



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ – UFPI
CAMPUS UNIVERSITÁRIO MINISTRO PETRÔNIO PORTELLA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE – CCS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Avaliação das propriedades antioxidantes e toxicológicas da agatisflavona: subsídio para o desenvolvimento de um medicamento

ANDERSON WILBUR LOPES ANDRADE

TERESINA – PIAUÍ

2016

ANDERSON WILBUR LOPES ANDRADE

Avaliação das propriedades antioxidantes e toxicológicas da agatisflavona: subsídio para o desenvolvimento de um medicamento

Dissertação submetida ao Programa 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: Profa. Dra. Jéssica Pereira Costa

TERESINA – PIAUÍ

2016

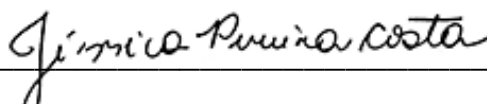
ANDERSON WILBUR LOPES ANDRADE

Avaliação das propriedades antioxidantes e toxicológicas da agatisflavona: subsídio para o desenvolvimento de um medicamento

Dissertação submetida ao Programa 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.

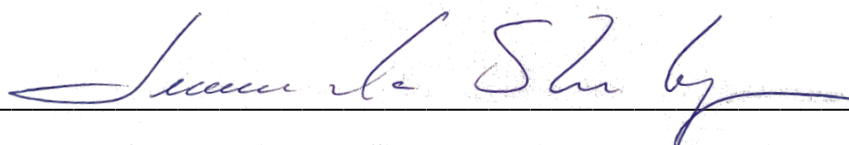
Aprovada em: 24/05/2016

BANCA EXAMINADORA



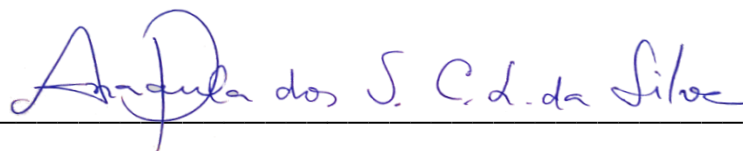
Profa. Dra. Jéssica Pereira Costa (Orientadora)

Departamento de Enfermagem – UFPI



Prof. Dr. Luciano da Silva Lopes (Membro interno)

Departamento de Biofísica e Fisiologia - UFPI



Profa. Dra. Ana Paula dos Santos Correia Lima da Silva (Membro externo)

Departamento de Biologia – UAB/UFPI

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ**REITOR**

Prof. Dr. José de Arimatéia Dantas Lopes

VICE-REITOR

Profa. Dra. Nadir do Nascimento Nogueira

PRÓ-REITOR PARA ASSUNTOS DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

Prof. Dr. Pedro Vilarinho Castelo Branco

PRÓ-REITOR DE PÓS-GRADUAÇÃO

Prof. Dr. Helder Nunes da Cunha

DIRETOR DO CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

Profa. Dra. Regina Ferraz Mendes

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

Prof. Dr. Paulo Michel Pinheiro Ferreira

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

Prof. Dra. Marcília Pinheiro da Costa

AGRADECIMENTOS

Agradeço inicialmente aos meus pais, **Francisco Frederico Andrade Neto** e **Raimunda Lopes Ribeiro**, e à minha irmã, **Sacha Dayane Lopes Andrade** pelo carinho, apoio e compreensão nessa e em outras jornadas que trilhei.

À minha orientadora, Profa. Dra. **Jéssica Pereira Costa**, e ao co-orientador, Prof. Dr. **Rivelilson Mendes de Freitas** (*in memoriam*), pela confiança, dedicação, sugestões, críticas, amizade e incentivo na concretização desta dissertação.

Ao Prof Dr. **Jorge Maurício David** pela disponibilidade da substância utilizada e a Profa. Dr. **Adriana Maria Viana Nunes** pela sua paciência e ensinamentos.

À minha companheira, **Lyghia Maria Araújo Meirelles**, meu exemplo de amor à pesquisa científica. Sou grato por sua amizade e sentimentos sinceros, por despertar em mim o interesse pelo mundo científico e por sempre, juntamente com minha amiga, **Jurema da Silva Araújo**, dedicar palavras de estímulos, conforto e perseverança em praticamente todos os momentos desta caminhada.

Aos meus colegas de pós-graduação (PPGCF 2015-2017) e do Laboratório em Pesquisa Neuroquímica Experimental (LAPNEX), em especial ao Me. **George Laylson da Silva Oliveira**. Demonstro aqui minha eterna gratidão, pois sem o conhecimento, esforço, ajuda e o empenho de vocês esse trabalho não teria sido possível.

