



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ
CAMPUS UNIVERSITÁRIO MINISTRO PETRÔNIO PORTELLA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Estudos farmacológicos e ensaios pré-clínicos com 1,3-diestearil-2-oleil-glicerol (TG1)
derivado de *Platonia insignis* Mart

PATRÍCIA RÉGIA PEREIRA DOS SANTOS

Teresina – Piauí

2012

PATRÍCIA RÉGIA PEREIRA DOS SANTOS

**Estudos farmacológicos e ensaios pré-clínicos com 1,3-diestearil-2-oleil-glicerol (TG1)
derivado de *Platonia insignis* Mart**

Dissertação submetida à Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas do Departamento de Bioquímica e Farmacologia da Universidade Federal do Piauí, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Chistiane Mendes Feitosa

Co-Orientador: Prof. Dr. Rivelilson Mendes de Freitas

Teresina – Piauí

2012

PATRÍCIA RÉGIA PEREIRA DOS SANTOS

Estudos farmacológicos e ensaios pré-clínicos com 1,3-diestearil-2-oleil-glicerol (TG1)

derivado de *Platonia insignis* Mart

Dissertação submetida à Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas do Departamento de Bioquímica e Farmacologia da Universidade Federal do Piauí, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Aprovada em ____/____/____

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Chistiane Mendes Feitosa- (Orientadora)

Departamento de Química – CCN/ UFPI

Prof^a. Dr^a. Ana Amélia de Carvalho Melo Cavalcante - (Examinador Interno)

Docente do programa PPGCF/ UFPI

Prof^a. Dr^a. Juceni Pereira De Lima David - (Examinador Externo)

Universidade Federal da Bahia/ UFBA

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ

REITOR

Prof. Dr. José Arimatéia Dantas Lopes

VICE-REITOR

Prof^a. Dr^a. Nadir do Nascimento Nogueira

PRO-REITOR PARA ASSUNTOS DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

Prof. Dr. Saulo Cunha de Serpa Brandão

DIRETOR DO CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

Prof. Msc. Antonio dos Santos Rocha Filho

VICE-DIRETOR DO CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

José Guilherme Ferre Pompeu

**COORDENADOR DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS**

Prof. Dr. Rivelilson Mendes de Freitas

**VICE-COORDENADOR DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS**

Prof. Dr. Lívio César Cunha Nunes

Dedicatória

Ao meu DEUS, "O senhor fez em mim Maravilhas, Santo é seu nome! A minha alma engrandece o Senhor, exulta meu Espírito em Deus meu salvador. Seu Amor para sempre se estende sobre aqueles que o temem. Glória ao Pai e ao Filho e ao Espírito Santo, desde agora e para sempre e pelos séculos. Amém"

(MAGNIFICAT)

Aos meus Pais por me ensinarem a buscar o sonho, o valor do estudo, o valor de olhar sempre nos olhos dos meus pares.

À professora Chistiane, pelo trabalho .

Ao professor Rivelilson. Incansável, nunca vi igual. Parabéns.

Meus irmãos Tatiana, Marcos e Samia , Incentivadores.

Heitor e Rafael. Meus grandes amores. Me acalmavam.

Aos meus amigos e familiares pelo incentivo, compreensão e amor.

Agradecimentos

Todas as pessoas especiais tem um motivo para estar em nossas vidas.....

Deus, pai de infinita bondade e compaixão, por possibilitar mais esta vitória. “O temor do Senhor é o princípio da sabedoria; tem bom entendimento todos os que cumprem os seus preceitos; o seu louvor subsiste para sempre” (Salmos 111:10).

Aos meus amados pais, *Antônio da Cruz Santos e Maria Eunice Pereira dos Santos*, presença constante em tudo que faço. Me ensinando desde cedo o caminho certo. Fiéis para sempre. *Tatiana, Marcos, Sâmia, Heitor e Rafael*. Amo todos vocês.

A minha orientadora, *Profª. Drª. Chistiane Mendes Feitosa*, pela oportunidade.

Aos professores colaboradores, que me ajudaram em todo o desenvolvimento desse trabalho. Ao *Prof. Dr. Rivelilson Mendes de Freitas*, pelo apoio incansável no desenvolvimento dos experimentos dessa dissertação, Obrigada. Ao *Prof. Dr. Joaquim Soares da Costa Júnior* por fornecer a substância utilizada nesta pesquisa, e compor a banca de defesa de dissertação.

À *Profª. Dra. Ana Amélia de Carvalho Melo Cavalcante* e *profº José Machado Moita Neto* por gentilmente aceitarem o convite para participar da minha banca de qualificação. E novamente à professora Ana Amélia por voltar a banca na defesa da dissertação.

Aos Professores do *Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas (PPGCF)*, que contribuíram para meu crescimento científico, compartilhando seus valiosos conhecimentos técnicos e profissionais.

A minha turma de Mestrado, juntos nessa caminhada. Pelos momentos de alegria e aprendizado. *Dayane e Jéssica*. Obrigada pelo apoio, pela disponibilidade em sempre querer ajudar.

Ao *Grande*, Laboratório em Pesquisa Neuroquímica Experimental (LAPNEX) composto por Grandes pessoas: *Rusbene, Guilherme, Amanda, Cássio, Katrícia, Ana Paula, Oskar, Pauline, Talyta C. Branco, seu Orlando e dona Graça*. Minha total gratidão por toda a ajuda, sem vocês esse trabalho não teria sido possível. Verdadeiramente.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS	ix
LISTA DE FIGURAS	xi
LISTA DE TABELAS	xii
RESUMO	xiii
ABSTRACT	xiv
1. INTRODUÇÃO	17
2. OBJETIVOS	19
2.1 Objetivo Geral.....	19
2.2 Objetivos Específicos.....	19
3. REVISÃO DE LITERATURA	20
3.1 A doença de Alzheimer.....	20
3.2 Ácidos graxos.....	21
Referências	25
4. CAPÍTULO I: Levantamento das propriedades físico-químicas e farmacológicas de extratos e compostos isolados de <i>Platonia insignis</i> Mart. uma perspectiva para o desenvolvimento de fitomedicamentos	29
Resumo.....	31
Abstract.....	32
Introdução.....	33
Fitomedicamentos no Brasil.....	34
Uso popular do bacuri.....	35
Principais Produtos Naturais- Fitoquímica e Farmacologia.....	36
Aspectos Físico-químicos da polpa de <i>Platonia insignis</i> Mart.....	39
Extratos de <i>Platonia insignis</i> Mart. - Avaliação farmacológica e toxicológica.....	41
Conclusão.....	42
Referências.....	43
5. CAPÍTULO II: Ensaio Pré-clínico em ratos tratados com 1,3-diestearil-2-oleilglicerol(TG1)	48
Resumo.....	49

Abstract.....	51
Introdução.....	52
Materiais e Métodos.....	53
Resultados.....	57
Discussão.....	64
Referências.....	69
6. CAPÍTULO III: Avaliação dos efeitos do 1,3-diestearil-2-oleil-glicerol (TG1)	
sobre a memória de ratos adultos.....	73
Resumo.....	74
Abstract.....	76
Introdução.....	77
Materiais e Métodos.....	78
Resultados.....	83
Discussão.....	87
Referências	90
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	94
ANEXOS	

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

®	Marca registrada
AChE	Acetilcolinesterase
AA	Ácido Araquidônico
AcOEt	Acetato de etila
ALKP	Fosfatase alcalina
ALT	Alanina aminotransferase
ANOVA	Análise de Variância
APPs	Acilfloroglucinol policíclico poliprenilado
AST	Aspartato aminotransferase
BBI	Manteiga da semente de bacuri industrializada
BBU	Manteiga da semente de bacuri extraída na UFPI
CHCM	Concentração de hemoglobina corpuscular média
CT	Colesterol total
DA	Doença de Alzheimer
DCM	Diclorometano
DHA	Ácido docosahexaenóico
EE	Extrato etanólico
EH	Extrato Hexânico
EPA	Ácido eicosapentaenóico
E.P.M	Erro padrão da média
GFC	Garcinielliptona FC
HCM	Hemoglobina corpuscular média
i.p	Intraperitoneal
NO	Óxido nítrico
OH	Radical Hidroxila
PEAB	Porcentagem de entradas para os braços abertos
PTBA	Porcentagem do tempo de permanência nos braços abertos
SNC	Sistema Nervoso Central
SOD	Superóxido dismutase
TBARS	Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico.

TEAC	Atividade Antirradical livre
TNF- α	Fator de necrose tumoral - α
TPBA	Tempo de permanência nos braços abertos
VCM	Volume corpuscular médio
v.o	Via oral

LISTA DE FIGURAS

Introdução

- Figura 1** Estrutura química do 1,3-diestearil-2oleil-glicerol (TG1) fitol..... **24**

Capítulo I

- Figura 1** *Platonia insignis* Mart., árvore , frutos, flores..... **35**

- Figura 2** Principais compostos isolados de *Platonia insignis* Mart. e família clusiaceae..... **38**

Capítulo II

- Figura 1** Avaliação histopatológica do efeito do tratamento durante 30 dias com 1,3-diestearil-2oleil-glicerol (TG1) e veículo no tecido hepático de ratos adultos..... **61**

- Figura 2** Avaliação histopatológica do efeito do tratamento durante 30 dias com 1,3-diestearil-2oleil-glicerol (TG1) e veículo no corpo estriado de ratos adultos..... **62**

- Figura 3** Avaliação histopatológica do efeito do tratamento durante 30 dias com 1,3-diestearil-2oleil-glicerol (TG1) e veículo no hipocampo de ratos adultos..... **63**

Capítulo III

- Figura 1** Estrutura química do 1,3-diestearil-2-oleil-glicerol (TG1) **79**

- Figura 2** Efeito do tratamento com 1,3-diestearil-2-oleil-glicerol (TG1) 30mg/Kg v.o. na memória tardia de ratos no teste da esquiva passiva..... **84**

- Figura 3** Efeito do tratamento com 1,3-diestearil-2-oleil-glicerol (TG1) 30mg/Kg v.o. na aquisição da memória de ratos no teste T Maze.... **84**

- Figura 4** Latência (s) no dia do teste (dia 4) para alcançar o local onde no dia dos treinos estava localizada a plataforma no teste Labirinto Aquático de Morris..... **85**

LISTA DE TABELAS**Capítulo I**

Tabela 1	Principais substâncias bioativas de <i>Platonia insignis</i> Mart., e propriedades farmacológicas.....	39
Tabela 2	Valores de umidade, lipídios, sólidos solúveis totais, pH e acidez total titulável da polpa de <i>Platonia insignis</i> Mart.....	40
Tabela 3	Teores de ácido ascórbico, fenóis totais, e atividade antirradical livre da polpa de <i>Platonia insignis</i> Mart.....	40

Capítulo II

Tabela 1	Resultados dos parâmetros hematológicos de ratos Wistar tratados com 1,3-diestearil-2-oleil-glicerol (TG1) por via oral durante 30 dias consecutivos.....	58
Tabela 2	Resultados dos parâmetros bioquímicos de ratos Wistar tratados com 1,3-diestearil-2-oleil-glicerol (TG1) por via oral durante 30 dias consecutivos.....	59

Capítulo III

Tabela 1	Determinação dos níveis de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico(TBARS), conteúdo de nitrito, atividade da catalase e superóxido dismutase em hipocampo de ratos tratados com 1,3-diestearil-2-oleil-glicerol (TG1) por via oral durante 30 dias.....	86
-----------------	--	-----------

Estudos farmacológicos e ensaios pré-clínicos com 1,3-diestearil-2-oleil-glicerol (TG1) derivado de *Platonia insignis* Mart. PATRÍCIA RÉGIA PEREIRA DOS SANTOS. Orientadora: Chistiane Mendes Feitosa. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas. Centro de Ciências da Saúde. Departamento de Bioquímica e Farmacologia, UFPI, 2012.

RESUMO

A substância 1,3-diestearil-2-oleil-glicerol (TG1) é um triglicerídeo isolado do extrato hexânico das sementes de *Platonia insignis* Mart. É um derivado da trioleína, solúvel em solventes apolares, possui fórmula molecular $C_{58}H_{112}O_6$ e ponto de ebulição $554\text{ }^{\circ}\text{C}$, com massa molecular de 885.43 u.m.a. É um composto com ponto de fusão igual a $5\text{ }^{\circ}\text{C}$, de densidade $0,97\text{ g/cm}^3$. No capítulo 1, foi realizado um levantamento das propriedades físico-químicas e farmacológicas de extratos e compostos isolados de *Platonia insignis* Mart. Os extratos mais estudados foram o hexânico, etanólico e o metanólico, nos quais diversas propriedades farmacológicas foram investigadas a saber: antioxidante, antiinflamatória e cicatrizante. E entre os compostos isolados foram apontados: euxantonas, ácido ascórbico, polifenóis, 7-epiclusianona e guttiferona-A, indicando que a espécie *P. insignis*, apresenta extratos e compostos que podem ser melhor caracterizados para formulação de novas formas farmacêuticas. No capítulo 2, foi realizado um ensaio pré-clínico em ratos Wistar adultos tratados com 1,3-diestearil-2-oleil-glicerol (TG1) por via oral na dose de 30 mg kg^{-1} , para avaliação dos parâmetros comportamentais, bioquímicos, hematológicos e histopatológicos no hipocampo, corpo estriado e tecido hepático. E ainda análise do potencial citotóxico pelo método MTT. O TG1 não apresentou atividade citotóxica *in vitro*. Os parâmetros comportamentais não apresentaram alterações significativas, e não houve morte. Os ratos tratados com TG1 apresentaram alterações apenas na hemoglobina corpuscular média (HCM) e na concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM), quando comparados com grupo controle. A aspartato aminotransferase (AST), fosfatase alcalina, ácido úrico tiveram seus níveis reduzidos, conferindo preservação dos rins e fígado dos animais na dose testada ($p < 0,05$), e não mostraram comprometimento das áreas cerebrais: corpo estriado e hipocampo. Estes resultados indicam que o TG1 não produz alterações hematológicas, bioquímicas e histopatológicas cerebrais e hepáticas em ratos o que caracteriza uma baixa toxicidade. No capítulo 3, verificou-se a influência do 1,3-diestearil-2-oleil-glicerol (TG1) 30 mg/kg (v.o), sobre a memória de ratos, na atividade anticolinesterásica *in vitro* e o potencial antioxidante em hipocampo. No teste da esQUIVA passiva o grupo tratado com TG1 revelou um aumento significativo no tempo de latência para descida da plataforma quando comparado com o treino, significando um aprimoramento na aprendizagem e memória ($T_0 = 33,50 \pm 6,118$; $T_{15} = 20,13 \pm 4,846$; $T_{24} = 203,1 \pm 47,50$). Enquanto que no teste Labirinto Aquático de Morris, observou-se uma diminuição significativa de (63,59% e 38,71%) no tempo de latência, quando comparados com o grupo veículo e controle (Neostigmina $0,5\text{ mg/kg}$), respectivamente. Nos testes neuroquímicos o grupo tratado com TG1 apresentou uma diminuição significativa de 88,49% na peroxidação lipídica e 76,89% no conteúdo de nitrito e um aumento significativo de 51,97% na atividade da enzima catalase e 45,53% na atividade da superóxido dismutase. Ainda, na determinação *in vitro* da inibição da atividade anticolinesterásica revelou 77,12, 72,34, 61,17 e 20,21% de inibição nas concentrações de $0,1\text{ }\mu\text{g/ml}$, $0,05\text{ }\mu\text{g/ml}$, $0,025\text{ }\mu\text{g/ml}$ e $0,0125\text{ }\mu\text{g/ml}$ respectivamente, revelando que o TG1 é uma molécula promissora para o desenvolvimento de novos fármacos.

Palavras-chave: Anticolinesterásico, Antioxidante, *Platonia insignis* Mart., Memória 1,3-diestearil-2-oleil-glicerol (TG1).

Pharmacological studies and preclinical studies with 1,3-distearoyl-2-oleoyl-glycerol (TG1) derived from *Platonia insignis* Mart. PATRÍCIA RÉGIA PEREIRA DOS SANTOS. Advisor: Chistiane Mendes Feitosa. Master's Dissertation. Post-Graduate Program in Pharmaceutical Sciences. Center for Health Sciences. Department of Biochemistry and Pharmacology, UFPI, 2012.

ABSTRACT

The substance 1,3-distearoyl-2-oleoyl-glycerol (TG1) is triglyceride isolated from the hexane extract of the seeds of *Platonia insignis* Mart. It is a derivative of triolein, soluble in nonpolar solvents, has molecular form $C_{58}H_{112}O_6$ and boiling point $554\text{ }^{\circ}\text{C}$, has a molecular mass of 885.43 u.m.a. It is a compound with a melting point equal to $5\text{ }^{\circ}\text{C}$, density of 0.97 g/cm^3 . In chapter 1, a survey was conducted of physico-chemical properties and pharmacological extracts and compounds isolated from *Platonia insignis* Mart. The extracts most studied were hexane, ethanol and methanol, in which were investigated various pharmacological properties: antioxidant, anti-inflammatory and healing. And among the compounds were appointed and structurally determined: euxantonas, ascorbic acid, polyphenols, 7-epiclusianone and guttiferona-A, indicating that the species *P. insignis* present extracts and compounds that can best be characterized the formulation of news dosage forms. The chapter 2, was conducted preclinical test in Wistar rats treated orally with 1,3-distearoyl-2-oleoyl-glycerol (TG1) at a dose of 30 mg kg^{-1} , for the evaluation of parameters behavioral, biochemical, hematology and histopathology in the hippocampus, corpus striatum and liver tissue. And analysis of the cytotoxic potential by MTT method. The TG1 showed no cytotoxic activity in vitro. The behavioral parameters did not change significantly, and there were no deaths. Rats treated with TG1 showed changes only in mean corpuscular hemoglobin (MCH) and mean corpuscular hemoglobin concentration (MCHC) in hematological analyzes compared with the control group. The aspartate aminotransferase (AST), alkaline phosphatase, uric acid levels were reduced by giving the preservation of kidneys and livers of animals at the dose tested ($p < 0.05$), And showed no impairment of TG1 brain areas: corpus striatum and hippocampus. These results indicate that the TG1 not produce changes hematological, biochemical and histopathological brain and liver in mice which characterizes a low toxicity. In the chapter 3 verified the influence of 1,3-distearoyl-2-oleoyl-glycerol (TG1) 30 mg / kg (v.o) on memory in rats, anticholinesterase activity in vitro and antioxidant potential in hippocampus. In the test of passive avoidance group treated with TG1 showed significant increase in latency to the platform down when compared to the training, meaning an improvement in learning and memory ($T_0 = 33.50 \pm 6.118$; $T_{15} = 20.13 \pm 4.846$, $T_{24} = 203.1 \pm 47.50$). Whereas in the Morris water maze test watched a significant decrease of 63.59% and 38.71% in the latency time when compared with the vehicle group and control (neostigmine 0.5 mg / kg) respectively. In tests neurochemical the group treated with TG1 showed a significant decrease of 88.49% in lipid peroxidation and 76.89% in the content of nitrite and a significant increase of 51.97% in the activity of the enzyme catalase and 45.53% in the activity of superoxide dismutase. still the determining *in vitro* inhibition of acetylcholinesterase activity obtained 77,12, 72,34, 61,17 and 20,21% of inhibition at concentrations of $0,1\text{ }\mu\text{g/ml}$, $0,05\text{ }\mu\text{g/ml}$, $0,025\text{ }\mu\text{g/ml}$ e $0,0125\text{ }\mu\text{g/ml}$ respectively, revealing that the TG1 is a promising molecule for the development of new pharmaceuticals.

Keywords: Anticholinesterase, Antioxidant, *Platonia insignis* Mart., Memory, 1,3-distearoyl-2-oleoyl-glycerol(TG1).

1. INTRODUÇÃO

A utilização cada vez maior de plantas medicinais na cura ou prevenção de doenças tornou o extrativismo dessas, uma alternativa obrigatória na agricultura nacional e na medicina popular. Os fitoterápicos representam o alicerce da indústria nacional farmacêutica de pequeno e médio porte. Dentre as plantas medicinais cultivadas, boa parte são espécies exóticas, mas muitas espécies nativas têm seu uso largamente aplicado pela população, baseado em pesquisas químicas e farmacológicas, ou no conhecimento empírico ou tradicional pela população (SIMÕES et al., 2000).

O conhecimento sobre plantas medicinais, muitas vezes representa a única alternativa de muitas comunidades e grupos étnicos. Atualmente, ainda é possível encontrar nas regiões mais pobres do país e nos grandes centros brasileiros, plantas medicinais comercializadas em feiras livres, mercados populares, ou simplesmente cultivadas em quintais residenciais (MACIEL et al., 2002). A diversidade genética vegetal do Brasil representa uma das maiores do mundo. Possui mais de 55.000 espécies catalogadas de um total estimado entre 350.000 a 550.000, e destas espécies muitas apresentam atividade biológica (RODRIGUES *et al.*, 2008). No âmbito regional, o estudo dos usos tradicionais de plantas e seus produtos no Nordeste do Brasil vêm crescendo nos últimos anos. Investigando plantas conhecidas pelos usos etnomedicinais no Nordeste do Brasil, verificou-se um total de 650 espécies e 407 gêneros pertencentes a 111 famílias. Destas, cerca de 126 espécies referidas pelos seus usos medicinais são exóticas e cultivadas na região, correspondendo a cerca de 20% do total (AGRA et al., 2008).

Dentre os vários usos das plantas medicinais pela população pode ser destacado a sua utilização em virtude de suas propriedades sobre o sistema nervoso central (SNC). E diante desse fato, a doença de Alzheimer representa um transtorno psicossocial de interesse para a saúde pública e para a pesquisa e desenvolvimento de novos bioprodutos para uma possível aplicação na terapêutica dessa patologia. A doença de Alzheimer pode ser caracterizada pela disfunção da memória que representa o sinal mais precoce e proeminente desse transtorno. Esse sinal clínico é essencial para o diagnóstico de acordo com os critérios diagnósticos atuais (STOPFORD et al., 2007). O estudo de muitas plantas medicinais brasileiras através de “screening fitoquímico” tem sido foco na busca do tratamento e cura de muitas doenças como, por exemplo, na doença de Alzheimer (FEITOSA et al., 2011).

A utilização de plantas medicinais como fonte de produtos terapêuticos acompanha a história da humanidade, nas mais diferentes sociedades. Inúmeros relatos do seu uso tornam quase mística a relação de benefícios obtidos. Registros antigos da medicina romana, egípcia, persa e hebraica mostram que as ervas eram utilizadas de forma extensiva para o tratamento, a cura e a prevenção de praticamente todas as doenças conhecidas pelo homem (CALIXTO, 2000; FRANCO; FONTANA, 2003). A elucidação dos componentes ativos presentes nas plantas e seus mecanismos de ação, configuram como um dos maiores desafios para a química farmacêutica, bioquímica, toxicologia e a farmacologia (GEBHARDT, 2000; MACIEL et al., 2002). Portanto, a busca por novas moléculas com propriedades farmacológicas importantes para o tratamento de doenças é uma área de interesse crescente entre os diversos grupos de pesquisa. Neste sentido, este estudo foi realizado com o intuito de apontar uma nova substância com possibilidade terapêutica, oriunda de uma planta medicinal.

O crescente interesse por medicamentos obtidos de plantas medicinais, mais especificamente os fitoterápicos, a possibilidade de implementação da fitoterapia no sistema público de saúde nacional e, principalmente, as resoluções RDC nº 17 de 24/02/2000 e RDC nº 48 de 16/03/2004, que dispõe sobre o registro de fitoterápicos no Brasil, estimularam o crescimento do número de publicações referentes a etnofarmacologia, registrando-se as espécies mais popularmente conhecidas e utilizadas, tanto entre populações indígenas quanto em urbanas, assim como a utilização de fitoterápicos em farmácias comunitárias e no sistema de saúde. As espécies nativas mais citadas como de uso popular estão representadas nas famílias Bignoniaceae, Anacardiaceae, Asteraceae, Leguminosae, Annonaceae, Apocynaceae, Lamiaceae e Euphorbiaceae. A entrada dos fitoterápicos no mercado está vinculada aos estudos científicos necessários para que a população tenha acesso a uma terapia alternativa de qualidade, haja visto que as exigências em segurança, eficácia e qualidade, estabelecidas pelas agências regulamentadoras se tornam cada vez mais rígidas (PUPO et al., 2007).

