLI; DAVIDSON, 2005). Como é o caso de *C. latiloba* e *C. membranacea*, nas quais os triquílios podem surgir entre 40 e 50 anos de idade na planta (BERG; ROSSELLI, 2005).

Os triquílios foram identificados na base do pecíolo das folhas de *C. pachystachya*, como tufos de tricomas tectores unicelulares (Figura 7a). Vários agrupamentos de cristais prismáticos de oxalato de cálcio foram identificados entre os triquílios (Figura 7b).

A presença de triquílios pode ser verificada em 44 espécies de *Cecropia*, a exemplo de *Cecropia engleriana*, *C. gaziovii* e *C. membranacea* e são caracterizados como indumento marrom com tricomas curtos; em *C. ficifolia* os triquílios são amarronzados sendo intercalados por longos tricomas brancos; em *C. goudotiana* o indumento é marrom com longos tricomas acinzentados à brancos; em *C. kavanayensis* o indumento é amarronzado com tricomas unicelulares curtos de amarronzados à esbranquiçados; *C. latiloba* apenas aparecem tricomas amarronzados (BERG; ROSSELLI, 2005). Adicionalmente, a ausência de triquílios foi constatada em *C. hololeuca*, *Cecropia pittieri* B. L. Rob. ex A. Stewart, *C. sciadophylla* e *Cecropia tacuna* C. C. Berg & P. Franco (BERG; ROSSELLI, 2005).

Gonçalves-Souza e Paiva (2016) relataram que “pearl bodies” não são considerados tricomas, apesar de Berg; RosSELLI e Davidson terem denominados “pearl bodies” como tais estruturas. Os corpúsculos em pérolas são os verdadeiros responsáveis por produzirem alimentos às formigas em folhas de *C. pachystachya*. Adicionalmente, Gonçalves-Souza e Paiva (2016) comprovaram que “pearl bodies” estão presentes em *C. pachystachya* apenas em nervuras longas de folhas jovens. No presente estudo, os corpúsculos em pérolas foram identificados na face abaxial das folhas jovens de *C. pachystachya* (Figura 7c, d). Esses corpúsculos também foram identificados em *C. longipes*, *C. membranacea* e *C. peltata* (GONZÁLEZ; VEGA, 2020).

Figura 6 – Morfoanatomia das folhas de *Cecropia pachystachya*



Fonte: A autora

Escalas: a-c, e, f = 20  $\mu$ m, d = 50  $\mu$ m.

Legenda: [d: microscopia de luzl; a-c, e, f: FEG]. a-f: Vista frontal da epiderme foliar (a-c: face adaxial; d-f: face abaxial). [nt1, nt2: tricoma não glandular; pa: papila; pr: cristal prismático; st: estômato; ft: tricoma filariforme].

Dentre os seis tipos de tricomas descritos para o gênero *Cecropia*, *C. pachystachya* possui três tipos de tricomas tectores, a. tricoma tector unicelular, simples, cônico e de paredes espessadas (Figura 5d, 6a, b, e, f), sendo denominado de tricoma cistolítico de acordo com Berg; Rosselli e Davidson (2005), podendo ser de base alargada ou não, estando presentes em ambas as faces, contudo em menor quantidade na face abaxial; b. tricoma filariforme, longo e contorcido (Figura 6e, f), ocorrendo somente na face abaxial; c. tricoma tector pluricelular unisseriado formado por cerca de cinco células (Figura 5d), ocorrendo em ambas as faces. Estes tricomas foram denominados por Berg e Rosselli (2005) como moniliformes e globulares.

Tricomas cônicos unicelulares são caracterizados como idioblastos por conterem cistólitos ou litocistos na base do tricoma, sendo formados principalmente por carbonato de cálcio e silício. Esse tipo de tricoma foi identificado também em *C. obtusa*, *C. peltata* e *C. longipes* na face adaxial, entretanto está ausente em *C. membranacea* (GONZÁLEZ; VEGA, 2020).

Tricomas tectores na epiderme superior e tricomas filariformes na epiderme inferior também foram descritos para *C. latiloba* (WALDHOFF; PAROLIN, 2010) e *C. glaziovii* (JUNIOR *et al.*, 2004). No entanto, tricomas glandulares foram observados nessas espécies somente na face adaxial (WALDHOFF; PAROLIN, 2010).

Tricomas filariformes são os responsáveis por conferir o aspecto esbranquiçado da parte inferior do limbo foliar de *C. pachystachya* à olho nú (JORGE; MARKMAN; FERRO, 1998). Adicionalmente, *C. obtusa* possui diversos tricomas aracnóideos ou filariformes brancos, na face abaxial, enquanto que *C. ficifolia* apresenta tricomas escabros ou híspidos (GAGLIOTI *et al.*, 2014). Grande quantidade de tricomas filariformes, na face adaxial, foram encontrados nas espécies *C. albicans*, *Cecropia maxima* Snethl., *Cecropia telealba* Cuatrec., *Cecropia telenitida* Cuatrec. e *C. hololeuca* (BERG; ROSSELLI, 2005). Entretanto, em *C. membranacea* aparece escasso indumento aracnoideo na face adaxial, além de tricomas puberosos sob a nervura, enquanto que na face abaxial ocorrem densos tricomas puberosos, como longos tricomas uncinados ou quase glabros e os tricomas filariformes encontram-se na margem foliar, sendo ocasionalmente presentes nas aréolas (BERG; ROSSELLI, 2005).

Vale destacar que os tricomas filariformes ou indumento de tricomas aracnoides (Figura 6e, f) influenciam na coloração das folhas das espécies de *Cecropia*, até mesmo mascaram a coloração real de folhas e estípulas, conforme a densidade ou a quantidade da presença desses tricomas (BERG; ROSSELLI, 2005).

Tricomas pluricelulares conferem coloração amarronzada a preto às folhas de *C. angustifolia*, além da presença de poucos tricomas filariformes na face adaxial. Entretanto, na face abaxial ocorre a presença de tricomas unicelulares uncinados além dos tricomas filariformes (BERG; ROSSELLI, 2005). Sendo assim, a presença de tricomas uncinados em *C. angustifolia* diferencia da espécie *C. pachystachya*, visto que esta espécie não possui esse tipo de tricoma.

Em estudo de Berg e Rosselli (2005), *Cecropia distachya* e *C. angustifolia* evidenciaram a presença de tricomas escabros, puberosos e filariformes na face adaxial, além de pequenos à longos tricomas uncinados e indumento aracnoideo na face adaxial em *C. distachya* (BERG; ROSSELLI, 2005). Ainda para *C. angustifolia* foram descritos tricomas filariformes em aréola e puberosos na face abaxial (BERG; ROSSELLI, 2005).

Para outras espécies de *Cecropia*, como em *C. ficifolia* e *C. kavanayensis* ocorre além de tricomas escabros, também ocorrem tricomas híspidos na face adaxial e indumento aracnoideo em aréola na face abaxial. *Cecropia glaziovii* e *C. goudotiana* possuem tricomas escabros na face adaxial, enquanto que a face abaxial de *C. glaziovii* é recoberta por tricomas filariformes em aréola, bem como em *C. hololeuca*. Para *C. goudotiana*, o indumento aracnoideo não ocorre em aréolas e recobrem densamente as nervuras das folhas (BERG; ROSSELLI, 2005).

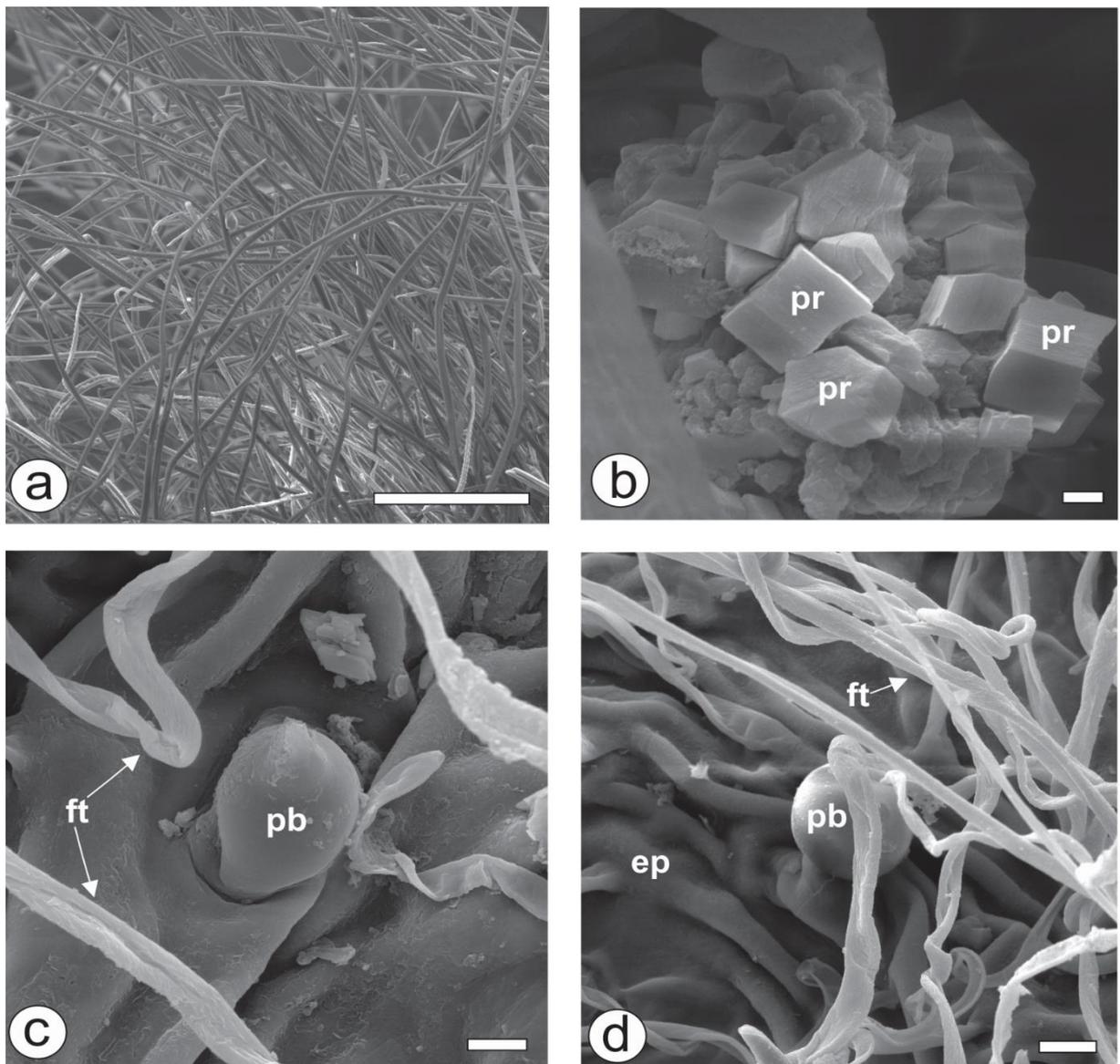
*Cecropia latiloba* tem a face adaxial com tricomas escabros, enquanto a face abaxial possui tricomas puberosos nas nervuras e com denso ou escasso tricomas filariformes nas aréolas.

Apesar dos tricomas tectores prevalecerem em espécies de *Cecropia*, ocorrem em outras espécies tricomas glandulares, como em *C. peltata* na face adaxial, em *C. membranacea* na face abaxial e em ambas as faces em *C. longipes* (GONZÁLEZ; VEGA, 2020).

Um detalhe verificado por González e Vega (2020) é o fato de o indumento aracnoideo ser restrito na margem foliar de *C. membranacea* e ausente na porção média do limbo, sendo considerada uma característica que diferencia *C. longipes* de *C. peltata* e de *C. pachystachya*.

Adicionalmente, os tricomas também auxiliam na diferenciação entre *C. pachystachya* e *T. papyrifera*, ambas conhecidas popularmente de embaúba. É possível diferenciá-las pelo indumento, uma vez que tricomas estrelados foram observados somente em *T. papyrifera* (YURQUINA *et al.*, 2008).

Figura 7 – Triquílios e tricomas glandulares em forma de clava em *Cecropia pachystachya*



Fonte: A autora

Escala: a = 200  $\mu$ m, b = 5  $\mu$ m, c = 10  $\mu$ m, d = 20  $\mu$ m.

Legenda: [a-d: FEG]. (a: indumento de triquílios; b: cristais sobre os triquílios; c, d: face abaxial). [pr: cristais prismáticos; pb: "pearl body"; ft: tricoma filariforme; ep: epiderme].

*Cecropia pachystachya*, em secção transversal, possui epiderme unisseriada, sendo que as células são maiores na face adaxial (Figura 8a). O mesmo ocorre em *C. longipes*, *C. membranacea* e *C. peltata*. Entretanto, em algumas espécies de *Cecropia* podem possuir a epiderme pluriestratificada, como é o caso da espécie *C. longipes* (GONZÁLEZ; VEGA, 2020). Os estômatos estão localizados no mesmo nível das demais células epidérmicas. Essas características, também foram encontradas nessa espécie por Jorge; Markman e Ferro (1998) e Petenatti; Petenatti e Del Vito (1998). Epiderme com células volumosas na face adaxial foram descritas para *C. latiloba* (WALDHOFF; PAROLIN, 2010).

Uma camada subepidérmica está presente na face adaxial de *C. pachystachya* (Figura 8a, b). Essa característica foi observada em *Cecropia* spp., contudo se destaca por ser um diferencial entre espécies de embaúda, como *C. pachystachya* e *M. gigantea* (ISHIDA; YAZAKI; HOE, 2005).

O mesofilo foliar é formado por células parenquimáticas (de preenchimento) contendo cloroplastos (clorênquima) ou podendo possuir células contendo substâncias ou estruturas, como água, cristais, alcaloides, compostos fenólicos, etc. O mesofilo é classificado quanto à organização e a presença dos parênquimas paliçádicos e esponjosos: mesofilo homogêneo (com somente parênquima paliçádico ou esponjoso), mesofilo dorsiventral (com parênquima paliçádico e esponjoso) e mesofilo isobilateral (com parênquima esponjoso entre as camadas de paliçádico). Portanto, a caracterização do mesofilo é um critério complementar na identificação da espécie medicinal (CUTLER; BOTHA; STEVENSON, 2011).

O mesofilo encontrado em *C. pachystachya* é dorsiventral, formado por uma camada de parênquima paliçádico e uma camada de parênquima esponjoso (Figura 8a). No entanto, Arrambarri *et al.* (2008) descreve o mesofilo de *C. pachystachya* formado exclusivamente por parênquima paliçádico, contradizendo o tipo de mesofilo identificado no presente estudo, sendo que Bieras e Graças Sajo (2009) e Jorge; Markman e Ferro (1998) também descreveram mesofilo dorsiventral, com parênquima paliçádico e esponjoso em *C. pachystachya*. Em *C. glaziovii* foi observado dois a três camadas de parênquima paliçádico (JUNIOR *et al.*, 2004). Mesofilo dorsiventral também foi encontrado em *M. gigantea* (ISHIDA; YAZAKI; HOE, 2005) e em outras espécies de *Cecropia*, como *C. longipes*, *C. membranacea* e *C. peltata* (GONZÁLEZ; VEGA, 2020).

Os feixes vasculares consistem de células especializadas, envolvidas no transporte de água e sais minerais, sendo translocados pelo xilema, enquanto que o floema é o responsável pelo transporte de seiva floemática (açúcares e proteínas). O floema transporta substâncias em qualquer direção na estrutura vegetal, e o xilema transloca as substâncias desde as raízes até o ápice da planta. Os feixes vasculares além de estarem presentes nas nervuras secundárias das folhas, também estão localizados nas nervuras principais, bem como em pecíolos e caules (CUTLER; BOTHA; STEVENSON, 2011). Neste estudo foram observados feixes vasculares de pequeno porte (Figura 8a) dispersos no mesofilo e envoltos por bainha parenquimática.

As folhas de *C. pachystachya* são lobadas e dividem-se em lobos maiores e menores, sendo o estudo anatômico feito também com base na observação das secções entre a nervura proximal (região da nervura próxima ao pecíolo), nervura medial (porção média da nervura na folha) e nervura distal (porção afastada do pecíolo). Diante disso, em secção transversal a nervura distal e medial entre os dois lobos (maiores e menores) possuem formato plano-convexo, enquanto que a nervura proximal é biconvexa, sendo a face abaxial mais proeminente. A epiderme da nervura é unisseriada e formada por células arredondadas (Figura 8c). Tricomas tectores semelhantes aos mencionados para o limbo foliar foram observados na nervura central (Figura 8c).

A diferenciação da camada subepidérmica em folhas e até mesmo no pecíolo, origina uma estrutura denominada de colênquima (constituído por celulose) ou esclerênquima (constituído por lignina), sendo ambos considerados tecidos de sustentação (APPEZZATO-DA-GLÓRIA; GUERREIRO-CARMELLO, 2006).