Aos membros da banca, Dr. **Luciano da Silva Lopes** e Dra. **Ana Paula dos Santos Correia Lima da Silva**, que gentilmente aceitaram o convite para examinarem esta dissertação de mestrado.

À **Coordenação** e aos **Professores do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas (PPGCF)** da Universidade Federal do Piauí.

Aos **funcionários que prestam serviços no Núcleo de Tecnologia Farmacêutica da UFPI**, pelos momentos de descontração e auxílio durante a execução desta pesquisa.

À **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Piauí - FAPEPI** pelo prezado apoio financeiro.

Por fim, meus sinceros agradecimentos a **todos** que direta ou indiretamente contribuíram para a concretização deste trabalho.

Avaliação das propriedades antioxidantes e toxicológicas da agatisflavona: subsídio para o desenvolvimento de um medicamento. ANDERSON WILBUR LOPES ANDRADE. Orientadora: Dra. Jéssica Pereira Costa. 118p. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Piauí, 2016.

RESUMO

Uma das classes de flavonoides que possuem baixa toxicidade e diversas propriedades inerentes ao grupo, são os biflavonoides. Dentre estes, a agatisflavona é um dos menos estudados, principalmente no que se refere à suas propriedades toxicológicas, sendo, portanto, o foco deste trabalho. Dessa forma, objetivo desta investigação foi avaliar tais propriedades da agatisflavona em modelos animais, bem como verificar a possível atividade antioxidante *in vitro* em parâmetros relacionados ao estresse oxidativo e realizar uma prospecção científica e tecnológica. Inicialmente, foi realizado um levantamento científico e tecnológico a respeito de suas aplicações farmacêuticas em patologias relacionadas ao Sistema Nervoso Central (SNC). As palavras-chave utilizadas foram: agatisflavona, antioxidante, ansiolítico, neuroprotetor, antidepressivo, assim como suas correlações. Em um segundo momento, avaliou-se as propriedades antioxidantes *in vitro* por meio dos ensaios DPPH[•], ABTS^{•+} e hidroxila, bem como a sua capacidade para iniciar a transferência de elétrons por meio do potencial redutor, em inibir a peroxidação lipídica pelo método TBARS e a produção de óxido nítrico pela Reação de Griess. Por fim, realizou-se a estimativa da DL₅₀ e a avaliação da toxicidade sobre os parâmetros anátomo e histopatológicos, fisiológicos e comportamentais da agatisflavona em camundongos *Swiss* fêmeas, bem como sua citotoxicidade frente à *Artemia salina*. Foi possível constatar um considerável número de publicações no que se refere às atividades farmacológicas da agatisflavona como: antimicrobiana, antivirais, anticarcinogênica. Este biflavonoide se destaca como composto potencialmente ativo sobre o SNC, atuando principalmente no processo de neurogênese. Porém, não foram verificados depósitos de patentes que correlacionam o biflavonoide a desordens neurológicas. Foi demonstrado que a agatisflavona apresenta capacidade antioxidante contra os radicais testados semelhante ($p < 0,05$) ao Trolox (padrão antioxidante utilizado) e a de outros compostos fenólicos: miricetina, fukugisida e morelloflavona, estruturalmente semelhantes à agatisflavona, o que evidencia sua importância na proteção contra os possíveis danos oxidativos ocasionados por radicais livres. Durante o tratamento, nenhuma morte foi registrada nas doses de 300 e 2000 mg/Kg ($n = 03$ /grupo), o que permite estimar que a DL₅₀ da agatisflavona seja maior ou igual a 5000 mg/Kg. O biflavonoide não alterou os parâmetros analisados de modo significativo e não foi verificada uma diferença estatística ($p > 0,05$) nos achados obtidos em relação ao grupo controle. A agatisflavona revelou possuir toxicidade frente à *Artemia salina* e baixa toxicidade aguda por via oral quando comparado ao grupo controle. Os dados obtidos na prospecção científica e tecnológica e dos testes *in vitro* e *in vivo* realizados neste estudo, permite o desenvolvimento de pesquisas inovadoras referentes às ações farmacológicas da agatisflavona, visto que, poucas patentes mencionam suas atividades farmacológicas, além dos resultados dos testes *in vitro* e *in vivo* realizados os quais demonstraram a capacidade antioxidante do biflavonoide agatisflavona nos ensaios realizados e de ser não tóxica em camundongos *Swiss* nas doses inferiores ou iguais a 2000 mg/Kg, uma vez que, não foi observada nenhuma morte nos grupos testes, além do fato de a agatisflavona não produzir alterações hematológicas, bioquímicas, comportamentais, fisiológicas e anátomo e histopatológicas significativas, quando comparadas aos grupos controles.