Neste contexto, o trabalho de dissertação intitulado de **“Estudos farmacológicos e ensaios pré-clínicos com 1,3-diestearil-2-oleil-glicerol (TG1) derivado de *Platonia insignis* Mart”**, foi organizado em capítulos originados de artigos científicos e submetidos a revistas nacionais com ampla divulgação na comunidade científica. Foram realizados testes em modelos experimentais já validados e diversos equipamentos foram utilizados para os experimentos *in vivo*, a saber: esQUIVA passiva, labirinto em T elevado e teste aquático de Morris. Os testes *in vitro* foram realizados em espectrofotômetro.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

- Avaliar as propriedades farmacológicas do 1,3-diestearil-2-oleil-glicerol (TG1), bem como investigar seus efeitos toxicológicos;

2.2 Objetivos Específicos

- Avaliar a toxicidade aguda em ratos, e identificar possíveis alterações sobre os parâmetros bioquímicos e hematológicos.
- Realizar análises histopatológicas das áreas cerebrais hipocampo e corpo estriado, e do fígado de ratos adultos tratados por via oral com 1,3-diestearil-2-oleil-glicerol (TG1).
- Avaliar propriedade anticolinesterásica e antioxidante do 1,3-diestearil-2-oleil-glicerol (TG1) *in vitro* e em modelos experimentais em ratos adultos.
- Realizar testes de memória em ratos adultos, por meio dos testes Esquiva passiva, Labirinto em T elevado e Teste Aquático de Morris.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1. A Doença de Alzheimer

A doença de Alzheimer (DA) mesmo tendo uma etiologia complicada, tem como característica marcante, o declínio progressivo da cognição e da memória. As manifestações clínicas mais evidentes são perda progressiva da memória, problemas na cognição, e mudança de personalidade. Vários estudos têm demonstrado que o estresse oxidativo, bem como os danos observados nas terminações nervosas colinérgicas e o depósito do peptídeo β -amilóide podem explicar a fisiopatologia dessa enfermidade (VITRAC et al., 2010; YANG et al., 2011). É atualmente a desordem neurodegenerativa com maior número de casos diagnosticados no mundo. Além disso é uma patologia que apresenta anormalidades no metabolismo da glicose, onde verifica-se uma diminuição da sua utilização, e ainda alterações na metabolização do fosfato energético adenosina trifosfato (ATP). Os distúrbios no metabolismo energético estão intrínsecamente associados ao aumento do estresse oxidativo, o qual pode ser resultado de oxidação de biomoléculas, e início de excitotoxicidade neuronal (TOTA et al., 2010). Em suma, a doença de Alzheimer é uma das formas de demência mais comuns em boa parte da população idosa e de interesse para as pesquisas por novos fármacos para o seu tratamento (MUKHERJEE et al., 2007).

Essa doença compromete progressivamente o cotidiano do portador, além de apresentar uma série de sintomas neuropsiquiátricos e alterações comportamentais. Considerando que a população de idosos no Brasil é de 15 milhões de pessoas, pode ser estimado que aproximadamente 1,1 milhão de pessoas são portadores dessa demência. A doença se instala de forma insidiosa, desenvolvendo-se de forma lenta e continuamente ao longo dos anos. A idade e a história familiar da doença representam os principais fatores de risco. Sua etiologia ainda é desconhecida, dentre as alterações já observadas, podem ser destacadas as alterações nas conexões neurofibrilares, as placas neuríticas e as alterações do metabolismo amilóide, caracterizado pela deposição de fragmentos de aminoácidos da proteína β -amilóide, formando as placas senis (PCDT, 2010).

Na progressão dessa doença também pode ser observado as perdas sinápticas e a morte neuronal culminando em lesão cerebral. O déficit colinérgico, observado após estudo em cérebros de cadáveres motivou as pesquisas por inibidores da enzima acetilcolinesterase (AChE), que é a enzima responsável pela hidrólise do neurotransmissor acetilcolina. Essa intervenção, em curto prazo melhora a cognição e outros sintomas dessa doença, como o comprometimento do comportamento e da realização das tarefas diárias pelo portador da DA, de forma leve a moderada. O primeiro inibidor da AChE utilizado terapeuticamente foi a

tacrina. Em seguida foram descobertos e aplicados a clínica a donepezila, rivastigmina e galantamina. Esses medicamentos tiveram sua eficácia determinadas em ensaios clínicos e são capazes de modificar as manifestações da DA (PCDT, 2010).

3.2 .Ácidos graxos

Os componentes lipídicos, especialmente os ácidos graxos, encontram-se nas mais diferentes formas de vida, respondendo por importantes funções nas membranas celulares e nos processos metabólicos (YEHUDA et al., 2002). Os ácidos graxos poliinsaturados tem sido alvo de vários estudos. Destaca-se a sua importância, em diversas doenças, principalmente degenerativas, como a doença de Alzheimer, Parkinson e esclerose amiotrófica (SUMIYOSHI et al., 2008). Aproximadamente 70% do peso seco da bainha de mielina, é de lipídeos, dentre os quais citamos os esfingolipídeos, cerebrosídeos, sulfatídeos, e esfingomielinas. Um dos ácidos graxos mais comuns, dentre os esfingolipídeos é o ácido nervônico, que corresponde ao componente majoritário dos cerebrosídeos e sulfatídeos da bainha de mielina (SANDHOFF, 2010).

Pesquisadores investigaram a taxa do ácido docosahexanóico (DHA) no fígado de portadores da doença de Alzheimer, e verificaram uma concentração reduzida deste ácido graxo poliinsaturado. O DHA é precursor de diversos ácidos graxos essenciais para o funcionamento dos neurônios, entre eles o ácido tetracosanóico, um esfingolipídeo formador da bainha de mielina dos neurônios (ASTARITA et al., 2010). Outro estudo reportou que a administração dietética de DHA em animais com doença de Alzheimer (DA) induzido está relacionada com uma melhora na cognição, facilitação da memória, proteção da integridade da membrana lipídica e das funções celulares neuronais (OSTER; PILLOT, 2010; JICHA; MARKERBERY, 2010).

Dentre os efeitos de compostos obtidos de plantas medicinais para o tratamento dessa doença pouco se conhece sobre a eficácia de ácidos graxos sobre a fisiopatologia da DA. Os ácidos graxos, do ponto de vista bioquímico apresentam-se como hidrocarbonetos de cadeia alifática ligada ao um grupo carboxila, e são designados como ácidos graxos monoinsaturados ou poliinsaturados, de acordo com a presença e número de duplas ligações entre os carbonos (SHAPIRO et al., 2011).

Os lipídios encontrados na dieta constituem uma fonte de ácidos graxos essenciais para o organismo dos seres humanos, sendo destacada a presença dos ácidos linoléicos e linolênicos. Além desses, o ácido alfa-linolênico, Omega-3, é o precursor dietético do ácido

eicosapentaenóico (EPA) e do ácido docosahexaenóico (DHA). Por sua vez, o ácido linoléico, Omega-6, é o precursor do ácido araquidônico (AA). Os ácidos graxos são importantes para o balanço energético, biossíntese de membranas, produção de eicosanóides e outras funções especializadas.

Além disso, os metabólitos dos ácidos graxos do Omega-6 possuem atividades pró-inflamatórias, ao passo que os ácidos graxos do Omega-3, tendem a ser antiinflamatórios, reforçando, assim, a necessidade de estudos com esses compostos com relação aos seus efeitos sobre o SNC e sua segurança quanto ao uso por humanos (RUNG, 2010).

Os ácidos graxos poli-insaturados estão envolvidos em diversas atividades no organismo humano, como a sinalização celular, regulação da atividade enzimática, síntese de eicosanóides, regulação da migração neuronal, determinação da plasticidade sináptica e modulação da produção de citocinas que possuem atividade neuromodulatória e/ou neurotransmissora. E, portanto, provavelmente responde pela fisiopatologia de alguns transtornos psiquiátricos como a esquizofrenia, a DA, a ansiedade e a depressão. Estudos evidenciaram a relação entre a suplementação de ácido eicosapentaenóico (EPA) e ômega-3, bem como a melhora dos sintomas da esquizofrenia, reforçando o nosso interesse em investigar o papel dos ácidos graxos na fisiopatologia da DA (ZENDEGS et al., 2010). Os ácidos graxos do tipo oleico e linoleico demonstraram atividade antimicrobiana em estudos com espécies de plantas secas, sugerindo um possível efeito farmacológico para o grupo de compostos derivados de ácidos graxos (FACHINETTO et al., 2007).

Um outro estudo evidenciou que o butirato, ácido graxo de cadeia curta, revelou atividade antihiperlipemizante, por diminuir a resistência à insulina periféricamente e o propionato, também um ácido graxo de cadeia curta, ao ser biotransformado pelo metabolismo hepático estimula a gliconeogênese e a síntese de lipídeos (BRAGA et al., 2010). Outra propriedade apontada em trabalho recente, é seu uso como carreadores de fármacos, por otimizar a distribuição e absorção, melhorando a biodisponibilidade após administração oral, uma vez que melhoram a permeabilidade intestinal dos fármacos, e promovem também uma absorção seletiva nos tecidos alvos. E quando conjugados com medicamentos para administração parenteral, prolongam a meia-vida, e facilitam a entrega no local específico de ação potencializando seus efeitos farmacológicos (HACKETT et al., 2012).

Alguns óleos comestíveis são compostos de ésteres de ácidos graxos, a exemplo do glicidol. Esse composto é apontado como um possível agente cancerígeno animal. Uma avaliação sobre sua genotoxicidade por meio de ensaios como teste de mutação bacteriana

reversa, teste de micronúcleo e teste de aberração cromossômica em cultura de células, indicaram que o glicidol não oferece maiores riscos a saúde, reforçando a necessidade de ensaios pré-clínicos para avaliar a segurança desses bioprodutos (IKEDA et al., 2012). Os ácidos graxos (cáprico e caprílico) podem ser utilizados em nutrição parenteral em indivíduos que necessitam de suplementação nutricional. Devido a esse uso, estudos toxicológicos em diversos modelos animais foram realizados, dentre eles, teste de indução de hipersensibilidade (testes oculares e dérmicos), experimentos de toxicidade por administração oral e parenteral e ensaios para avaliar sua carcinogenicidade. Os resultados apontaram que esses ácidos graxos possuem pouco ou nenhum risco de toxicidade, quando consumido como suplementação, sugerindo que seu uso pode ser feito de forma seguro. Diante disso, essa revisão de literatura reforça necessidade da realização do presente estudo (TRAUL et al., 2000).

Para tanto, foi selecionado para o desenvolvimento dessa dissertação de mestrado o composto 1,3-diestearil-2-oleil-glicerol, denominado aqui de TG1 (**Figura 1**), que corresponde a um triglicerídeo isolado anteriormente por prévios estudos do nosso grupo de pesquisa a partir do extrato hexânico das sementes de *Platonia insignis* Mart.

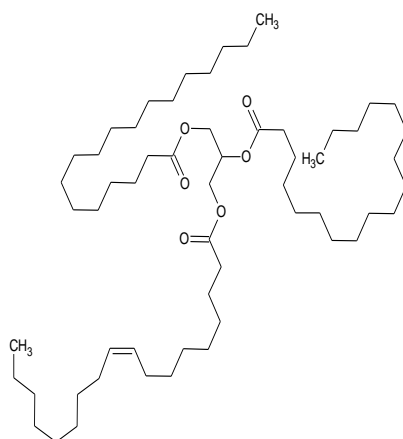


Figura 1: Estrutura química do 1,3-diestearil-2-oleil-glicerol (TG1).

Fonte: COSTA JÚNOR (2012)

A substância 1,3-diestearil-2-oleil-glicerol é um derivado da trioleína, solúvel em solventes apolares. Possui fórmula molecular $C_{58}H_{112}O_6$ e ponto de ebulição $554\text{ }^{\circ}\text{C}$. Sua composição estrutural é formada por C (76,93%), H (12,47%) e O (10,60%), e apresenta massa molecular de 885.43 u.m.a. É um composto semissólido com ponto de fusão igual a $5\text{ }^{\circ}\text{C}$, de densidade $0,97\text{ g/cm}^3$, e pouco explorado quanto as suas propriedades farmacológicas e toxicológicas. Diante disso, pode ser destacado que até o presente momento não há relatos sobre o TG1 quanto a sua segurança em ensaios pré-clínicos e eficácia em modelos farmacológicos, justificando mais uma vez a necessidade da realização desse estudo.

Nesse trabalho foi avaliada a toxicidade em ensaios pré-clínicos e exploradas as propriedades anticolinesterásica e antioxidante do composto por meio de ensaios *in vitro* e *in vivo*, respectivamente. Além disso, foram realizados testes de memória em animais (Esquiva passiva, Labirinto em T elevado e Teste Aquático de Morris), visando avaliar a hipótese de que o composto TG1 pode ser uma alternativa terapêutica para o delineamento de novos fitomedicamentos para o tratamento de doenças como o Mal de Alzheimer, Parkinson, Câncer e Esclerose Múltipla.

REFERÊNCIAS

AGRA, M.F.; SILVA, K.N.; BASÍLIO, I.J.L.D.; FREITAS, P.F.; BARBOSA-FILHO, J.M. Survey of medicinal plants used in the region Northeast of Brazil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n. 3, p. 472-508, 2008.

ASTARITA, G.; JUNG, K.; BERCHTOLD, N.C.; NGUYEN, V.Q.; GILLEN, D. L. Deficient liver Biosynthesis of Docosahexaenoic Acid correlates with cognitive Impairment in Alzheimer's Disease. **PLoS ONE**. V. 5. P. 1-8, 2010.

BRAGA, A.; MEDEIROS, T.P.; ARAÚJO, B.V. Investigação da atividade antihiperlicemiante da farinha da casca de *Passiflora edulis* Sims, Passifloraceae, em ratos diabéticos induzidos por haloxano. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v. 20, n. 2, p. 186-191. 2010.

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

FACHINETTO, J.M.; BAGATINI, M.D.; DURIGON, J.; DA SILVA, A.C.F.; TEDESCO, S.B. Efeito anti-proliferativo das infusões de *Achyrocline satureioides* DC (Asteraceae) sobre o ciclo celular de *Allium cepa*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v. 17, n. 1, p. 49-54. 2007.

FEITOSA, C.M.; LUZ, N.N.; FREITAS, R.M.; BEZERRA, M.Z.B.; TREVISAN, M.T.S. Acetylcholinesterase Inhibition by some promising Brazilian Medicinal Plants. **Brazilian Journal of Biology**.v. 71, p. 783-790, 2011.

FRANCO, I.J.; FONTANA, V.L. **Ervas & plantas: a medicina dos simples**. 8^a. ed. Erechim, RS: Edelbra, 2003.

GEBHARDT, R. *In vitro* screening of plant extracts and phytopharmaceuticals: novel approaches for the elucidation of active compounds and their mechanisms. **Planta Medica**, v. 66, n. 2, p. 99-105, 2000.

HACKETT, M.J.; ZARO, J.L.; SHEN, W.C.; GULEY, P.C.; CHO, M.J. Fatty acids as therapeutic auxiliaries for oral and parenteral formulations. **Advanced Drug Delivery Reviews**. 2012 – *in press*.

IKEDA, N.; FUJII, K.; SARADA, M.; SAITO, H.; KAWABATA, M.; NARUSE, K.; YUKI, K.; NAKAGIRI, H.; HONDA, H.; TAMAKI, Y.; NISHIYAMA, N.; KASAMATSU, T. Genotoxicity studies of glycidol fatty acid ester (glycidol linoleate) and glycidol. **Food and Chemical Toxicology**. v. 50, p. 3927-3933, 2012.

JICHA, G. A.; MARKESBERY, W. R. Omega 3 fatty acids: potential role in the management of early Alzheimer's disease. **Clin Interv Aging**. v. 5. p. 45-61, 2010.

MACIEL, M.A.M.; PINTO, A.C.; VEIGA JR, V.F.; GRYNBERG, N.F.; ECHEVARRIA, A. Plantas Medicinais: A Necessidade de Estudos Multidisciplinares. **Química Nova**, v. 25, n. 3, p. 429-438, 2002.

MINISTÉRIO DA SAÚDE, Secretaria de Atenção à Saúde. Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas (PCDT) - Doença de Alzheimer. **PORTARIA Nº 491, DE 23 DE SETEMBRO DE 2010**.

MUKHERJEE, P.K.; KUMAR, V.; MAINAK, M.; HOUGHTON, P.J. Acetylcholinesterase inhibitors from plants. **Phytomedicine**. v. 14, p. 289-300, 2007.

OSTER, T.; PILLOT, T. Docosahexaenoic acid and synaptic protection in Alzheimer's disease mice. **Biochimica et biophysica Acta**. v. 1801, p. 791 -798, 2010.

PUPO, M.T.; GALLO, M.B.C.; VIEIRA, P.C. Biologia Química: Uma Estratégia moderna para pesquisa em produtos naturais. **Química Nova**. v. 30, p. 1446-1455, 2007.

RUNG, P.A. Tese de Mestrado: **A Influência da Restrição de ácidos graxos essenciais no Desenvolvimento da Retina de ratos**. Universidade Federal Fluminense. Niterói. Brasil. 2010.

SANDOHOFF, R. Very long chain sphingolipids: Tissue expression function and synthesis. **FEBS letters**. v. 584. p. 1907-1913, 2010.

SHAPIRO, H.; TEHILLA, M.; SINGER, J.A.; BRUCK, R.; LUZZATTI, R.; SINGER, P. The therapeutic potential of long-chain omega-3 fatty acids in nonalcoholic fatty liver disease. **Clinical Nutrition**. v. 30, p. 6-19, 2011.

SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P.R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 2ed. Porto Alegre/Florianópolis. 221-320p. 2000.

STOPFORD, C.L.; SNOWDEN, J.S.; THOMPSON, J.C.; NEARY, D. Distinct memory Profiles in Alzheimer's Disease. (Cerebral Function Unit, Greater Manchester Neuroscience Centre, Hope Hospital, Salford). **Cortex**. v. 43, p. 846-857, 2007.

SUMIYOSHI, T.; MATSUI, M; ITOH, H; HIGUCHI, Y ; ARAY, H; TAKAMIYA, C; KURACHI, M; Essential polyunsaturated fatty acids and social cognition in schizophrenia. **Psychiatry Research**. v. 157 .p. 87-93, 2008.

TOTA, S.; AWASTHI, H.; KAMAT, P.K.; NATH, C.; HANIF, K. Protective effect of quercetin against intracerebral streptozocin induced reduction in cerebral blood flow and impairment of memory in mice. **Behavioral Brain Research**, 2010.

TRAUL, K.A.; DRIEDGER, A.; INGLE, D.L.; NAKHASI, D. Review of the Toxicologic Properties of Medium-chain Triglycerides. **Food and Chemical Toxicology** v. 38, p. 79-98, 2000.

VITRAC, C.H.; BERBILLE, H.; MÉRILLON, J.M.; VITRAC, X. Soy isoflavones as potential inhibitors of Alzheimer β -amyloid fibril aggregation *in vitro*. **Food Research International**. v. 43, p. 2176-2178, 2010.

YANG, H.; JIN, G.; REN, D.; LUO, S.; ZHOU, T. Mechanism of isoflavone aglycone's effect on cognitive performance of senescence-accelerated mice. **Brain and Cognition**, v. 76, p. 206-210, 2011.

YEHUDA, S.; RABINOVITZ, S.; CARASSO, R. L.; MOSTOFSKY, D. I. The role of polyunsaturated fatty acids in restoring the aging neuronal membrane. **Neurobiol Aging**. v. 23. P. 843-853, 2002.

ZENDEGS, J.C.S.; PIMENTEL, G.D.; PRIEL, M.R. Ácidos graxos Omega 3 e tratamento da esquizofrenia. **Revista de Psiquiatria Clínica**. v. 37, n. 5, p. 223-227, 2010.

CAPÍTULO I: Levantamento das propriedades físico-químicas e farmacológicas de extratos e compostos isolados de *Platonia insignis* Mart: uma perspectiva para o desenvolvimento de fitomedicamentos.

(Artigo submetido à Revista Brasileira de Farmácia)

Levantamento das propriedades físico-químicas e farmacológicas de extratos e compostos isolados de *Platonia insignis* Mart: uma perspectiva para o desenvolvimento de fitomedicamentos.

Patricia Régia Pereira dos Santos¹, Rusbene Bruno Fonseca de Carvalho², Joaquim Soares da Costa Júnior³, Rivelilson Mendes de Freitas¹ & Chistiane Mendes Feitosa^{1,2*}

¹Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Piauí, Campus Ministro Petrônio Portela, Teresina – PI, Brasil.

²Departamento de Química, Centro de Ciências da Natureza, Universidade Federal do Piauí, Campus Ministro Petrônio Portela, Teresina – PI, Brasil.

³Instituto Federal do Piauí, Campus Teresina Central, Teresina – PI, Brasil.

* Email: chistiane@ufpi.edu.br - Universidade Federal do Piauí, Centro de Ciências da Natureza, Departamento de Química, Campus Universitário Ministro Petrônio Portella, Ininga, 64049-550 - Teresina, PI - Brasil

RESUMO

A espécie *Platonia insignis* Mart., popularmente conhecida como bacuri pode ser considerada uma fonte promissora de compostos bioativos para o delineamento de novos fitomedicamentos. Este trabalho teve como objetivo realizar um levantamento bibliográfico sobre os extratos mais estudados e compostos bioativos isolados dessa espécie. Os achados para fundamentação desse trabalho foram realizadas em banco de dados como: Science Direct, LILACS, Scielo, Pub Med, teses de doutorados, dissertação de mestrados e Google acadêmico, tendo como pré-requisito inarredável a relevância da informação, e nem tanto o tempo da publicação. Dentre os extratos de *P. insignis* foi verificado que os mais estudados foram o hexânico, etanólico e o metanólico. Nesses extratos foram investigadas diversas propriedades farmacológicas: antioxidante, antiinflamatória e cicatrizante. Dentre os compostos isolados foram identificados e determinados estruturalmente: euxantonas, ácido ascórbico, polifenóis, bem como as benzofenonas preniladas a saber: 7-epiclusianona e guttiferona-A. Além desses achados, identificou-se a substância garcinielliptona FC (GFC), inédito no gênero, que demonstrou potencial antioxidante. A atividade antioxidante apontada nessa espécie pode estar diretamente relacionada ao teor de fenóis totais. Os achados encontrados na literatura indicam que a espécie *P. insignis* bastante consumida no Nordeste do Brasil, apresenta extratos e compostos que podem ser melhor caracterizados para sua utilização na formulação de novas formas farmacêuticas.

Palavras-chave: Fitomedicamentos, *Platonia insignis* Mart., Propriedades farmacológicas.

ABSTRACT: Survey of physicochemical and pharmacological properties of extracts and compounds isolated from *Platonia insignis* Mart. a perspective for developing phytomedicines.

The species *Platonia insignis* Mart., Popularly known as bacuri can be considered a promising source of bioactive compounds for the design of new phytomedicines. This study aimed to conduct a bibliographic survey on the most studied extracts and bioactive compounds isolated from this species. The search for grounding this paper were performed in the database as: Science Direct, LILACS, SciELO, Pub Med, Masters dissertation and PhD theses, academic Google. Having a prerequisite unwavering relevance of information, and not so much the time of publication. Among the extracts of the *P. insignis* was determined that the most studied were hexane, the ethanol and methanol. In these extracts were investigated various pharmacological properties: antioxidant, anti-inflammatory and cicatrizante. Furthermore was verified the cytotoxicity and genotoxicity of these extracts. Among the isolated compounds were identified and structurally determined: euxantones, ascorbic acid, polyphenols, as well as prenylated benzophenones to know ; 7-epiclusianone and guttiferona-A. In addition to these, was determined the compound garcinielliptona FC (GFC), unprecedented in the genre, which showed antioxidant potential. The antioxidane activity pointed this species may be directly related to the content of phenols totals. Os findings in the literature indicate that the species *P. insignis* widely consumed in the Northeast of Brazil, presents extracts and compounds that can be best characterized for its use in the formulation of novel dosage forms.