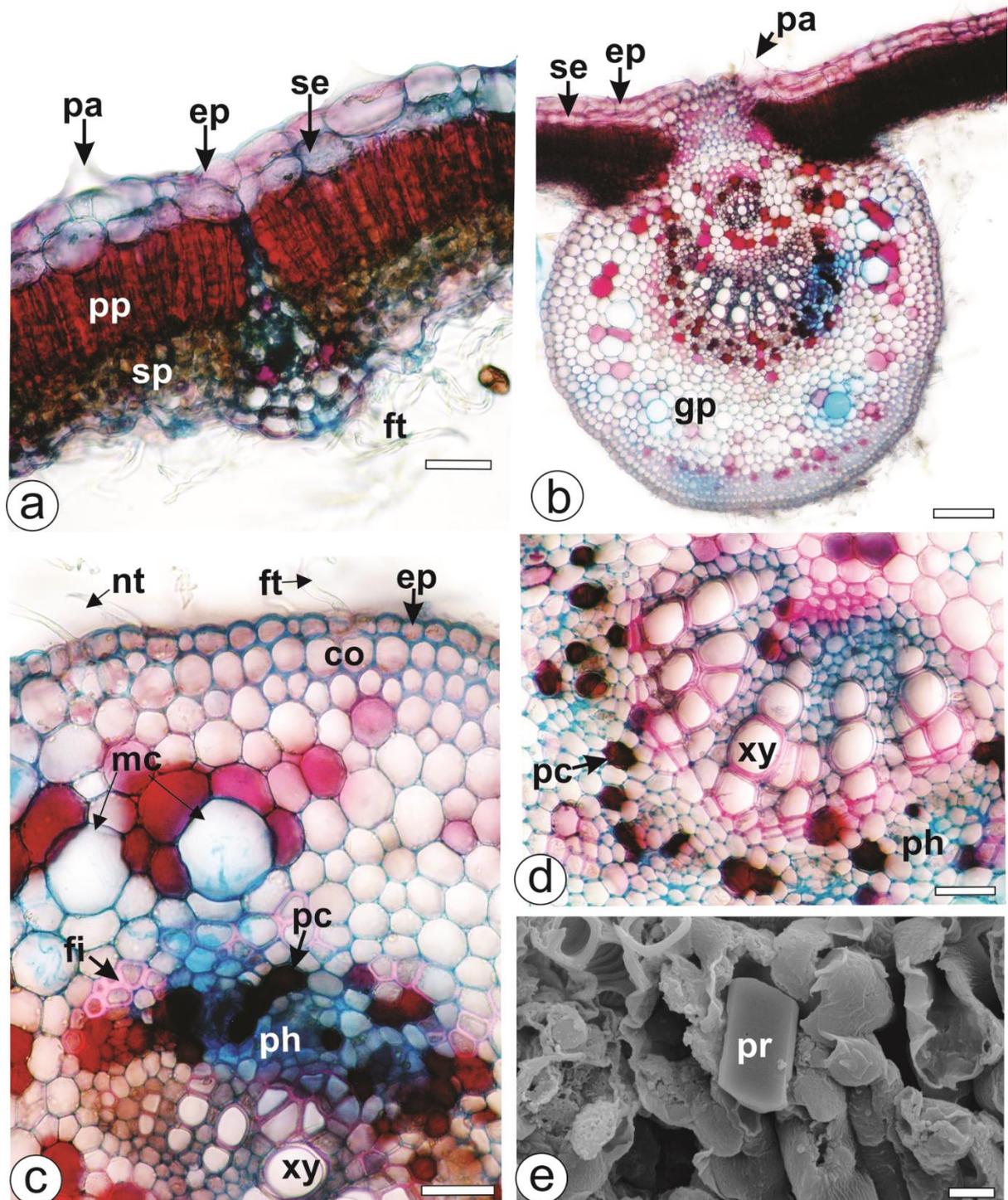
O colênquima é classificado de acordo com o espessamento das paredes celulares, podendo ser do tipo angular, lacunar, laminar e anelar. O colênquima angular é caracterizado pelo espessamento dos ângulos nas paredes celulares, onde encontram-se três ou mais células; no colênquima lacunar ocorre espaçamentos entre as células. O colênquima laminar apresenta espessamento em todas as paredes tangenciais celulares, de forma interna e externa, enquanto que o colênquima anelar possui espessamento mais uniforme das paredes celulares. (APPEZZATO-DA-GLÓRIA; GUERREIRO-CARMELLO, 2006).

Nesse contexto, ocorre subjacente à epiderme, um colênquima angular formado por até cinco camadas de células (Figura 8b), parênquima fundamental e células mucilaginosas (Figura 8b, c).

O sistema vascular está representado por feixes vasculares colaterais (Figura 8b) que estão distribuídos da seguinte maneira: no lobo menor, a nervura proximal mostra três feixes em arco aberto e dois dorsais, enquanto que as nervuras medial (Figura 8b) e distal evidenciam um feixe único central em arco aberto e um feixe dorsal; o lobo maior apresenta a mesma distribuição observada na região proximal do lobo menor, enquanto que na região medial são observados cerca de sete feixes desorganizados e a porção distal tem distribuição dos feixes semelhante à mesma porção do lobo menor.

Fibras (Figura 8c), drusas e cristais prismáticos (Figura 8e) estão presentes próximos ao floema. Essas características foram relatadas para *C. pachystachya* (BIERAS; GRAÇAS SAJO, 2009; PETENATTI; PETENATTI; DEL VITO, 1999).

Figura 8 – Anatomia foliar de *Cecropia pachystachya*



Fonte: A autora

Escala: a, c, d = 50  $\mu$ m, b = 100  $\mu$ m, e = 10  $\mu$ m.

Legenda: Seções transversais da lâmina foliar (a), nervura central (b-e). [a-d: Dupla coloração em azul de astra e fucsina básica; e: FEG]. [pa: papila; ep: epiderme; se: camada subepidérmica; pp: parênquima paliçádico; sp: parênquima esponjoso; ft: tricoma filariforme; gp: parênquima de preenchimento; nt: tricoma não glandular; co: colênquima; mc: células mucilaginosas; fi: fibra; pc: compostos fenólicos; ph: floema; xy: xilema; pr: cristal prismático].

O pecíolo, em secção transversal, possui forma circular (Figura 9a). A epiderme é unisseriada e coberta por cutícula lisa e delgada (Figura 9d). Estão presentes os tricomas tectores previamente mencionados para o limbo foliar (Figura 9b, c). Contudo, Jorge; Markman e Ferro (1998) encontraram também tricomas glandulares formado por pedicelo com duas células e cabeça com seis ou mais células. Berg e Rosselli (2005) relataram a presença de tricomas tectores filariformes, além dos tricomas pluricelulares, aos quais descreveu como amarronzados.

Tricomas filariformes na epiderme do pecíolo também foram encontrados em *C. engleriana*, *C. hololeuca* e *C. kavanayensis* (BERG; ROSSELLI, 2005), porém para esta espécie são escassos (VELÁSQUEZ, 1971). Tricomas pluricelulares amarronzados são encontrados dispersos entre o indumento aracnoideo de *C. engleriana*, enquanto que pode ser encontrado somente tricomas pluricelulares amarronzados em *C. hololeuca* na base do pecíolo (BERG; ROSSELLI, 2005).

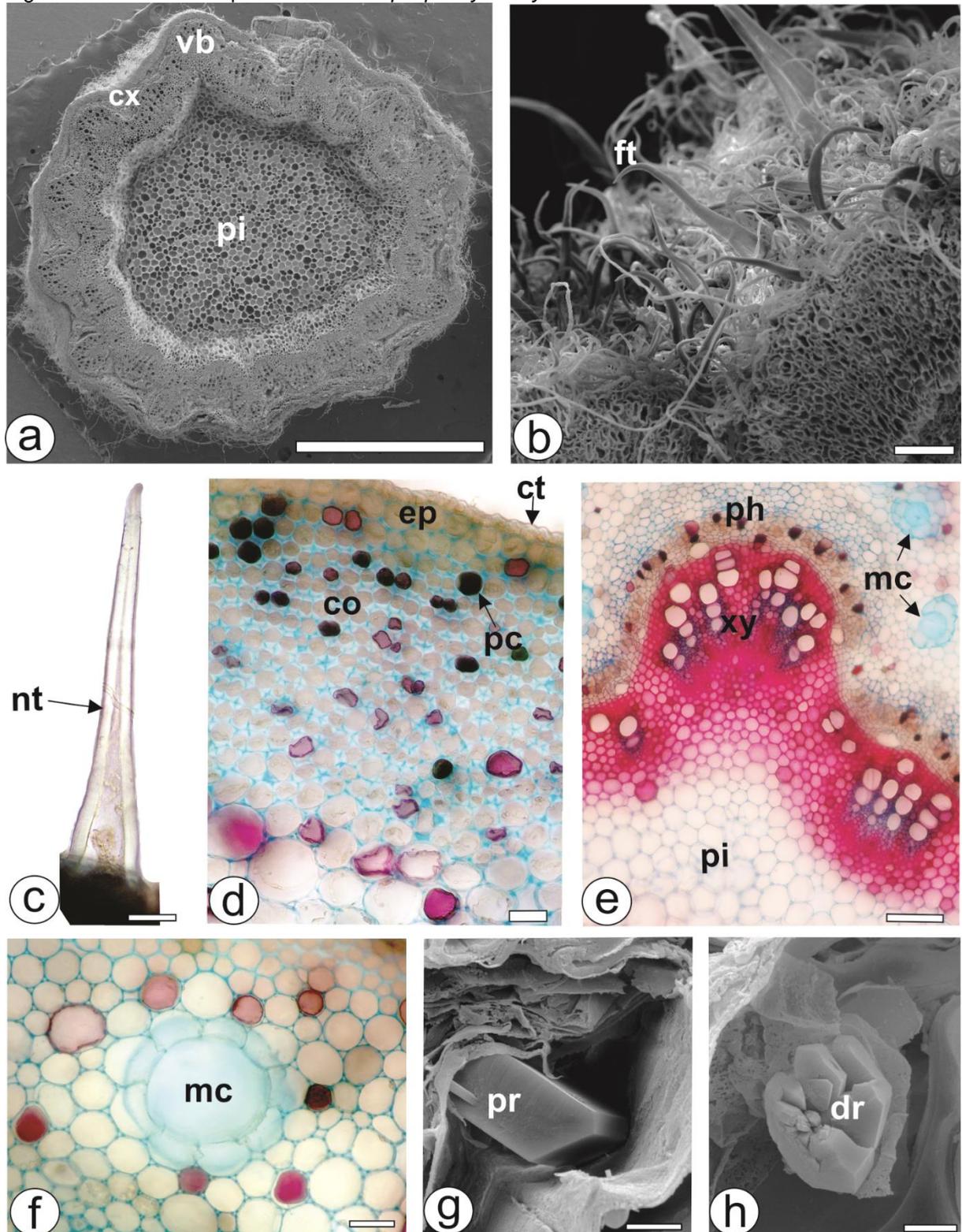
Em *C. ficifolia*, apenas foram identificados tricomas filariformes, que ocasionalmente, são glabros (BERG; ROSSELLI, 2005). Uma característica relevante é que *C. gaziovii* apresenta tricomas curvados à uncinados predominantemente no pecíolo (BERG; ROSSELLI, 2005).

Tricomas glabros são vistos de forma isolada em *C. membranacea* (BERG; ROSSELLI, 2005).

Subjacentemente à epiderme ocorre cerca de 15 camadas de colênquima angular (Figura 9d) e na região do córtex são observadas células mucilaginosas (Figura 9f). Drusas (Figura 9h) e cristais prismáticos (Figura 9g) também ocorrem nessa região. O sistema vascular é formado por duas séries de 14 feixes colaterais, formando uma região medular. Em toda a região perimedular ocorrem células lignificadas (Figura 9e).

A distribuição dos feixes vasculares é uma característica importante na identificação de adulterantes como é o caso de *Tetrapanax papyrifer*. Esta espécie apresentou diferente organização dos feixes vasculares nas porções proximal, medial e distal do pecíolo em relação à *C. pachystachya*, a saber, no pecíolo proximal os feixes vasculares estão dispersos, formando uma medula central, enquanto que no pecíolo medial os feixes estão organizados em forma de anel e na região distal a distribuição dos feixes é em U (MOURAD, 2013).

Figura 9 – Anatomia do pecíolo de *Cecropia pachystachya*



Fonte: A autora

Escala: a = 1 mm, b = 100  $\mu$ m, c-f = 50  $\mu$ m, g,h = 10  $\mu$ m.

Legenda: [c-f: Dupla coloração em azul de astra e fucsina básica; a, b, g,h: FEG]. [vb: feixe vascular; cx: córtex; pi: medula; ft: tricoma filariforme; nt: tricoma não glandular; ct: cutícula; ep: epiderme; pc: compostos fenólicos; co: colênquima; mc: células mucilaginosas; ph: floema; xy: xilema; pi: medula; pr: cristal prismático; dr: drusa].

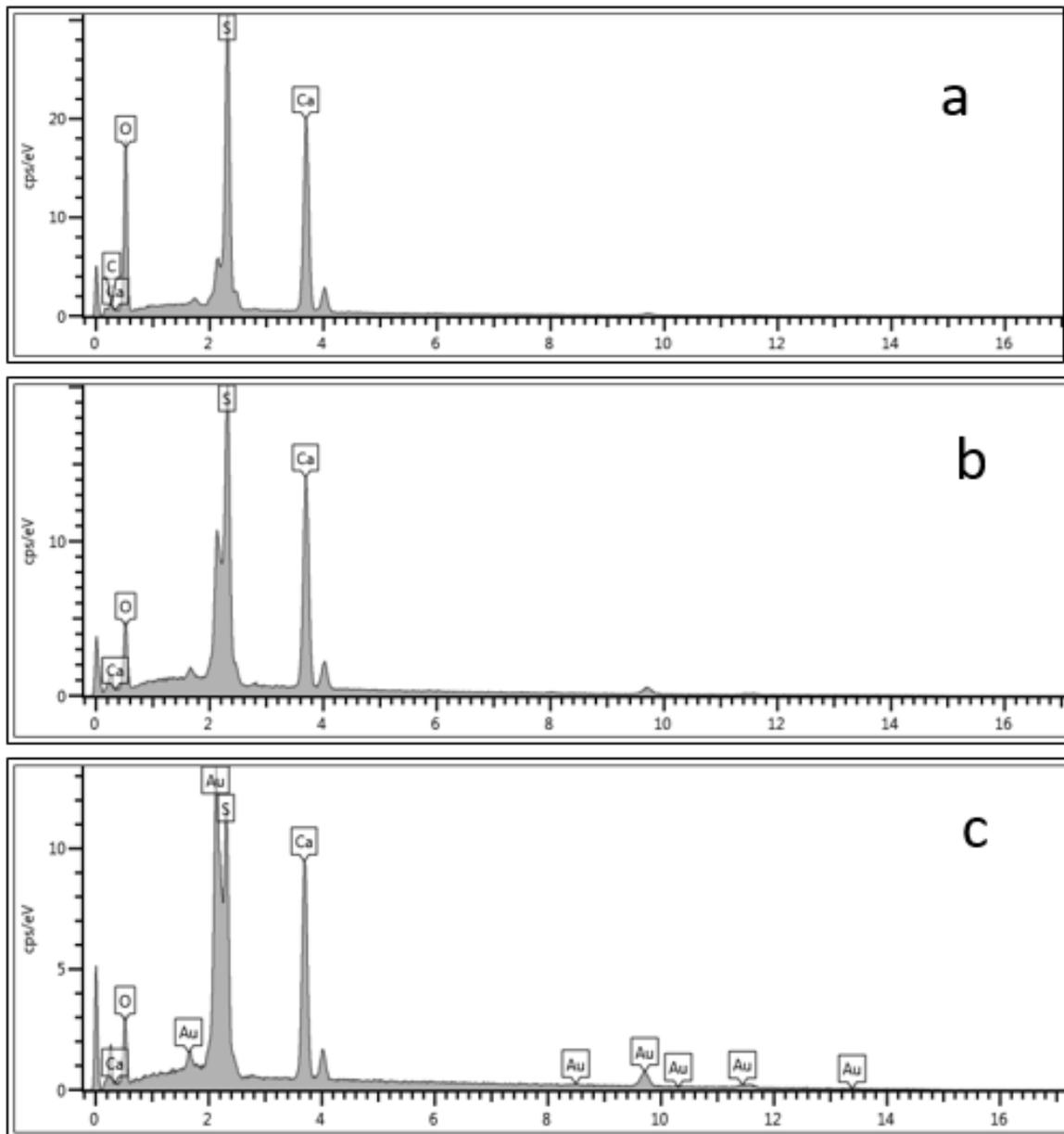
A presença ou a ausência de cristais são consideradas características que identificam a espécie vegetal. O tipo e a composição química elementar desses cristais são as principais variações que ocorrem nessas estruturas. Apesar de os cristais de oxalato de cálcio serem os mais encontrados em tecidos, outros elementos químicos podem ser encontrados na formação. Portanto, cristais de sulfato de cálcio, oxalato de cálcio, oxalato de magnésio, são considerados outros elementos químicos que são encontrados nas plantas (HE *et al.*, 2012).