Palavras-chave: Agatisflavona. Antioxidante. Biflavonoide. Sistema Nervoso Central. Toxicidade Aguda.

Evaluation of antioxidant and toxicological properties of agathisflavone: subsidy for the development of a medicine. ANDERSON WILBUR LOPES ANDRADE. Advisor: Dra. Jéssica Pereira Costa. 118p. Master's Dissertation. Post-Graduate Program in Pharmaceutical Sciences, Federal University of Piauí, 2016.

ABSTRACT

One of the classes of flavonoids that have low toxicity and various properties inherent in the group are biflavonoids. Among these, agathisflavone is one of the least studied primarily in regard to their toxicological properties and, therefore, the focus of this work. In this way, objective of this investigation was to evaluate such properties agathisflavone in animal models, as well as verify the possible antioxidant activity, *in vitro*, in parameters related to oxidative stress and accomplish a scientific and technological prospection. Initially, was performed a scientific and technological survey about their pharmaceutical applications in diseases related to the central nervous system (CNS). The keywords used were: agathisflavone, antioxidant, anxiolytic, neuroprotective, antidepressant, as well as their correlations. In a second time, we evaluated the antioxidant properties *in vitro* by means of the DPPH[•], ABTS^{•+} and hydroxyl assays, as well as its ability to initiate the transfer of electrons through the reducing potential to inhibit lipid peroxidation by the TBARS method and the production of nitric oxide by the Griess reaction. Finally, it was held an estimated LD₅₀ and a toxicity evaluation on anatomical and histological, physiological and behavioral parameters of agathisflavone in Swiss female mice, as well as cytotoxicity front *Artemia salina*. It was possible to observe a considerable number of publications in what it refers to agathisflavone pharmacological activity as antimicrobial, antiviral, anti-carcinogenic. This biflavonoid stands out as potentially active compound CNS, mainly in the process of neurogenesis. However, not been verified patent deposits correlating biflavonoid to neurological disorders. It was demonstrated that the agathisflavone presents antioxidant capacity against radicals tested ($p < 0.05$) similar to Trolox (antioxidant standard used) and other phenolic compounds: myricetin, fukugisida and morelloflavone structurally similar to agathisflavone, which highlights its importance protect against possible oxidative damage caused by free radicals. During treatment, no were recorded deaths at doses of 300 and 2000 mg/Kg ($n = 03 / \text{group}$), which allows to estimate the LD₅₀ agathisflavone is greater than or equal to 5000 mg/Kg. The biflavonoid did not change the parameters analyzed significantly and was not observed a statistical difference ($p > 0.05$) regarding the results obtained in the control group. The agathisflavone have revealed toxicity front of *Artemia salina* and low acute oral toxicity when compared to the control group. The data obtained in the scientific and technological prospection and in the testing *in vitro* and *in vivo* performed in this study, allows the development of innovative researches referring to the pharmacological actions of agathisflavone, since, few patents mention their pharmacological activities, moreover the results of tests carried, *in vitro* and *in vivo*, which demonstrated the antioxidant capacity of agathisflavone biflavonoid in performed tests and be non-toxic in Swiss mice at doses lower or equal to 2000 mg/Kg, since, it was not observed any death in the test groups, and the fact the agathisflavone not produces changes hematological, biochemical, behavioral, physiological and anatomical and histopathological significant when compared to control groups.

Keywords: Agathisflavone. Antioxidant. Biflavonoids. Central Nervous System. Acute toxicity.