KEYWORDS: Pharmacological properties, Phytomedicines, *Platonia insignis* Mart.

INTRODUÇÃO

Nas áreas de ocorrência natural, o bacurizeiro (*Platonia insignis* Mart) recebe diferentes denominações comuns. Foram compiladas para a espécie em estudo um total 28 sinonímias populares. “Bacuri”, palavra de origem tupi que significa “o que cai logo que amadurece”, devido ao fato de que o fruto é normalmente coletado, e não colhido, uma vez que as plantas possuem porte elevado, e por ser difícil identificar o tempo certo de maturação para a colheita (MOURA et al., 2007).

O bacuri é o fruto da espécie *P.insignis* Mart., pertencente à família Clusiaceae, subfamília Clusioideae e ao gênero *Platonia*. A família Clusiaceae é composta por 1000 espécies e 47 gêneros, distribuídos em regiões tropicais e subtropicais do mundo. É também um gênero encontrado em regiões temperadas. Em nove destes, 90 espécies tem os frutos comestíveis. O termo *Platonia* é uma homenagem a Platão, filósofo grego, e *insignis*, significa notável, insigne, importante, grande, aquele que chama a atenção, em alusão ao porte e à utilidade da planta, bem como, ao tamanho, sabor e aroma do fruto (BARROSO et al., 2002; MOURA et al., 2007).

Platonia insignis é uma espécie frutífera e madeireira, tem origem na Amazônia Oriental Brasileira, no Estado do Pará e é encontrada em todos os estados da Região Norte do Brasil e no Mato Grosso, Maranhão e Piauí. Fora do território Nacional, é também encontrado nas Guianas, Peru, Bolívia, Colômbia e Equador. Assume importância econômica nos Estados do Pará, Maranhão, Tocantins e Piauí, em áreas de vegetação secundária (SOUZA et al., 2000; MOURA et al., 2007).

Até o século XIX, os recursos terapêuticos constituíam-se em sua maior parte por plantas e extratos vegetais, estes representavam os medicamentos utilizados. O seu emprego com fins terapêuticos era alicerçado no conhecimento popular e científico. Nesse cenário as plantas medicinais eram empregadas de modos generalizados das mais diversas formas, como fornecedoras de substâncias ativas isoladas, extratos totais, extratos purificados ou selecionados, e droga íntegra na preparação de infusos ou decoctos (SIMÕES et al., 2000).

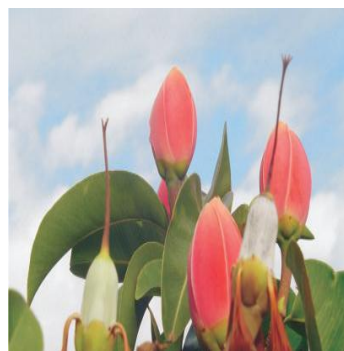
Um produto fitoterápico, segundo a Portaria N° 6 da Secretaria de Vigilância Sanitária do Ministério da Saúde do Brasil (1995) preserva a integridade química e farmacológica do vegetal de origem, assegurando sua ação biológica e uso seguro. Além de valorizar seu potencial terapêutico. Esse fim percorre um longo caminho caracterizado por estudos prévios relativos a aspectos botânicos, agrônômicos, fitoquímicos, farmacológicos, toxicológicos, de desenvolvimento de metodologias analíticas e tecnológicas. Todo esse embasamento científico o diferencia das plantas medicinais e das preparações usadas na medicina popular (SIMÕES et al., 2000).

Este estudo objetiva fazer um levantamento sobre os aspectos físico-químicos de *P.insignis*, e das propriedades farmacológicas dos extratos estudados, bem como os compostos bioativos já isolados de *P. insignis* Mart.

1. Fitomedicamentos no Brasil.

No fim dos anos 50, com o desastre da talidomida, os órgãos fiscalizadores sanitários passaram a exercer um maior controle sobre o uso de medicamentos. Foram estabelecidas normas para o emprego de fitoterápicos no Brasil, representadas pelo Serviço Nacional de Fiscalização da Medicina e da Farmácia. A normatização dos fitoterápicos foi atrelada às exigências inerentes a esses produtos, compreendendo: realização concomitante de estudos toxicológicos pré-clínicos e clínicos (Portaria SVS nº116 de 08/08/1995). A portaria SVS nº1.029/98, por sua vez agrega procedimento de registro simplificado para produtos fitoterápicos tradicionais aprovados pelo SVS (SIMÕES et al., 2000).

O interesse gradativo por medicamentos obtidos de plantas medicinais, mais especificamente os fitoterápicos, a possibilidade de implementação da fitoterapia no sistema público de saúde nacional e, ainda, as resoluções RDC nº 17 de 24/02/2000 e RDC nº 48 de 16/03/2004, regulamentadoras do registro de fitoterápicos no Brasil, fomentaram as publicações referentes a etnofarmacologia, apontando as espécies mais popularmente conhecidas e utilizadas, tanto entre populações indígenas quanto em urbanas, assim como a utilização de fitoterápicos em farmácias comunitárias e no sistema de saúde. As espécies nativas mais citadas como de uso popular estão representadas nas famílias Bignoniaceae, Anacardiaceae, Asteraceae, Leguminosae, Annonaceae, Apocynaceae, Euphorbiaceae, Leguminosae, Piperaceae, Euphorbiaceae, Rubiaceae, Rutaceae, Lamiaceae, Meliaceae, Annonaceae, Solanaceae, Clusiaceae, Myrtaceae, Apocinaceae e Combretaceae, respectivamente em ordem decrescente de citações (PUPO et al., 2007).



A

B

C

Figura 1: *Platonia insignis*-(**A**) Árvore, (**B**) Frutos, (**C**) Flores . (MOURA et al., 2007a).

2. Uso popular do Bacuri

O fruto do bacuri, rico em vitaminas, aminoácidos e minerais é bastante apreciado do ponto de vista culinário (sucos, sorvetes, iogurtes, pudins, doces e cremes). A graxa de bacuri, obtida do óleo das sementes, é bastante utilizada por sua ação antiinflamatória. E seu uso no tratamento de queimaduras, é comumente citado. A “banha de bacuri” é usada na medicina popular como cicatrizante e no tratamento de doenças dermatológicas (AGRA et al., 2007; BEZERRA et al., 2005; MOURA et al., 2007; SHANLEY & MEDINA, 2005). Sob o aspecto econômico-madeireiro, tem grande potencial na produção de madeira de lei, compacta e resistente de alta qualidade. O beneficiamento das sementes pode gerar o farelo, que pode ser aproveitado como adubo, e alimentação animal (AGUIAR, 2006).

A polpa do fruto tem sabor e odor agradáveis, de grande aceitação popular, tanto “in natura”, quanto no preparo de sorvetes, compotas e geleias. A casca também pode ser usada para fabricação de doces, cremes e sorvetes, aumentando o rendimento do fruto. Esse processo deve ocorrer após separação da resina existente nessa parte do fruto (AGUIAR, 2006). Seu fruto é do tamanho de uma laranja, redondo de casca grossa, cor amarelo-citrino, com polpa viscosa e muito saborosa, quando maduro exala um perfume suave e fragrância semelhante ao jasmim (FONSECA, 1954).A figura 1 ilustra a árvore, fruto e a flor da espécie *P. insignis* Mart.

O uso de plantas medicinais, seus extratos e substâncias isoladas (princípio ativo), vêm crescendo no cuidado primário à saúde, e como justificativa dentre vários fatores, podemos citar a sua franca aceitabilidade, disponibilidade e baixo custo (KOLEVA et al., 2002; BALUNAS et al., 2006; VARANDA, 2006).

3. Principais produtos Naturais- Fitoquímica e Farmacologia

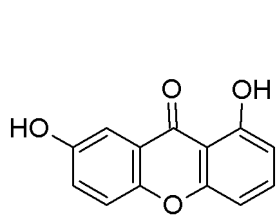
O gênero *Platonia* é muito rico em diversas substâncias naturais como xantonas (Euxantonas) **(A)**, ácidos graxos, e triglicerídeos (ROBERTS, 1961; HILDITCH & PATHAK, 1949; BENTES et al., 1986). Estudos recentes com a polpa da fruta detectaram o ácido ascórbico **(B)**, e polifenóis como principais compostos bioativos (CLERICI & CARVALHO-SILVA, 2011). As xantonas respondem pelas propriedades farmacológicas como antitumorais, antiinflamatória, antitrombótica, antimicrobial e efeitos neurofarmacológicos, induzindo a formação de neurites no tecido nervoso (MAK et al., 2000; HA et al., 2006).

O estudo fitoquímico dos extratos hexânico do pericarpo e metanólico das sementes do bacupari, *Garcinia brasiliensis*, revelou a presença das benzofenonas preniladas, 7-epiclusianona **(C)** e guttiferona-A **(D)**, respectivamente. Esta espécie é da mesma família do bacuri. Tanto os extratos, quanto os compostos, foram apontados como possibilidades terapêuticas para doenças causadas por microorganismos gram negativos (NALDONI et al., 2009). O composto acilfloroglucinol, um policíclico poliprenilado (APPs), isolado da família clusiaceae, tem despertado interesse dos pesquisadores por suas propriedades antimicrobianas (OLIVEIRA et al., 1999), leishmanicida (PEREIRA et al., 2010), antidepressiva (CUESTA-RUBIO et al., 2002), antioxidante (CUESTA-RUBIO et al., 2002, CIOCHINA & GROSSMAN, 2006; CHEN et al., 2010), citotóxica (BAGGETT et al., 2005), antiretroviral (PICCINELLI et al., 2005), antiinflamatória (WENG et al., 2004), antitumoral (ZEISSER-LABOUÉBE et al., 2006; HENRY et al., 2009).

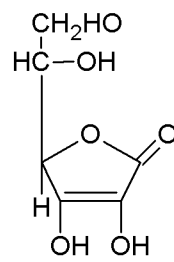
Em estudos de compostos voláteis da polpa de bacuri as análises revelaram a presença de alcoóis terpênicos, sendo o mais abundante o linalol **(E)** (ALVES & JENNINGS, 1979; BOULANGER et al., 1999; ROGEZ et al., 2004; FRANCO & JANZANTTI, 2005). As cascas de *P. insignis* apresentam alto teor de euxantona (1,3%), substância cristalina de cor amarela, em forma de agulhas ou lâminas, com ponto de fusão de 240 °C e facilmente sublimável (ROBERTS, 1961).

O estudo fitoquímico das frações lipídicas das sementes de bacuri revelou a presença dos ácidos palmítico (44,2%), palmitoléico (13,2%), esteárico (2,3%), oléico (37,8%) e linoléico (2,5%), além de 10% de tripalmitina, indicando-o como uma boa alternativa para a indústria de óleo (Bentes et al., 1986). A substância Garcinielliptona FC (GFC) **(F)** é uma benzofenona poliprenilada, isolada do extrato hexânico das sementes do bacuri, é inédita no gênero *Platônia*. O composto -1,3-diestearil-2-oleil-glicerol (TG1) **(G)**, um triacilglicerídeo

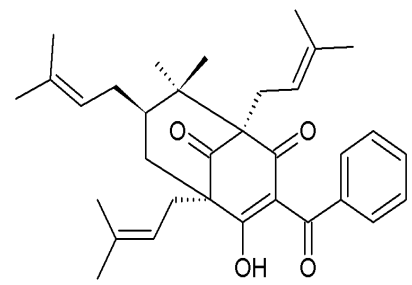
também isolado do mesmo extrato dessa espécie. Porém, não há relato na literatura de testes farmacológicos descritos para este composto (COSTA JÚNIOR, 2011). O fruto desta espécie também é rico em β -caroteno (RODRIGUEZ-AMAYA et al., 2008). A figura 2 representa essas principais substâncias isoladas.



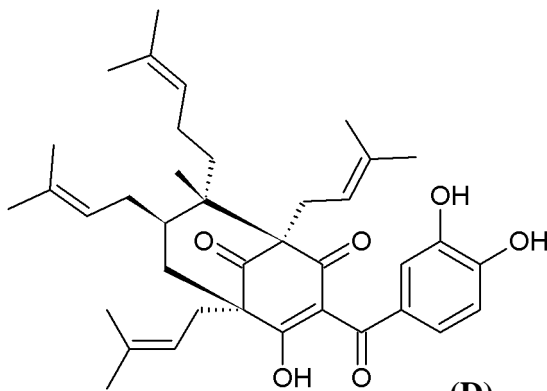
(A)



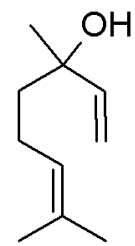
(B)



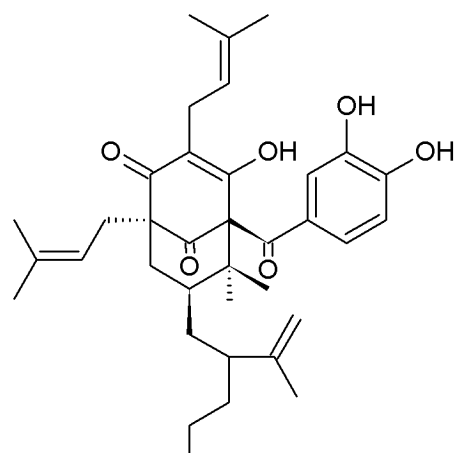
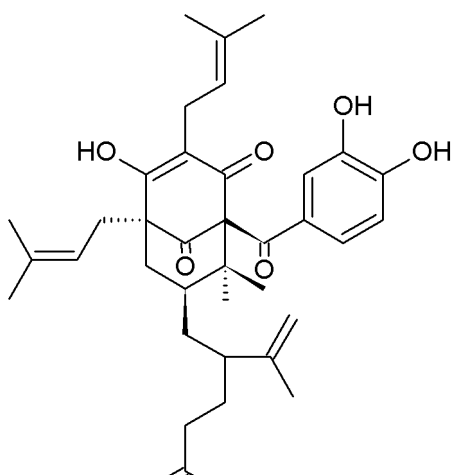
(C)



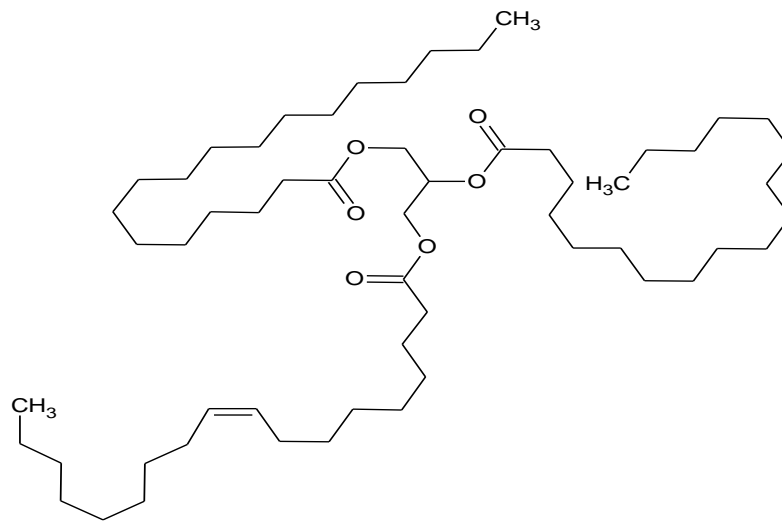
(D)



(E)



(F)



(G)

Figura 2: Principais substâncias isoladas de *P. insignis* e Família clusiaceae.

Na tabela 1, relacionamos as principais substâncias bioativas extraídas de *P. insignis* Mart., presentes na polpa, casca do fruto ou nas sementes, e suas propriedades farmacológicas

Tabela 1: Principais substâncias bioativas de *Platonia insignis* Mart. Propriedades farmacológicas apontadas.

Substância bioativa	Propriedades Farmacológicas	Referências
---------------------	-----------------------------	-------------

Xantonas	Antitumoral Antiinflamatória Antitrombótico Antimicrobiana Neurofarmacológicas	(Roberts, 1961) (Mak et al., 2000) (Ha et al., 2006)
Ácidos graxos	Acelera cicatrização	(Calder, 2003) (Cardoso et al., 2004) (Hatanaka & Curi, 2007) (Costa Júnior et al., 2011)
Acilfloroglucinol policíclico poliprenilado	Antimicrobiana Leishmanicida Antidepressiva Antioxidante Citotóxica	(Oliveira et al., 1999) (Pereira et al., 2010) (Cuesta-Rubio et al., 2002) (Ciochina & Grossma, 2006) (Chen et al., 2010) (Baggett et al., 2005)
Euxantona	Antiretroviral Antiinflamatória Antitumoral Antiinflamatória Vasodilatadora	(Piccinelli et al., 2005) (Weng et al., 2004) (Zeisser-Labouebe et al., 2006) (Wu et al., 2008) (Fang et al., 2006) (Ha et al., 2006) (Naidu et al., 2007)
Garcinielliptona FC	Antioxidante	(Costa Júnior et al., 2011)

4. Aspectos físico-químicos da polpa de *P. insignis* Mart.

São apontadas como características físico-químicas da polpa do fruto avaliada em estudos recentes os teores de sólidos solúveis totais, pH, acidez total titulável, umidade e lipídios (Tabela 2). O teor de sólidos solúveis totais apresenta correlação com teores de açúcares e ácidos orgânicos (SILVA et al., 2002). Em seu trabalho, CANUTO e COLABORADORES (2010), mediram teor de compostos bioativos; ácido ascórbico, compostos fenólicos totais (Tabela 3) da polpa do bacuri, e correlacionou o último, com a atividade para remoção de radicais livres, ao afirmar que esta atividade, pode ser justificada pela presença de fenóis totais.

Tabela 2: Valores de umidade, lipídios, sólidos solúveis totais, pH e acidez total titulável da polpa de *P. insignis* Mart.

Propriedades	Valores
Umidade ¹	84,8 ± 0,8
Lipídios ¹	1,1 ± 0,6
sólidos solúveis totais ²	13,0 ± 1,8
pH	3,4 ± 0,2
acidez total titulável ³	2,9 ± 0,1

(1) expresso como g/100 g de polpa; (2) expresso em ° Brix; (3) expresso em mg ácido cítrico/100 g de polpa.

Dados expressos como média de duplicata ± desvio-padrão.

Fonte: (Canuto *et al.*, 2010)

Tabela 3: Teores de ácido ascórbico, fenóis totais e atividade antirradical livre da polpa de *P. insignis* Mart.

Amostra	Ácido ascórbico ¹	Fenóis totais ²	TEAC ³
polpa	0,2 ± 0,0	0,4 ± 0,0	0,6 ± 0,3

(1) Ácido Ascórbico, expresso em mg/100g de polpa; (2) Fenóis Totais, expresso como mmol.L-1 de ácido gálico; (3) Atividade Antirradical livre Equivalente ao Trolox, expresso como µmol.L-1 de Trolox. Dados expressos como média de duplicata ± desvio-padrão.

Fonte: (Canuto *et al.*, 2010).

Em outro estudo foi realizada uma caracterização físico-química das cascas e sementes do bacuri visando apontar aplicações na indústria química e de alimentos. Os resultados mostraram que as sementes ou caroços contêm em média $31,88 \pm 0,60\%$ de lipídeos, habilitando-os para sofrer processo de prensagem. Os teores de proteína presente na casca ($2,78 \pm 0,28\text{g}/100\text{g}$) e semente ($3,43 \pm 0,87\text{g}/100\text{g}$) são elevados se comparados a outros resíduos de frutas já estudados, como cupuaçu (*Theobroma grandiflorum* Schum) com 1,2%; pequi (*Caryocar brasiliense* Camb) que apresenta 2,3%. O teor de fibra insolúvel nivela-se ao da linhaça (*Linum usitatissimum* L.), mamona (*Ricinus communis* L.) e amendoim (*Arachis hypogaea* L.). Os resultados de pectina, importante fibra solúvel, foram bons quando comparados a outros resíduos cítricos, mostrando bom potencial de exploração na indústria de alimentos, como espessante e geleificante em uma grande variedade de produtos. Os

resultados para minerais foram heterogêneos, mas mostraram elevados teores de Mg^{+2} , Mn^{+2} , Na^+ , K^+ e Ca^{+2} . Dentre os ácidos graxos saturados e insaturados, podem ser destacados, os ácidos palmítico (40,6%), oléico (28%) e palmitoléico (22,1%). Os valores de umidade encontrados foram altos, o que recomenda a utilização rápida em processos de extração de insumos (SOARES, 2010).

5. Extratos de *Platonia insignis* Mart. – Avaliação farmacológica e Toxicológica.

A literatura registra os estudos fitoquímicos da casca, da polpa e da semente do bacuri. Em um trabalho previamente publicado, o estudo fitoquímico da casca das sementes foi realizado por meio da análise dos extratos hexânico e etanólico, e desse último, as frações acetato de etila e dicloro-metano (DCM). O extrato hexânico (EH) revelou potencial atividade leishmanicida frente às formas promastigotas de *L. amazonenses*, resultado semelhante foi reportado para as frações acetato de etila (ACoEt) e diclorometano (DCM), sendo esta última, de performance superior (COSTA JÚNIOR et al., 2011).

Em estudos de toxicidade frente à *Artemia salina leach*, o EH e a fração ACE, foram moderadamente citotóxicos, ao passo que a fração DCM foi fortemente citotóxica. Os extratos e as frações de *P. insignis* são genotóxicos em fibroblastos de pulmão de hamster chinês (céls.V79) (COSTA JÚNIOR et al., 2012).

Todos os extratos e frações de *P.insignis* Mart. apresentaram potencial antioxidante, pelos métodos DPPH•, ABTS•+ e *Saccharomyces cerevisiae*. O composto garcinielliptona FC (GFC), isolado do extrato hexânico exibiu ação antioxidante *in vitro* pelos métodos TBARS (substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico) e através do sequestro de radicais hidroxilas (OH) e óxido nítrico (NO) (COSTA JÚNIOR et al., 2011).

O extrato etanólico (EE) de *P. insignis* exibiu um efeito protetor, por sua ação antioxidante e anticonvulsivante, e um efeito estimulador no SNC em camundongos. A fração DCM também apresentou atividade anticonvulsivante (COSTA JÚNIOR et al., 2010).

O óleo das sementes de *P. insignis* Mart. revelou potencial cicatrizante, ao acelerar o processo de cicatrização de feridas cutâneas em ratos. (COSTA JÚNIOR et al., 2011).

Em estudos recentes, o extrato metanólico da polpa do bacuri revelou considerável efeito antioxidante, e presença de compostos bioativos como vitamina C, flavonóides, antocianinas e polifenóis (RUFINO et al., 2010). O extrato etanólico das cascas de bacuri resultou no isolamento da mistura dos esteróides sitosterol e estigmasterol identificados por RMN 1H e ^{13}C (SOUSA et al., 2009).

Foram avaliadas também duas manteigas da semente de bacuri, uma representando o extrato hexânico das sementes, extraída na UFPI (BBU) e outra manteiga industrializada (BBI). As manteigas foram analisadas quanto à atividade citotóxica em MTT (brometo de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolio), revelando baixa citotoxicidade e em estudos de toxicidade aguda em ratos não apresentaram resultados significativos. Os ensaios *in vitro* da atividade leishmanicida mostraram que as manteigas inibem significativamente formas promastigotas de *Leishmania Amazonenses*. Quanto à atividade anti-inflamatória das manteigas, por via oral, no modelo de edema de pata, induzido por carregenina, a BBI apresentou resultados superiores à BBU. O composto garcinielliptona GFC foi encontrado nas duas manteigas, porém em concentração maior na BBU (LUSTOSA, 2012).