O espectro de EDS (espectroscopia de energia dispersiva de raios X) dos cristais presentes em *C. pachystachya* revelou picos de carbono, oxigênio, cálcio e enxofre (Figura 10). Entretanto, os três primeiros elementos encontram-se em maior quantidade na composição dos cristais, caracterizando-os desta forma como cristais de oxalato de cálcio. A razão do enxofre fazer parte da composição química desses cristais, pode estar relacionada a detoxificação desse elemento (SILVA; AGUIAR-DIAS; MENDONÇA, 2014) devido a presença em excesso de enxofre na composição do solo.

Espécies da família Urticaceae apresentam como uma das características a presença de acúmulo de cálcio (BERG; ROSSELLI; DAVIDSON, 2005). Portanto esse elemento químico está inserido na composição química dos cristais. Cristais ou drusas de oxalato de cálcio foram encontradas por Petenatti; Petenatti e Del Vito (1999) e Bieras e Graças Sajo (2009) espalhados por feixes vasculares e feixes secundários, sendo a sua composição química formada por oxalato de cálcio.

Cristais de oxalato de cálcio em forma de drusa também foram encontrados depositados em ambas as faces do limbo foliar e no mesofilo de *C. longipes*, *C. membranacea* e *C. peltata* (GONZÁLEZ; VEGA, 2020).

Figura 10 – Espectro de EDS dos cristais de *Cecropia pachystachya*



Fonte: A autora

Legenda: [a: cristal prismático sobre a papila; b: cristal prismático na nervura central; c: drusa no pecíolo].

### 5.1.2 Análise histoquímica

Na análise histoquímica, compostos lipofílicos foram evidenciados pelo Sudam III na cutícula do limbo foliar, nervura central do mesofilo e do pecíolo. Além disso, células contendo compostos lipofílicos foram evidenciados em regiões de feixes secundários da folha (Figura 11a), bem como na nervura central, na região do floema. No pecíolo, foi observada a presença de muitas células lipofílicas em toda a extensão do córtex, no floema (Figura 12a) e algumas células na medula.

Cloreto férrico e dicromato de potássio reagiram com compostos fenólicos em grande parte do mesofilo, principalmente nos parênquimas lacunoso e esponjoso (Figura 11b), no tricoma pluricelular da face adaxial e na nervura central, em células das regiões do xilema e do floema. Compostos fenólicos também foram revelados no pecíolo (Figura 12b), em maior parte no córtex (Figura 12c), bem como nos feixes vasculares e na medula. Compostos fenólicos foram descritos para *C. pachystachya* (BIERAS; GRAÇAS-SAJO, 2009).

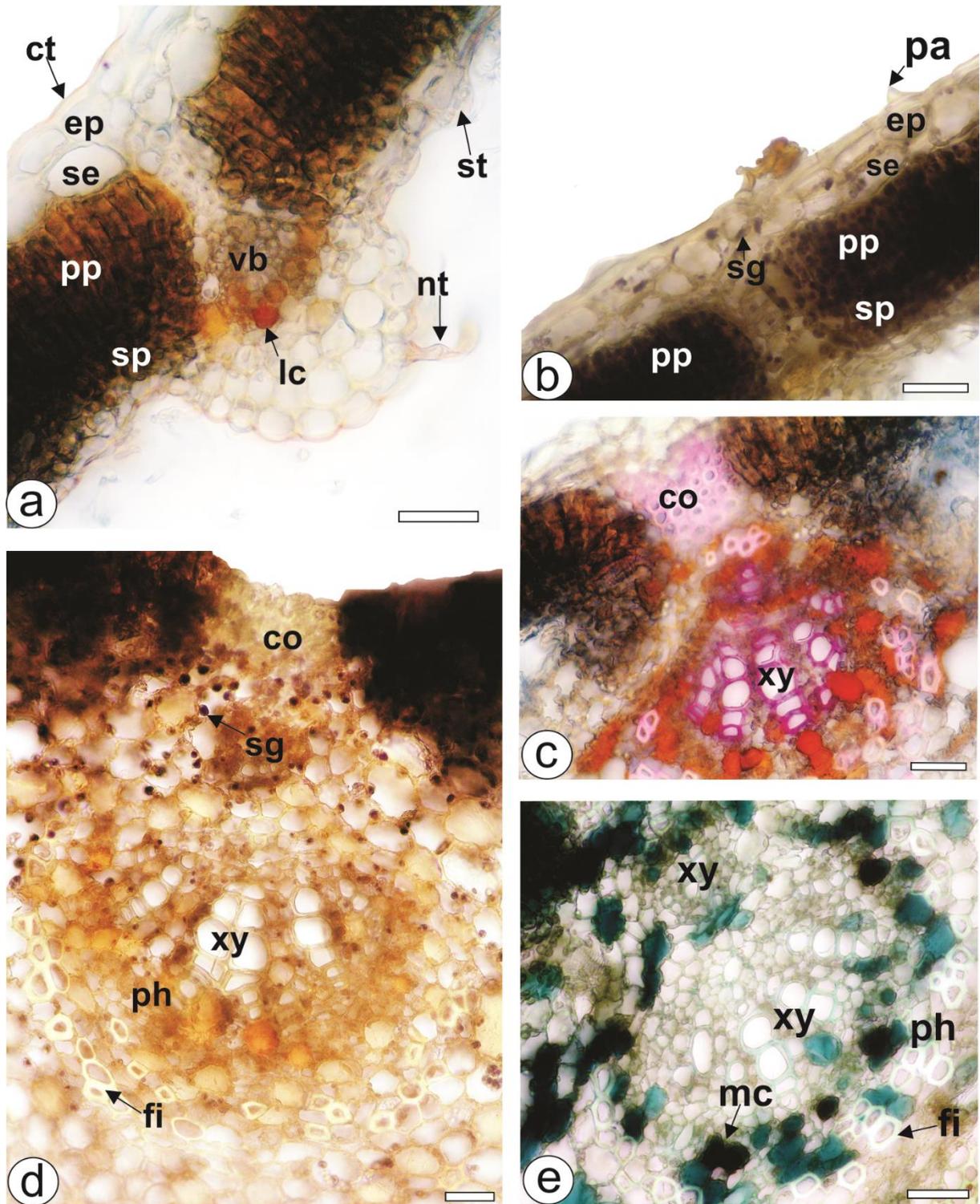
Floroglucina clorídrica reagiu para estruturas lignificadas, no xilema da nervura central (Figura 11c) e no pecíolo (Figura 12d).

Grãos de amido foram encontrados na nervura central (Figura 11d), próximos aos feixes vasculares e ao colênquima, bem como na epiderme superior e na camada subepidermal, além de grãos de amido dispersos no parênquima lacunoso. No entanto, foram verificados poucos grãos de amido no pecíolo, das quais são mais evidentes no córtex, ao redor das células mucilaginosas (Figura 12e).

As células com conteúdo mucilaginoso estão presentes na nervura central (Figura 11e), próximos aos feixes vasculares. No entanto, no pecíolo estão presentes em grande quantidade no córtex e esporadicamente na medula (Figura 12f).

O mesofilo com dutos mucilaginosos também foi confirmado por Petenatti; Petenatti e Del Vito (1999).

Figura 11 – Histoquímico da lâmina foliar e da nervura central de *Cecropia pachystachya*

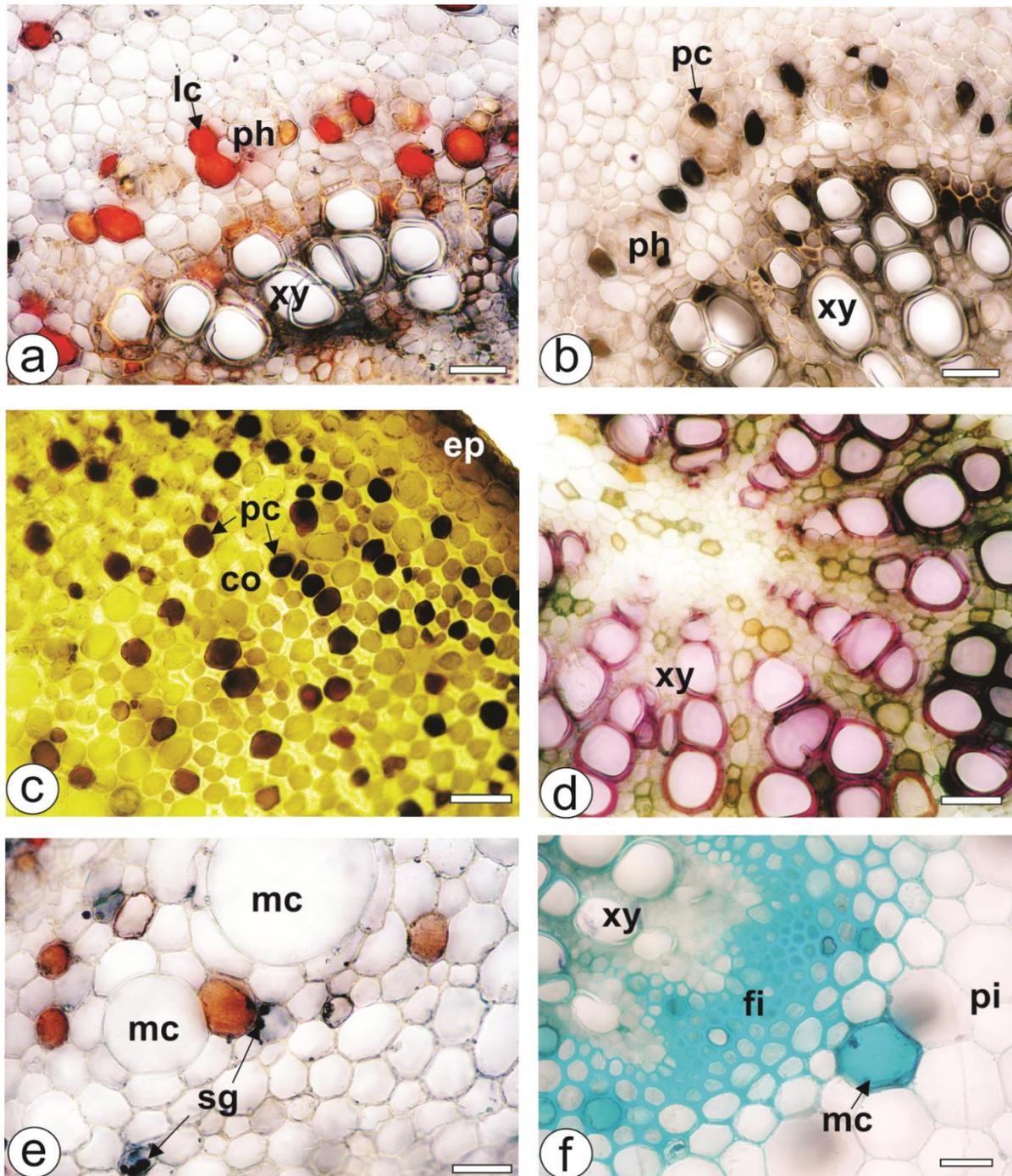


Fonte: A autora

Escala: 50  $\mu$ m.

Legenda: [a: Sudam III; b: solução de cloreto férrico; c: floroglucina/HCl; d: solução de iodo (2%); e: azul de metileno (0,1%)]. [ct: cutícula; ep: epiderme; se: camada subepidérmica; pp: parênquima paliçádico; sp: parênquima esponjoso; vb: feixe vascular; lc: compostos lipofílicos; st: estômato; nt: tricoma não glandular; pa: papila; sg: grãos de amido; co: colênquima; xy: xilema; ph: floema; fi: fibra; mc: compostos mucilaginosos].

Figura 12– Histoquímico do pecíolo de *Cecropia pachystachya*



Fonte: A autora

Escala: 50 µm.

Legenda: [a: Sudam III; b: solução de cloreto férrico; c: solução de dicromato de potássio (10%); d: floroglucina/HCl; e: solução de iodo (2%); f: azul de metileno (0,1%)]. [lc: compostos lipofílicos; ph: floema; xy: xilema; pc: compostos fenólicos; ep: epiderme; co: colênquima; mc: células mucilaginosas; ducto secretor; sg: grãos de amido; fi: fibras; mc: compstos mucilaginosos; pi: medula].

## 5.2 ESTUDO ETNOFARMACOLÓGICO

### 5.2.1 Análise fitoquímica dos extratos de *C. pachystachya*

O extrato FSE obtido das folhas de *C. pachystachya* foi analisado por CLAE-DAD-EM e EM/EM, e foram identificados 13 metabólitos (Figura 13). Esses compostos foram detectados através dos dados espectrais de UV, EM e EM/EM em comparação com dados publicados na literatura para tais substâncias.

Dentre os metabólitos secundários identificados estão: ácido quínico **(1)**, ácido hexônico **(2)**, ácido cítrico **(3)**, ácido 5-*O-E*-caffeoil quínico **(4)**, dímero de procianidina **(5)**, C-hexosil C-pentosil luteolina **(6)**, C-hexosil C-pentosil luteolina **(7)**, C-hexosil luteolina **(8)**, C-hexosil apigenina **(9)**, C-hexosil O-pentosil apigenina **(10)**, O-deoxihexosil-hexosil quercetina **(11)**, C-hexosil apigenina **(12)** e O-hexosil quercetina **(13)**.

O ácido quínico é um composto caracterizado como um ácido fenólico em que em uma reação de esterificação com o ácido caféico origina o ácido clorogênico (SOARES, 2002). Portanto, o ácido quínico e o ácido 5-*O-E*-caffeoil quínico encontrados em FSE reagem formando o ácido clorogênico (OLIVEIRA; BASTOS, 2011).

Os dímeros de procianidina identificados para as amostras de *C. pachystachya* nesse estudo, provavelmente possui em sua estrutura química a catequina como unidade terminal (CALLEMIEN; COLLIN, 2008). E os outros compostos químicos encontrados como luteolina, apigenina (BEZERRA *et al.*, 2016) e quercetina em que são caracterizados como flavonoides (LIMA *et al.*, 2001).

Em estudos prévios, autores como Brango-Vanegas *et al.* (2014) identificou em frações metanólicas de *C. pachystachya* os seguintes metabólitos: um derivado de ácido cinâmico, quatro flavonoides glicosilados e um flavonoide C-diglicosilados, sendo que foram identificados nove compostos majoritários. A identificação de derivado de ácido cinâmico foi descrita pela primeira vez em estudos de Brango-Vanegas *et al.* (2014), entretanto o presente estudo revela a presença do mesmo composto em FSE, pela identificação do ácido clorogênico. O mesmo autor ainda afirma que o gênero *Cecropia* possui uma boa distribuição de C-glicosilados, bem como a presença de flavonoides e de ácidos fenólicos já foram reportados (GAZAL *et al.*, 2014). A maioria dos compostos encontrados em FSE são fenólicos, em que condiz com os estudos histoquímicos realizados no atual trabalho, sendo localizados

em grande quantidade em folhas e pecíolos, principalmente no parênquima lacunoso e esponjoso do mesofilo, e no córtex do pecíolo de *C. pachystachya*.

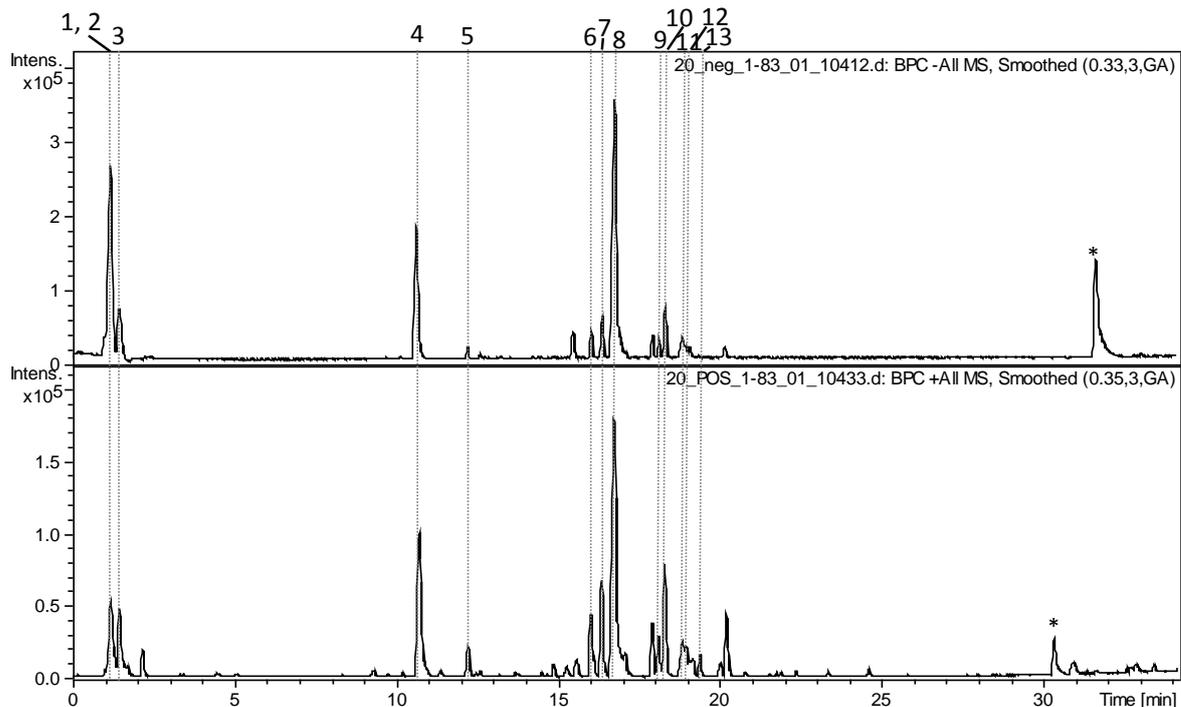
Outros compostos majoritários já foram descritos para a espécie, em estudos feitos com extratos aquosos como ácido clorogênico (ácido fenólico), isoorientina, orientina, isovitexina e isoquercetina (COSTA *et al.*, 2011; GAZAL *et al.*, 2014). Ácido clorogênico é um ácido fenólico, enquanto que os demais são considerados C-glicosil flavonoides (MENDONÇA *et al.*, 2016). Ácido clorogênico já foi identificado em *C. obtusifolia*, *C. glaziovii* e *C. pachystachya*, porém para as duas últimas espécies esse composto é encontrado em grande quantidade (COSTA *et al.*, 2011).