LISTA DE FIGURAS

INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA

Figura 1: Organização do trabalho de dissertação.....	18
Figura 2: Etapas da P&D de medicamentos de origem vegetal.	21
Figura 3: Estrutura química básica dos flavonoides.....	22
Figura 4: Biossíntese dos flavonoides.	22
Figura 5: Estrutura química da agatisflavona.	24

CAPÍTULO I

Figura 6: Evolução temporal das publicações referentes à agatisflavona na base de dados Periódicos CAPES, <i>Science Direct</i> , <i>Web of Science</i> , <i>Scopus</i> , <i>Pub Med</i> e <i>ACS Publications</i> . .	38
Figura 7: Neurogênese induzida pelo AR potencializada pela agatisflavona.	41
Figura 8: Possível mecanismo de ação sedativo, hipnótico, ansiolítico e antiepilético da agatisflavona.....	42
Figura 9: Possível mecanismo de ação neuroprotetor da agatisflavona.	43

CAPÍTULO II

Figura 10: Reação antioxidante da agatisflavona por <i>scavenging</i> do radical DPPH [•]	58
Figura 11: Reação antioxidante da agatisflavona por <i>scavenging</i> do radical ABTS ^{•+}	59
Figura 12: Reação antioxidante da agatisflavona por <i>scavenging</i> do radical OH [•]	60
Figura 13: Reação antioxidante da agatisflavona por <i>scavenging</i> do NO.....	61
Figura 14: Reação antioxidante da agatisflavona por inibição da peroxidação lipídica.	62
Figura 15: Reação antioxidante da agatisflavona por potencial redutor.	63
Figura 16: Capacidade antioxidante da agatisflavona em diferentes concentrações sobre o radical DPPH [•]	64
Figura 17: Capacidade antioxidante da agatisflavona em diferentes concentrações sobre o radical ABTS ^{•+}	65
Figura 18: Capacidade antioxidante da agatisflavona em diferentes concentrações na inibição da degradação da 2-desoxirribose por remoção de radical OH [•]	66

Figura 19: Potencial redutor ($\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}$) da agatisflavona em diferentes concentrações.	67
Figura 20: Capacidade antioxidante da agatisflavona em diferentes concentrações sobre a formação a geração de íons nitrito.....	68
Figura 21: Capacidade antioxidante da agatisflavona em diferentes concentrações por redução dos níveis de TBARS.	69
Figura 22: Propostas de mecanismos de atividade antioxidante da agatisflavona por doação de H^{\bullet} e elétrons.....	71

CAPÍTULO III

Figura 23: Equipamento de monitorização do consumo de água e ração e dos parâmetros fisiológicos dos animais em estudo.	87
Figura 24: Esquematização do procedimento de ensaio de toxicidade aguda <i>in vivo</i> com uma dose inicial de 300 mg/Kg de peso corporal.....	88
Figura 25: Teste comportamental Campo Aberto	89
Figura 26: Teste comportamental com a Barra Giratória (<i>rota rod</i>).....	89
Figura 27: Variação do peso absoluto dos órgãos coletados em camundongos <i>Swiss</i> após 14 dias da administração aguda da agatisflavona por via oral	97
Figura 30: Avaliação histopatológica dos órgãos (cérebro, pulmão e coração) coletados dos animais tratados com agatisflavona (300 e 2000 mg/Kg) e veículo (C.N.).....	98
Figura 31: Avaliação histopatológica dos órgãos (baço, fígado e rim) coletados dos animais tratados com agatisflavona (300 e 2000 mg/Kg) e veículo (C.N.).....	99
Figura 32: Taxa de letalidade de <i>A. salina</i> em 24 horas na presença da agatisflavona e dicromato de potássio em diferentes concentrações.....	100

LISTA DE TABELAS

INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA

Tabela 1: Propriedades físico-químicas da agatisflavona.....	25
Tabela 2: Exemplos de fontes vegetais da agatisflavona.	25
Tabela 3: Descrição da agatisflavona quanto aos estudos farmacológicos, toxicológicos e experimentais.....	26

CAPÍTULO I

Tabela 4: Número de artigos científicos publicados nas bases Periódicos CAPES, <i>Science Direct</i> , <i>Scopus</i> , <i>Pub Med</i> e <i>ACS Publications</i> por palavras-chave.....	37
Tabela 5: Publicações nas bases de dados Periódicos CAPES, <i>ScienceDirect</i> , <i>Web of Science</i> , <i>Scopus</i> , <i>PubMed</i> e <i>ACS Publications</i> , 1999-2015.....	40
Tabela 6: Número de patentes depositadas nos bancos tecnológicos INPI, WIPO, EPO, USPTO por palavras-chave.	43
Tabela 7: Patentes relacionadas à atividade farmacológica da agatisflavona depositadas nos bancos tecnológicos WIPO, EPO, USPTO.	44
Tabela 8: Relação das patentes encontradas nos bancos tecnológicos WIPO, EPO, USPTO agrupadas quanto a sua Classificação Internacional de Patentes.	45