CONCLUSÃO

A natureza é a mais promissora fonte de compostos bioativos, para produção de um fitomedicamento. Os estudos fitoquímicos e farmacológicos já realizados com extratos e compostos isolados da espécie *P. insignis* Mart. (bacuri) e citados nesse levantamento, indicam que os compostos isolados ou extratos são fontes promissoras para a elaboração de possíveis fitomedicamentos a partir dessa planta, bastante consumida no Nordeste do Brasil. As propriedades antiinflamatória, antioxidante, anticonvulsivante e citotóxica apresentadas por extratos e alguns compostos são importantes para a elaboração de um possível medicamento, com ação na terapêutica de diversas doenças, como Câncer, Mal de Alzheimer e Parkinson.

REFERÊNCIAS

AGRA, M.F.; FREITAS, P.F.; BARBOSA-FILHO, J.M. Synopsis of the plants known as medicinal and poisonous in Northeast of Brazil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, p. 114-140, 2007.

AGUIAR, L.P. **QUALIDADE E POTENCIAL DE UTILIZAÇÃO DE BACURÍS (PLATONIA INSIGNIS MART.) ORIUNDOS DA REGIÃO MEIO NORTE**. 2006. 122F. TESE (MESTRADO). FORTALEZA, 2006.

ALVES, S.; JENNINGS, W.G. Volatile composition of certain amazonian fruits. **Food Chemistry**, v. 4, p. 149- 159, 1979.

BAGGETT, S.; PROTIVA, P.; MAZZOLA, E.P.; YANG, H.; RESSLER, E.T.; BASILE, M.J.; WEINSTEIN, I. B.; KENNELLY, E.J. Bioactive Benzophenones from *Garcinia xanthochymus* Fruits. **Journal of Natural Products**, v. 68, p. 354-360, 2005.

BALUNAS, M.J., JONES, W.P., CHIN, Y.W., MI, Q., FARNSWORTH, N. R., SOEJARTO, D.D., CORDELL, G.A., SWANSON, S.M., PEZZUTO, J.M., CHAI, H.B., KINGHORN, A.D. Relationships between inhibitory activity against a cancer cell line panel, profiles of plants collected, and compound classes isolated in an anticancer drug discovery project. **Chemistry & Biodiversity**. v. 3, p. 897-915,2006.

BARROSO, G.M.; PEIXOTO, A.L.; ICHASO, C.L.F.; COSTA, C.G.; GUIMARÃES, E. F.; LIMA, H.C. **Sistemática de Angiospermas do Brasil Minas Gerais**: Viçosa, 309p, 2002.

BENTES, M.H.S.; SERRUYA, H.; ROCHA FILHO, G.N.; GODOY, R.L.O.; SILVA CABRAL, J.A.; SOARES MAIA, J.G. Estudo químico das sementes de bacuri. **Acta Amazonica**, v. 16, p. 363-368, 1986.

BEZERRA, G.; MAIA, G.A.; DE FIGUEIREDO, R.W. Potencial agroeconômico do bacuri: revisão. **Boletim Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, v. 102, p. 0323, 2005.

CALDER, P.C. Long-chain n-3 fatty acids and inflammation: potential application in surgical and trauma patients. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 36, p. 433-446, 2003.

CARDOSO, C.R.B.; SOUZA, M.A.; FERRO, E.A.V.; FAVORETO, J.R.; PENA, J.D.O. Influence of topical administration of n 3 and n 6 essential and n 9 nonessential fatty acids on the healing of cutaneous wounds. **Wound repair and regeneration**, v. 12, p. 235-243, 2004.

CANUTO, G. A. B. ; XAVIER, A. A. O. ; NEVES, L. C. ; BENASSI, M. T. . Caracterização físico-química de polpas de frutos da amazônia e sua correlação com a atividade anti-radical livre. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 32, p. 1196-1205, 2010.

CIOCHINA, R.; GROSSMAN, R.B. Polycyclic polyprenylated acylphloroglucinols. **Chemical Reviews**, v. 106, p. 3963-86, 2006.

CLERECI , M.T.P.S.; CARVALHO E SILVA . L.B. Nutritional bioactive compounds and technological aspects of minor fruits grown in Brazil. **Food Research International**, v. 44,1658 -1670,2011.

COSTA JÚNIOR, J.S.; FEITOSA, C.M.; CITÓ, A.M. G. L.; FREITAS, R.M.; HENRIQUES, J.A.P.Evaluation of Effects of Ethanolic Extract from *Platonia insignis* Mart. On Pilocarpine-induced Seizures.**Journal of Biological Sciences**.vol. 10(8). p.747-753.2010.

COSTA JÚNIOR, J.S.; FERRAZ, A.B. F.; FILHO, B.A.B.; FEITOSA, C.M., CITÓ, A. M.G.L.; FREITAS, R.M.; SAFFI, J. Evaluation of antioxidante effects in vitro of

garcinielliptone FC (GFC) isolated from *Platonia insignis* Mart. **Journal of Medicinal Plants Research**. v. 5, p. 293-299, 2011.

COSTA JÚNIOR, J.S.; FERRAZ, A.B.F.; SOUSA, T.O.; SILVA, R.A.C.; LIMA, S. G., FEITOSA, C.M.; CITÓ, A.M.G.L.; FREITAS, R.M.; SPEROTTO, A.R.M.; PÉRES, V. F.; MOURA, D.J., SAFFI, J. Investigation of Biological Activities of Dichloromethane and Ethyl Acetate Fractions of *Platonia insignis* Mart. Seed. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**. 2012 in press.

CUESTA-RUBIO. O.; FRONTANA-URIBE. B.A.; RAMIREZ-APAN, T.; CARDENAS, J. Polyisoprenylated benzophenones in cuban propolis; biological activity of nemorosone. *Zeitschrift für Naturforschung. C, Journal of biosciences*, v. 57, p. 372-378, 2002.

FANG, L.H.; MU, Y.M.; LIN, L.L.; XIAO, P.G.; DU, G.H. Vasorelaxant effect of euanthone in the rat thoracic aorta. **Vascular Pharmacology**, v. 45, p. 96-101, 2006.

FONSECA, E.T. **Frutas do Brasil**. Rio de Janeiro. P. 77-78, 1954.

FRANCO, M.R.B.; JANZANTTI, N.S. Aroma of minor tropical fruits. **Flavour and fragrance journal**, v. 20, p. 358-371, 2005.

HA, W.Y.; WU, P.K.; KOK, T.W.; LEUNG, K.W.; MAK, N.K.; YUE, P.Y.K.; NGAI, S.M.; TSAI, S.N.; WONG, R.N.S. Involvement of protein kinase C and E2F-5 in euanthone-induced neurite differentiation of neuroblastoma. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 38, p. 1393-1401, 2006.

HARBORNE, J.B.; BAXTER, H.; MOSS, G.P. **Phytochemical dictionary: a handbook of bioactive compounds from plants**. 2. London, 1999.

HATANAKA, E.; CURI, R. Ácidos graxos e cicatrização: uma revisão. **Revista Brasileira de Farmácia**, v. 88, p. 53-58, 2007.

HENRY, G.E.; CAMPBELL, M.S.; ZELINSKY, A.A.; LIU, Y.; BOWEN-FORBES, C.S.; LI, L.; NAIR, M.G.; ROWLEY, D.C.; SEERAM, N.P. Bioactive acylphloroglucinols from *Hypericum densiflorum*. **Phytotherapy Research**, v. 23, p. 1759-1762, 2009.

HILDITCH, T.P.; PATHAK, S.P. S. The component glyceride of Bacury (*Platonia Insignis* Mart.) seed fat. **Journal of the Chemical Society**. v.1949, p. 87-90, 1949.

LUSTOSA, A.K.M.F. **Avaliação do potencial farmacológico da manteiga de bacuri (*Platonia insignis* Mart.) e de forma farmacêutica de uso tópico com ela desenvolvida**. 2012.125p. Dissertação (Mestrado-Área Ciências Farmacêuticas). Universidade Federal do Piauí. Teresina. Piauí.

KOLEVA, II.; VAN BEEK, T.A.; LINSSEN, J.P.; DE GROOT, A.; EVSTATIEVA, L.N. Screening of plant extracts for antioxidant activity: a comparative study on three testing methods. **Phytochemical Analysis**. v. 13, p. 8-17, 2002.

MAK, N.K.; LI, W.K.; ZHANG, M.; WONG, R.N.S.; TAI, L.S.; YUNG, K.K.L.; LEUNG, H.W. Effects of euxanthone on neuronal differentiation. **Life Sciences**, v. 66, p. 347-354, 2000.

MOURA, M.C.C.L.; HOMMA, A.K O.; MENEZES, A.J.E.A.; CARVALHO, A.C.P.P.; FERREIRA, A.; BENBADIS, A.K.; MULLER, C.H.; FERREIRA, C.A.P.; CRUZ, C.D.; ARAÚJO, E.C.E.; MATOS, G.B.; ALMEIDA, H.J.; CARVALHO, J.E.U.; COSTA, J.T.A.; ARAÚJO, J.R. G.; MACARENHAS, K.M.; VASCONCELOS, L.F.L., ALOUFA, M.A.I.; MARTIS, M.R.; INNVECO, R.; SOUZA, V.A.B. **Bacuri: Agrobiodiversidade**. 1ed. São Luis, 2007a. 210p.

NAIDU, M.; KUAN, C.Y.K.; LO, W.L.; RAZA, M.; TOLKOVSKY, A.; MAK, N.K.; WONG, R.N.S.; KEYNES, R. Analysis of the action of euxanthone, a plant-derived compound that stimulates neurite outgrowth. **Neuroscience**, v. 148, p. 915-924, 2007.

NALDONI, F.J.; CLAUDINO, A.L.R.; CRUZ Jr, J.W.; CHAVASCO, J.K.; FARIA E SILVA, P.M.; VELOSO, M.P.; DOS SANTOS, M.H. Antimicrobial Activity of Benzophenones and Extracts from the Fruits of *Garcinia brasiliensis*. **Journal Of Medicinal Food**, v 12 ,p.403-407,2009.

OLIVEIRA, C.M.A.; PORTO, A.L.M.; BITTRICH, V.; MARSAIOLI, A.J. Two polyisoprenylated benzophenones from the floral resins of three *Clusia* species. **Phytochemistry**, v. 50, p. 1073-1079, 1999.

PEREIRA, I. O.; MARQUES, M.J.; PAVAN, A L.R.; CODONHO, B.S., BARBIÉRIC. L.; BEIJO, L.A.; DORIGUETTO, A.C.; D'MARTIN, E.C.; DOS SANTOS, M.H. Leishmanicidal activity of benzophenones and extracts from *Garcinia brasiliensis* Mart. **fruits. Phytomedicine**, v. 17, p. 339-345, 2010.

PICCINELLI, A.L.; CUESTA-RUBIO, O.; CHICA, M.B.; MAHMOOD, N.; PAGANO, B.; PAVONE, M.; BARONE, V.; RASTRELLI, L. Structural revision of clusianone and 7-epi-clusianone and anti-HIV activity of polyisoprenylated benzophenones. **Tetrahedron**, v. 61, p. 8206-8211, 2005.

PUPO, M.T.; GALLO, M.B.C.; VIEIRA, P.C. *Biologia Química: Uma Estratégia Moderna para a Pesquisa em Produtos Naturais*. **Química Nova**. v.30.Nº 6.p.1446-1455,2007.

ROBERTS, J.C. **Naturally Occurring Xanthenes**. **Chemical Reviews**, v. 61, p. 591- 605, 1961.

RODRIGUEZ-AMAYA, D.B.; KIMURA, M.; GODOY, H.T.; AMAYA-FARFAN, J. Updated Brazilian database on food carotenoids: Factors affecting carotenoid composition. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 21 , p. 445– 463, 2008.

ROGEZ, H.; BUXANT, R.; MIGNOLET, E.; SOUZA, J.N.S.; SILVA, E.M.; LARONDELLE, Y. Chemical composition of the pulp of three typical Amazonian fruits: araçá-boi (*Eugenia stipitata*), bacuri (*Platonia insignis*) and cupuaçu (*Theobroma grandiflorum*). **European Food Research and Technology**, v. 218, p. 380-384, 2004.

RUFINO, M.S.M.; ALVES, R.E.; BRITO, E.S.; PÉREZ-JIMÉNEZ, J.; SAURACALIXTO, F.; MANCINI-FILHO, J. Bioactive compounds and antioxidant capacities of 18 non-traditional tropical fruits from Brazil. **Food Chemistry**, v.121, p. 996-1002, 2010.

SANTOS, M. do S.S.A. **Caracterização física, química e tecnológica do bacuri (*Platonia insignis Mart.*) e seus produtos**. 1982.63f. Tese (Mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 1982.

SHANLEY, P.; MEDINA, G. **Frutíferas e plantas úteis na vida amazônica**. Pará: Belém, 300p, 2005.

SILVA, P.S.L.; SÁ, W.R.; MARIGUELE, K.H.; BARBOSA, A.P.R.; OLIVEIRA, O.F. Distribuição do teor de sólidos solúveis totais em frutos de algumas espécies de clima temperado. **Revista Caatinga**, Mossoró, v. 15, p.19-23, 2002.

SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P. R.; **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 2ed. Porto Alegre/ Florianópolis, 2000. 221-320p.

SOARES, A.G.. **Caracterização Físico – Química do Resíduo Agroindustrial dos Frutos do Bacurizeiro (*Platonia Insignis Mart*) com Objetivo de Produção de Insumos para Indústria de Alimentos e Química**. 2010. 101p. Dissertação (Doutorado-Área Ciências e Tecnologia de Alimentos). Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Seropédica.

SOUSA, C. M. de M.; CARVALHO, A. A.; CHAVES, M. H (UFPI).- Determinação da composição química do óleo essencial da casca do bacuri extraído por *headspace* e hidrodestilação. 32a **Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química**, 2009.

SOUZA, V.A.B.; VASCONCELOS, L.F.L.; ARAÚJO, E.C.E.; ALVES, R.E. **Bacurizeiro: *Platonia insignis Mart.*** São Paulo: Jaboticabal, 2000. 72p.

VARANDA, E.A. Atividade mutagênica de plantas medicinais. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada** . v. 27, p. 1-7, 2006.

WENG, J.R.; TSAO, L.T.; WANG, J.P.; WU, R.R.; LIN, C.N. Antiinflammatory phloroglucinols and terpenoids from *Garcinia subelliptica*. **Journal of Natural Products**, v. 67, p. 1796-9, 2004.

WU, C.C.; LU, Y.H.; WEI, B.L.; YANG, S.C.; WON, S.J.; LIN, C.N. Phloroglucinols with prooxidant activity from *Garcinia subelliptica*. **Journal of Natural Products**, v. 71, p. 246-50, 2008.

ZEISSER-LABOUÈBE, M.; LANGE, N.; GURNY, R.; DELIE, F. Hypericin-loaded nanoparticles for the photodynamic treatment of ovarian cancer. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 326, p. 174-181, 2006.

**CAPÍTULO II: Ensaio pré-clínico em ratos tratados com 1,3-diestearil-2-
oleil-glicerol (TG1)**

(Artigo submetido à Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas

Básica e Aplicada)

Ensaio pré-clínico em ratos tratados com 1,3-diesteril-2-oleil-glicerol (TG1).

Patricia Régia Pereira dos Santos¹; Aldenora Maria Ximenes Rodrigues¹; Guilherme Antônio Lopes de Oliveira¹; Joaquim Soares da Costa Júnior²; Rivelilson Mendes de Freitas¹; Chistiane Mendes Feitosa^{1,*}

¹Laboratório de Pesquisa em Neuroquímica Experimental do Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Piauí, Teresina - PI, Brasil.

²Instituto Federal de Ciência, Educação e Tecnologia do Piauí, Teresina - PI, Brasil.

* Autor para correspondência: Universidade Federal do Piauí. Campus Universitário Ministro Petrônio Portella – Bairro Ininga CEP: 64049-550 - Teresina, PI – Brasil. E-mail: rivelilson@pq.cnpq.br. Telefone: (86) 3237-1240

RESUMO

O 1,3-diestearil-2-oleil-glicerol (TG1) é um triglicerídeo isolado do extrato hexânico da semente de *Platonia insignis* Mart, conhecido como bacuri. Corresponde a um derivado da trioleína, solúvel em solventes apolares. Até o momento não há relatos de estudos desse composto na literatura. O objetivo deste estudo foi avaliar a toxicidade aguda do TG1 após administração via oral para determinação do efeito sobre os parâmetros comportamentais, bioquímicos, hematológicos e histopatológicos no hipocampo, corpo estriado e tecido hepático de ratos Wistar adultos tratados com TG1 na dose de 30 mg kg⁻¹, e avaliar a atividade citotóxica in vitro desta substância pelo método MTT. O estudo revelou que os parâmetros comportamentais não apresentaram alterações significativas. Durante o tratamento não foi observada nenhuma morte entre os animais. Os ratos tratados com TG1 apresentaram alterações apenas nos índices hematimétricos hemoglobina corpuscular média (HCM) e na concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) nas análises hematológicas, quando comparados com grupo controle. As análises bioquímicas da aspartato aminotransferase (AST), fosfatase alcalina, ácido úrico tiveram seus níveis reduzidos, conferindo preservação dos rins e fígado dos animais na dose testada (p<0,05). Neste estudo, os animais tratados com TG1 não mostraram comprometimento das áreas cerebrais: corpo estriado e hipocampo. Estes resultados indicam que o tratamento com TG1 não produz

alterações hematológicas, bioquímicas e histopatológicas cerebrais e hepáticas em ratos o que caracteriza uma baixa toxicidade. TG1 não revelou potencial citotóxico pelo método MTT. Esses dados necessitam de futuras pesquisas para comparar os resultados em outras vias, bem como para realizar análises anatomopatológicas dos animais tratados com TG1, assegurando o uso seguro deste triglicerídeo pela indústria farmacêutica e alimentícia.

PALAVRAS-CHAVE: Bioquímica; Hematologia; Histologia; Toxicidade aguda. 1,3-diestearil-2-oleil-glicerol.

ABSTRACT: The 1,3-distearyl-2-oleyl-glycerol (TG1) is a triglyceride isolated from the hexane extract of *Platonia insignis* Mart seeds, known as “bacuri”. Corresponds to a derivative of triolein, soluble in nonpolar solvents. So far there are no reports of this compound in the literature. The aim of this study was to assess the acute toxicity of TG1 after oral administration to determine its effects on behavioral, biochemical, hematological and histopathological parameters upon hippocampus, striatum and liver tissue of adult rats treated with TG1 at a dose of 30 mg kg⁻¹, and to evaluate the in vitro cytotoxic activity of this substance by MTT method. This study revealed that the behavioral parameters were not changed statistically. During the treatment no deaths were observed among animals. Rats

treated with TG1 showed changes only in indices erythrocyte mean corpuscular hemoglobin (MCH) and mean corpuscular hemoglobin concentration (MCH) when compared with the control group. Biochemical analysis of serum aspartate aminotransferase (AST), alkaline phosphatase and uric acid levels were reduced, indicating preservation of kidneys and livers of animals at the dose tested ($p < 0.05$). In this study, animals treated with TG1 showed no impairment of brain areas, striatum and hippocampus. These results indicate that treatment with TG1 not produce hematological, biochemical and histopathological liver or brain alterations in rats, suggesting low toxicity. TG1 showed no cytotoxic potential by MTT method. These data need further research to compare the results with others ways and to perform anatomopathologic examinations in animals treated with TG1, ensuring a safe use of this triglyceride by pharmaceutical and food industries.

KEYWORDS: Acute toxicity, Biochemistry, Hematology, Histology, 1,3-distearyl-2-oleyl-glycerol.

INTRODUÇÃO

O composto 1,3-diestearil-2-oleil-glicerol (TG1) é um triglicerídeo isolado do extrato hexânico da semente de *Platonia insignis* Mart. e corresponde a um derivado da trioleína, solúvel em solventes apolares. Possui fórmula molecular $C_{58}H_{112}O_6$. Sua composição química é definida como C (76,93%), H (12,47%), O (10,60%), e massa molecular 856 u.m.a(COSTA JÚNIOR et al., 2012).

A trioleína corresponde a um triacilglicerol de *Persicae semen* (Rosaceae), recentemente apontada como promissora na terapêutica antitrombótica (Chaves et al., 2010). Esse triacilglicerol compõe substratos em técnicas para seleção de microorganismos lipolíticos, zimograma que consiste na detecção qualitativa da atividade de lipase secretada em meio sólido contendo ágar, meio de cultivo e substrato composto com tributirina, trioleína, óleo de oliva, Tween-80 (MESSIAS et al., 2011).

Diante desse potencial farmacológico e da necessidade da realização da avaliação toxicológica de espécies vegetais é de grande interesse científico e comercial a determinação da toxicidade da trioleína em ensaios pré-clínicos, uma vez que os resultados obtidos podem servir ao conhecimento e ao desenvolvimento de um fitoterápico a partir desse triacilglicerol isolado de uma espécie vegetal popularmente utilizada pela população de nosso Estado com finalidade terapêutica e alimentícia. Recentemente a Anvisa publicou o Guia para a Realização de Estudos de Toxicidade Pré-clínica de Fitoterápicos (RE N° 90) (CRAVEIRO et al., 2008). E nesse estudo foram seguidos os padrões estabelecidos por esse guia para a avaliação da toxicidade aguda do triacilglicerol em estudo.

Após revisão da literatura sobre o 1,3-diestearil-2-oleil-glicerol (TG1) foi verificado que não há disponíveis estudos toxicológicos sobre esse composto, justificando a necessidade e a importância da realização do presente estudo. Porém há relatos recentes sobre a citotoxicidade a partir do extrato hexânico (EH) do qual foi isolado o composto TG1. Em estudos de toxicidade frente à *Artemia salina leach*, o EH e a fração acetato de etila do extrato etanólico da semente do bacurí apresentaram efeitos moderadamente citotóxicos, enquanto que a fração diclorometano foi fortemente citotóxica. Além disso, os extratos e as frações de *P. insignis* podem ser genotóxicos aos fibroblastos pulmonares de hamster chinês (célis.V79) (COSTA JÚNIOR et al., 2012). Diante disso, é importante um estudo mais detalhado sobre as propriedades toxicológicas dessa espécie, bem como de compostos obtidos a partir de estudos fitoquímicos.

Dessa forma, esse estudo teve como objetivo avaliar a toxicidade aguda sobre os parâmetros bioquímicos e hematológicos, bem como realizar análises histopatológicas em áreas cerebrais como hipocampo e corpo estriado, e tecido hepático de ratos adultos tratados por via oral com 1,3-diestearil-2-oleil-glicerol (TG1) e analisar a citotoxicidade *in vitro* do TG1 em 2 linhagens de células tumorais. Essa análise faz parte de um screening inicial para determinação do potencial antitumoral. Além disso, durante o ensaio pré-clínico também foram avaliados os parâmetros comportamentais em ratos adultos para melhor avaliar sua segurança.

MATERIAL E MÉTODOS

Animais

Foram utilizados, por experimento, Ratos Wistar machos adultos com peso variando entre 200 a 250 g e 2 meses de idade, provenientes do Biotério Central do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Piauí. Os animais receberam água e dieta (Purina®) *ad libitum* e foram mantidos sob condições controladas de iluminação (ciclo 12 h claro/escuro) e temperatura (25 ± 2 °C). O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação com Animais da Universidade Federal do Piauí (n° 004/2012).

Células e metodologia pra determinação da citotoxicidade in vitro.

As linhagens tumorais utilizadas, NCIH (carcinoma de pulmão - humano), HEP-2 (carcinoma de laringe humano) foram obtidas do Banco de células do Rio de Janeiro, tendo sido cultivadas em meio RPMI 1640 ou DMEN, suplementados com 10 % de soro fetal bovino e 1 % de antibióticos, mantidas em estufa a 37 °C e atmosfera contendo 5% de CO₂. O TG1 foi diluído em DMSO puro estéril e testado na concentração de 25 µg/mL. A citotoxicidade foi avaliada pelo método do MTT descrito primeiramente por MOSMAN, (1983), Este método verifica a viabilidade e o estado metabólico da célula. É uma análise colorimétrica baseada na conversão do sal 3-(4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5-difenil-2-H-brometo de tetrazolium (MTT) em azul de formazan, a partir de enzimas mitocondriais presentes somente nas células metabolicamente ativas.