Gazal *et al.* (2014) ainda ressalta que as propriedades medicinais de muitas espécies em geral estão relacionadas diretamente com flavonoides ou compostos fenólicos.

Algumas espécies de *Cecropia*, como *C. glaziovii*, *C. obtusifolia* e *C. lyratiloba* também possuem em grande maioria compostos fenólicos, dentre eles C-glicosil flavonoides e proantocianidinas (COSTA; SCHENKEL; REGINATTO, 2011). E outros metabólitos também ocorrem simultaneamente em *C. pachystachya*, *C. glaziovii* e *C. hololeuca*, como orientina, isoorientina, catequinas e epicatequinas (COSTA; SCHENKEL; REGINATTO, 2011). A distinção entre essas duas espécies pode ser feita por alguns compostos, sendo a vitexina (C-glicosil flavonoide) presente em maior quantidade em *C. glaziovii*, enquanto que isoorientina e orientina (C-glicosil flavonoides) são encontrados em *C. pachystachya* (COSTA *et al.*, 2011). O mesmo autor ainda sugere que a isovitexina pode ser utilizada como um marcador fitoquímico para *C. glaziovii*, enquanto a isoorientina pode ser usada como um marcador para *C. pachystachya*.

A identificação de metabólitos pela cromatografia, principalmente de compostos fenólicos, contribui para a identificação das espécies de *Cecropia* e na padronização dos extratos vegetais (COSTA *et al.*, 2011).

Figura 13 - Análises de FSE das folhas de *Cecropia pachystachya* por CLAE-DAD-EM e EM/EM em modos de ionização negativa e positiva



Fonte: A autora

Nota: (\*picos não pertencentes à amostra).

## 5.2.2 Avaliação de segurança

### 5.2.2.1 Estudo da toxicidade aguda

Na avaliação da toxicidade aguda, nenhum animal morreu durante os 15 dias de experimento. O screening hipocrático segundo o método descrito por Malone e Robichaud (1962), indica o grau da intensidade dos efeitos comportamentais através de uma escala que varia entre 0-3: 0 (sem efeito), 1 (efeito diminuído), 2 (efeito presente) e 3 (efeito intenso). Os animais tratados com FSE demonstraram algumas mudanças no comportamento, entretanto estas reações foram consideradas não significativas. Dentre os sinais comportamentais observados, evidenciamos a presença de hiperatividade (escala 2) em alguns animais durante os 14 dias de observação. Ocasionalmente, e durante as primeiras 24 h, os animais ainda manifestaram piloereção, irritabilidade, tremores, comportamento de levantar e escalar, agressividade, vocalização e autolimpeza (escala 1).

Nos animais tratados com o FSE não foram observadas quaisquer alterações quanto à ingestão de ração e água, ou no ganho de peso corpóreo quando comparado ao controle (Tabela 1). Os pesos relativos dos órgãos vitais não revelaram diferenças significativas entre o grupo controle e o grupo tratado (Tabela 1). Como complemento, as análises macroscópicas dos órgãos vitais (coração, pulmão, fígado, baço e rins) (Figura 14) e dos órgãos reprodutivos (ovários e útero) não demonstraram qualquer forma de alteração ou sinal em que resultasse em toxicidade. Além disso, não foram encontradas alterações histopatológicas nos órgãos vitais avaliados (Figura 15). Portanto, diante dos resultados obtidos com o screening hipocrático, peso relativo de órgãos, ingestão de ração e de água, e das análises patológicas (macroscópica e microscópica) de órgãos, o FSE, até a dose de 2000 mg/kg, pode ser considerado seguro.

Estudos toxicológicos com extratos de plantas são considerados essenciais para garantir a segurança em sua utilização. Como muitos fármacos, plantas medicinais também podem eventualmente causar efeitos tóxicos ou adversos (BIGLIANI *et al.*, 2010). A partir dessa premissa, realizamos uma investigação sobre o perfil toxicológico do FSE.

O atual estudo investigou a toxicidade oral aguda em ratos fêmeas (Wistar) por serem consideradas mais sensíveis que ratos machos (OECD, 2008). O experimento toxicológico aqui apresentado comprovou a ausência de toxicidade do FSE até a dose de 2000 mg/kg, além de que não foi observada morte de nenhum animal. Portanto, o FSE pode ser considerado seguro nas condições experimentais utilizadas nesse estudo, ou seja, em ratos. Consolini e Migliori (2005) também não encontraram toxicidade em extratos metanólicos de *C. pachystachya*. Porém, um estudo com extratos aquosos numa dose de 0,76 g/kg mostrou alteração no padrão alimentar, nos pesos corporais e na morfologia dos órgãos de camundongos, contudo não promoveu toxicidade em fluido broncoalveolar (COSTA; SCHENKEL; REGINATTO, 2011).

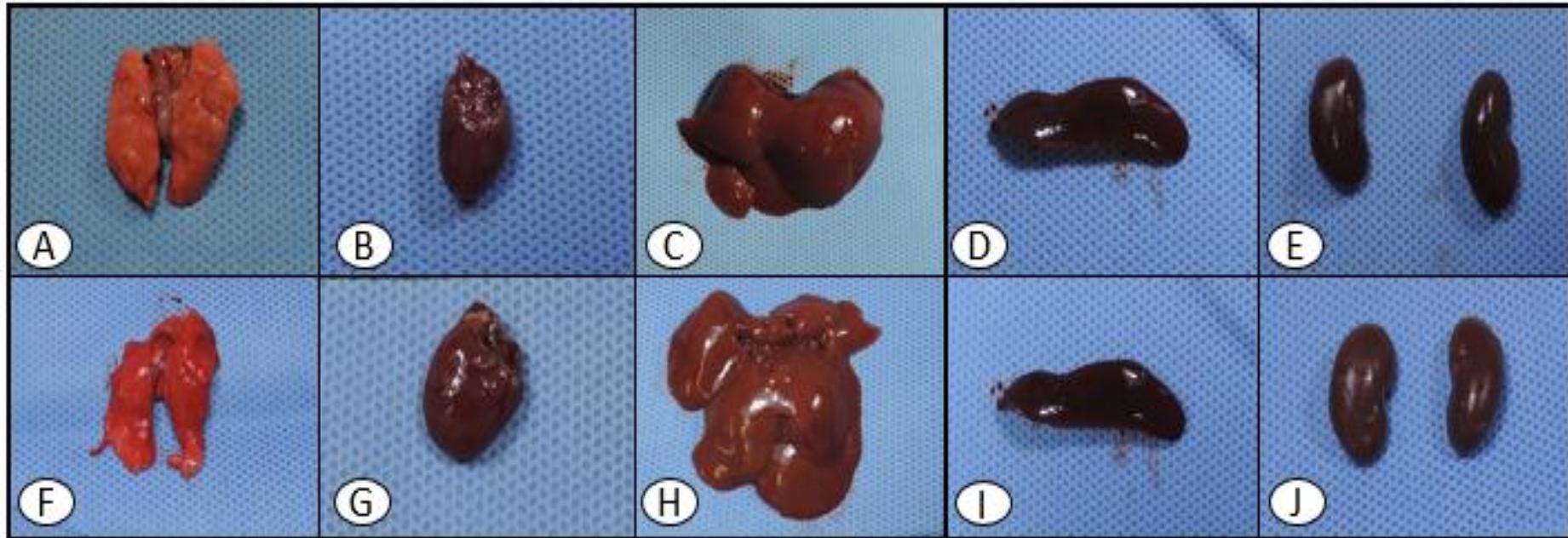
Tabela 1 - Efeito da fração solúvel em etanol (FSE) de *Cecropia pachystachya* sobre o peso corporal (g) inicial, final e relativo (%) de cada órgão após 15 dias de exposição

<b>Parâmetro</b>	<b>Controle</b>	<b>FSE 2000 mg/kg</b>
<i>Peso inicial (g)</i>	253,60 ± 6,94	255,60 ± 9,23
<i>Peso final (g)</i>	254,40 ± 6,65	249,20 ± 7,94
<b>Peso relativo de cada órgão</b>		
<i>Coração (g/100g pc)</i>	0,26 ± 0,00	0,26 ± 0,01
<i>Pulmão (g/100g pc)</i>	0,46 ± 0,01	0,44 ± 0,01
<i>Fígado (g/100g pc)</i>	3,33 ± 0,23	3,18 ± 0,11
<i>Baço (g/100g pc)</i>	0,21 ± 0,02	0,19 ± 0,01
<i>Rim direito (g/100g pc)</i>	0,34 ± 0,01	0,34 ± 0,01
<i>Rim esquerdo (g/100g pc)</i>	0,33 ± 0,01	0,33 ± 0,00
<i>Ovário direito (g/100g pc)</i>	0,02 ± 0,00	0,02 ± 0,00
<i>Ovário esquerdo (g/100g pc)</i>	0,02 ± 0,00	0,02 ± 0,00
<i>Útero (g/100g pc)</i>	0,28 ± 0,03	0,24 ± 0,03

Fonte: A autora

Nota: Análises estatísticas foram feitas utilizando o teste t-Student's. Valores são expressos como a média ± E.P.M ( $n = 5$ ) em comparação ao grupo controle ( $\alpha: p \leq 0,05$ ). Índice do peso de cada órgão (%) = (peso do órgão x 100) / peso corporal.

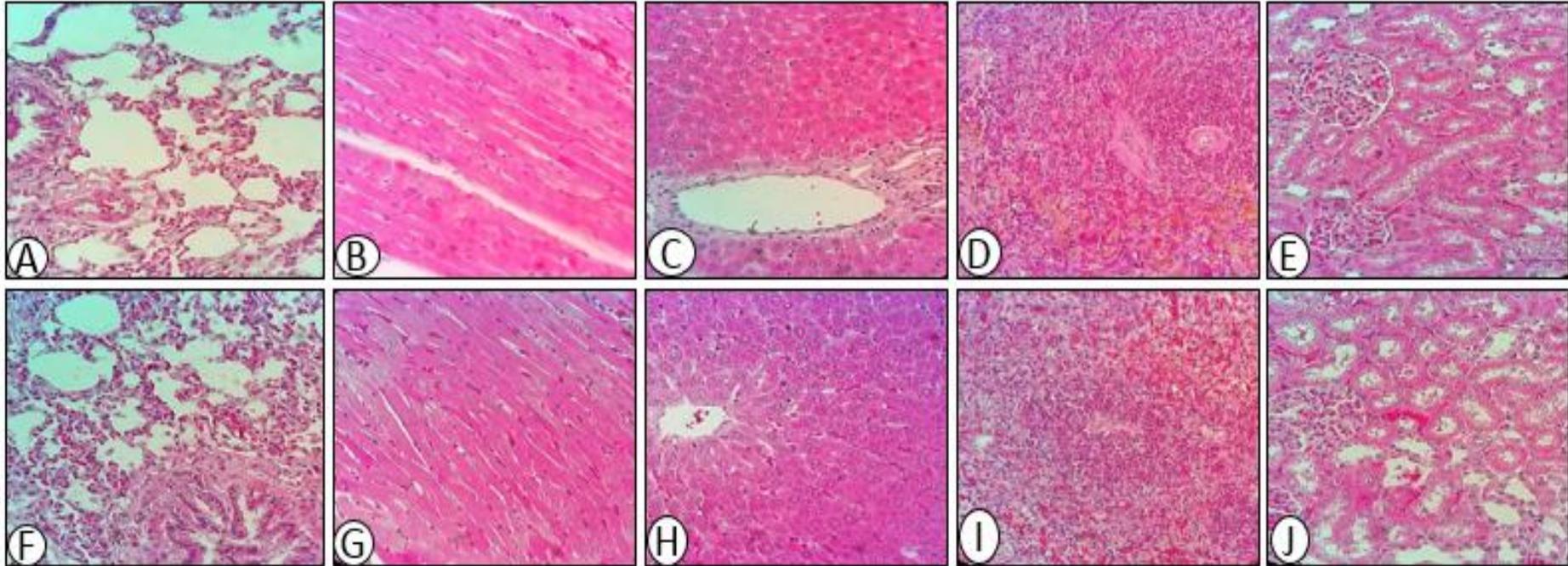
Figura 14 – Fotomacrógrafos do pulmão, coração, fígado, baço e rim de ratos fêmeas tratadas com o veículo (controle) ou maior dosagem de FSE (2000 mg/kg)



Fonte: A autora

Legenda: [A-E: órgãos dos grupos controles; F-J: órgãos dos grupos tratados com FSE]. A, F: pulmão. B, G: coração. C, H: fígado. D, I: baço. E, J: rim.

Figura 15 – Avaliação histopatológica do pulmão, coração, fígado, baço e rim de ratos fêmeas oralmente tratadas com o veículo (controle) ou com a maior dosagem de FSE (2000 mg/kg)



Fonte: A autora

Legenda: Dupla coloração com hematoxilina e eosina (40 X). [A-E: órgãos dos grupos controle; F-J: órgãos dos grupos tratados com FSE]. A, F: pulmão. B, G: coração. C, H: fígado. D, I: baço. E, J: rim.

### 5.2.3 Efeitos diuréticos

#### 5.2.3.1 Estudo da atividade diurética aguda

No volume urinário não foi observado aumento significativo em diferentes doses (30, 100 e 300 mg/kg) de FSE em amostras de 4h (Tabela 2). No entanto, as amostras de 8h revelaram um aumento da diurese para os grupos tratados com FSE em todas as doses (30, 100 e 300 mg/kg) (Tabela 2). Portanto, a avaliação diurética dos extratos aquosos demonstrou ausência de efeitos diuréticos na diurese aguda de 4h em grupos tratados com FSE. No entanto, ocorreu aumento significativo da diurese de 8h em todas as doses de FSE (30, 100 e 300 mg/kg), comprovando a atividade diurética dos extratos aquosos de *C. pachystachya*, sendo assim, a menor dose já corresponde tal atividade. Dentre os grupos tratados com HCTZ foi observado aumento da diurese nas amostras de 4h e 8h, condizendo com a atividade deste fármaco (Tabela 2). Além de FSE induzir um aumento da diurese aguda de 8h em todas as doses (30, 100 e 300 mg/kg), houve uma alteração significativa dos valores de pH em 8h, do qual resultou num pH mais baixo (ácido) em comparação às amostras do grupo controle, para cada dose (Tabela 2). Da mesma forma, ocorreu para o grupo tratado com HCTZ, na diurese de 8 h.

Dentre os resultados obtidos da análise da densidade, somente foram revelados valores significativos para as amostras de 8h, dos grupos tratados com FSE em todas as doses (30, 100 e 300 mg/kg) (Tabela 2).

Tabela 2 - Efeito do tratamento com a fração solúvel em etanol (FSE) de *Cecropia pachystachya* sobre o volume urinário, pH e densidade em 4 e 8 horas das amostras urinárias

<b>Grupo</b>	<b>Volume urinário (mL/100g/4h)</b>	<b>Volume urinário (mL/100g/8h)</b>	<b>pH (4h)</b>	<b>pH (8h)</b>	<b>Densidade (4h)</b>	<b>Densidade (8h)</b>
<i>Controle</i>	3,03 ± 0,09	3,82 ± 0,09	7,50 ± 0,05	7,97 ± 0,13	1010,7 ± 0,73	1036,7 ± 1,81
<i>HCTZ (25 mg/kg)</i>	5,14 ± 0,32 <sup>a</sup>	6,19 ± 0,32 <sup>a</sup>	7,70 ± 0,12	7,20 ± 0,10 <sup>a</sup>	1012,0 ± 0,00	1039,0 ± 0,50
<i>FSE (30 mg/kg)</i>	3,47 ± 0,19	4,62 ± 0,27 <sup>a</sup>	7,60 ± 0,03	6,40 ± 0,08 <sup>a</sup>	1010,0 ± 0,54	1020,7 ± 1,45 <sup>a</sup>
<i>FSE (100 mg/kg)</i>	3,40 ± 0,17	5,01 ± 0,13 <sup>a</sup>	7,60 ± 0,14	6,97 ± 0,25 <sup>a</sup>	1009,3 ± 0,36	1017,3 ± 0,36 <sup>a</sup>
<i>FSE (300 mg/kg)</i>	3,09 ± 0,19	5,67 ± 0,21 <sup>a</sup>	7,70 ± 0,05	6,77 ± 0,20 <sup>a</sup>	1010,7 ± 0,73	1022,0 ± 2,18 <sup>a</sup>

Fonte: A autora

Nota: Para os tratamentos com FSE, análises estatísticas foram feitas utilizando one-way ANOVA seguido do teste de Dunnett's. Tratamentos com HCTZ foram comparados com o grupo controle utilizando o teste t- Student's. Os valores são expressos como a média ± E.P.M ( $n = 6$ ). <sup>a</sup> $p \leq 0,05$  quando comparado com o grupo controle.