CAPÍTULO III

Tabela 9: Resultados da determinação da dose letal 50% (DL ₅₀) em camundongos <i>Swiss</i> , tratados com agatisflavona por via oral.....	93
Tabela 10: Variação de peso corporal, do consumo de água e ração e da eliminação renal e fecal em camundongos durante 14 dias de observação após administração aguda por via oral da agatisflavona.....	94
Tabela 11: Resultados do teste campo aberto e teste de barra giratória (<i>rota rod</i>) realizados por camundongos <i>Swiss</i> após administração oral única da agatisflavona.....	95
Tabela 12: Resultados dos parâmetros bioquímicos de camundongos <i>Swiss</i> , tratados com agatisflavona por via oral.	96

Tabela 13: Resultados dos parâmetros hematológicos de camundongos <i>Swiss</i> , tratados com agatisflavona por via oral	97
Tabela 14: Concentração letal média (CL ₅₀) da agatisflavona e dicromato de potássio.	101

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AAPH	2'-azobis-2-amidinopropano-dicloridrato
Abs	Absorbância
ABTS ^{•+}	2,2'-azinobis (ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico)
ACS	<i>American Chemical Society</i>
ALT	Alanina Aminotransferase AMPc Adenosina 3',5'-monofosfato cíclico
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AR	Ácido Retinóico
AST	Aminotransferase
CAPES	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
CCA	Central do Centro de Ciências Agrárias
CDK5/p25	Cinase 5 dependente de ciclina proteína p25
CHCM	Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média
CI ₅₀	Concentração Inibitória Média
CIP	Classificação Internacional de Patentes
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CL ₅₀	Concentração Letal Média
DE ₅₀	Dose Eficaz Média
DPPH [•]	2,2-difenil-1-picrilhidrazil
DL ₅₀	Dose Letal em 50 por cento
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
E.P.M.	Erro Padrão Da Média
EPO	<i>European Patent Office</i>
ERNs	Espécies Reativa de Nitrogênio
EROs	Espécies Reativas de Oxigênio
GABA	Ácido Gama-Aminobutírico
GHS	<i>Globally Harmonised System</i>
HCM	Hemoglobina Corpuscular Média
INPI	Instituto Nacional de Propriedade Industrial
i.p.	Intraperitoneal
MTT	brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio)
NPS	Nitroprussiato De Sódio
OECD	<i>Organisation for Economic Co-operation and Development</i>

P&D	Pesquisa e Desenvolvimento
SNC	Sistema Nervoso Central
TBA	Terc-butilamina
TBARS	Substâncias Reativas Ao Ácido Tiobarbitúrico
USPTO	<i>United States Patent and Trademark Office</i>
UV	Ultravioleta
v.o	Via Oral
VCM	Volume Corpuscular Médio
WIPO	<i>World Intellectual Property Organization</i>

LISTA DE SÍMBOLOS E MEDIDAS

μL	microlitros
$\mu\text{g/mL}$	microgramas por mililitros
μM	micromolar
%	porcentagem
$^{\circ}\text{C}$	grau Celsius
cm^2	centímetro quadrado
Fe^{2+}	ferrocianeto de potássio
Fe^{3+}	ferricianeto de potássio
FeSO_4	sulfato de ferro II
fL.	fentolitros
g	gramas
g/cm^3	gramas por centímetro cúbico
g/mol	gramas por mol
h	Hora
H^{\bullet}	Hidrogênio Radicalar
$\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$	persulfato de potássio
Kg	quilo
L	litros
mg	miligramas
mg/dL	miligramas por decilitro
mg/Kg	miligramas por quilo
mg/L	miligramas por litro
mL	mililitros
mM	milimolar
N_2	nitrogênio
N	normal
NaOH	hidróxido de sódio
nm	nanômetros
NO	Óxido nítrico
O_2	oxigênio
OH^{\bullet}	Radical Hidroxila