As células foram plaqueadas na concentração de 1×10^5 células/mL. O TG1 previamente dissolvido em DMSO foi diluído em série no meio RPMI para obtenção das concentrações finais e adicionado em placa de 96 poços (100 μ L/ poço). As placas foram incubadas por 72 horas em estufa a 5% de CO₂ a 37°C. Em seguida, foram adicionados 25 mL da solução de MTT (sal de tetrazolium), e as placas foram incubadas por 3h. A absorbância foi lida após dissolução do precipitado com DMSO puro em espectrofotômetro de placa a 595nm.

Determinação dos Parâmetros comportamentais em Ratos

No protocolo experimental da triagem farmacológica comportamental, foram utilizados dois grupos de 10 ratos. Esse protocolo visa avaliar o comportamento dos animais frente à administração de substâncias isoladas de espécies vegetais e/ou sintéticas. Foram estabelecidos alguns critérios comparativos para uma série de comportamentos, que na sua maioria são exibidos normalmente pelos animais. Dessa forma foi verificada a presença ou não de determinadas alterações comportamentais em decorrência do tratamento, possivelmente está relacionada ou não a atividade sobre o sistema nervoso central de roedores. Essa triagem inicial do composto estudado viabiliza a realização de testes mais específicos (ALMEIDA et al., 1999; ALMEIDA, 2006; OMENA, 2007).

O grupo controle foi tratado via oral com solução de Tween 80 a 0,05% dissolvido em solução salina 0,9% (veículo; n=10) durante 30 dias consecutivos. E no segundo grupo, os animais os animais foram tratados com TG1 na dose de 30 mg kg⁻¹ emulsionado no veículo durante 30 dias consecutivos. Em seguida, os animais foram colocados em gaiolas com ração e água *ad libitum* e observados durante as primeiras 72 horas e por um período de 30 dias para observação dos parâmetros comportamentais, segundo teste hipocrático descrito por Malone e Robichaud (1962).

Estudo da toxicidade aguda em parâmetros bioquímicos e hematológicos de ratos tratados com do 1,3-diestearil-2-oleil-glicerol (TG1)

Nesse protocolo experimental, dois grupos de dez ratos foram tratados da seguinte forma. O primeiro grupo foi tratado por via oral com TG1 na dose de 30 mg kg⁻¹ em veículo

durante 30 dias consecutivos. O grupo controle foi tratado com veículo (Tween 80 0,05% dissolvido em solução salina 0,9%) durante 30 dias consecutivos.

Após 30 dias do tratamento agudo, os animais foram anestesiados com 0,3 mL de pentobarbital sódico (40 mg kg⁻¹, i.p.) e em seguida foi feita a coleta de sangue por rompimento do plexo retro-orbital com auxílio de capilar de vidro (WAYNFORTH, 1980). O sangue foi acondicionado em dois tipos de tubo, um com anticoagulante HB (Laborlab[®]) para determinação dos parâmetros hematológicos e o outro, sem anticoagulante, para obtenção do soro para avaliação dos parâmetros bioquímicos.

Para análise bioquímica, o material foi centrifugado a 3500 rpm durante 10 minutos e, em seguida, determinados os parâmetros glicose, uréia, creatinina, aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT) colesterol total, triglicerídeos, fosfatase alcalina (ALKP), bilirrubinas total e direta e ácido úrico. Os ensaios foram realizados em aparelho automatizado Vitros 250 com sistemas comerciais da Johnson & Johnson[®].

A contagem de eritrócitos, leucócitos totais, plaquetas, hemoglobina, hematócrito e os índices hematimétricos volume corpuscular médio (VCM), hemoglobina corpuscular média (HCM), concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) foram determinados imediatamente após a coleta por meio do analisador automático de células hematológicas Advia 120/hematology (Siemens).

Avaliação histopatológica em cérebros e tecido hepático e ratos tratados com do 1,3-diestearil-2-oleil-glicerol (TG1).

Por sua vez, para esse protocolo experimental, dois grupos de seis ratos foram tratados da seguinte forma. O primeiro grupo foi tratado por via oral com TG1 na dose de 30 mg kg⁻¹ em veículo durante 30 dias consecutivos. O grupo controle foi tratado com veículo (Tween 80 0,05% dissolvido em solução salina 0,9%) durante 30 dias consecutivos.

Após 30 dias de tratamento, todos os animais foram eutanasiados por anestesia com pentobarbital sódico (50 mg kg⁻¹, i.p.). Seus cérebros e fígado foram removidos e fixados em formalina a 10% por 72 h para a realização das análises histopatológicas. Cortes sagitais, feitos em intervalos de 1 mm, foram obtidos a partir de um corte inicial próximo aos corpos mamilares. Para o estudo microscópico, secções de 10 µm foram feitas, coradas em hematoxilina - eosina (H & E), e analisadas com auxílio de um microscópio óptico em um

aumento de 40 e 100X. As áreas cerebrais e do fígado foram observadas e classificadas de acordo com as descrições do Atlas de Paxinos e Watson (1986). O grau de lesão foi expresso através de uma escala percentual de 0 (nenhum) a 100 (total) para cada hipocampo, corpo estriado e fígado analisados de acordo com o método descrito anteriormente (MALONE & ROBICHAUD, 1977; AL-ALBORI et al., 2002). Os animais foram definidos como tendo lesão cerebral quando havia pelo menos 50% de alteração no hipocampo, corpo estriado ou tecido hepático (CÂMPELO et al., 2011).

Análises estatísticas

Os valores foram expressos como média \pm erro padrão da média (E.P.M.). As diferenças entre os grupos foram determinadas por meio da Análise de Variância (ANOVA), seguida, quando detectada diferença, pelo teste *t*-Student-Newman-Keuls como *post hoc* teste. Os valores foram considerados significativos quando $p < 0,05$.

Análise da citotoxicidade *in vitro*.

Os experimentos foram analisados segundo suas médias e respectivos desvio no programa GraphPad Prism. Cada amostra foi testada em duplicata. Uma escala de intensidade foi utilizada para avaliar o potencial citotóxico das amostras testadas. Amostras sem atividade (1 a 20% de inibição), com pouca atividade (inibição de crescimento celular variando de 20 a 50%), com atividade moderada (inibição de crescimento celular variando de 50 a 70%) e com muita atividade (inibição de crescimento variando de 70 a 100%).

RESULTADOS

Determinação da citotoxicidade in vitro do TG1.

O 1,3-diestearil-2-oleil-glicerol (TG1) apresentou um percentual de inibição de 16% com erro de 1,4 para a linhagem de células HEP-2 (carcinoma de laringe humano) e para a linhagem NCI H2N2 (Carcinoma de pulmão humano) inibição de 12,6 com erro de 1,3. De acordo com a escala de intensidade para avaliação do potencial citotóxico, esses valores o caracteriza como uma substância sem atividade citotóxica.

Determinação dos parâmetros comportamentais em ratos pelo método do Screening Hipocrático

O 1,3-diestearil-2-oleil-glicerol (TG1) não alterou o peso corpóreo dos animais durante os 30 dias de observação. Não houve alteração no consumo de água e ração dos animais durante os 30 dias de observação. Dentre os sinais clínicos sugestivos de toxicidade, o único observado foi piloereção e nenhuma morte foi registrada para a dose administrada de 30 mg kg⁻¹ durante os dos 30 dias consecutivos de tratamento. Aspectos quanto ao estado de consciência e disposição, coordenação motora, tônus muscular, reflexos, atividade do sistema nervoso central e autônomo foram preservados.

Resultados das análises dos parâmetros hematológicos e bioquímicos de ratos tratados com 1,3-diestearil-2-oleil-glicerol (TG1)

O tratamento dos animais com a dose de 30 mg kg⁻¹ (v.o) do TG1 alterou apenas o HCM e CHCM nos parâmetros hematológicos, em comparação com o grupo controle (**Tabela 1**). Os demais parâmetros analisados permaneceram dentro dos valores de referencia e não demonstram importância clínica.

A tabela 2 apresenta os valores obtidos da avaliação dos parâmetros bioquímicos em ratos submetidos aos ensaios toxicológicos, por via oral com TGI durante 30 dias. Nesse grupo foram verificadas alterações nas análises para o ácido úrico, AST, bilirrubina total e direta, fostatase alcalina em comparação com o grupo controle (p<0,05) na dose testada.

Tabela 1. Parâmetros hematológicos de ratos Wistar tratados com 1,3-diestearil-2-oleil-glicerol (TG1) por via oral durante 30 dias consecutivos

Parâmetros	Controle	TG1
	(n=10)	(n=10)
Hemácias (mm ³)	7,71 ± 0,19	7,51 ± 0,20
Hemoglobina (g dL ⁻¹)	12,60 ± 0,27	13,01 ± 0,72
Hematócrito (%)	41,21 ± 0,94	39,96 ± 0,79
VCM (fL)	53,70 ± 0,81	54,49 ± 0,95
HCM (pg)	16,44 ± 0,35	18,01 ± 0,69*
CHCM (g dL ⁻³)	30,62 ± 0,26	34,09 ± 0,85*
Plaquetas (mm ³)	585,3 ± 79,87	552,9 ± 27,8

Legenda: Parâmetros hematológicos obtidos de ratos wistar machos tratados de forma aguda por via oral com veículo Tween 80 0,05% dissolvido em solução salina 0,9% (Controle, $n = 10$ por grupo) e com TG1 na dose 30 mg kg^{-1} e observados durante 30 dias. Os valores representam a média ± E.P.M. do número de animais usados nos experimentos. n - representa o número de animais em cada grupo. * $p < 0,05$, quando comparados ao grupo controle (ANOVA e teste t - Student-Neuman-Keuls como *post hoc* teste).

Tabela 2. Parâmetros bioquímicos de ratos Wistar tratados com 1,3-diestearil-2-oleil-glicerol (TG1) por via oral durante 30 dias consecutivos

Parâmetros	Controle	TG1
	(n=10)	(n=10)
Glicose (mg dL ⁻¹)	149,50 ± 8,92	141,5 ± 5,42
Uréia (mg dL ⁻¹)	45,70 ± 1,55	47,14 ± 1,27
Creatinina (mg dL ⁻¹)	0,51 ± 0,06	0,41 ± 0,03
Ácido úrico (mg dL ⁻¹)	9,06 ± 0,55	1,04 ± 0,18*
Triglicerídeos (mg dL ⁻¹)	71,1 ± 11,08	59,4 ± 8,23
CT (mg dL ⁻¹)	75,60 ± 8,64	77,17 ± 9,21
AST (U mL ⁻¹)	256,20 ± 16,96	151,5 ± 14,63*
ALT (U mL ⁻¹)	77,00 ± 1,35	95,0 ± 10,76
Fosfatase alcalina (U L ⁻¹)	625,8 ± 27,21	232,1 ± 21,23*
Bilirrubina total (mg dL ⁻¹)	0,39 ± 0,06	0,80 ± 0,03*
Bilirrubina direta (mg dL ⁻¹)	0,14 ± 0,02	0,32 ± 0,01*

Legenda: Parâmetros bioquímicos obtidos de ratos wistar machos tratados de forma aguda por via oral com veículo Tween 80 0,05% dissolvido em solução salina 0,9% (Controle, $n = 10$ por grupo) e com TG1 na dose 30 mg kg^{-1} e observados por 24 horas. Os valores representam a média \pm E.P.M. do número de animais usados nos experimentos. n - representa o número de animais em cada grupo. * $p < 0,05$, quando comparados ao grupo controle (ANOVA e teste t - Student-Neuman-Keuls como *post hoc* test).

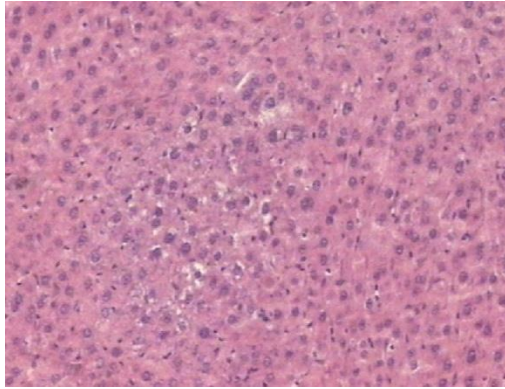
Resultados das análises histopatológicas em ratos Wistar tratados com 1,3-diestearil-2-oleil-glicerol (TG1) durante 30 dias consecutivos.

A figura 1 apresenta as alterações histopatológicas no tecido hepático de ratos adultos. Nesse experimento, os animais tratados com TG1 (30 mg kg⁻¹) e com veículo tiveram o tecido hepático analisado. Na análise histopatológica do fígado pode ser verificado um efeito vascular importante e presente em todos os fragmentos avaliados. Esse efeito pode ser descrito por uma intensa congestão vascular (provavelmente por aumento da pressão), bem como pelas discretas áreas de esteatose em microgotas. No geral, a arquitetura do fígado foi detectada de forma preservada. Além disso, observa-se uma discreta poliploidia nas células hepáticas, que é comum em um órgão como o fígado, que possui enorme capacidade de regeneração. Já o grupo tratado com veículo não apresentou nenhuma alteração histológica.

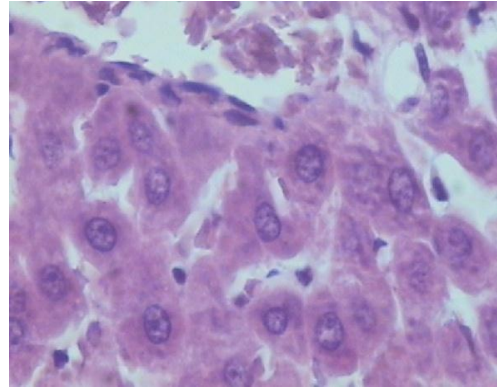
A figura 2 mostra o estudo histopatológico no corpo estriado de ratos adultos. Nesse estudo não foi observada nenhuma alteração histopatológica no corpo estriado dos ratos tratados com TG1 e veículo durante 30 dias com doses repetidas.

A figura 3 mostra o estudo histopatológico no hipocampo de ratos adultos. Nesse estudo foi verificado apenas no hipocampo algumas células com núcleos picnóticos. Além disso, não foi observada nenhuma alteração histopatológica no corpo estriado.

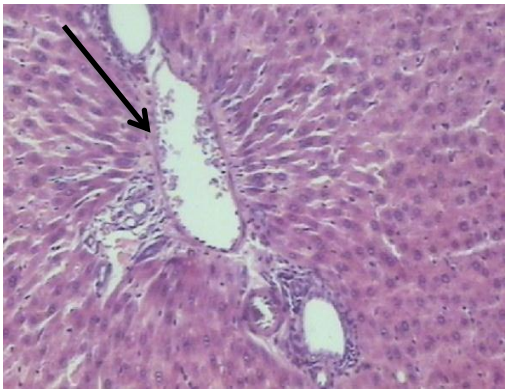
Figura 1. Avaliação histopatológicas do efeito do tratamento durante 30 dias com TG1 e veículo no tecido hepáticos de ratos adultos.



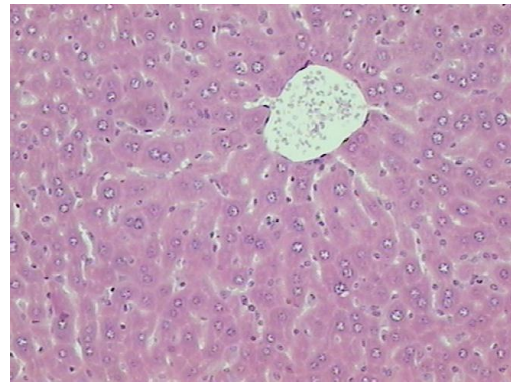
A



B



C



D

Figura 1: A, B e C - Alterações histopatológicas no fígado de ratos adultos tratados com TG1 durante 30 dias consecutivos. Observado um efeito vascular importante representado por uma intensa congestão vascular, bem como pelas discretas áreas de esteatose em microgotas (**seta preta**): Hematoxilina - Eosina (H & E) 40X e 100X respectivamente; Barra de Escala = 10 μ m). **D** - Ausência de alterações histopatológicas no fígado de ratos adultos tratados com veículo durante 30 dias consecutivos.

Figura 2: Avaliação do efeito do tratamento com 1,3-diestearil-2-oleil-glicerol (TG1) e veículo no corpo estriado de ratos adultos.

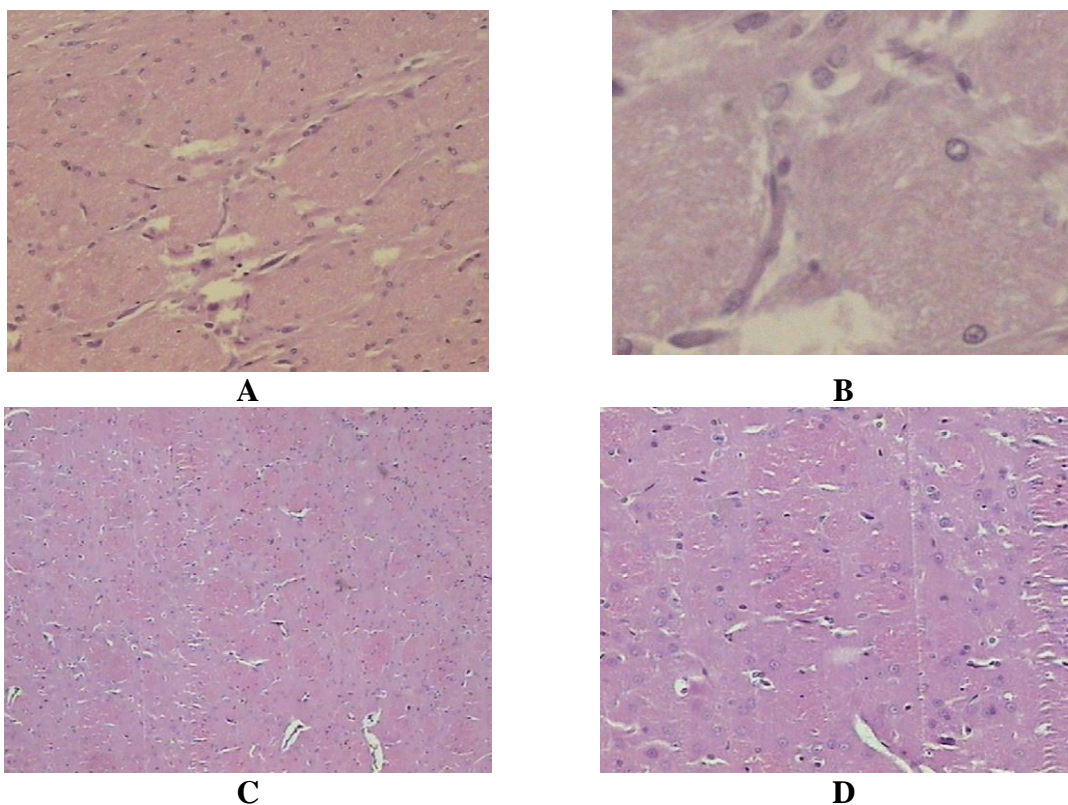


Figura 2: A e B - Ausência de alterações histopatológicas no corpo estriado de ratos tratados com TG1. **C e D** - Ausência de Alterações histopatológicas no corpo estriado de ratos tratados com veículo, Hematoxilina - Eosina (H & E) 40 e 100X, respectivamente; Barra de Escala = 10 μ m).

Figura 3. Avaliação do efeito do tratamento com 1,3-diestearil-2-oleil-glicerol (TG1) e veículo no hipocampo de ratos adultos.

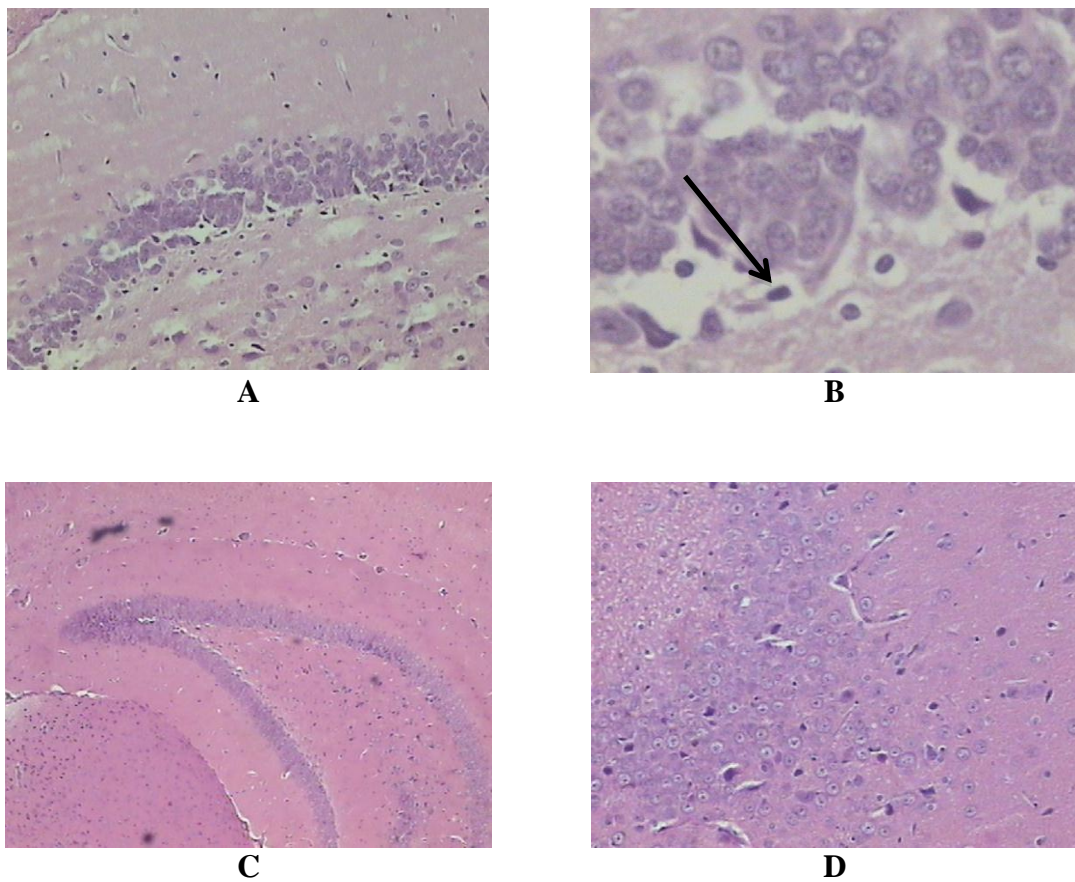


Figura 3: A e B - Alterações histopatológicas no hipocampo de ratos tratados com TG1, nessa lâmina podem ser observadas algumas células com núcleos picnóticos (**seta preta – figura B**). **C e D**- Ausência de alterações histopatológicas no hipocampo de ratos tratados com veículo. Hematoxilina - Eosina (H & E) 40 e 100X, respectivamente; Barra de Escala = 10 μ m).

DISCUSSÃO

O Estudo da citotoxicidade pelo método do MTT vem sendo utilizada no programa de screening do National Cancer Institute dos Estados Unidos (NCI), que testa mais de 10.000 amostras a cada ano (SKEHAN et al., 1990). É um método rápido, sensível e barato. Este método tem a capacidade de analisar a viabilidade e o estado metabólico da célula. É uma análise colorimétrica baseada na conversão do sal 3-(4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5-difenil-2-H-brometo de tetrazolium (MTT) em azul de formazan, a partir de enzimas mitocondriais presentes somente nas células metabolicamente ativas. Esse estudo citotóxico pelo método do MTT permite definir facilmente a citotoxicidade, mas não o mecanismo de ação (BERRIDGE et al., 1996). Na análise da citotoxicidade *in vitro*, os resultados apresentados pelo TG1 do percentual de inibição da atividade metabólica das células HEP-2 e NCI H2N2, o caracterizam como uma substância não citotóxica. Esse achado sugere inicialmente segurança no seu uso. No entanto, estudos complementares com outras linhagens celulares são necessários para reforçar esses achados.