Em relação à excreção dos eletrólitos  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  e  $\text{Cl}^-$  das amostras urinárias de 4h e de 8h, em decorrência dos animais tratados com FSE, ocorreu somente um aumento da excreção de íons  $\text{Cl}^-$  para a dose de 300 mg/kg em 8h, quando comparado ao controle (Tabela 3).

A análise da presença de eletrólitos em amostras urinárias, para os grupos tratados com HCTZ, houve um aumento significativo na eliminação de  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  e  $\text{Cl}^-$  em amostras de 4h. Entretanto, somente não foi identificado um aumento significativo da excreção de íons  $\text{K}^+$ , em amostras de 8h. A eliminação de eletrólitos ou alterações nas concentrações dos níveis de eletrólitos são características que ocorrem normalmente em fármacos tiazídicos, como é o caso da HCTZ (ALMEIDA *et al.*, 2017).

Consolini e Migliori (2005) já efetuaram estudos cardiotônicos e diuréticos com extratos aquosos em um modelo comparativo entre plantas coletadas de regiões montanhosas de clima temperado e de plantas oriundas de região neotropical, na Argentina. Diante disso, os autores não identificaram atividade diurética em doses orais de 300 mg/kg e 600 mg/kg de extratos aquosos de *C. pachystachya* das duas regiões estudadas, em ratos fêmeas. É importante destacar ainda que a variação hormonal existente em indivíduos do sexo feminino pode influenciar na atividade diurética ou cardiovascular.

Apesar disso, não há na literatura estudos realizados que avaliassem e detalhassem a efetividade da diurese, em um modelo de estudo de atividade aguda ou prolongada, principalmente feito em ratos machos. Portanto, o presente trabalho detalha a atividade diurética dos extratos aquosos de *C. pachystachya* proposta pela primeira vez. Além do mais, estudos já foram realizados na comprovação dos efeitos anti-inflamatórios, hipotensor, sedativo, hipoglicemiante (ARAGÃO *et al.*, 2010) e antinociceptivo (ZANCARO *et al.*, 2005) de *C. pachystachya*.

Dados da literatura apontam que extratos de *C. pachystachya* demonstraram a atividade diurética através da inibição da enzima conversora de angiotensina (ECA) num estudo *in vitro*, sendo que esse mecanismo ocorre devido à um possível sinergismo entre alguns metabólitos secundários, como C-glucosil flavonoides e proantocianidinas (COSTA; SCHENKEL; REGINATTO, 2011). Entretanto, no modelo experimental do atual estudo realizado, não pode ser confirmada essa afirmação. E

diante disso, possivelmente estudos posteriores deveriam ser realizados para detectar com precisão o mecanismo de ação farmacológico em prol da atividade diurética.

O mesmo autor ainda cita que *Cecropia glaziovii* também possui atividade diurética em consequência da mesma inibição da ECA, no entanto, trabalhos demonstraram que uma administração única do extrato aquoso de *C. glaziovii* não alterou o processo diurético.

#### 5.2.3.2 Estudo da atividade diurética prolongada

O tratamento prolongado de FSE (30, 100 e 300 mg/kg) não mostrou aumento significativo da diurese durante os sete dias de tratamento (Tabela 4). Entretanto, foi observado aumento significativo da diurese no 1º dia (24 h após o início do tratamento) para as doses de (100 e 300 mg/kg) de FSE e no 3º dia (48 h após o início do tratamento) para a dose de 300 mg/kg de FSE, quando comparados ao controle (Tabela 4). A excreção de eletrólitos nas amostras de urina após o período de sete dias mostrou valores significativos somente para HCTZ. Entretanto, a excreção dos eletrólitos para FSE aumentou apenas no 5º dia e em todas as doses (30, 100 e 300 mg/kg), quando comparado ao grupo controle. E no 3º dia, ocorreu somente aumento da excreção dos eletrólitos ( $\text{Na}^+$  e  $\text{K}^+$ ) para HCTZ (Tabela 4).

A análise do pH (Tabela 5) revelou uma redução significativa nos valores para a diurese prolongada no 1º dia para HCTZ e FSE (30, 100 e 300 mg/kg). No entanto, ocorreu uma redução do pH no 3º dia, somente em HCTZ e um aumento do valor para FSE (300 mg/kg) no 7º dia. No 5º dia não houve alteração significativa para o pH. E a análise da densidade (Tabela 5), uma redução foi observada para esse parâmetro no 1º dia para HCTZ e FSE (30, 100 e 300 mg/kg). No 5º dia, somente FSE (300 mg/kg) demonstrou um aumento significativo da densidade. E no 7º dia, não foram observadas alterações significativas para os valores.

Quanto aos resultados da diurese prolongada em um estudo feito por sete dias, a diurese durante esse período, não foi evidente para *C. pachystachya*, entretanto quanto a análise da diurese de maneira isolada, a diurese aguda de 8 h mostrou-se efetiva. Esse estudo da diurese prolongada está sendo descrito pela primeira vez para essa espécie medicinal.

Tabela 3 - Efeito agudo da administração oral da fração solúvel em etanol (FSE) de *Cecropia pachystachya* sobre a excreção urinária de eletrólitos em 4 e 8 horas

Grupo	El <sub>Na+</sub> (μEq/min/100g)	El <sub>K+</sub> (μEq/min/100g)	El <sub>Cl-</sub> (μEq/min/100g)	Índice salurético <sup>b</sup>		
				Na <sup>+</sup>	K <sup>+</sup>	Cl <sup>-</sup>
<b>Urina 4 horas</b>						
Controle	0,82 ± 0,03	1,09 ± 0,03	1,44 ± 0,04	-	-	-
HCTZ (25 mg/kg)	3,21 ± 0,22 <sup>a</sup>	1,34 ± 0,04 <sup>a</sup>	4,21 ± 0,21 <sup>a</sup>	3,91	1,23	2,92
FSE (30 mg/kg)	0,88 ± 0,04	1,10 ± 0,05	1,74 ± 0,11	1,07	1,01	1,21
FSE (100 mg/kg)	0,81 ± 0,02	1,04 ± 0,03	1,77 ± 0,11	0,99	0,95	1,23
FSE (300 mg/kg)	0,76 ± 0,03	0,97 ± 0,05	1,58 ± 0,11	0,93	0,89	1,10
<b>Urina 8 horas</b>						
Controle	0,56 ± 0,01	0,75 ± 0,10	0,86 ± 0,03	-	-	-
HCTZ (25 mg/kg)	2,03 ± 0,10 <sup>a</sup>	0,58 ± 0,15	2,21 ± 0,11 <sup>a</sup>	3,62	0,77	2,57
FSE (30 mg/kg)	0,61 ± 0,07	0,74 ± 0,04	1,16 ± 0,07	1,09	0,99	1,35
FSE (100 mg/kg)	0,58 ± 0,04	0,78 ± 0,06	1,31 ± 0,12	1,04	1,04	1,52
FSE (300 mg/kg)	0,71 ± 0,04	0,93 ± 0,04	1,47 ± 0,17 <sup>a</sup>	1,27	1,24	1,71

Fonte: A autora

Nota: Para tratamentos com FSE, análises estatísticas foram feitas utilizando one-way ANOVA seguido do teste de Dunnett's. Tratamentos com HCTZ foram comparados com o controle utilizando teste t-Student's. Valores são expressos como a média ± E.P.M. ( $n = 6$ ). <sup>a</sup>  $p \leq 0,05$  quando comparado com o grupo controle. <sup>b</sup>Índice salurético = mmol/L grupo problema/mmol/L grupo controle. El: Excreted load (carga excretada); HCTZ: hidroclorotiazida.

Tabela 4 - Efeitos da prolongada administração oral da fração solúvel em etanol (FSE) obtida de *Cecropia pachystachya* sobre a urina cumulativa e excreção de Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> e Cl<sup>-</sup>

(continua)

Grupo	Urina cumulativa Volume (mL/100g)	El <sub>Na+</sub> (μEq/min/100g)	El <sub>K+</sub> (μEq/min/100g)	El <sub>Cl-</sub> (μEq/min/100g)
<b>Dia 1</b>				
Controle	8,00 ± 0,31	0,65 ± 0,02	0,90 ± 0,02	1,58 ± 0,13
HCTZ (25 mg/kg)	12,03 ± 0,25 <sup>a</sup>	0,90 ± 0,19	1,12 ± 0,20	1,22 ± 0,25
FSE (30 mg/kg)	9,76 ± 0,21	0,60 ± 0,04	0,46 ± 0,04	0,93 ± 0,15
FSE (100 mg/kg)	10,35 ± 0,15 <sup>a</sup>	0,55 ± 0,03	0,43 ± 0,03	0,78 ± 0,13
FSE (300 mg/kg)	11,58 ± 0,21 <sup>a</sup>	0,65 ± 0,07	0,53 ± 0,06	0,84 ± 0,10
<b>Dia 3</b>				
Controle	15,54 ± 0,66	1,88 ± 0,05	2,58 ± 0,05	4,42 ± 0,10
HCTZ (25 mg/kg)	20,83 ± 0,98 <sup>a</sup>	3,20 ± 0,11 <sup>a</sup>	4,34 ± 0,32	4,90 ± 0,23
FSE (30 mg/kg)	16,16 ± 0,18	2,12 ± 0,05	2,00 ± 0,06	3,71 ± 0,07
FSE (100 mg/kg)	16,88 ± 1,08	1,90 ± 0,04	0,43 ± 0,04	3,11 ± 0,08
FSE (300 mg/kg)	19,58 ± 0,11 <sup>a</sup>	2,30 ± 0,19	2,74 ± 0,28	3,52 ± 0,33
<b>Dia 5</b>				
Controle	23,23 ± 0,72	1,52 ± 0,12	2,00 ± 0,10	3,53 ± 0,19
HCTZ (25 mg/kg)	29,67 ± 1,60 <sup>a</sup>	6,47 ± 0,40 <sup>a</sup>	9,14 ± 0,54 <sup>a</sup>	10,81 ± 0,42 <sup>a</sup>

Tabela 4 - Efeitos da prolongada administração oral da fração solúvel em etanol (FSE) obtida de *Cecropia pachystachya* sobre a urina cumulativa e excreção de Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> e Cl<sup>-</sup>

(conclusão)

Grupo	Urina cumulativa Volume (mL/100g)	El <sub>Na+</sub> (μEq/min/100g)	El <sub>K+</sub> (μEq/min/100g)	El <sub>Cl-</sub> (μEq/min/100g)
<b>Dia 5</b>				
<i>FSE (30 mg/kg)</i>	22,71 ± 0,32	4,25 ± 0,10 <sup>a</sup>	4,75 ± 0,04 <sup>a</sup>	7,82 ± 0,12 <sup>a</sup>
<i>FSE (100 mg/kg)</i>	24,04 ± 1,40	4,07 ± 0,10 <sup>a</sup>	4,50 ± 0,07 <sup>a</sup>	6,92 ± 0,11 <sup>a</sup>
<i>FSE (300 mg/kg)</i>	25,19 ± 0,40	4,66 ± 0,20 <sup>a</sup>	5,63 ± 0,28 <sup>a</sup>	7,82 ± 0,19 <sup>a</sup>
<b>Dia 7</b>				
<i>Controle</i>	30,39 ± 0,67	6,32 ± 0,29	8,19 ± 0,19	14,94 ± 0,32
<i>HCTZ (25 mg/kg)</i>	39,04 ± 2,62 <sup>a</sup>	10,87 ± 0,56 <sup>a</sup>	15,80 ± 0,79 <sup>a</sup>	18,66 ± 0,44 <sup>a</sup>
<i>FSE (30 mg/kg)</i>	28,91 ± 0,46	6,84 ± 0,11	7,56 ± 0,06	12,89 ± 0,22
<i>FSE (100 mg/kg)</i>	32,79 ± 1,57	6,63 ± 0,12	7,27 ± 0,07	11,10 ± 0,10
<i>FSE (300 mg/kg)</i>	30,88 ± 0,38	7,24 ± 0,26	8,69 ± 0,24	13,51 ± 0,29

Fonte: A autora

Nota: Para os tratamentos com FSE, análises estatísticas foram feitas usando one-way ANOVA seguido do teste de Dunnett's. Tratamentos com HCTZ foram comparados com o grupo controle usando o teste t-Student's. Valores são expressos como a média ± E.P.M. ( $n = 6$ ). <sup>a</sup> $p \leq 0,05$  quando comparado com o grupo controle. El: Excreted load (carga excretada); HCTZ: hidroclorotiazida.

Tabela 5 - Efeitos da prolongada administração oral da fração solúvel em etanol (FSE) de *Cecropia pachystachya* sobre pH e densidade

(continua)

<b>Grupo</b>	<b>pH</b>	<b>Densidade</b>
<b>Dia 1</b>		
<i>Controle</i>	8,13 ± 0,05	1031,3 ± 1,27
<i>HCTZ (25 mg/kg)</i>	7,70 ± 0,04 <sup>a</sup>	1024,0 ± 1,00 <sup>a</sup>
<i>FSE (30 mg/kg)</i>	7,34 ± 0,04 <sup>a</sup>	1015,3 ± 1,27 <sup>a</sup>
<i>FSE (100 mg/kg)</i>	7,63 ± 0,05 <sup>a</sup>	1014,7 ± 1,45 <sup>a</sup>
<i>FSE (300 mg/kg)</i>	7,53 ± 0,02 <sup>a</sup>	1014,0 ± 1,09 <sup>a</sup>
<b>Dia 3</b>		
<i>Controle</i>	7,67 ± 0,02	1027,3 ± 0,73
<i>HCTZ (25 mg/kg)</i>	7,45 ± 0,02 <sup>a</sup>	1027,0 ± 0,50
<i>FSE (30 mg/kg)</i>	7,77 ± 0,02	1028,7 ± 0,36
<i>FSE (100 mg/kg)</i>	7,77 ± 0,02	1024,7 ± 0,91
<i>FSE (300 mg/kg)</i>	7,57 ± 0,05	1030,0 ± 1,63
<b>Dia 5</b>		
<i>Controle</i>	7,77 ± 0,06	1027,3 ± 0,73
<i>HCTZ (25 mg/kg)</i>	8,05 ± 0,14	1025,0 ± 0,50

Tabela 5 - Efeitos da prolongada administração oral da fração solúvel em etanol (FSE) de *Cecropia pachystachya* sobre pH e densidade

(conclusão)

Grupo	pH	Densidade
<b>Dia 5</b>		
<i>FSE (30 mg/kg)</i>	8,00 ± 0,05	1030,7 ± 0,73
<i>FSE (100 mg/kg)</i>	8,00 ± 0,05	1031,3 ± 1,45
<i>FSE (300 mg/kg)</i>	7,90 ± 0,11	1032,7 ± 0,91
<b>Dia 7</b>		
<i>Controle</i>	7,90 ± 0,05	1028,7 ± 0,91
<i>HCTZ (25 mg/kg)</i>	7,85 ± 0,02	1027,0 ± 2,50
<i>FSE (30 mg/kg)</i>	8,13 ± 0,15	1027,3 ± 0,91
<i>FSE (100 mg/kg)</i>	7,83 ± 0,05	1026,0 ± 1,63
<i>FSE (300 mg/kg)</i>	8,30 ± 0,05 <sup>a</sup>	1025,3 ± 0,73

Fonte: A autora

Nota: Para os tratamentos com FSE, análises estatísticas foram feitas usando one-way ANOVA seguido do teste de Dunnett's. Tratamentos com HCTZ foram comparados com o grupo controle usando o teste t- Student's. Valores são expressos como a média ± E.P.M. ( $n = 6$ ). <sup>a</sup>  $p \leq 0,05$  quando comparado com o grupo controle. HCTZ: hidroclorotiazida.

#### 5.2.4 Avaliação da atividade antioxidante

O estresse oxidativo é um processo ocasionado pelo desequilíbrio no sistema endógeno antioxidante do organismo humano, que possui dificuldades na eliminação de radicais livres e espécies reativas de oxigênio. O acúmulo desses radicais no organismo é um fator primordial para causar inúmeras doenças como: doença de Alzheimer, colite ulcerativa, câncer e doenças cardiovasculares (CHANDA; DAVE, 2009).