UI/L unidades internacionais por litro

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
2 OBJETIVOS	19
2.1 Objetivo geral	19
2.2 Objetivos específicos.....	19
3 REVISÃO DE LITERATURA.....	20
3.1 Pesquisa & Desenvolvimento de medicamentos a partir de plantas medicinais	20
3.2 A importância dos flavonoides como fonte potencial de compostos bioativos.....	21
3.3 Biflavonoide agatisflavona	24
REFERÊNCIAS	28
4 CAPÍTULO I: Agatisflavona, um biflavonoide com aplicações farmacológicas para o sistema nervoso central: uma revisão	32
4.1 Introdução.....	34
4.2 Metodologia.....	36
4.3 Resultados e discussão.....	37
4.3.1 Prospecção científica sobre a agatisflavona	37
4.3.2 Prospecção tecnológica sobre a agatisflavona.....	43
4.4 Conclusão	47
REFERÊNCIAS	48
5 CAPÍTULO II: Avaliação das propriedades antioxidantes <i>in vitro</i> do biflavonoide agatisflavona.....	53
5.1 Introdução.....	55
5.2 Materiais e métodos.....	57
5.2.1 Reagentes.....	57
5.2.2 Obtenção do composto	57
5.2.3 Avaliação da capacidade antioxidante da agatisflavona por <i>scavenging</i> do radical DPPH'	57
5.2.4 Avaliação da capacidade antioxidante da agatisflavona por <i>scavenging</i> do radical ABTS ^{•+}	58
5.2.5 Avaliação da capacidade antioxidante da agatisflavona por <i>scavenging</i> do radical hidroxila (OH [•])	59
5.2.6 Avaliação da capacidade antioxidante da agatisflavona por <i>scavenging</i> óxido nítrico (NO).....	61

5.2.7 Avaliação da capacidade antioxidante da agatisflavona por inibição da peroxidação lipídica	61
5.2.8 Avaliação da capacidade antioxidante da agatisflavona por potencial redutor	63
5.2.9 Análises estatísticas	63
5.3 Resultados.....	64
5.3.1 Capacidade antioxidante por <i>scavenging</i> do radical DPPH'	64
5.3.2 Capacidade antioxidante por <i>scavenging</i> do radical ABTS ⁺⁺	65
5.3.3 Capacidade antioxidante por <i>scavenging</i> do radical OH [*]	66
5.3.4 Capacidade antioxidante pelo potencial redutor.....	67
5.3.5 Capacidade antioxidante por <i>scavenging</i> do NO.....	68
5.3.6 Capacidade antioxidante por inibição da peroxidação lipídica	69
5.4 Discussão	71
5.5 Conclusão	76
REFERÊNCIAS	77
6 CAPÍTULO III: Avaliação toxicológica do biflavonoide agatisflavona: teste de toxicidade aguda e <i>in vitro</i> frente à <i>Artemia salina</i>	82
6.1 Introdução.....	84
6.2 Metodologia.....	86
6.2.1 Animais e substância	86
6.2.2 Avaliação toxicológica: <i>screening</i> hipocrático e estimativa da DL ₅₀	86
6.2.3 Avaliação comportamental	88
6.2.4 Estudos da toxicidade aguda da agatisflavona em parâmetros bioquímicos e hematológicos.....	90
6.2.5 Estudo da toxicidade aguda da agatisflavona em parâmetros anátomo e histopatológicos	90
6.2.6 Avaliação da toxicidade <i>in vitro</i> da agatisflavona frente à <i>Artemia salina</i>	91
6.2.7 Análises estatísticas	91
6.3 Resultados.....	93
6.3.1 <i>Screening</i> hipocrático, estimativa da DL ₅₀ e avaliação dos parâmetros fisiológicos e comportamentais.....	93
6.3.2 Toxicidade aguda em parâmetros bioquímicos e hematológicos	95
6.3.3 Estudo da toxicidade aguda da agatisflavona em parâmetros anátomo e histopatológicos	97
6.3.4 Citotoxicidade frente ao microcrustáceo <i>Artemia salina</i>	100
6.4 Discussão.....	102

6.5 Conclusão	106
REFERÊNCIAS	107
7 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	111
8 PERSPECTIVAS.....	112
9 PRODUÇÃO CIENTÍFICA NA VIGÊNCIA DO MESTRADO.....	113
ANEXOS.....	115
ANEXO A – Carta de aprovação do comitê de ética em experimentação animal - UFPI.....	116
ANEXO B – Confirmação de submissão de artigo ao <i>International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Science</i> (Qualis B3).....	117
ANEXO C – Confirmação de submissão de artigo ao <i>Chemico-Biological Interactions Journal</i> (Qualis B1).....	118

1 INTRODUÇÃO

O Brasil, cuja vasta biodiversidade, segundo Barreiro e Bolzani (2009), corresponde entre 15 e 20% de toda a biodiversidade mundial, é considerado o maior do planeta em número de espécies endêmicas (animais, plantas, fungos, insetos, organismos marinhos e bactérias). Estas são consideradas fontes de substâncias biologicamente ativas e sua preservação e estudo são de fundamental importância para a descoberta de novos fármacos com potenciais ações farmacológicas, despertando interesse de pesquisadores da área farmacêutica (ORLANDA, 2011).