Os resultados demonstraram que a administração via oral de forma aguda com 1,3-diestearil-2-oleil-glicerol (TG1) em ratos Wistar adultos durante 30 dias consecutivos produz piloereção que pode ser um indicativo clínico sugestivo de toxicidade. De forma geral, nesse estudo o tratamento com TG1 não produziu efeitos tóxicos mais severos em outros parâmetros comportamentais observados durante 30 dias, sugerindo que o TG1 pode ser usado de forma segura, uma vez que demonstrou baixa toxicidade durante o ensaio pré-clínico.

Complementando esses dados encontrados durante o período de observação, os animais não perderam massa corporal, e não houve alteração no consumo de ração e água. Esse dado pode reforçar inicialmente a hipótese de que o TG1 pode ser usado de forma segura na indústria farmacêutica e alimentícia, uma vez que o fruto do bacurí é usado regularmente pela população do estado do Piauí e outras regiões do Nordeste brasileiro com essas duas finalidades. A literatura demonstra que a massa corporal do animal é um importante indicador para a avaliação da toxicidade de uma substância isolada de espécies vegetais e/ou não. Portanto, o monitoramento de espécies vegetais e de compostos isolados dessa espécie é importante durante as pesquisas farmacológicas e toxicológicas como forma de ampliar as informações quanto a segurança e eficácia (JAHN & GÜNZEL, 1997).

Os parâmetros hematológicos e bioquímicos podem sofrer alterações devido a vários fatores, dentre eles, a linhagem e a cepa de uma dada espécie, bem como em função do

método de coleta de sangue. Assim, é fundamental determinar os valores de referência para animais de diferentes biotérios de acordo com a espécie, a dieta, a linhagem, o sexo e a faixa etária. Os roedores têm sido os animais mais utilizados pelos centros de pesquisa, uma vez que constituem o grupo de animais disparadamente mais utilizados para estudos científicos em diversas áreas, por possuírem características fisiológicas e genéticas semelhantes à dos humanos (MELO et al., 2012).

Os valores de ácido úrico, triglicerídeos, AST e fosfatase alcalina dos ratos tratados com o TG1, diminuíram em relação aos valores desses analitos quando comparados aos obtidos entre os animais do grupo controle. A bilirrubina total e direta aumentaram de forma significativa em comparação com o grupo controle. Por outro lado, foi visto um aumento no nível de ALT, embora essa alteração não tenha sido significativa. Ao passo que os analitos como a glicose, ureia, creatinina e colesterol total não sofreram alteração em comparação aos valores de referência.

Os níveis de glicose no sangue fornecem dados sobre a homeostase geral desse carboidrato no sangue. A ureia resulta do metabolismo proteico, o seu nível sanguíneo, bem como o nível da creatinina pode ser característico de insuficiência renal e, portanto, podem ser usados como marcadores em diagnóstico (SACHER & McPHERSON, 2002). Teoricamente, a creatinina é mais indicada como marcador da função renal, uma vez que a quantidade presente nos rins é mais constante, além de não ser reabsorvida nos túbulos renais como a ureia (STEVEN & SCCOTT, 2002). Nesse estudo a ureia e a creatinina não tiveram seus níveis aumentados, sugerindo que o TG1 pode ser administrado de forma aguda sem produzir sobrecarga da função renal em roedores. Além disso, esse dado pode ser reforçado pela diminuição do nível de ácido úrico durante o tratamento com TG1 em doses repetidas durante os 30 dias consecutivos. A insuficiência renal, naturalmente acarreta acúmulo de ureia, creatinina e ácido úrico (SACHER & McPHERSON, 2002). A redução dos valores plasmáticos de ácido úrico e ureia, sugerem uma melhora da performance renal (DANTAS et al., 2006). Diante desses dados, pode ser então prospectado que não houve comprometimento da função renal, embora mais ensaios sobre a toxicidade subcrônica e crônica sejam necessários para consolidar esse achado.

Os principais componentes lipídicos do sangue são o colesterol, triglicérides e os fosfolipídeos. Suas determinações são cada vez mais comum entre os médicos e leigos, no intuito de avaliar o risco de doenças cardíacas (SACHER & McPHERSON, 2002). Os adipócitos correspondem às células do tecido adiposo, encontrado sob a pele, nas glândulas mamárias e cavidade abdominal. Essas células respondem pela estocagem de triglicerídeos

que serve como combustível para as reações metabólicas no organismo (LEHNINGER et al., 2005). Nas células musculares também podem ser encontrados grandes depósitos de triglicérides (CHAMPE & HARVEY, 2000). Um dos fatores de risco mais enfatizados nas doenças cardiovasculares, é o aumento de triglicérides. A redução do seu nível é de grande necessidade e urgência para o tratamento dessas doenças (AUSTIN et al., 1998). Com relação aos níveis séricos dos triglicérides não foi detectada alteração significativa nos animais tratados com TG1, embora tenha sido visto uma diminuição sem importância clínica já que os valores permaneceram dentro dos valores de referência.

O fígado é o órgão central do metabolismo no organismo (SACHER & McPHERSON, 2002), é comum pesquisar a atividade das enzimas hepáticas em clínica de pequenos animais, para detectar anormalidades na atividade dessas enzimas, uma vez que são consideradas marcadores sensíveis de alterações hepatobiliares. As patologias que acometem o fígado acabam por alterar o perfil das enzimas hepáticas elevando seus valores séricos, e essas mudanças podem ser induzidas por agentes exógenos químicos, como por exemplo, um fármaco (SHARON & CENTER, 1995).

As enzimas transaminases (ALT e AST) e fosfatase alcalina são de grande importância como marcadores de lesões nas células hepáticas (MARTIN et al., 1981). A fosfatase alcalina é a enzima mais frequentemente associada à obstrução do ducto biliar (SACHER & McPHERSON, 2002) e as transaminases estão amplamente distribuídas nos tecidos, sendo que a AST predomina no fígado, coração, músculo cardíaco, músculo estriado, rim e pâncreas, ao passo que a ALT predomina no fígado, rim e coração. As transaminases são consideradas indicadores sensíveis de dano hepatocelular (MILLER & GONÇALVES, 1999; AL-HABORI et al., 2002). A administração aguda do TG1 provocou uma diminuição significativa da AST e ALKP. Sugerindo certa preservação do tecido hepático, ou seja, um possível efeito hepatoprotetor. No entanto, esses achados precisam ser mais investigados. A ALT não sofreu nenhuma alteração de interesse clínico. Um estudo recente aponta que a AST, pode apresentar-se mais elevada, possivelmente pela influência da anestesia e estresse muscular aos quais os ratos são submetidos para a coleta de sangue (MELO et al., 2012).

A fosfatase alcalina (ALKP) é uma enzima fosfohidrolase, presente em vários tecidos, com maiores concentrações no fígado, no epitélio do trato biliar e nos ossos. O aumento da atividade sérica de FAL pode ocorrer em condições de colestase, intra e extrahepática, por indução com drogas ou hormônios, pela hiperatividade osteoblástica e em processos necróticos (WRIGHT & PLUMMER, 1974; MILLER & GONÇALVES, 1999). Essa enzima pode ter seu aumento associado aos distúrbios intestinais (Sacher & Mcpherson, 2002). Nesse

estudo foi observada uma diminuição significativa na fosfatase alcalina, indicando que o TG1 não induziu nenhuma alteração bioquímica indicativa de hepatopatia no soro de ratos Wistar.

A bilirrubina é um pigmento tetrapirrólico. Aproximadamente 70 a 80% resulta do metabolismo da hemoglobina (Hb) de hemácias senescentes (≤ 300 mg/dia); uma outra fração, 20 a 30% são derivadas das células eritróides da medula prematuramente e de hematoproteínas de outros locais do organismo (principalmente fígado). As hemácias ao sofrerem metabolismo nas células reticuloendoteliais (RE) originam a bilirrubina. Esta é transportada ao fígado ligada à albumina, para ser conjugada com ácido glicurônico e transportada aos canalículos biliares e, em seguida, ao duodeno. No intestino, a bilirrubina é hidrolisada a bilirrubina não conjugada e reduzida a urobilinogênios por bactérias e aproximadamente 80 a 90% são excretadas nas fezes inalteradas ou oxidadas. Uma fração bem pequena, menos de 3 mg/dL são filtradas por meio dos glomérulos para a urina como urobilinogênio. Bilirrubina conjugada (direta) é aumentada em doenças hereditárias e durante o dano celular hepático. Bilirrubina não conjugada (indireta) pode estar aumentada devido ao uso de medicamentos (WALLACH, 2009). Nesse estudo observou-se uma elevação tanto da bilirrubina total, quanto da direta, após o tratamento com TG1. Como esse aumento não foi acompanhado nenhuma elevação dos níveis da AST, já que pode ser considerada como um importante marcador de toxicidade hepática. Dessa forma, os resultados encontrados não indicam que essa alteração pode ser uma manifestação toxicológica, mas apenas uma variação fisiológica.

Um estudo recente aponta que os parâmetros hematológicos dos ratos da linhagem Wistar podem ser semelhantes aos dos humanos, com exceção da quantidade de hemácias e de plaquetas. Os ratos possuem uma quantidade maior destes dois parâmetros hematológicos, o que confere maior viscosidade ao sangue e rápida coagulação. Assim os índices hematimétricos (VCM, HCM e CHCM) que são calculados a partir das hemácias, hemoglobina e hematócrito sofrem também uma pequena alteração quando comparados aos valores de referência para humanos (MELO et al., 2012). Quanto ao estudo hematológico, o tratamento dos animais com a dose de 30 mg kg^{-1} (v.o), do TG1 em doses repetidas alterou apenas o HCM e CHCM nos parâmetros hematológicos em comparação com o grupo controle. Estes índices por serem produto de cálculos, provavelmente estão mais suscetíveis a variações analíticas.

Estudos anteriores mostraram que a fisiopatologia das doenças neurodegenerativas envolve várias alterações em nível neuroquímico e histológico em regiões cerebrais que precisam ser investigadas, por meio da administração de compostos naturais, buscando um

possível efeito neuroprotetor (BARROS et al., 2007; XAVIER et al., 2007; FREITAS et al., 2011). O hipocampo é uma das áreas cerebrais mais suscetíveis ao estresse oxidativo (SIQUEIRA et al., 2005). O fígado tem um papel importante no equilíbrio homeostático dos processos biológicos, uma vez que regula as funções metabólicas envolvidas com a síntese, armazenamento e o catabolismo de substâncias químicas endógena e exógena. A peroxidação lipídica contribui para o desenvolvimento de processos isquêmicos e uma série de outros eventos patológicos causadores de lesão hepática (BELO et al., 2012).

Nos estudos histopatológicos foram observadas apenas no hipocampo algumas células com núcleos picnóticos. E não foi observada nenhuma alteração histopatológica no corpo estriado. Dessa forma, o uso do TG1 não causou alterações às áreas cerebral estudadas, revelando segurança quanto ao seu uso. Na análise histopatológica do fígado pode ser verificado um efeito vascular importante e presente em todos os fragmentos avaliados. Este efeito pode ser descrito por uma intensa congestão vascular (provavelmente por aumento da pressão), bem como pelas discretas áreas de esteatose em microgotas. No geral, a arquitetura do fígado foi detectada de forma preservada. Além disso, foi observada a presença de uma discreta poliploidia nas células hepáticas, que é comum em um órgão como o fígado, que possui enorme capacidade de regeneração sugerindo, assim, que não houve nenhum grau de comprometimento desses órgãos. Mas esses achados devem ser reforçados com estudos em um período de tratamento subcrônico e crônico em doses repetidas.

Esses resultados indicam que o tratamento agudo com 1,3-diestearil-2-oleil-glicerol (TG1) na dose de 30 mg kg⁻¹ não alterou de forma geral o padrão comportamental dos ratos, e não produziu alterações hematológicas, e histopatológicas nas áreas cerebrais e hepáticas analisadas. A redução dos níveis da AST e ALKP pode sugerir até mesmo certa proteção hepática, que deverá ser melhor investigada em modelos animais de hepatotoxicidade. O aumento da bilirrubina total e direta não chega a caracterizar uma toxicidade, provavelmente apenas uma alteração fisiológica. Tanto as áreas cerebrais, como o fígado foram mantidas de forma preservadas durante o tratamento. TG1 não apresentou atividade citotóxica in vitro pelo método MTT. Diante disso, a continuação dos estudos com essa substância, apontam para um possível agente terapêutico no tratamento de doenças, particularmente as neurodegenerativas.

REFERÊNCIAS

AL-HABORI , M.; AL-AGHBARI, A.; AL-MAMARY, M.; BAKER, M. Toxicological evaluation of *Catha edulis* leaves: a long term feeding experiment in animals. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 83, p. 209-217, 2002.

ALMEIDA, R.N. **Psicofarmacologia: fundamentos práticos**. 1ª. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006, 384p.

ALMEIDA, R.N.; FALCÃO, A.C.G.M.; DINIZ, R.S.T.; QUINTANS-JÚNIOR, L.J.; POLARI, R.M.; BARBOSA-FILHO, J.M.; AGRA, M.F.; DUARTE, J.C.; FERREIRA, C.D.; ANTONIOLLI, A.R.; ARAÚJO CC. Metodologia para avaliação de plantas com atividade no Sistema Nervoso Central e alguns dados experimentais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 80, p. 72-76, 1999.

AUSTIN, M.A.; HOKANSON, J.E.; EDWARDS, K.L. Hypertriglyceridemia as a cardiovascular risk factor. **American Journal of Cardiology**, v. 81, p. 7-12, 1998.

BARROS, D.O.; XAVIER, S.M.; BARBOSA, C.O.; SILVA, R.F.; MAIA, F.D.; OLIVEIRA, A.A.; FREITAS, R.M., Effects of the vitamin E in catalase activities in hippocampus after status epilepticus induced by pilocarpine in Wistar rats. **Neuroscience Letters**.v.416,p.227-230, 2007.

BELO, M.A.A.; SOARES, V.E.; SOUZA, L.M.; SOBREIRA, M.F.R.; CASSOL, D.M.S.; TOMA, S.B. Hepatoprotective treatment attenuates oxidative damages induced by carbon tetrachloride in rats. **Experimental and Toxicologic Pathology**. V.64,p.155-165, 2012.

BERRIDGE, M. V.; TAN, A. S.; McCOY, K. D.; WANG, R. The Biochemical and Cellular Basis of Cell Proliferation Assays that Use Tetrazolium Salts. **Biochemica**.v. 4, p. 14-19, 1996.

CHAVES, D.S.A.; COSTA, S.S.; ALMEIDA, A.P.; FRATTANI, F.; ASSAFIM, M.; ZINGALI, B.R. Metabólitos Secundários de origem vegetal: Uma Fonte Potencial de Fármacos Antitrombóticos. **Química Nova**.v. 33, p.172-180, 2010.

CAMPÊLO, L.M.L.; FEITOSA, C.M.; TOMÉ, A.R.; FREITAS, R.M. Avaliação do potencial neuroprotetor do óleo essencial de *Citrus limon* em hipocampo e corpo estriado de camundongos após convulsões induzidas pela pilocarpina. **Boletín Latinoamericano y Del Caribe de Plantas Medicinales y Aromaticas**, v. 9, n. 6, p. 440-445, 2011.

CHAMPE, P.C.; HARVEY, R. **Bioquímica ilustrada**. 2ª. ed. Porto Alegre: Artmed, 2000, 446p.

COSTA JÚNIOR, J. S.; FERRAZ, A. B. F.; SOUSA, T. O.; SILVA, R. A. C.; LIMA, S. G.; FEITOSA, C. M.; CITÓ, A. M. G. L.; FREITAS, R. M.; SPEROTTO, A. R. M.; PÉRES, V. F.; MOURA, D. J.; SAFFI, J. Investigation of Biological Activities of Dichloromethane and Ethyl Acetate Fractions of *Platonia insignis* Mart. Seed. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**. *in press*. 2012.

COSTA JÚNIOR, J. S.; FERRAZ, A. B. F.; SOUSA, T. O.; SILVA, R. A. C.; LIMA, S. G.; FEITOSA, C. M.; CITÓ, A. M. G. L.; FREITAS, R. M.; SPEROTTO, A. R. M.; PÉRES, V. F.; MOURA, D. J.; SAFFI, J. Investigation of Biological Activities of Dichloromethane and Ethyl Acetate Fractions of *Platonia insignis* Mart. Seed. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**. Article first published online: 31 AUG 2012

CRAVEIRO, A.C.S.; CARVALHO, D.M.M.; NUNES, R.S.; FAKHOURI, R.; RODRIGUES, S.A.; SILVA, F.T. Toxicidade aguda do Extrato aquoso de folhas de *Erythrina velutina* em animais experimentais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v.18 ,p. 739-743, 2008.

DANTAS, J.A.; AMBIEL, C.R.; CUMAN, R.K.N.; BARONI, S.; BERSANI, A.; CIOMAR, A. Valores de referência de alguns parâmetros fisiológicos de ratos do Biotério Central da Universidade Estadual de Maringá, Estado do Paraná. **Acta Scientiarum Health Sciences**. v. 28, p. 165-170, 2006.

FREITAS, R.M.; DEJIANG FENG, D.; JORDAN, J. Neuropharmacological effects of lipoic acid and ubiquinone on δ -aminolevulinic dehydratase, Na^+ , K^+ -ATPase, and Mg^{2+} -ATPase activities in rat hippocampus after pilocarpine-induced seizures. **Fundamental & Clinical Pharmacology**, v. 25, p. 211-216, 2011.

JAHN, A.I.; GÜNZEL, P.K.H. The value of spermatology in male reproductive toxicology: do spermatologic examinations in fertility studies provide new and additional information relevant for safety assessment? **Reproductive Toxicology**, v. 11, p. 171-178, 1997.

LEHNINGER, A.L.; NELSON, D.L.; COX, M.M. **Principles of Biochemistry**. 4^a. ed. New York: Freeman and Company, 2005, 119p.

MALONE, M.H.; ROBICHAUD, R.C. A Hippocratic screen for pure or crude drug materials. **Lloydia**, v. 25, p. 320-332, 1962.

MARTIN, D.W.; MAYES, P.A.; RODWELL, Y.W. In: **HARPER'S Review of Biochemistry**. Califórnia: Lange Medical, 1981, 688p.

MELO, M.G.D., DÓRIA, G.A.A., SERAFINI, M.R., ARAÚJO, A.A.S. Valores de referência Hematológicos e Bioquímicos de Ratos (*Rattus norvegicus* linhagem Wistar) provenientes do biotério central da Universidade Federal de Sergipe. **Scientia Plena**. v. 8. N^o. 4, p. 1-6, 2012.

MESSIAS, J.M.; DA COSTA, B.Z.; DE LIMA, V.M.G.; GIESE, E.C.; DEKKERS, R.F.H.; BARBOSA, A.M. Lipases Microbianas: Produção, Propriedades e aplicações biotecnológicas. **Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas**. v. 32, n. 2, p. 213-234, 2011.

MILLER, O.; GONÇALVES, R.R. **Laboratório para o clínico**. 8.ed. São Paulo: Editora Arheneu, 1999, 607p.

MOSSMAN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal Immunology Methods**. v. 65, p. 55-63, 1983.

OMENA, M.L.R.A. Ensaio Etnofarmacológico de Espécies vegetais com ação no sistema nervoso central, originárias do bioma Caatinga. **Saúde & Ambiente em Revista**. v. 2, n. 2, p. 92-107, 2007.

PAXINOS, G.; WATSON, C. **The brain in stereotaxic coordinates**. New York: Academic Press, 1986

SACHER, R.A., McPHERSON, R.A. **Widmann Interpretação Clínica dos exames Laboratoriais**. 11ª edição. São Paulo. Manole, 2002, 445p.

SHARON, A.; CENTER, D.M.V. Avaliação fitoquímica da função hepática no cão e gato. In: **Atualização terapêutica veterinária: pequenos animais**. p. 1166-1183, 1995.

SIQUEIRA, I.R.; FOCESATTO, C.; ANDRADE, A.; SANTOS, M.; HAGEN, M.; KLEIN-BELLO, A.; NETTO, C.A. Total antioxidant capacity is impaired in different structures from aged rat brain. **International Journal of Developmental Neuroscience**. v.23, p. 663-671, 2005.

SKEHAN, P.; STORENG, R.; SCUDIERO, D.; MONKS, A.; MCMAHON, J.; VISTICA, D.; WARREN, J.T.; BODESCH, H.; KENNEY, S.; BOYD, M. R. New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer – drug screening. **Journal of the National Cancer Institute**. v. 82, p. 1107-1112, 1990.

STEVEN, L.S.; SCOTT, M.S. Urinary sistem. In: **Fundamentals of veterinary clinical pathology**. Iowa: Iowa State, p. 277-336, 2002.

XAVIER, S.M.L.; BARBOSA, C.O.; BARROS, D.O.; SILVA, R.F.; OLIVEIRA, A.A.; FREITAS, R.M. Vitamin C antioxidant in hippocampus of adult Wistar rats after seizures and status epilepticus induced by pilocarpine. **Neuroscience Letters**, v. 420, p. 76-79, 2007.

WALLACH, J.B. **Interpretação de Exames laboratoriais**. 8ª. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2009, 1465p.

WAYNFORTH, B.H. Injection techniques. In: **Experimental and Surgical Techniques in the Rat**. London: Academic Press, 1980.

WRIGHT, P.J.; PLUMMER, D.T. The use of urinary enzyme measurement of direct renal damage caused by nephrotoxic compound. **Biochemical Pharmacology**, v. 23, p. 65-73, 1974.

**CAPÍTULO III: Avaliação dos efeitos do 1,3-diestearil-2-oleil-glicerol (TG1)
sobre a memória de ratos adultos.**

(Artigo submetido à Revista Brasileira de Psiquiatria)

Avaliação dos efeitos do 1,3-diestearil-2-oleil-glicerol (TG1) sobre a memória de ratos adultos

Patricia Régia Pereira dos Santos¹; Amanda Antonia Cardoso de Almeida¹; Rusbene Bruno Fonseca de Carvalho¹; Joaquim Soares da Costa Júnior²; Lays Rodrigues Moura¹; Rivelilson Mendes de Freitas¹; Chistiane Mendes Feitosa^{1,*}

¹Laboratório de Pesquisa em Neuroquímica Experimental do Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Piauí, Teresina - PI, Brasil.

²Instituto Federal de Ciência, Educação e Tecnologia do Piauí, Teresina - PI, Brasil.

*Autor para correspondência: Universidade Federal do Piauí. Campus Universitário Ministro Petrônio Portella – Bairro Ininga CEP: 64049-550 - Teresina, PI – Brasil. E-mail: rivelilson@pq.cnpq.br. Telefone: (86) 3237-1240

RESUMO

A doença de Alzheimer (DA) é um processo patológico neurodegenerativo crônico associado ao envelhecimento. Essa patologia ocasiona deterioração da cognição e perda da memória. A falta de fármacos empregados na prevenção e no tratamento da DA tem estimulado a pesquisa por novos agentes que possam representar uma inovadora alternativa terapêutica. O presente estudo objetivou verificar a influência do 1,3-diestearil-2-oleil-glicerol (TG1) sobre a memória em modelos animais específicos, bem como avaliar *in vitro* a atividade anticolinesterásica e o potencial antioxidante em hipocampo de ratos adultos tratados com TG1. No teste da esquiwa passiva os grupos tratados com TG1 30 mg/kg apresentaram um aumento significativo no tempo de latência para descida da plataforma quando comparado com o treino, significando um aprimoramento na aprendizagem e memória (T0 = 33,50 ± 6,118; T15 = 20,13 ± 4,846; T24 = 203,1 ± 47,50). No teste Labirinto Aquático de Morris no grupo tratado com TG1 pode ser observada uma diminuição significativa de 63,59% e 38,71% no tempo de latência, quando comparados com o grupo veículo e controle (Neostigmina 0,5 mg/kg), respectivamente. Nos testes neuroquímicos pode ser verificado nos grupos tratados com TG1 30 mg/kg (v.o) uma diminuição significativa de 88,49% na peroxidação lipídica, 76,89% no conteúdo de nitrito. Além disso, pode ser observado um aumento significativo de

51,97% na atividade da enzima catalase e 45,53% na atividade da enzima superóxido dismutase quando comparado ao veículo. Na determinação *in vitro* da inibição da atividade anticolinesterásica TG1 revelou 77,12% , 72,34% , 61,17% , 20,21% de inibição nas concentrações de 0,1 µg/ml, 0,05 µg/ml, 0,025 µg/ml e 0,0125 µg/ml respectivamente. Os resultados revelam que TG1 é uma molécula promissora para o desenvolvimento de novos fármacos com grande potencial na prevenção e/ou tratamento doença de Alzheimer. No entanto, testes complementares sobre o processo de memória em ratos precisam ser feitos para justificar o desenvolvimento de uma nova formulação para o tratamento de doenças neurodegenerativas.