Dentre as espécies reativas de oxigênio, estão os ânions superóxidos, peróxido de hidrogênio, além de que o processo de peroxidação lipídica ocasionado pelos radicais livres, resulta na acumulação de lipoperóxidos. Para reduzir esses efeitos ocasionados, algumas enzimas tais como superóxido dismutase e catalase, agem sobre os íons ou produtos, reduzindo os níveis de ânions superóxidos e peróxido de hidrogênio, respectivamente (CHANDA; DAVE, 2009).

Nesse contexto, a atividade da enzima superóxido dismutase (SOD) em todos os grupos tratados com FSE (30, 100 e 300 mg/kg) apresentou valores significativamente inferiores quando comparados ao grupo controle ou com a HCTZ. De forma semelhante, a atividade da SOD no grupo HCTZ foi significativamente diferente da apresentada nos animais tratados apenas com o veículo. Ainda para o tecido renal, a atividade da catalase (CAT) foi estatisticamente superior (em todas as doses do FSE) em comparação ao grupo controle. Entretanto, o conteúdo de lipoperóxidos (LPO) não foi considerado estatisticamente significativo quando comparado entre os diferentes grupos experimentais (Tabela 6).

No tecido cardíaco, a atividade da enzima SOD em todos os grupos tratados com FSE (30, 100 e 300 mg/kg) foi significativamente inferior ao grupo controle e ao grupo tratado com HCTZ. Da mesma maneira, foi constatada a diferença significativa para a atividade da enzima SOD no grupo HCTZ quando comparado ao controle.

Entre os grupos tratados, a análise da atividade da enzima CAT no tecido cardíaco revelou somente aumento significativo do valor para FSE (30 mg/kg). Além de que, da mesma forma, o grupo controle positivo obteve um aumento significativo da atividade enzimática, em comparação ao grupo controle negativo. E a análise do conteúdo de LPO, somente foi observado um valor estatístico inferior para FSE (100 mg/kg), em relação ao grupo controle e ao grupo com HCTZ (Tabela 6).

Portanto, o presente trabalho identificou no tecido renal, aumento expressivo da atividade enzimática da catalase em todos os grupos tratados com FSE (30, 100 e 300 mg/kg). No entanto, para os demais parâmetros, foi identificada atividade expressiva de CAT somente em FSE (30 mg/kg) no tecido cardíaco.

Diante disso, a catalase é responsável pela degradação de peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), e esta atividade pode ser explicada pela ação de alguns metabólitos secundários, como taninos e compostos fenólicos, sendo presentes em extratos aquosos de *C. pachystachya*, segundo o estudo de Mendonça *et al.* (2016). Gazal *et al.* (2014) também demonstrou a efetividade antioxidante dos extratos aquosos de *C. pachystachya*, em uma dose de 200 mg/kg.

A atividade antioxidante dos extratos metanólicos de *C. pachystachya* foi comprovada em outros estudos como o de Aragão *et al.* (2010), Costa; Schenkel e Reginatto (2011) e Velázquez *et al.* (2003). Costa; Schenkel e Reginatto (2011) e Velázquez *et al.* (2003) mostraram inibição da peroxidação lipídica, além da ação de SOD em capturar ânions superóxidos identificada por Velázquez *et al.* (2003).

A atividade antioxidante comprovada neste estudo, é confirmada pela presença de metabólitos secundários, principalmente dos compostos fenólicos, como flavonoides e polifenóis (ARAGÃO *et al.*, 2010; GAZAL *et al.*, 2014). Glicosil flavonoides (subclasse dos flavonoides) e altas concentrações de ácido clorogênico, orientina e isoorientina são outros metabólitos responsáveis pela ação antioxidante e estão presentes em extratos de *C. pachystachya* (MENDONÇA *et al.*, 2016; PACHECO *et al.*, 2014). Ácido clorogênico e compostos fenólicos foram identificados através do estudo fitoquímico com FSE no atual trabalho, demonstrando desta forma a relação da atividade antioxidante de *C. pachystachya*.

Tabela 6 - Efeitos da administração oral de FSE de *Cecropia pachystachya* sobre o estado redox tecidual

Parâmetro	Controle	HCTZ 25 mg/kg	FSE 30 mg/kg	FSE 100 mg/kg	FSE 300 mg/kg
<b>Rim</b>					
SOD	1360,69 ± 87,16	652,77 ± 40,59 <sup>a</sup>	195,77 ± 4,88 <sup>ab</sup>	196,30 ± 3,83 <sup>ab</sup>	121,14 ± 4,34 <sup>ab</sup>
CAT	2,09 ± 0,19	3,02 ± 0,35	5,28 ± 0,24 <sup>a</sup>	4,76 ± 0,23 <sup>a</sup>	4,78 ± 0,14 <sup>a</sup>
LPO	130,42 ± 15,74	91,80 ± 18,68	161,15 ± 17,33	184,51 ± 28,79	184,07 ± 21,95
<b>Coração</b>					
SOD	1765,86 ± 77,44	571,96 ± 26,27 <sup>a</sup>	320,96 ± 24,83 <sup>a</sup>	282,87 ± 10,03 <sup>a</sup>	476,89 ± 38,14 <sup>a</sup>
CAT	2,26 ± 0,15	3,64 ± 0,28 <sup>a</sup>	3,09 ± 0,19 <sup>a</sup>	1,79 ± 0,26	2,28 ± 0,29
LPO	96,75 ± 17,20	75,68 ± 17,18	73,34 ± 20,02	12,47 ± 10,18 <sup>ab</sup>	81,38 ± 14,77

Fonte: A autora

Nota: Para os tratamentos com FSE, análises estatísticas foram feitas usando one-way ANOVA seguido do teste de Dunnett's. Tratamentos com HCTZ foram comparados com o controle ou FSE usando o teste t- Student's. Valores são expressos como a média ± E.P.M. ( $n = 6$ ). <sup>a</sup>  $p \leq 0,05$  quando comparado ao grupo controle. <sup>b</sup>  $p \leq 0,05$  quando comparado à HCTZ. HCTZ: hidroclorotiazida. SOD: Superóxido dismutase (U de SOD/mg de proteína); CAT: catalase (mmol/min/mg de proteína); LPO: lipoperóxidos (mmol hidroperóxidos/ mg de proteína).

### 5.2.5 Efeitos sobre a pressão arterial e frequência cardíaca

O tratamento prolongado com FSE (30, 100 e 300 mg/kg) não demonstrou alteração significativa para os valores da pressão arterial sistólica (SBP), pressão arterial diastólica (DBP), pressão média (MAP) e da frequência cardíaca (HR) em ratos machos normotensos (Tabela 7). Entretanto, HCTZ apresentou uma redução significativa da pressão sanguínea sistólica (SBP) quando comparada ao controle, sendo que foi registrado uma pressão sanguínea de  $111,69 \pm 2,14$  mm Hg para HCTZ e um valor de  $125,55 \pm 5,42$  mm Hg para o controle negativo (veículo) (Tabela 7).

Em estudos anteriores, como o de Consolini e Migliori (2005), efetuaram uma pesquisa com extratos aquosos e metanólicos em ratos normotensos, com o objetivo de avaliar o efeito diurético e hipotensor, em amostras de *C. pachystachya*, sendo que essas amostras eram de localidades diferentes, em que uma era da região neotropical e a outra da região temperada, na Argentina. Sendo assim, esses autores revelaram que plantas da região neotropical evidenciaram uma atividade hipotensora em doses menores que a da região temperada. Nesse caso, o extrato aquoso da região neotropical revelou atividade hipotensora na dose de 90 – 300 mg/kg, enquanto que para a região temperada, em uma dose de 180 mg/kg.

Portanto, as amostras de folhas de *C. pachystachya* adquiridas na região norte do Paraná, na cidade de Tuneiras do Oeste, não revelaram efeito hipotensor em nenhuma das doses de 30, 100 e 300 mg/kg de FSE, quanto à análise isolada das pressões arteriais. Possivelmente, a análise do efeito hipotensor avaliado diretamente em vasos sanguíneos, ocorreu devido a concentração de metabólitos secundários serem diferentes entre as espécies de *C. pachystachya*, em consequência das diferentes regiões climáticas, ressaltando que a amostra avaliada era de clima subtropical úmido.

Apesar de que, plantas maiores que cresceram em florestas de regiões tropicais e subtropicais do México e da América do Sul, demonstraram efeito hipotensor maior, do que em árvores de regiões temperadas da Argentina (CONSOLINI; MIGLIORI, 2005).

Tabela 7 - Efeito da prolongada administração oral da fração solúvel em etanol (FSE) de *Cecropia pachystachya* sobre a pressão arterial e frequência cardíaca de ratos machos Wistar

<b>Grupo</b>	<b>SBP (mm Hg)</b>	<b>DBP (mm Hg)</b>	<b>MAP (mm Hg)</b>	<b>HR (bpm)</b>
<b><i>Tratamento prolongado</i></b>				
<i>Controle</i>	125,55 ± 5,42	72,49 ± 5,53	100,43 ± 4,28	284,71 ± 7,02
<i>HCTZ (25 mg/kg)</i>	111,69 ± 2,14 <sup>a</sup>	64,52 ± 3,50	96,13 ± 5,61	329,62 ± 22,20
<i>FSE (30 mg/kg)</i>	123,20 ± 6,38	72,05 ± 4,11	97,57 ± 4,96	350,35 ± 20,90
<i>FSE (100 mg/kg)</i>	117,31 ± 2,66	76,85 ± 2,06	98,40 ± 2,26	343,59 ± 9,47
<i>FSE (300 mg/kg)</i>	127,07 ± 3,71	79,87 ± 3,50	103,74 ± 3,25	318,54 ± 21,09

Fonte: A autora

Nota: Para os tratamentos com FSE, análises estatísticas foram feitas usando one-way ANOVA seguido do teste de Dunnett's. Tratamentos com HCTZ foram comparados com o controle usando o teste t-Student's. Valores são expressos como a média ± E.P.M. ( $n = 6$ ). <sup>a</sup>  $p \leq 0.05$  quando comparado com o grupo controle. HCTZ: hidroclorotiazida.

O mecanismo de ação, principalmente dos fármacos diuréticos tiazídicos, é relacionado aos efeitos diuréticos e natriuréticos pela redução do volume extracelular. Após um período em torno de quatro a seis semanas, o volume circulante em vasos sanguíneos normaliza-se, ocorrendo uma redução vascular periférica (NOBRE *et al.*, 2010).

A vasodilatação ocasionada pela redução vascular periférica é explicada pela abertura de canais de  $K^+$  no músculo liso vascular. Diante desses conceitos, os fármacos diuréticos tiazídicos em baixas doses são indicados para o tratamento da hipertensão arterial (NOBRE *et al.*, 2010).

Com essa afirmação, possivelmente FSE não demonstrou efetividade quanto a atividade hipotensora, por não possuir ação vasodilatadora em um estudo de tratamento prolongado em até 7 dias. Entretanto, possivelmente a ação hipotensora de *C. pachystachya* pode ser afirmada em um estudo de tratamento prolongado por um período superior a 7 dias, ou até mesmo meses.

O efeito hipotensor causado para *C. pachystachya* na pesquisa de Consolini e Migliori (2005) é explicado pela relação que envolve a inervação adrenérgica dos vasos, sendo essa teoria concluída através de uma experimentação em ratos reserpinizados, em que foi induzido a hipertensão arterial com a administração do fármaco reserpina. Os autores ainda discutiram que nesse modelo de experimentação, houve um esgotamento das catecolaminas (neurotransmissores) em que não causou resposta sobre a inervação adrenérgica dos vasos, logo, não houve alteração na resistência desses vasos.

Portanto, a atividade hipotensora de *C. pachystachya* é produzida pela central inibição da inervação simpática dos vasos (CONSOLINI; MIGLIORI, 2005), sendo que com esse bloqueio, não ocorre o aumento da resistência dos vasos sanguíneos e nem aumento da força de contração cardíaca (relacionado à frequência cardíaca), resultando em uma hipotensão arterial.

*Cecropia glaziovii* também é considerada como uma espécie medicinal hipotensora, no entanto o seu mecanismo de ação é diferente em comparação à *C. pachystachya*, sendo que para *C. glaziovii* ocorre o relaxamento do músculo liso, por meio de dois mecanismos: bloqueio dos canais de cálcio (do tipo 1) no músculo liso e dos efeitos sobre  $\beta$ -2 receptores adrenérgicos (COSTA; SCHENKEL; REGINATTO,

2011). Essa atividade hipotensora de *C. glaziovii* é resultante de um período de tratamento superior a 14 dias com extratos aquosos, contudo, não houve inibição da atividade ECA (COSTA; SCHENKEL; REGINATTO, 2011). Lima-Landman *et al.* (2007) comprovou também a efetividade da atividade hipotensora dos extratos aquosos de *C. glaziovii* (0,15 g/kg), através de repetidas administrações por via oral em ratos normotensos, entretanto, em um período superior a 65 dias. Além disso, Lima-Landman *et al.* (2007) observaram que os metabólitos secundários responsáveis pela atividade hipotensora, estavam mais concentrados na fração butanólica, pelo fato de que observaram que tal atividade era desempenhada em menos tempo (35 dias), entretanto em altas doses (0,5 g/kg).

Os estudiosos também concluíram que esses compostos metabólicos possuíam mais afinidade pela porção menos polar do solvente extrator. Outras pesquisas feitas com *C. glaziovii* revelaram que o flavonoide isolado dos extratos alcoólicos, a isovitexina, é provavelmente a responsável pela ação antihipertensiva (LORENZI; MATOS, 2008).

De maneira geral, a ação hipotensora em que os extratos provenientes de estruturas vegetativas de *Cecropia*, pode ser explicada por vários mecanismos, dentre eles: bloqueio do sistema renina-angiotensina, causando a inibição da enzima conversora de angiotensina (ECA), não ocorrendo desta forma a conversão de angiotensina I em angiotensina II; bloqueio dos receptores de angiotensina (AT1), aumento na síntese de óxido nítrico (NO), mudanças no influxo de cálcio, entre outros (LIMA-LANDMAN *et al.*, 2007).

Para os níveis de frequência cardíaca, não houve mudanças significativas em que pudesse serem observados aumento ou redução da frequência cardíaca, em consequência da alteração dos níveis pressóricos. No entanto, pesquisadores como Consolini e Migliori (2005) observaram uma contradição entre os resultados de uma atividade hipotensora e da frequência cardíaca para extratos de *C. pachystachya*. Sendo assim, observaram que a *C. pachystachya* da região neotropical, com alta intensidade hipotensora, não alterou de forma significativa os níveis de frequência cardíaca. Apesar de que a planta da região temperada, com menor intensidade de efeito hipotensor, aumentou a frequência cardíaca dos ratos reserpinizados.

Ainda do estudo de Consolini e Migliori (2005), não foi comprovado efeito diurético, mesmo tendo aumento da frequência cardíaca. Com isso, foi sugerido que

esse efeito do aumento da frequência cardíaca não estimula terminações nervosas simpáticas, mas causa efeito diretamente no coração ou inibe a inervação colinérgica.

#### 5.2.6 Avaliação bioquímica

A análise do soro sanguíneo do grupo experimental após o tratamento prolongado de sete dias demonstrou mudanças significativas para FSE (30 e 100 mg/kg) e para HCTZ (Tabela 8), em alguns dos parâmetros estudados, sendo esses resultados comparados ao controle. Sendo assim, foi observado um acréscimo nos valores de ureia para FSE (30 mg/kg) e para HCTZ (25 mg/kg). Entretanto, os níveis de potássio no soro sanguíneo para o grupo controle positivo foi reduzido. Para os grupos tratados com FSE (30 e 100 mg/kg), foi identificado uma redução significativa para os níveis de aspartato aminotransferase (AST ou TGO). Enquanto que os outros parâmetros analisados como, creatinina, sódio, cloro e alanina aminotransferase (ALT ou TGP) não houveram mudanças estatísticas para os grupos tratados.

A ureia é um metabólito nitrogenado formado a partir da degradação de proteínas (proteólise) em aminoácidos no organismo e sendo excretados em maior quantidade pela urina, mas também em quantidades menores pelo trato gastrointestinal ou a pele. A biossíntese da ureia é feita no fígado, cujo nitrogênio contido nos aminoácidos é convertido em ureia, em um processo enzimático. A concentração de ureia no plasma sanguíneo é dependente do fluxo urinário e de outros fatores tais como o tipo da dieta e a taxa de produção hepática de ureia no organismo (SODRÉ; COSTA; LIMA, 2007).

Do ponto de vista clínico, a uréia está relacionada com os valores de creatinina, podendo indicar algumas patologias, dentre elas: necrose tubular dos rins, condição de privação alimentar, insuficiência hepática e outros (SODRÉ; COSTA; LIMA, 2007).

Diante desses conceitos, relacionando os valores de ureia e de creatinina para os grupos tratados com FSE e HCTZ, não houve nenhuma indicação clínica de processo patológico entre as dosagens avaliadas. Apesar de somente ter aumentado estatisticamente o valor de FSE (30 mg/kg) e HCTZ (25 mg/kg) para ureia quando comparado ao controle, não é um dado significativo, pois os valores de creatinina não houve qualquer alteração. O aspecto de ter aumentado os valores entre os grupos

tratados em questão, pode ter relação com a dieta ou o processo de metabolismo hepático dos animais.