Neste contexto, aproximadamente 66% das drogas utilizadas atualmente são derivadas diretamente de produtos naturais ou desenvolvidas a partir de um composto natural (NEWMAN; CRAGG, 2007). No mercado farmacêutico, a grande parcela dos fármacos em uso clínico tem sido gerada dos metabólicos secundários oriundos de produtos naturais ou por meio de sínteses químicas planejadas a partir destes, comprovando que a parceria entre a química medicinal e a química de produtos naturais se torna um efetivo instrumento para a descoberta de fármacos inovadores (BARREIRO; BOLZANI, 2009). Desta forma, as plantas constituem uma das principais fontes de substâncias biologicamente ativas com atividades terapêuticas diversas.

Durante o procedimento de P&D de medicamentos obtidos de produtos naturais, os processos de caracterização, isolamento, rendimento, biotransformação, controle de qualidade, recursos humanos e a tecnologia farmacêutica empregada agregam altos valores às indústrias, que por sua vez avaliam de forma criteriosa o custo e o benefício de uma nova invenção (LIU; CONSTANTINIDES; LI, 2014; ATANASOV et al., 2015).

O processo de P&D de um novo medicamento passa por uma série de etapas que se complementam entre si. A etapa inicial do processo corresponde à descoberta ou síntese de uma molécula que gera os princípios ativos, também denominados de farmoquímicos. A segunda é a sua extração, a partir de produtos de origem vegetal ou animal. A terceira rota tecnológica, que tem ganhado especial destaque na produção de novas drogas, é a síntese e modificação química do composto por meio da biotecnologia (PIERONI et al., 2009).

As empresas que atuam no setor farmacêutico estão entre as indústrias dependentes da inovação que mais investem em pesquisa e desenvolvimento (P&D). Porém, apesar do grande investimento em P&D, no cenário atual, o número de novas moléculas desenvolvidas e autorizadas a comercialização está em declínio. Esta repercussão negativa provavelmente se

deve ao excessivo rigor dos testes clínicos e não clínicos exigidos pelos órgãos reguladores (ATANASOV et al., 2015; CLEGG; GABHANN, 2015).

Não obstante estes desafios, as indústrias farmacêuticas, em parceria com centros de pesquisas e universidades, continuam a investir na realização de estudos sobre as propriedades farmacológicas de novas substâncias biologicamente ativas, inovando e utilizando a propriedade intelectual obtida para a ampliação do desenvolvimento tecnológico e, conseqüentemente, do crescimento econômico e científico do país (WALSH; FISCHBACH, 2011; MACHADO et al., 2014).

Assim, é constante o entusiasmo de grupos de pesquisa pela descoberta de novos compostos derivados de diferentes fontes naturais. A presente dissertação de mestrado, por meio de uma prospecção científica e tecnológica e um estudo de toxicidade, pretende fornecer um embasamento para o desenvolvimento de estudos de pré-formulação de novas formas farmacêuticas como alternativa terapêutica para doenças neurológicas, particularmente nas desordens que apresentam em sua gênese processos oxidativos.

Portanto, este trabalho, intitulado “**Avaliação das propriedades antioxidantes e toxicológicas da agatisflavona: subsídio para o desenvolvimento de um medicamento**” foi dividido em capítulos conforme a **Figura 1**, baseando-se em artigos científicos submetidos e publicados em revistas de caráter internacional com o objetivo de fornecer maior abrangência dos resultados encontrados e torná-los disponíveis a outros grupos de pesquisa.



Fonte: Arquivo pessoal.

O primeiro capítulo apresenta uma prospecção científica e tecnológica, a fim de conhecer o estado da arte e apresentação tecnológica da agatisflavona, objetivando destacar sua relevância no cenário nacional e mundial. O capítulo dois apresenta um estudo da atividade antioxidante da agatisflavona em testes *in vitro*. Por fim, o terceiro capítulo expõe a estimativa da Dose Letal em 50 por cento (DL₅₀) e a avaliação da toxicidade aguda e *in vitro* frente a *Artemia salina* da agatisflavona nos animais utilizados neste estudo.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

- Avaliar as propriedades toxicológicas da agatisflavona em modelos animais experimentais de camundongos, bem como verificar a possível atividade antioxidante *in vitro* em parâmetros relacionados ao estresse oxidativo.