Palavras-chave: Alzheimer, Memória, 1,3-diestearil-2-oleil-glicerol.

ABSTRACT: Assessment of the effects of 1,3-distearyl-2-oleoyl-glycerol (TG1) on the memory of adult rats

Alzheimer's disease (AD) is a chronic neurodegenerative disease process associated with aging. This disease causes deterioration of cognition and memory loss. The lack of drugs used in the prevention and treatment of AD has stimulated the search for new agents that may represent a novel therapeutic alternative. The present study aimed to investigate the influence of 1,3-distearyl-2-oleyl-glycerol (TG1) on specific memory in animal models, and to evaluate the in vitro antioxidant potential and anticholinesterase activity in the hippocampus of adult rats treated with TG1. In the test of passive avoidance treated groups TG1 30 mg / kg showed significant increase in latency to the platform down when compared to the training, meaning an improvement in learning and memory (D0 = 33.50 ± 6.118 ; T15 = 20.13 ± 4.846 , T24 = 203.1 ± 47.50). Already in the Morris water maze test in the treated group TG1 can be observed a significant decrease of 63.59% and 38.71% in the latency time when compared with the vehicle group and control (neostigmine 0.5 mg / kg) , respectively. In neurochemical tests can be found in treated groups TG1 with 30 mg / kg (po) a significant reduction of lipid peroxidation 88.49% 76.89% and the content of nitrite. Furthermore, it can be observed a significant increase in the activity of 51.97% catalase and 45.53% in the activity of superoxide dismutase when compared to vehicle. When determining in vitro inhibition of anticholinesterase activity the TG1 showed 77.12%, 72.34%, 61.17%, 20.21% inhibition at concentrations of 0.1 g / ml, 0.05 / ml, 0.025 mg / ml and 0.0125 g / ml respectively .The results show that TG1 is a promising molecule for the development of pharmaceuticals with great potential in the prevention and / or treatment of Alzheimer's disease. However, tests on the process memory in rats must be made to justify the development of a new formulation for the treatment of neurodegenerative diseases.

Keywords: Alzheimer's, Memory, 1,3-distearyl-2-oleoyl-glycerol.

INTRODUÇÃO

A doença de Alzheimer (DA) é um processo patológico neurodegenerativo crônico, que ocorre preferencialmente na idade adulta, sendo caracterizada por um início insidioso com deterioração lenta na cognição, perda da memória, capacidade funcional, comportamento e humor (DEL BO et al., 2009; ITO et al., 2010). Dados estatísticos apontam que a doença de Alzheimer afeta 5% a 10% da população com idade superior a 65 anos e 20% a 40% daqueles com faixa etária superior a 85 anos. Estima-se que em 2050, mais de 25% da população mundial será idosa, sugerindo um aumento da prevalência e da incidência dessa doença, sendo portanto, extremamente necessária a busca por novas formas de tratamento mais eficazes e seguras. Nos países desenvolvidos, a DA está em terceiro lugar no pódio das doenças que mais causam morte, perdendo apenas para as doenças cardiovasculares e para o câncer (MOUNT; DOWNTON, 2006). Em países como Brasil, Nigéria, Índia e Taiwan é estimada a incidência anual de 1-2 % de casos de demência (KALARIA et al., 2008; BLENNOW et al., 2006).

Do ponto de vista neuropatológico é observado que o cérebro de indivíduos com DA atrofia cortical difusa, a presença de grande número de placas senis e novos neurofibrilares, degenerações grânulo-vacuolares e perda neuronal. É Verificado ainda um acúmulo da proteína β -amilóide nas placas senis e da microtubulina tau nos novos neurofibrilares. Transtornos da transmissão da acetilcolina e acetiltransferases ocorrem frequentemente nos indivíduos afetados (SMITH, 1999; IANISKI, 2011).

A caracterização principal da DA é a formação de placas senis contendo o peptídeo β -amiloide (β), uma proteína com efeitos neurotóxicos (AVRAMOVICH et al., 2002). No espaço extracelular, o peptídeo β pode se ligar a várias biomoléculas. Algumas destas ligações podem desencadear cascatas de eventos celulares modulando diversas vias de sinalização que ocasionam danos às células e intensa resposta inflamatória (SNYDER et al., 2005; BU et al., 2006). Indiretamente, o dano dos neurônios pelo peptídeo β ocorre pela ativação da microglia e de astrócitos, os quais produzem mediadores tóxicos e inflamatórios como o óxido nítrico (NO), interleucinas 1 β (IL-1 β) e 6 (IL-6) e fator de necrose tumoral (TNF- α) (MEDEIROS et al., 2007). Além da ativação glial e da produção de mediadores inflamatórios, também se identifica a ativação do sistema complemento, a indução de enzimas envolvidas no processo inflamatório como a ciclooxigenase-2 (COX-2) e a óxido nítrico sintase induzível (iNOS), o que gera um aumento de NO e de espécies reativas derivadas de oxigênio (EROS), e conseqüentemente um estresse oxidativo (TUPPO e ARIAS, 2005; HENEKA e O`BANION, 2007).

Alguns estudos mostraram que o hipocampo é essencial para estruturar a memória curta que é reduzida dramaticamente em indivíduos afetados pela doença de Alzheimer (DA). O tratamento mais promissor para a DA é obtido pelo aumento do nível circulante de acetilcolina no cérebro usando inibidores da enzima acetilcolinesterase (AChE) (SERENIKI e VITAL, 2008).

Inibidores da AChE como a fisostigmina, neostigmina, galantamina e tacrina vem sendo utilizados no tratamento da DA, entretanto, algumas destas substâncias apresentam efeitos colaterais indesejáveis, como, a hepatotoxicidade. A galantamina (Reminyl®), um alcalóide obtido de plantas, possui ação longa, seletiva, reversível e competitiva para inibir a acetilcolinesterase (AChE), é considerado mais efetivo no tratamento da doença e apresenta menos limitações (INGKANINAN et al., 2000). Diante deste contexto a falta de fármacos empregados para o tratamento e a prevenção da DA, que associem uma alta eficácia e baixos efeitos colaterais, tem estimulado a pesquisa por novos agentes que possam representar uma alternativa terapêutica. Portanto, a redução do estresse oxidativo têm sido comprovado como uma estratégia terapêutica para atenuar os eventos neurodegenerativos e a morte neuronal na DA (MOORE e O'BANION, 2002).

Visto tudo isso, o presente estudo objetivou verificar a influência do 1,3-diestearil-2-oleil-glicerol (TG1) sobre a memória em modelos animais específicos, bem como avaliar *in vitro* a atividade anticolinesterase e o potencial antioxidante em hipocampo de ratos adultos tratados com TG1.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados nos ensaios pré-clínicos ratos Wistar, machos, de dois meses de idade, pesando entre 250-300 g, provenientes do Biotério Central do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Piauí. Os animais receberam água e dieta (Labina®) *ad libitum* e foram mantidos sob condições controladas de iluminação (com ciclo claro/escuro de 12 h) e temperatura ($25 \pm 1^\circ\text{C}$). O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação com Animais da Universidade Federal do Piauí (nº 004/2012).

Isolamento e determinação estrutural da substancia isolada

Essa substância é um derivado da trioleína, solúvel em solventes apolares. Possui fórmula molecular $\text{C}_{58}\text{H}_{112}\text{O}_6$, sua composição é estrutural é formada por C (76,93%), H

(12,47%) e O (10,60%), e apresenta massa molecular de 856 u.m.a. O 1,3-diestearil-2-oleil-glicerol, denominado de TG1 (**Ilustração 1**), corresponde a um triglicerídeo e foi isolado anteriormente a partir do extrato hexânico das sementes de *Platonia insignis* Mart (COSTA JÚNIOR et al., 2012)

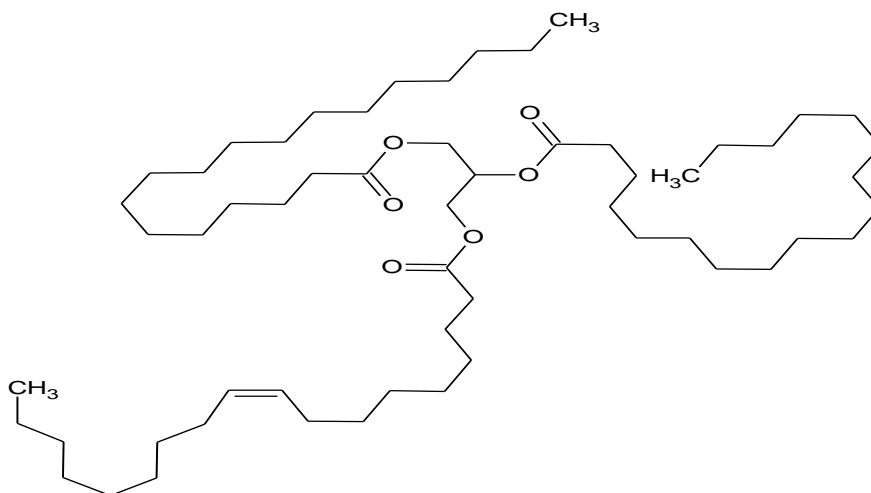


Figura 1: Estrutura química do 1,3-diestearil-2-oleil-glicerol (TG1).

Esquiva Passiva (Passive Avoidance Test)

A esquiva inibitória consiste em um aparelho confeccionado em alumínio de 2 mm, com pintura epóxi de alto impacto, chão em barras de aço inoxidável com espaçamento de 12,5 mm, área interna de fuga com 200 mm x 75 mm, porta e frente em acrílico transparente, bandeja coletora de dejetos e urina. O rato é colocado sobre a plataforma no interior de uma caixa com o soalho metálico conectado a um estimulador elétrico. O rato, como um animal exploratório vai procurar explorar o restante da caixa.

Para o teste de sessão única, os animais foram inicialmente submetidos a uma sessão de treino individual, na qual foram gentilmente colocados sobre a plataforma fixa na lateral esquerda da caixa de esquiva inibitória e permitidos explorar toda a caixa. Após alguns segundos, no instante em que o animal desce da plataforma com as quatro patas na grade de barras de bronze eletrificáveis para explorar o resto da caixa, recebe um choque elétrico de 0.4 a 0.5 mA por 2 a 3 segundos. O animal é então retirado da caixa de teste e recolocado na sua caixa residência (VIANNA et. al., 2001).

Para avaliar a memória formada durante a sessão treino os animais foram submetidos a sessões de teste, 15 minutos e 24 horas após o treino (para memória de curta e longa duração,

respectivamente), quando foram novamente colocados sobre a plataforma da caixa de esquiwa. Na sessão de teste foi verificada a latência de descida da plataforma. Quanto mais o animal reter a memória formada durante o treino, maior será a latência de descida da plataforma no momento do teste.

Labirinto em T Elevado (T MAZE)

Esse teste para estudos de memória foi validado por Viana e colaboradores (1994). O labirinto foi construído em madeira, com 3 braços de dimensões idênticas (50 X 10 cm), sendo um braço fechado por paredes de 40 cm de altura perpendicular aos dois braços abertos opostos. Para evitar a queda dos animais os braços abertos estão circundados por uma tira de acrílico de 1 cm de altura. O labirinto está elevado 50 cm do chão (Figura 14). Nos dois dias antes do teste os animais foram gentilmente manuseados durante 5 minutos. Vinte quatro horas após o final do tratamento com TG1 30 mg/kg e Tween 80 0,05% em salina 0,9%, o teste foi realizado. Cada rato foi colocado no final do braço fechado do labirinto e o tempo gasto para sair do braço com as quatro patas foi registrado (treino). A seguir o mesmo procedimento foi repetido em dois treinos subsequentes (Esquiwa 1 e 2) com 30 segundos de intervalo. Dois dias mais tarde (48 h), o animal foi colocado novamente no labirinto e o tempo gasto para sair do braço fechado foi medido (Esquiwa 3). O tempo máximo de observação (*cut off*) durante as esquivas foi de 300 seg.

Labirinto Aquático de Morris (Water Maze)

Este teste é usado para se avaliar a memória espacial (MORRIS, 1984). O labirinto aquático consiste de um tanque de plástico circular (132 cm de diâmetro) e paredes de 40 cm de altura, cheio (até 10 cm da borda) com água (25°C) acrescida de amido de milho (para deixar a água opaca). O aparelho possui uma plataforma de acrílico (15 X 15 X 19) colocada no quadrante noroeste 2 cm abaixo da superfície da água (Figura 15).

Vinte e quatro horas após o término do tratamento com TG1 e Tween 80 0,05% em salina 0,9%, os animais iniciaram o treinamento. Foram feitos 6 treinos em dois dias consecutivos (aprendizagem) e após 48 horas os animais foram testados para avaliação da memória espacial (retenção).

Durante o treino o animal foi colocado em 6 locais diferentes do tanque e teve 54 segundos para achar a plataforma ao final deste tempo, era colocado manualmente na mesma durante 10 segundos e retirado do tanque por 30 segundos. Ao final do segundo dia cada

animal recebeu 12 treinos para a aquisição da memória. No quarto dia (48h após), a plataforma foi removida e os animais colocados no tanque, na posição sudeste (em relação à posição da plataforma). Os animais permaneceram até 60 segundos e o tempo de latência para alcançar o local da plataforma original foi registrado.

Métodos para determinação dos conteúdos de substâncias ácidas reativas com o ácido tiobarbitúrico (TBARS)

O grau de peroxidação lipídica foi mensurado por meio da determinação dos níveis de TBARS, método previamente descrito por Draper e Hadley (1990). Foi preparado o homogenato a 10% (w/v) em tampão fosfato de sódio 50 mM, pH 7,4 com as áreas hipocâmpais de todos os grupos, veículo (n=8), e TG1 30 mg/kg (n=8). Os resultados foram expressos em nmol de MDA/g de tecido.

Método da determinação do conteúdo de nitrito

O conteúdo de nitrito nos grupos experimentais, veículo (n=8), e TG1 30 mg/kg (n=8), foram determinados com base na reação de Griess (GREEN et al., 1995). Os resultados foram expressos em mM.

Método da determinação da atividade da Catalase (CAT)

A atividade da CAT foi medida nos grupos experimentais, veículo (n=8), AC 250 (n=8) e TG1 30 mg/kg (n=8), utilizando o princípio básico da medida da velocidade de produção de O₂ e H₂O (CHANCE; MAEHLY, 1955). A concentração de proteínas foi determinada (LOWRY et al, 1951). Os resultados foram expressos em mmol/min/mg de proteína (CHANCE e MAEHLY, 1955).

Método da determinação da atividade da Superóxido Dismutase (SOD)

Os homogenatos hipocâmpais 10% foram centrifugados (800 × g, 20 min), e os sobrenadantes utilizados para determinar das atividades de superóxido dismutase (SOD). Atividade da SOD nos grupos veículo (n=8), TG1 30 mg/kg (n=8) foi testada por meio da taxa de redução do citocromo C pelos radicais superóxidos, utilizando o sistema xantina - xantina oxidase como fonte geradora de ânion superóxido (O₂⁻) (ARTHUR; BOYNE, 1985). Os resultados foram expressos em U/mg de proteína. Uma unidade (U) da atividade da SOD corresponde à inibição de 50% da reação do O₂⁻ com o Citocromo C. A concentração da proteína foi obtida pelo método de Lowry e colaboradores (1951).

Determinação *in vitro* da atividade anticolinesterásica do 1,3-diestearil-2-oleil-glicerol (TG1)

O efeito inibitório do TG1 sobre atividade da enzima acetilcolinesterase *in vitro* foi avaliada conforme descrito por Ellman e colaboradores (1961). Foi Utilizado um espectrofotômetro Biosistem SP220, para a atividade de inibição quantitativa. Inicialmente, 100 µL da amostra (concentrações de 0,0125%, 0,00652%, 0,003125% e 0,001563% em solução tampão 50 mM Tris-HCl, pH 8, e 10% de metanol) foram misturados com 100 µL de AChE 0,22 U/mL (22 U de enzima diluída em 100 mL de tampão 50 mM Tris-HCl, pH 8, 0,1% BSA) e 200 µL de tampão (50 mM Tris-HCl, pH 8, 0,1% (albumina sérica bovina-BSA). A mistura foi incubada por 5 min a 30 °C, posteriormente foi adicionado 500 µL de ácido 5,5-ditiobis (2-nitrobenzóico)- DTNB (Na concentração de 3 mM em tampão Tris-HCl, pH 8, e NaCl 0,1 M, MgCl₂ 0,02 M) e 100 µL de ATCI (4 mM em água).

Um branco também foi preparado por substituição AChE com 100 µL de tampão (50 mM Tris-HCl, pH 8 buffer, 0,1% BSA). Todas as amostras foram analisadas em triplicata. A reação foi monitorada por 5 min em 412 nm. O medicamento rivastigmina (Exelon®) foi usado como padrão, e como controle negativo foi utilizado o Tampão (0,1% de metanol em 50 mMol/L Tris-HCl, pH 8, 10%). A porcentagem de inibição da substância isolada e da rivastigmina foram calculados de acordo com a equação 1. Os valores da concentração inibitória média (CI₅₀) foram obtidos por intermédio de plotagem Log-Probít.

$$I(\%) = 1 - \frac{\text{Taxa de reação da amostra}}{\text{Taxa de reação do branco}} \times 100 \quad \text{(Equação 1)}$$

Análises Estatísticas

Após a coleta dos dados, os mesmos foram tabulados em planilhas e em seguida analisados estatisticamente. Os resultados foram expressos como a média ± erro padrão da média (E.P.M) utilizando o “Software” GraphPad Prisma 5.0 A comparação entre os grupos experimentais, foi realizada por meio do teste one-way ANOVA, seguida pelo teste t- Student Newman-Keuls como *post hoc* test e com o nível de significância de 5%.

RESULTADOS

Esquiva Passiva (Passive Avoidance Test)

No teste da esquiva passiva os animais aprendem a evitar o choque (treino), quando avaliados 15 minutos após o choque (memória recente) ou 24 horas após o choque (memória tardia). A Figura 2 mostra que os animais do grupo veículo (twee 80 0,05%) apresentaram uma boa retenção de memória, na fase imediata (memória recente) ($T0 = 102,6 \pm 33,95$; $T15 = 164,5 \pm 51,28$; $T24 = 94,00 \pm 33,79$), já nos grupos tratados com controle positivo (Neostigmina 30 mg/kg) apresentaram uma melhor retenção na fase de consolidação (memória tardia), ($T0 = 33,50 \pm 6,11$; $T15 = 20,13 \pm 4,84$; $T24 = 203,1 \pm 47,50$) ($p < 0,05$). Nos grupos tratados com TG1 30 mg/kg apresentaram um aumento significativo no tempo de latência para descida da plataforma quando comparado com o treino, significando um aprimoramento na aprendizagem e memória ($T0 = 33,50 \pm 6,118$; $T15 = 20,13 \pm 4,846$; $T24 = 203,1 \pm 47,50$).

Comparando os grupos tratados, pode ser observada uma redução de 68,57% no tempo de latência de descida da plataforma, nos ratos tratados com TG1 (30 mg/kg) quando avaliados no treino comparado com o veículo, quanto na memória recente foi observado uma diminuição de 18,3% no grupo tratado com TG1 em relação ao veículo e um aumento de 85% em relação ao controle positivo, já quando avaliados na memória tardia houve um aumento significativo no tempo de latência para descida da barra no grupo tratado com TG1 30 mg/kg, apresentando melhor atividade que o fármaco de referência.

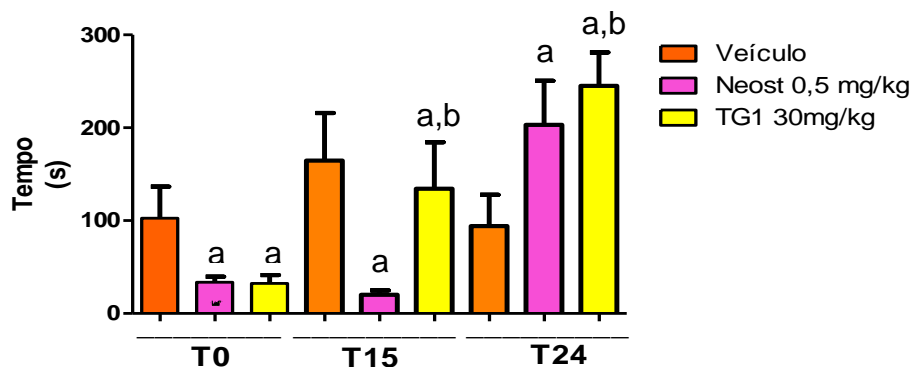


Figura 2 – Efeito do tratamento com 1,3-diesteril-2-oleil-glicerol (TG1) 30 mg/kg (v.o.) na memória tardia de ratos (n=8) no Teste da Esquiva Passiva, ($p < 0.05$).

Labirinto em T Elevado (T MAZE)

Como ilustrado na figura 3, o tratamento com TG1 30 mg/kg (v.o.) não afetou a memória, uma vez que o tempo de permanência no braço fechado foi semelhante ao tempo do grupo controle e superior ao tempo do grupo tratado com neostigmina (0,5 mg/kg). A exploração do espaço aversivo foi maior nos ratos tratados com a neostigmina, sugerindo que o TG1 pode ter efeitos melhores quanto a memória e aprendizagem em ratos.

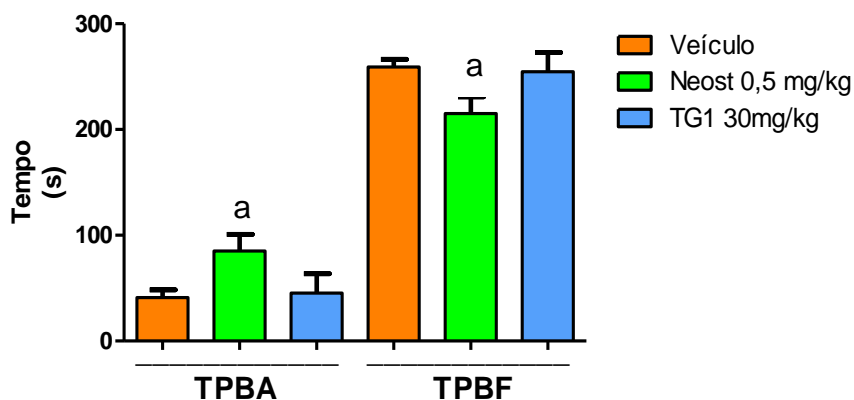


Figura 3 – Efeito de tratamento com 1,3-diesteril-2-oleil-glicerol (TG1) 30mg/kg (v.o.) na aquisição da memória de ratos (n=8) no teste T Maze ($p < 0,05$).

Labirinto Aquático de Morris (Water Maze)

A Figura 4 mostra a latência para encontrar a plataforma no labirinto aquático de Morris no dia teste. Pode ser observado uma diminuição significativa de 63,59% e 38,71% no tempo de latência do grupo tratado com TG1 (30 mg/kg, v.o) ($15,25 \pm 5,371s$), quando comparados com o grupo veículo ($41,88 \pm 2,248s$) e controle (Neostigmina 0,5 mg/kg) ($24,88 \pm 3,425s$), para encontrar a plataforma respectivamente.