Outro parâmetro bioquímico analisado estão os níveis de potássio presentes no soro sanguíneo, em que foi observado somente uma redução significativa da concentração desse eletrólito em ratos tratados com HCTZ. A redução da concentração de potássio no soro condiz com o efeito adverso proporcionado pelo HCTZ, em que aumenta a excreção de  $K^+$  podendo ocorrer um processo denominado de hipocalemia. Entretanto, esse efeito adverso não compromete os benefícios trazidos pelo medicamento em reduzir os riscos cardiovasculares (MOREIRA; CIPULLO; VILELA-MARTIN, 2013).

E a análise da enzima aspartato aminotransferase (AST ou TGO) ocorreu uma redução significativa para os grupos tratados com ESCP (30 e 100 mg/kg). Essa enzima e alanina aminotransferase (ALT ou TGP) são considerados marcadores bioquímicos para lesão tecidual, principalmente no fígado, quando os níveis estiverem altos (HARAGUCHI *et al.*, 2009). Com esse conceito, dentre os grupos analisados no atual trabalho, a análise dos níveis de ALT e AST não sofreram alterações consideráveis, portanto não houve indicativo de lesão hepática.

Tabela 8 - Efeitos da prolongada administração oral da fração solúvel em etanol (FSE) de *Cecropia pachystachya* sobre os parâmetros bioquímicos de ratos machos Wistar após sete dias de tratamento

Parâmetros	Controle	FSE	FSE	FSE	HCTZ
		30 mg/kg	100 mg/kg	300 mg/kg	25 mg/kg
Ureia (mg/dL)	38,68 ± 0,68	48,35 ± 1,53 <sup>a</sup>	42,52 ± 1,34	44,45 ± 1,05	45,23 ± 2,13 <sup>a</sup>
Creatinina (mg/dL)	0,28 ± 0,01	0,31 ± 0,01	0,26 ± 0,02	0,27 ± 0,01	0,27 ± 0,01
Sódio (mmol/L)	119,63 ± 1,44	117,38 ± 1,81	116,70 ± 2,48	117,73 ± 0,89	115,50 ± 0,92
Potássio (mmol/L)	4,98 ± 0,21	4,92 ± 0,14	4,47 ± 0,17	4,53 ± 0,11	3,77 ± 0,18 <sup>a</sup>
Cloro (mmol/L)	90,90 ± 0,91	89,97 ± 1,55	89,93 ± 1,62	90,05 ± 0,63	87,23 ± 0,60
AST (U/L)	179,37 ± 14,37	90,17 ± 7,39 <sup>a</sup>	90,52 ± 6,95 <sup>a</sup>	131,82 ± 17,45	107,77 ± 15,76
ALT (U/L)	38,33 ± 2,07	42,62 ± 4,21	30,78 ± 2,37	40,90 ± 4,68	33,80 ± 2,89

Fonte: A autora

Nota: Para os tratamentos com FSE, análises estatísticas foram feitas usando one-way ANOVA seguido do teste de Dunnett's. Tratamentos com HCTZ foram comparados com o controle usando o teste t- Student's. Valores são expressos como a média ± E.P.M. ( $n = 6$ ). <sup>a</sup>  $p \leq 0,05$  quando comparado com o grupo controle. HCTZ: hidroclorotiazida.

### 5.3 INVESTIGAÇÃO DOS EFEITOS VASODILADORES DO FSE EM LEITO MESENTÉRICO ISOLADO E PERFUNDIDO

O FSE administrado no grupo experimental não revelou em nenhuma das doses (30, 100 e 300 mg/kg) a capacidade em alterar a resistência vascular do leito mesentérico (dados não mostraram).

Poucos autores estudaram a pressão de perfusão em ratos administrados com extratos de *C. pachystachya*. Consolini e Migliori (2005) avaliaram o efeito hipotensor através da medição direta da vasodilatação, por meio da inibição do sistema simpático. Os resultados obtidos por esses autores mostraram que em um estudo feito em leito muscular esquelético de ratos, onde *C. pachystachya* originária da região neotropical foi a que obteve melhor atividade hipotensora em relação à planta da região temperada, sendo que foi registrado uma pressão basal de  $93,0 \pm 7,1$  mmHg ( $n = 8$ ). Entretanto, esses autores não registraram mudanças significativas em concentrações entre 0,15 e 20 mg de liofilizado para 100 mL. Portanto, os autores concluíram que houve ausência de efeitos vasodilatadores em um estudo de leito muscular esquelético de ratos, sugerindo que a atividade hipotensora não está relacionada diretamente à vasodilatação dos vasos sanguíneos.

## 6 CONCLUSÃO

As principais características encontradas para a espécie medicinal *Cecropia pachystachya* nesse estudo, auxiliam e garantem a identificação correta desta droga vegetal, frente à tantas outras espécies denominadas como “embaúba”, como forma de garantir o controle da qualidade de *C. pachystachya* e fornecer aos usuários segurança quanto ao consumo de extratos ou derivados desta espécie. Com isso, dentre os principais parâmetros encontrados que caracterizam a droga vegetal são: mesofilo dorsiventral e hipostomática, estômatos anomocíticos, tricomas cônicos, tricomas tectores unicelulares e pluricelulares, tricomas filariformes contorcidos, diferenças quanto a organização dos feixes vasculares entre a nervura medial do lobo maior e do lobo menor, células mucilaginosas na nervura, pecíolo arredondado com duas séries de 14 feixes colaterais e células mucilaginosas.

A análise histoquímica revelou compostos fenólicos no mesofilo e no pecíolo, estruturas lignificadas no xilema e em fibras próximas ao xilema, poucos grãos-de-amido dispersos pela nervura e pelo pecíolo e mucilagem no córtex e na medula do pecíolo.

O estudo fitoquímico identificou ácidos fenólicos e flavonoides em *C. pachystachya*, sendo eles: ácido quínico, ácido hexônico, ácido cítrico, ácido 5-O-E-caffeoil quínico, dímero de procianidina, C-hexosil C-pentosil luteolina, C-hexosil luteolina, C-hexosil apigenina, C-hexosil O-pentosil apigenina, O-deoxihexosil-hexosil quercetina e O-hexosil quercetina.

E o estudo etnofarmacológico provou a efetividade do ESCP das folhas de *C. pachystachya* quanto a ação diurética, principalmente para a diurese aguda de 8 h, em todas as doses de FSE (30, 100 e 300 mg/kg), considerando que a menor dose já corresponde à uma atividade diurética. Os efeitos antioxidantes também foram identificados para *C. pachystachya* para a atividade da enzima catalase (CAT) em todas as doses de FSE (30, 100 e 300 mg/kg) para o tecido renal, enquanto que para o tecido cardíaco, houve somente atividade expressiva da enzima CAT na dose de FSE (30 mg/kg). Portanto, a menor dose indica a atividade antioxidante para a enzima catalase. E os extratos de *C. pachystachya* demonstraram-se ainda seguros em uma administração oral em uma dose até 2000 mg/kg.

## REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, de L. M. *et al.* Diuréticos: um artigo de revisão. **Revista Científica Fagoc Saúde**, v. 2, n. 1, p. 78-83, 2017.
- ALMEIDA, M. Z. de. **Plantas medicinais**. 3. ed. Salvador: EDUFBA, 2011. 221p.
- ALMEIDA, V. de *et al.* Comparative morphoanatomical analysis of *Mikania* species. **Rev. Bras. Farmacogn.**, Curitiba , v. 27, n. 1, p. 9-19, Feb. 2017.
- ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução da Diretoria Colegiada**. RCD nº 26, de 13/05/2014. Brasília, 2014.
- ANVISA. **Farmacopeia Brasileira 2019**. 6. ed. v. 1. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br>. Acesso em: 15 nov. 2019.
- APPEZZATO-DA-GLÓRIA, B.; GUERREIRO-CARMELLO, S. M. **Anatomia vegetal**. 2. ed. UFV-Universidade Federal de Viçosa, 2006.
- ARAGÃO, D. M. *et al.* Hypoglycemic effects of *Cecropia pachystachya* in normal and alloxan-induced diabetic rats. **J. Ethnopharmacol.**, v. 128, n. 3, p. 629-633, 2010.
- ARAMBARRI, A. M. *et al.* Leaf anatomy of medicinal shrubs and trees from Misiones forest of the Paranaense Province (Argentina). Part 2. **Bol. Soc. Argent. Bot**, v. 43, n. 1-2, p. 31-60, 2008.
- BATTISTI, C. *et al.* Plantas medicinais utilizadas no município de Palmeira das Missões, RS, Brasil. **R. Bras. Bioci.**, Porto Alegre, v. 11, n. 3, p. 338-348, jul./set. 2013.
- BEERS, R. F.; SIZER, I. W. A Spectrophotometric Method for Measuring the Breakdown of Hydrogen Peroxide by Catalase. **J. Biol. Chem.**, v.195, p.133–140, 1952.
- BERG, C. C. Espécies de *Cecropia* da Amazônia Brasileira. **Acta Amazon.**, v. 8, n. 2, p. 149-182, 1978.
- BERG, C. C.; ROSSELLI, P. F. **Cecropia**. Flora Neotropica Monograph 94. New York: The New York Botanical Garden, 2005. 230 p.
- BERG, C. C.; ROSSELLI, P. F.; DAVIDSON, D. W. **Cecropia**. Flora Neotropica. The New York Botanical Garden, 2005. 230 p.
- BERLYN G. P.; MIKSCH, J. P. **Botanical microtechnique and cytochemistry**. 1 ed. Ames: The Iowa State University, 1976. 326 p.
- BERTOCCO, A. R. P. *et al.* Microscopic diagnosis of the leaf and stem of *Piper solmsianum* C. DC. **Microsc. Res. Tech**, v. 80, n. 8, p. 831-837, 2017.

BEZERRA, A. G. *et al.* Análise fitoquímica do extrato hidroetanólico de *Turnera diffusa* Willd e avaliação de seus efeitos na morte de astrócitos. **Einstein**, São Paulo, v. 14, n. 1, p. 56-63, mar. 2016 .

BIERAS, A. C.; GRAÇAS SAJO, M. das. Leaf structure of the cerrado (Brazilian savanna) woody plants. **Trees**, v. 23, n. 3, p. 451-471, 2009.

BIGLIANI, M. C. *et al.* Effects of *Cecropia pachystachya* and *Larrea divaricata* aqueous extracts in mice. **Hum. Exp. Toxicol.** v. 29, n. 7, p. 601-606, 2010.

BOBEK, V. B. *et al.* Comparative analytical micrographs of “vassouras” (*Baccharis*, Asteraceae). **Rev. Bras. Farmacogn.**, Curitiba , v. 26, n. 6, p. 665-672, dec. 2016.

BORCARD, G. G. *et al.* Estudo etnofarmacológico em entorno de floresta urbana como subsídio para a implantação da Fitoterapia no Sistema Único de Saúde. **Rev. Bras. PI. Med.**, Campinas, v.17, n.4, supl. II, p.928-936, 2015.

BRANGO-VANEGAS, J. *et al.* Glycosylflavonoids from *Cecropia pachystachya* Trécul are quorum sensing inhibitors. **Phytomedicine**, v. 21, n. 5, p. 670-675, 2014.

BRASIL. **Diretrizes Brasileiras de Hipertensão VI.** v.13, n.1, 2010.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento de Assistência Farmacêutica. **Política e Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos** / Ministério da Saúde, Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos, Departamento de Assistência Farmacêutica. – Brasília: Ministério da Saúde, 2016. 190 p.

BOEGER, M. T.; WISNIEWSKI, C. Comparação da morfologia foliar de espécies arbóreas de três estádios sucessionais distintos de floresta ombrófila densa (Floresta Atlântica) no Sul do Brasil. **Braz. J. Bot.**, v. 26, n. 1, p. 61-72, 2003.

BUDEL, J. M. *et al.* Foliar anatomy and microscopy of six Brazilian species of *Baccharis* (Asteraceae). **Microsc. Res. Tech.**, v. 81, p. 832–842, 2018.

CALLEMIEN, D.; COLLIN, S. Use of RP-HPLC-ESI (–)-MS/MS to differentiate various proanthocyanidin isomers in lager beer extracts. **J. Am. Soc. Brew. Chem.**, v. 66, n. 2, p. 109-115, 2008.

CHANDA, S.; DAVE, R. In vitro models for antioxidant activity evaluation and some medicinal plants possessing antioxidant properties: An overview. **Afr. J. Microbiol. Res.**, v. 3, n. 13, p. 981-996, 2009.

CONSOLINI, A. E.; MIGLIORI, G. N. Cardiovascular effects of the South American medicinal plant *Cecropia pachystachya* (ambay) on rats. **J. Ethnopharmacol.**, v. 96, n. 3, p. 417-422, 2005.

COSTA, G. M. *et al.* An HPLC-DAD method to quantification of main phenolic compounds from leaves of *Cecropia* species. **J. Braz. Chem. Soc.**, v. 22, n. 6, p. 1096-1102, 2011.

COSTA, G. M.; SCHENKEL, E. P.; REGINATTO, F. H. Chemical and pharmacological aspects of the genus *Cecropia*. **Nat. Prod. Commun.**, v. 6, n. 6, p. 1-8, 2011.

CUTLER; D. F.; BOTHAT.; STEVENSON, D. W. **Anatomia vegetal: uma abordagem aplicada**. Tradução: Marcelo Gravina de Moraes. Porto Alegre: Artmed, 2011. 304 p.

DE BOER, H. J.; ICHIM, M. C.; NEWMASER, S. G. DNA Barcoding and Pharmacovigilance of Herbal Medicines. **Drug Saf.**, v. 38, n. 7, p. 611-620, 2015.

DUQUE, A.P. do *et al.* In vivo wound healing activity of gels containing *Cecropia pachystachya* leaves. **J. Pharm. Pharmacol.**, v. 68, p.128–138, 2016.

FAHN, A. **Plant anatomy**. 3 ed. Oxford: Pergamon, 1982.

FLOR, A. S. S. O.; BARBOSA, W. L. R. Sabedoria popular no uso de plantas medicinais pelos moradores do bairro do sossego no distrito de Marudá – PA. **Rev. Bras. Pl. Med.**, v.17, n.4, p.757-768, 2015.

FOSTER, A. S. **Practical plant anatomy**. 2 ed. Princeton, NJ: Van Nostrand, p. 228, 1949.

GABE, M. **Techniques Histologiques**. Paris: Masson et Cie, 1968. 1113 p.

GAGLIOTI, A. L.; AGUIAR, D. P. P. **Cecropia in Flora do Brasil 2020 em construção**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB15038>>. Acesso em: 01 ago. 2019.

GAGLIOTI, A. L.; AGUIAR, D. P. P. **Cecropia in Flora do Brasil 2020 em construção**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://www.floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB15041>>. Acesso em: 20 jul. 2019.

GAGLIOTI, A. L.; ALMEIDA-SCABBIA, R. J. de; ROMANIUC-NETO, S. Flora das cangas da Serra dos Carajás, Pará, Brasil: Urticaceae. **Rodriguésia**, v, 67, n. 5, p. 1485-1492, 2016.

GAGLIOTI, A. L. *et al.* Conhecendo espécies de plantas da Amazônia: embaúba (*Cecropia obtusa* Trécul- Urticaceae). **Embrapa Amazônia Oriental-Comunicado Técnico (INFOTECA-E)**, 2014.

GAGLIOTI, A. L. *et al.* **Urticaceae in Flora do Brasil 2020 em construção**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://www.floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB243>>. Acesso em: 25 jul. 2019.

GAO, S. J. *et al.* Antioxidant effects of superoxide dismutase and horseradish peroxidase on lipid peroxidation. **Ann N Y Acad Sci**. **864**, p. 284–287, 1988.

GASPAROTTO JUNIOR, A. *et al.* Natriuretic and diuretic effects of *Tropaeolum majus* (Tropaeolaceae) in rats. **J. Ethnopharmacol.**, v.122, n.3, p.517–522, 2009.

GASPAROTTO JUNIOR, A. *et al.* Antihypertensive effects of isoquercitrin and extracts from *Tropaeolum majus* L.: evidence for the inhibition of angiotensin converting enzyme. **J. Ethnopharmacol.**, v.134, n.2, p. 363–372, 2011.

GAZAL, M. *et al.* Antidepressant-like effects of aqueous extract from *Cecropia pachystachya* leaves in a mouse model of chronic unpredictable stress. **Brain Res. Bull.**, v.108, p. 10-17, 2014.

GONÇALVES-SOUZA, P.; PAIVA, E. A. S. Food bodies of *Cecropia pachystachya* (Cecropiaceae) leaves: structural and functional features suggesting complementary role to Müllerian bodies. **N. Z. J. Bot.**, v. 54, n. 3, p. 323-334, 2016.

GONZÁLEZ, J. D. V.; VEJA, R. R. Valor taxonômico de nuevos caracteres anatómicos de la lámina foliar de três espécies de *Cecropia* (Urtacaceae: Cecropiae) em Córdoba, Colômbia. **Acta Biol. Colom.**, v. 25, n. 2, 2020.

HARAGUCHI, F. K. *et al.* Influência das proteínas do soro sobre enzimas hepáticas, perfil lipídico e formação óssea de ratos hipercolesterolêmicos. **Rev. Nutr. Campinas**, v. 22, n. 4, p. 517-525, aug. 2009.

HE, D. *et al.* Two-dimensional quasi-freestanding molecular crystals for high-performance organic field-effect transistors. **Nat. Commun.**, v. 5, n. 5162, p. 1-7, 2014.

ISHIDA, A.; YAZAKI, K.; HOE, A. L. Ontogenetic transition of leaf physiology and anatomy from seedlings to mature trees of a rain forest pioneer tree, *Macaranga gigantea*. **Tree physiol.**, v. 25, n. 5, p. 513-522, 2005.

JANZEN, D. H. Allelopathy by myrmecophytes: the ant *Azteca* as an allelopathic agent of *Cecropia*. **Ecology**, v. 50, p. 147-153, 1969.

JOHANSEN, D. A. **Plant Microtechnique**. New York: McGraw Hill Book, 1940.

JORGE, L. I. F.; MARKMAN, B. E. O.; FERRO, V. D. O. Elementos histológicos característicos de *Cecropia pachystachya* Trécul (embaúba). **Rev. Bras. Farmacog.**, v. 7, n. 1, p. 35-40, 1998.

JÚNIOR, B. J. N. *et al.* Avaliação do conhecimento e percepção dos profissionais da estratégia de saúde da família sobre o uso de plantas medicinais e fitoterapia em Petrolina-PE, Brasil. **Rev. Bras. Pl. Med.**, Campinas, v.18, n.1, p.57-66, 2016.

JUNIOR, P. C.P. F. *et al.* Espécies pioneiras e climácicas da floresta ombrófila densa: anatomia foliar comparada. **INSULA Revista de Botânica**, v. 33, p. 21, 2004.

KRAUS, J. E.; ARDUIN, M. **Manual básico de métodos em morfologia vegetal**. Rio de Janeiro: Universidade Rural, 1997.

LEITÃO, F. *et al.* Medicinal plants traded in the open-air markets in the State of Rio de Janeiro, Brazil: an overview on their botanical diversity and toxicological potential. **Rev. Bras. Farmacogn.**, v. 24, p. 225-247, 2014.

LIMA, A. **Índice Terapêutico Fitoterápico**: ITF.1.ed.Petrópolis, RJ: EPUB, 2008.

LIMA, E. C. de S. *et al.* Characterization of Nutrients in the Leaves and Fruits of Embaúba (*Cecropia pachystachya*) Trécul. **Journal of Regulatory Science**, v.4, p. 29-37, 2016.

LIMA-LANDMAN, M. T. R. *et al.* Antihypertensive effect of a standardized aqueous extract of *Cecropia glaziovii* Sneth in rats: an in vivo approach to the hypotensive mechanism. **Phytomedicine**, v. 14, n. 5, p. 314-320, 2007.

LIMA, L. R. P. *et al.* Bixina, Norbixina e Quercetina e seus efeitos no metabolismo lipídico de coelhos. **Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.**, São Paulo, v. 38, n. 4, p. 196-200, 2001.

LINHARES, J. F. P. *et al.* Etnobotânica das principais plantas medicinais comercializadas em feiras e mercados de São Luís, Estado do Maranhão, Brasil. **Rev. Pan-Amaz Saúde**, v. 5, n. 3, p. 39-46, 2014.

LIU, K.; HUANG, Y. Chinese Herbal Medicine on Cardiovascular Diseases and the Mechanisms of Action. **Front. Pharmacol.**, v. 7, n. 469, 2016.

LONGINO, J. T. Geographic variation and community structure in an ant-plant mutualism: *Azteca* and *Cecropia* in Costa Rica. **Biotropica**, v. 21, p. 126-132, 1989.

LOPES, H. F. Genética e hipertensão arterial. **Rev. Bras. Hipertens.**, v.21, n.2, p.87-91, 2014.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. de A. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas**. 2. ed. Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum, 2008.

MACHADO, C. D. *et al.* *Schinus molle*: anatomy of leaves and stems, chemical composition and insecticidal activities of volatile oil against bed bug (*Cimex lectularius*). **Rev. Bras. Farmacogn.**, Curitiba, v. 29, n. 1, p. 1-10, feb. 2019.

MALONE, M. H.; ROBICHAUD, R. C. A hippocratic screen for pure or crude drug materials. **J. Nat. Prod.**, v. 25, p. 320-331, 1962.

MAQUIAVELI, C. C. *et al.* *Cecropia pachystachya* extract attenuated the renal lesion in 5/6nephrectomized rats by reducing inflammation and renal arginase activity. **J. Ethnopharmacol.**, v. 158, p. 49–57, 2014.

MATERA, S. *et al.* Intestinal antispasmodic effects of three Argentinian plants: *Hypericum connatum*, *Berberis ruscifolia* and *Cecropia pachystachya*: mechanisms of action and comparison with the effects of *Brugmansia arborea*. **Pharmacology online**, v.2, p. 91-99, 2016.

MCGREGOR, D. D. The Effect of Sympathetic Nerve Stimulation of Vasoconstrictor Responses in Perfused Mesenteric Blood Vessels of the Rat. **J. Physiol.**, v. 177, n.1, p. 21-30, 1965.

MENDES, P.; CARDOSO, V.P. Inibidores da enzima de conversão da angiotensina ou antagonistas dos receptores da angiotensina: evidências na mortalidade e eventos cardiovasculares maiores em diabéticos hipertensos. **Rev. Port. Med. Geral Fam.**, v. 32, p. 330-338, 2016.

MENDONÇA, E. D. *et al.* Genotoxic, mutagenic and antigenotoxic effects of *Cecropia pachystachya* Trécul aqueous extract using in vivo and in vitro assays. **J. Ethnopharmacol.**, v.193, p. 214–220, 2016.

METCALFE, C. R.; CHALK, L. **Anatomy of the dicotyledons**. 2 ed. Oxford: Clarendon, 1983.

MIGACZ, I. P. *et al.* Comparative leaf morpho-anatomy of six species of *Eucalyptus* cultivated in Brazil. **Rev. Bras. Farmacogn.**, Curitiba , v. 28, n. 3, p. 273-281, jun. 2018.

MOREIRA, G. C.; CIPULLO, J. P.; VILELA-MARTIN, J. F. Existem diferenças entre os diversos diuréticos. **Rev. Bras. Hipertens.**, v. 20, n. 2, p. 55-62, 2013.

MOURAD, M. M. Petiolar vascularization of simple, lobed and compound leaves in certain taxa of the Araliaceae and its taxonomic implications. **Egypt. J. Exp. Biol. (Bot.)**, v.9, n. 2, p. 239-248, 2013.

NUNES, M. G. S.; BERNARDINO, A. de O.; MARTINS, R. D. Uso de plantas medicinais por pessoas com hipertensão. **Rev. Rene.**, v. 16, n. 6, p. 775-81, nov-dez. 2015.

OECD (Organization for Economic Co-operation and Development). Guidelines for Testing of Chemical, Guideline 425. *In*: OECD (ed.). **Acute oral toxicity – Up-and-down-procedure (UDP)**. Paris, France: 2008. p. 1-27.

OLIVEIRA, D. M. de; BASTOS, D. H. M. Biodisponibilidade de ácidos fenólicos. **Quím. Nova**, São Paulo, v. 34, n. 6, p. 1051-1056, 2011.

OLIVEIRA, G.M.M. de *et al.* Diretrizes de 2017 para manejo da hipertensão arterial em cuidados primários nos países de língua portuguesa. **Rev. Port. Cardiol.**, v. 36, n. 11, p. 789-798, 2017.

OLIVEIRA, G. V. de; CORREA, M. M.; DELABIE, J. H. Interação planta-inseto: Aspectos biológicos e ecológicos do mutualismo *Cecropia-Azteca*. **Entomo Brasilis**, v. 8, n. 2, p. 85-90, 2015.

PACHECO, N. R. *et al.* *Cecropia pachystachya*: A Species with Expressive *In Vivo* Topical Anti-Inflammatory and *In Vitro* Antioxidant Effects. **Biomed Res. Int.**, v. 2014, p. 1-11, 2014.

PETENATTI, E. M.; PETENATTI, M. E.; DEL VITO, L.A. Medicamentos Herbarios en el Centro-Oeste Argentino. "Amby": Control de Calidad de la Droga Oficial y sus Adulterantes. **Acta Farm. Borzaeretlse**, v. 17, n. 3, p. 197-212, 1998.

PETENATTI, E. M.; PETENATTI, M. E.; DEL VITTO, L. A. Herbal remedies in Central-Western Argentina, I. "Amaby": genuine drug and adulterants. **Acta Hort.**, v. 503, p. 91-96, 1999.

PIRES, N. F. *et al.* Estudo da superposição de mecanismos fisiopatológicos como modelo de hipertensão arterial com repercussões cardíacas graves. **Rev. Bras. Hipertens.**, v.21, n.2, p. 104-113, 2014.

RADOVANOVIC, C. A. T. *et al.* Hipertensão arterial e outros fatores de risco associados às doenças cardiovasculares em adultos. **Rev. Latino-Am. Enfermagem**, v.22, n.4, p.547-553, 2014.

RAMAN, V. *et al.* Microscopic characterization and HPTLC of the leaves, stems and roots of *Fadogia agrestis* – an African folk medicinal plant. **Rev. Bras. Farmacogn.**, Curitiba , v. 28, n. 6, p. 631-639, Dec. 2018.

RAMOS, V. S. de *et al.* **Árvores da Floresta Estacional Semidecidual: Guia de Identificação das Espécies**. São Paulo: Universidade de São Paulo. Biota. Fapesp, 2008. 320p.

RAPHAEL, M. B. *et al.* Comparing germination success and seedling traits between exotic and native pioneers: *Cecropia pachystachya* versus *Macaranga gigantea*. **Plant Ecol.**, v. 216, n. 7, p. 1019-1027, 2015.

RIVERA-MONDRAGÓN, A. *et al.* Selection of chemical markers for the quality control of medicinal plants of the genus *Cecropia*. **Pharm. Biol.**, v. 55, n. 1, p. 1500-1512, 2017.

ROESER, K. R. Die Nadel der Schwarzkiefer-Massenprodukt und Kunstwerk der Natur. **Mikrokosmos**, v. 61, p. 31-36, 1962.

ROMANIUC-NETO *et al.* Urticaceae. *In*: G. Martinelli & M.A. Moraes (orgs.). **Livro Vermelho da Flora do Brasil**. Rio de Janeiro: Andrea Jakobsson: Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2013. p. 994-995.

ROMANIUC-NETO; S. R.; GALIOTTI, A. L.; GUIDO, B. M. de. Urticaceae Juss. do Parque Estadual das Fontes do Ipiranga, São Paulo, SP, Brasil. **Hoehnea**, v. 36, n. 1, p. 193-205, 2009.

RUDALL, P. Anatomy and systematic of Iridaceae. **Bot. J. Linn. Soc.**, v. 114, n. 1, 1994.

SANTOS, V. L. P. dos *et al.* Anatomy and microsocpy of *Piper caldense*, a folk medicinal plant from Brazil. **Rev. Bras. Farmacogn.** v. 28, n. 1, p. 9-15, 2018.

SARAIVA, M. E. *et al.* Plant species as a therapeutic resource in areas of the savanna in the state of Pernambuco, Northeast Brazil. **J. Ethnopharmacol.**, v. 171, p. 141–153, 2015.

SASS, J. E. **Botanical microtechnique**. 2 ed. Ames: The Iowa State College, p. 228, 1951.

SATO, T. M.; PASSOS, F. de C.; NOGUEIRA, A. C. Frugivoria de morcegos (Mammalia, Chiroptera) em *Cecropia pachystachya* (Urticaceae) e seus efeitos na germinação das sementes. **Pap. Avulsos Zool.**, São Paulo, v. 48, n. 3, p. 19-26, 2008.

SEDLAK, J.; LINDSAY, R. H. Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. **Anal Biochem.**v. 25, p.192–205, 1968.

SEMIONATTO, I. F. *et al.* Modulação Serotoninérgica de Respostas Cardiovasculares Basais e Induzidas pela Expansão Isotônica do Volume Extracelular em Ratos. **Arq. Bras. Cardiol.**, v.108, n.2, p. 154-160, 2017.

SILVA, R. J. F.; AGUIAR-DIAS, A. C. A. de; MENDONÇA, M. S. de. Rosetas e concreções cristalinas silicificadas em Piper (Piperaceae): registros inéditos de macropadrões. **Acta Amazonica**, v. 44, n. 4, p. 435-446, 2014.

SILVA, S. S. B. E. da; OLIVEIRA, S. de F. da B. de; PIERIN, A. M. G. O controle da hipertensão arterial em mulheres e homens: uma análise comparativa. **Rev. Esc. Enferm. USP**, v.50, n.1, p.50-58, 2016.

SOARES, S. E. Ácidos fenólicos como antioxidantes. **Rev. Nutr.**, Campinas , v. 15, n. 1, p. 71-81, jan. 2002.

SODRÉ, F. L.; COSTA, J. C. B.; LIMA, J. C. C. Avaliação da função e da lesão renal: um desafio laboratorial. **J. Bras. Patol. Med. Lab.**, v. 43, n. 5, p. 329-337, 2007.

SOUZA-MOREIRA, T. M.; SALGADO, H. R. N.; PIETRO, R. C. O Brasil no contexto de controle de qualidade de plantas medicinais. **Rev. Bras. Farmacogn.**, p. 435-440, 2010.

THE PLANT LIST. **Urticaceae**. Disponível em: <http://www.theplantlist.org/1.1/browse/A/Urticaceae/>. Acesso em: 20 ago. 2019.

TOLOUEI, S. E. L. *et al.* *Celosia argentea* L. (Amaranthaceae) a vasodilator species from the Brazilian Cerrado - An ethnopharmacological report. **J. Ethnopharmacol.**, v. 229, p. 115-126, 2019.

TOLOUEI, S. E. L. *et al.* *Anchietea pyrifolia* A. St.-Hil. as a Cardiovascular-Endowed Species: A Whole-Biological Investigation. **J. Med. Food**, v. 22, n. 4, p. 393-407, 2019.

TREIBER, E. L. *et al.* Phylogeny of the Cecropieae (Urticaceae) and the Evolution of an Ant-Plant Mutualism. **Syst. Bot.**, v. 41, n. 1, p. 56-66, 2016.

UPTON, R. *et al.* American Herbal Pharmacopeia. *In: Botanical Pharmacognosy. Microscopy Characterization of Botanical Medicines.* 1 ed. New York: CRC, 2011. p. 1-46.

VELÁSQUEZ, J. Contribución al conocimiento de las especies del género *Cecropia* L. (Moraceae) – “Yagrumos” – de Venezuela. **Acta Bot. Venez.**, p. 25-64, 1971.

VELÁZQUEZ, E. *et al.* Antioxidant activity of Paraguayan plant extracts. **Fitoterapia**, v.74, n. 1-2, p. 91-97, 2003.

NOBRE, F. *et al.* VI Diretrizes brasileiras de hipertensão. **Arq. Bras. Cardiol**, v. 95, n. 1, p. 1-51, 2010.

WALDHOFF, D.; PAROLIN, P. Morphology and anatomy of leaves. *In: JUNK, W. et al.* (eds). **Amazonian Floodplain Forests.** Dordrecht: Springer, 2010. v. 2010, p. 179-2020.

YURQUINA, R. S. *et al.* Morphoanatomical studies and antineumococcal and antioxidant activities of leaves from *Tetrapanax papyriferum* (Hook) K. Koch. **Lat. Am. J. Pharm.**, v. 27, n. 1, p. 5-9, 2008.

ZANGARO, W. *et al.* Relationships among arbuscular mycorrhizas, root morphology and seedling growth of tropical native woody species in southern Brazil. **J. Trop. Ecol.**, v. 21, n. 5, p. 529-540, 2005.

## ANEXO A – Documento de aprovação do uso de animais pelo Comitê de Ética



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
 FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS  
 PRÓ-REITORIA DE ENSINO DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA

### COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS - CEUA

Dourados-MS, 25 de março de 2018.

### CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada **“Padronização botânica e avaliação cardiovascular de Cecropia pachystachya TRÉCUL (URTICACEAE)”**, registrada sob o protocolo de nº 40/2017, sob a responsabilidade de Arquimedes Gasparotto Junior – que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino), encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 08 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovada pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFGD) da Universidade Federal da Grande Dourados, em reunião de 17/11/2017.

Finalidade	( ) Ensino ( X ) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	01/04/2018 a 31/12/2019
Espécie/linhagem/raça	Rattus norvegicus - Wistar
Nº de animais	72
Peso/idade	60 dias
Sexo	Fêmeas
Origem	Biotério Central da Universidade Federal da Grande Dourados- UFGD

*Melissa Negrão Sepulveda*

93

---

Melissa Negrão Sepulveda  
Coordenadora CEUA

Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA/UFGD – Rua João Rosa Góes, 1761 – Vila Progresso.  
Dourados/MS. E-mail: [ceua@ufgd.edu.br](mailto:ceua@ufgd.edu.br)