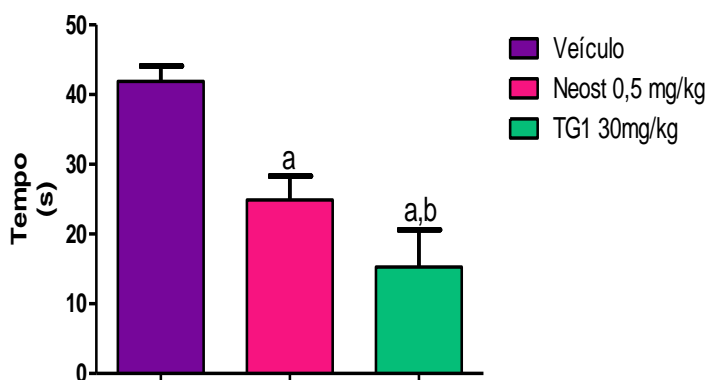


Figura 4 - Latência (s) no dia do teste (dia 4) para alcançar o local onde nos dias de treino estava localizada a plataforma. Os dados são expressos como média \pm erro-padrão. ^a $p \leq 0,05$ em comparação ao grupo veículo e ^b $p \leq 0,05$ em comparação ao grupo controle .

Avaliação da atividade antioxidante

Na Tabela 1 estão expostos os resultados neuroquímicos dos grupos tratados com TG1 30 mg/kg (v.o) e veículo. Foi verificado no grupo tratado com TG1 uma diminuição significativa de 88,49% na peroxidação lipídica e 76,89% no conteúdo de nitrito e um aumento significativo de 51,97% na atividade da enzima catalase e 45,53% na atividade da enzima superóxido dismutase quando comparado ao veículo.

Tabela 1: Determinação dos níveis de substâncias reativas com o ácido tiobarbitúrico (TBARS), conteúdo de nitrito, atividades da catalase e superóxido dismutase em hipocampo de ratos tratados com TG1.

Grupos	Parâmetros			
	TBARS (mmol/MDA/ μ g proteína)	NITRITO (μ M)	CATALASE (U/ μ g de proteína)	SOD (U/ μ g de proteína)
Veículo	1,39 \pm 0,15	90,41 \pm 1,22	14,45 \pm 0,13	2,35 \pm 0,14
TG1	0,16 \pm 0,01 ^a	20,90 \pm 0,79 ^a	30,09 \pm 2,23 ^a	3,42 \pm 0,28 ^a

Legenda: Os valores representam a média \pm EPM. dos níveis de substâncias reativas com o ácido tiobarbitúrico (TBARS), conteúdo de nitrito, atividades da catalase e superóxido dismutase em ratos Wistar machos tratados de forma aguda por via oral com veículo (Tween 80 0,05% dissolvido em solução salina 0,9) na dose de 0,1 mL/10 g de peso corpóreo e TG1 (1,3-diestearil-2-oleil-glicerol) na dose de 30 mg/Kg, (n=8 para os dois grupos). Após 30 dias de tratamento os animais foram eutanasiados com pentobabital sódico na dose 40 mg/Kg (i.p.), para remoção do encéfalo e dissecação do hipocampo para avaliação neuroquímica. ^ap<0,05 (ANOVA e *t*-Student-Newman-Keuls como *post hoc* teste).

Determinação *in vitro* da atividade anticolinesterásica do TG1

Nos resultados de determinação *in vitro* foi verificada a inibição da atividade da AChE 95,9, 86,92 e 77,12% quando usada a rivastigmina (controle positivo) em concentrações de 0,1, 0,05, 0025%, respectivamente. Quando avaliada a atividade de inibição do composto TG1 foi verificado os seguintes resultados: 0,1% (77,12%), 0,05% (72,34%), 0025% (61,17%) e 0,0125% (20,21%). Baseados nesses valores também foi determinada a CI₅₀ que corresponde a 4,38 μ g/mL (intervalo de confiança de 95% [1,27 – 4,56 μ g /mL]; $r^2 = 0,1592$).

DISCUSSÃO

A memória é a capacidade que o homem e os animais apresentam para armazenar informações que possam ser recuperadas e utilizadas posteriormente. Difere da aprendizagem, uma vez que esta é apenas o processo de aquisição das informações. São vários os processos da memória. O primeiro deles é a aquisição (aprendizagem), sendo seguida pela retenção durante tempos variáveis. A retenção por tempos curtos pode ser transformada em retenção de longa duração pelo processo da consolidação da memória. Em ambos os casos, entretanto, pode haver evocação (lembrança) ou esquecimento das informações memorizadas (ROBERTO, 2001).

A escolha de um modelo experimental para avaliação do aprendizado e a memória de um roedor, deve levar em consideração a capacidade do animal de aprender a tarefa e sua capacidade de executá-la. Na avaliação da cognição em ratos, o procedimento experimental do labirinto aquático de Morris é adequada, uma vez que esses animais demonstram ser bons nadadores e apresentam uma boa capacidade de localização espacial requerida neste teste pelo fato da água ser um meio aversivo, a tendência desta espécie é procurar escapar desse meio (PETTENUZZO, 2001).

Em experimentos com labirinto aquático e ratos Wistar jovens, Segal e colaboradores (1988), foram um dos primeiros pesquisadores a estudar a correlação entre a atividade da enzima acetilcolinesterase (AChE) em cérebro de ratos e o desempenho em uma tarefa espacial. Nesse estudo os autores avaliaram a atividade da enzima AChE em 43 regiões cerebrais diferentes de ratos. A aprendizagem individual e os índices de retenção foram encontrados e correlacionados significativamente com o nível da AChE em regiões específicas, como o corpo estriado e hipocampo.

O tratamento com TG1 causou aprimoramento na aprendizagem e na memória, evidenciados pela diminuição significativa no tempo necessário para os animais encontrarem o local da plataforma no labirinto aquático de Morris.

Do mesmo modo, no modelo de memória emocional, no qual o animal aprende a evitar um choque (esquiva passiva), que envolve o sistema límbico, do qual fazem parte, o hipocampo, amígdala, septo medial, bulbo olfatório e áreas talâmicas anteriores, interconectadas formando o circuito de Papez. O TG1, também foi capaz de melhorar os déficits de memória, na dose testada (30 mg/kg), na memória recente (poucos minutos após o aprendizado), e na memória tardia (um dia após o aprendizado), conforme demonstrado em nossos experimentos.

Os inibidores da AChE utilizados como tratamento da Doença de Alzheimer (tacrina, rivastigmina, donepezil e galantamina) alteram a função colinérgica central ao inibir as

enzimas que degradam a acetilcolina como a enzima AChE, aumentando, assim, a capacidade da acetilcolina de estimular os receptores nicotínicos e muscarínicos cerebrais (GROSSBERG et al., 2003).

O composto 1,3-diestearil-2-oleil-glicerol apresentou inibição da AChE próxima ao rivastigmina (controle positivo), apresentando, assim, uma forma eficaz a estimulação colinérgica nas mesmas concentrações da droga de referência (neostigmina).

Complementando esses dados, é importante demonstrar que um radical livre é qualquer espécie química que contém um ou mais elétrons desemparelhados, sendo o radical hidroxila, o radical superóxido e o NO os radicais mais comuns. Esses elétrons desemparelhados são aceptores de elétrons de outras moléculas, o que leva a sua oxidação. Os radicais livres e moléculas relacionadas são classificados como espécies reativas derivadas do oxigênio (EROS) por sua capacidade de causar oxidações dentro das células, podem afetar a função cerebral, inclusive a memória e aprendizagem. O acúmulo das EROS pode danificar lipídios, proteínas e ácidos nucleicos, em condições fisiológicas, as células são capazes de manter o fluxo de EROS abaixo de um limiar tóxico. O estresse oxidativo descreve uma condição na qual as defesas antioxidantes celulares são insuficientes para manter os níveis de EROS (SCHULZ et al, 2000).

Pesquisadores através de seus estudos fortalecem a possibilidade de que o dano oxidativo pode desempenhar um importante papel na patogênese da DA em pelo menos algumas regiões-chaves do cérebro. Indicando ainda que o dano oxidativo era observado nos cérebros com a DA como resposta às placas senis e aos emaranhados neurofibrilares, porém a hipótese mais recente observa que o dano oxidativo verificado em cérebros ocorre em indivíduos com comprometimento cognitivo leve, o que é considerado como fase pré-clínica da DA (KELLER et al, 2005; MIGLIORE et al, 2005; BONDA et al, 2010; LYRAS et al, 1997).

Desta forma, o presente estudo investigou a influência do TG1 na peroxidação lipídica, conteúdo de nitrito e atividade das enzimas catalase e superóxido dismutase no hipocampo dos ratos submetidos aos testes de memória. O óxido nítrico (NO) está envolvido em diversas funções celulares, dependendo do local de produção atua como agente vasorrelaxante, neurotransmissor e imunomodulatório. A peroxidação lipídica pode ser definida como os danos biológicos causados por radicais livres que são formados durante estresse oxidativo (ZIN et al., 2002; MIGLIORE, 2009). Os resultados revelaram uma potente atividade antioxidante do composto contra espécies reativas derivadas do oxigênio e/ou nitrogênio, sugerindo que o TG1 pode ser usado como uma alternativa terapêutica para

diversas patologias relacionadas ao estresse oxidativo, particularmente para doenças relacionadas com o sistema nervoso central, tal como, Doença de Alzheimer.

A superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT) são enzimas antioxidantes que atuam em locais diferentes na via metabólica de radicais livres, quando há uma alteração na atividade desta enzima sem alterações compensatórias no organismo pode resultar em estresse oxidativo (SARANDOL, 2007). Tendo em vista que a SOD e CAT podem ser consideradas as defesas antioxidantes enzimáticas endógenas mais importantes do organismo no combate a produção de radicais livres, o aumento da sua atividade sugere que TG1 apresenta um potencial antioxidante relacionado à modulação da atividade enzimática. No entanto, mais estudos devem ser realizados para determinar se esse composto é capaz de alterar a expressão gênica dessas enzimas.

CONCLUSÃO

De acordo com os resultados apresentados nesse estudo, pode ser concluído que o tratamento agudo com TG1 na dose de 30 mg/Kg i.p, apresentou um efeito benéfico sobre o déficit de aprendizagem e de memória, bem como pode modular a atividade de enzimas que são antioxidantes capazes de reduzir o estresse oxidativo e formação de nitrito, podendo até mesmo proporcionar uma proteção contra lesões cerebrais. No entanto, testes complementares sobre o processo de memória em ratos precisam ser feitos para justificar o desenvolvimento de uma nova formulação para o tratamento de doenças neurodegenerativas.

REFERÊNCIAS

ARTHUR, J.R.; BOYNE, R. Superoxide dismutase and glutathione peroxidase activities in

neutrophils from selenium deficient and copper deficient cattle. *Life Sciences*.v. 36,p. 1569-1575, 1985.

AVRAMOVICH, Y.; AMIT, T.; YODIM, M.B.H. Non-steroidal Anti-inflammatory Drugs Stimulate Secretion of Non-amyloidogenic Precursor Protein. *The American Society For Biochemistry and Molecular Biology* v. 277, p. 31466-31473, 2002.

BLENNOW, K.; LEON, M.; ZETTERBERG, H. Alzheimer`s disease. *Lancet*.v. 368. p 387-403, 2006.

BONDA, D.J.; WANG, X.; PERRY, G.; NUNOMURA, A.; TABATON, M.; ZHU, X.; SMITH, M.A. Oxidative stress in Alzheimer disease: A possibility for prevention. *Neuropharmacology* 59: 290-294, 2010.

BU, G.; CAM, J.; ZERBINATTI, C. LRP in amyloid- β production and etabolism. *New York Academy of Sciences*. v. 1086, p. 35-53, 2006.

CHANCE, B., MAEHLI, A.C. Assay catalases and peroxidases. *Methods in Enzymology*. v. 2,p. 764-768, 1955.

COSTA JÚNIOR, J. S., FERRAZ, A. B. F., SOUSA, T. O.,SILVA, R. A. C. ,LIMA, S. G.,FEITOSA, C. M.,CITÓ, A. M. G. L.,FREITAS,R. M.,SPEROTTO, A. R. M., PÉRES, V. F., MOURA, D. J., SAFFI,J. Investigation of Biological Activities of Dichloromethane and Ethyl Acetate Fractions of *Platonia insignis* Mart. Seed. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*. Article first published online: 31 AUG 2012.

DEL BO, R.; GHEZZI, S.; SCARPINI, E.; BRESOLIN, N.; COMI, G.P. VEGF genetic variability is associated with increased risk of developing Alzheimer`s disease. *Journal Neurology Science*.v. 283,p. 66-68, 2009.

DRAPER, H.H., HADLEY, M. Malondialdehyde determination as an index of lipid peroxidation. *Methods in Enzymology*. v. 186,p. 421-431, 1990.

ELLMAN, G. L.; COURTNEY, D. K.; ANDRES, V. Jr.; FEATHERSTONE, R. M: A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemistry Pharmacology*. v. 7,p. 88-95, 1961.

GREEN, LC, TANNENBAUM, SR, GOLDMAN, P. Nitrate synthesis in the germfree and conventional rat. *Science*.v. 212,p. 56-58, 1981.

GROSSBERG, G.T.Cholinesterase inhibitors for the treatment of Alzheimer`s disease: getting on and staying on. *Current The Research*. v. 64,p. 216-235, 2003

HENEKA, M.T.; O`BANION, M.K. Inflammatory processes in Alzheimer`s disease. *Journal Neuroimmunology*. v. 184,p. 69-91, 2007.

IANISKI, F.R. **Efeito neuroprotetor de nanocápsulas contendo meloxicam em um modelo da doença de Alzheimer induzido pelo peptídeo β -amiloide em camundongos.**

Dissertação (Mestrado em Nanociências). Santa Maria: Centro Universitário Franciscano, 83 f, 2011.

INGKANINAN, K.; DE BEST, C. M.; VAN DER HEIJDEN, R.; HOFTE, A. J.; KARABATAK, B.; IRTH, H.; TJADEN, U. R.; VAN DER GREEF, J.; VERPORTE, R.; High-performance liquid chromatography with on-line coupled UV, mass spectrometric and biochemical detection for identification of acetylcholinesterase inhibitors from natural products, **Journal Chromatography**. v. 61,p. 872, 2000.

ITO, K.; AHADIEH, S.; CORRIGAN, B.; FRENCH, J.; FULLERTON, T.; TENSFELDT, T. Disease progression meta-analysis model in Alzheimer`s disease. **Alzheimer`s & Dementia**. v. 6,p. 39-53, 2010.

KALARIA, R. N.; MAESTRE, G. E.; ARIZAGA, R.; FRIEDLAND R. P.; GALASKO, D.; HALL, K.; LUCHSINGER, J. A.; OGUNNIYI, A.; PERRY, E. K.; POCOTNIK, F.; PRINCE, M.; STEWART, R.; WIMO, A.; ZHANG, Z. X.; ANTUONO, P. Alzheimer`s disease and vascular dementia in developing countries: prevalence, management, and risk factors. **Lancet Neurology**. v. 7,p. 812-826, 2008.

KELLER, J.N.; SCHMITT, F.A.; SCHEFF, S.W.; DING, Q.; CHEN,Q.; BUTTERFIELD, D.A.; MARKESBERY, W.R. Evidence of increased oxidative damage in subjects with mild cognitive impairment. **Neurology**. v. 64,p. 1152–1156, 2005.

LOWRY, O.H., ROSEBROUGH, N.J., FARR, A.L., RANDAL, R.J. Protein measurement with follin phenol reagent. **Journal Biology Chemistry**. v. 193,p. 265-275, 1951.

LYRAS, L.; CAIRNS, N.J.; JENNER, A.; HALLIWELL, B. An assessment of oxidative damage to proteins, lipids, and DNA in brain from patients with Alzheimer`s disease. **Journal Neurochemystre**. v. 68,p. 2061–2069, 1997.

MEDEIROS, R.; REDIGER, R.D.S.; PASSOS, G.F.; PANDOLFO, P.; DUARTE, F.S.; FRANCO, J.L.; AFRE, A.L.; DI GIUNTA, G.; FIGUEIREDO, C.P.; TAKAHASHI, R.N.; CAMPOS, M.M.; CALIXTO, J.B. Connecting TNF- α signaling pathways to iNOS expression in a mouse model of Alzheimer`s disease: relevance for the behavioral and synaptic deficits induced by amyloid β protein. **Journal of Neuroscience**.v. 27,p. 5394-5404, 2007.

MIGLIOREA, L.; COPPEDÈB, F. Environmental-induced oxidative stress in neurodegenerative disorders and aging. **Mutation Research**. v. 674,p. 73-84, 2009.

MIGLIORE, L.; FONTANA, I.; TRIPPI, F.; COLOGNATO, R.; COPPEDÈ, F.; TOGNONI, G.; NUCCIARONE, B.; SICILIANO, G. Oxidative DNA damage in peripheral leukocytes of mild cognitive impairment and AD patients. **Neurobiology Aging** v.26,p. 567–573, 2005.

MOORE, A.H.; O`BANION, K. Neuroinflammation and anti-inflammatory therapy for Alzheimer`s disease. **Advanced Drug Delivery Reviews**.v. 54,p. 1627-1656, 2002.

MORRIS, R.G. Spatial localization does not require the presence of local cues. **Learn Motiv**.v. 12,p. 239-260, 1986.

MOUNT, C.; DOWNTON, C. Alzheimer disease: progress or profit? **Nature Medicine**.v. 12,p. 780-784, 2006.

ROBERTO LENT. Cem Bilhões de Neurônios: **Conceitos Fundamentais de Neurociência**, Ed. Atheneu, 588-616, 2001.

SARANDOL, A.; SARANDO, E.; EKER, S. S.; ERDINC, S.; VATANSEVER, E.; KIRLI, S. Major depressive disorder is accompanied with oxidative stress: short-term antidepressant treatment does not alter oxidative–antioxidative systems. **Human Psychopharmacology Clinical**.v. 22,p. 67-73, 2007.

SCHULZ, J.B.; LINDENAU, J.; SEYFRIED, J.; DICHGANS, J. Glutathione, oxidative stress and neurodegeneration. **European Journal Biochemistry**.v. 267,p. 4904–4911, 2000.

Segal M, Greenberger V, Israeli M, Biegon A. A correlation between regional acetylcholinesterase activity in rat brain and performance in a spatial task. **Behavioral Brain Research**. v. 30,p. 215-219, 1988.

SERENIKI, A.; VITAL, M. A. B. F: A doença de Alzheimer: aspectos fisiopatológicos e farmacológicos. **Revista Psiquiatria do Rio Grande do Sul** [on line] v. 30, 2008

SMITH, M.A.C. Doença de Alzheimer. **Revista Brasileira Psiquiatria**.v. 21,p. 3-7, 2011.

SNYDER, E.M.; NONG, Y.; ALMEIDA, C.G.; PAUL, S.; MORAN, T.; CHOI, F.Y.; NAIM, A.C.; SALTER, M.W.; LOMBROSO, P.J.; GOURAS, G.K.; GREENGARD, P. Regulation of NMDA receptor trafficking by amyloid- β . **Nature Neuroscience**. v. 8,p. 1051-1058, 2005.

PETTENUZZO, L.F. **Efeito da administração crônica pós-natal dos ácidos ropiônicos e metilmalônico sobre o comportamento de ratos no labirinto aquático de Morris (Water Maze) e sobre alguns parâmetros bioquímicos de estresse oxidativo em hipocampo**. [Dissertação]. Porto Alegre:Instituto de Ciências Básicas de Saúde. Universidade Federal do Rio Grande do Sul; 2001.

VIANA, M.B.; TOMAZ, C.; GRAEFF, F.G. The elevated T-maze: A new animal model of anxiety and memory. **Pharmacology Biochemistry Behavioral** v. 49,p 549-554, 1994.

VIANNA, M.R.; SZAPIRO, G.; MCGRAUGH, J.L.; MEDINA, J.H.; IZQUIERDO, I.Retrieval of memory for fear-motivated training initiates extinction requiring protein synthesis in the rat hippocampus. **Proc Natl Acad Sci U S A**.v. 98,p. 12251-12254, 2001.

TUPPO, E.; ARIAS, H. The role of inflammation in Alzheimer`s disease. **International Journal Biochemistry Cell B**.v. 37,p. 289-305, 2005.

ZIN, Z.M.; ABDUL-HAMID, A.; OSMAN, A.; Antioxidative activity of extracts from Mengkudu (*Morinda citrifolia* L.) root, fruit and leaf. **Food Chemistry**. v. 78,p. 227-231, 2002.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os estudos fitoquímicos e farmacológicos já realizados com extratos e substâncias isoladas da espécie *P. insignis* Mart. (bacuri), indicam que esses são fontes promissoras para a elaboração de possíveis fitomedicamentos a partir dessa planta, bastante consumida no Nordeste do Brasil. O tratamento agudo com 1,3-diestearil-2-oleil-glicerol

(TG1) na dose de 30 mg kg⁻¹ indicam ausência de toxicidade aguda, uma vez que, não alterou de forma geral o padrão comportamental dos ratos, e não produziu alterações hematológicas, histopatológicas cerebrais e hepáticas. A redução dos níveis da AST e ALP até mesmo pode sugerir certa proteção hepática, que deverá ser melhor investigada em modelos animais de hepatotoxicidade. O 1,3-diestearil-2-oleil-glicerol (TG1) apresentou inibição da AChE próxima a rivastigmina, sugerindo uma forma eficaz da estimulação colinérgica nas mesmas concentrações do fármaco de referência (neostigmina). Revelou também um efeito benéfico sobre o déficit de aprendizagem e de memória, redução no estresse oxidativo e formação de nitrito, podendo proporcionar uma proteção contra lesões cerebrais. Entretanto, testes complementares sobre o processo de memória em ratos precisam ser feitos para justificar o desenvolvimento de uma nova formulação para o tratamento de doenças neurodegenerativas.

ANEXOS

ANEXO A: Confirmação de submissão à Revista Brasileira de Farmácia.



REVISTA BRASILEIRA DE FARMÁCIA

Órgão Oficial da Associação Brasileira de Farmacêuticos

ISSN 0370-372x e ISSN 2176-0667

Rio de Janeiro, 19 de outubro de 2012

Prezado(a) Professor(a) **Chistiane Mendes Feitosa**, comunicamos o recebimento do trabalho intitulado: correspondente, segue em anexo o certificado de submissão do artigo " **Levantamento das propriedades físico-químicas e farmacológicas de extratos e compostos isolados de *Platonia insignis* Mart. uma perspectiva para o desenvolvimento de fitomedicamentos**", do qual o(a) senhor(a) é o(a) autor(a) correspondente. O trabalho recebeu o **Nº556 /2012** e foi encaminhado para os revisores da *Revista Brasileira de Farmácia*, que farão uma análise a fim de orientar o parecer do corpo editorial. Tão logo tenhamos uma resposta, entraremos em contato.

Atenciosamente,

Comissão Editorial

Revista Brasileira de Farmácia

Rua dos Andradas, 96/10º Andar – CEP 20051-000 – Rio de Janeiro – RJ

Tel.: (21) 2263-0791 Fax: (21) 2233-3672

www.revbrasfarm.org.br

revista@abf.org.br

**ANEXO B: Confirmação de submissão à Revista de Ciências Farmacêuticas
Básica e Aplicada**

Em 14 de outubro de 2012 21:36, Chistiane Feitosa <chistiane@ufpi.edu.br> escreveu:

Prezado editor da Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e aplicada

Estou enviando o artigo intitulado "Ensaio pré-clínico em ratos tratados com 1,3-diestearil-2-oleil-glicerol (TG1)" para submissão nesta revista, em anexo consta a carta e o artigo.

Atenciosamente,

Profa. Dra.Chistiane Mendes Feitosa

Bolsista de produtividade do CNPq

Programa de Mestrado em Ciências Farmacêuticas-UFPI

**Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada
Faculdade de Ciências Farmacêuticas - UNESP - Araraquara
e-mail para contato: rcfba@fcfar.unesp.br - tel.: (16) 3301 6892**