2.2 Objetivos específicos

- Realizar uma prospecção científica e tecnológica sobre o biflavonoide agatisflavona e suas aplicações farmacêuticas em patologias relacionadas ao Sistema Nervoso Central (SNC).
- Analisar o potencial antioxidante, *in vitro*, do biflavonoide agatisflavona mediante a inibição da 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH[•]), 2,2'-azinobis (ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico) (ABTS^{•+}), radical hidroxila (OH[•]) e óxido nítrico (NO), bem como sua capacidade de inibir a peroxidação lipídica pelo método TBARS (substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico) e seu potencial redutor.
- Estimar a dose letal 50% (DL₅₀) e avaliar a toxicidade aguda da agatisflavona nas doses 300 e 2000 mg/Kg camundongos adultos *Swiss* fêmea, tratados por via oral, dose única, mediante a observação, nestes animais, das alterações qualitativas e quantitativas em parâmetros metabólicos, bioquímicos, hematológicos e anátomo e histopatológicos do cérebro, fígado, rins, pâncreas, coração e pulmões;
- Avaliar a citotoxicidade da agatisflavona frente ao microcrustáceo *Artemia salina*, determinando a concentração letal média (CL₅₀).

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Pesquisa & Desenvolvimento de medicamentos a partir de plantas medicinais

A utilização de recursos naturais ocorre desde as mais remotas civilizações. O Brasil, como discutido anteriormente, é um país com expressiva diversidade, apresentando aproximadamente 55.000 espécies de plantas catalogadas de um total estimado entre 350.000 a 550.000, sendo que muitas destas espécies, em decorrência de suas atividades biológicas, repercutem tanto sobre a saúde mundial quanto no comércio internacional (OLIVEIRA et al., 2013).

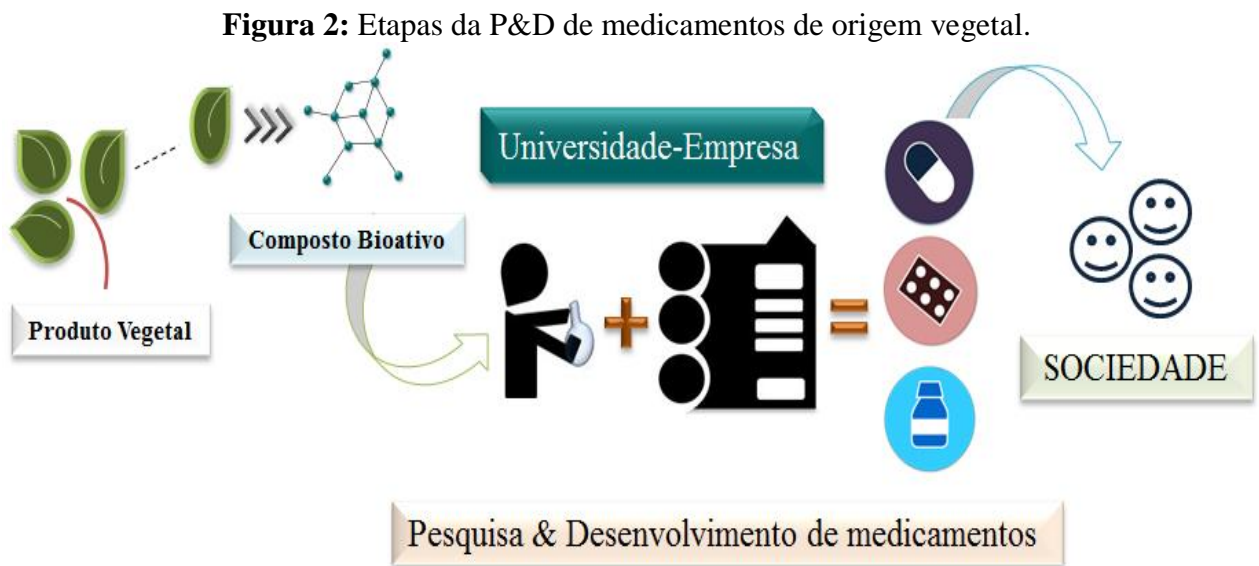
Brito (2013) menciona que os produtos à base de plantas medicinais movimentam cerca de 30 bilhões de dólares no mercado farmacêutico atual devido ao fato de 25% dos medicamentos prescritos mundialmente serem de origem vegetal. Assim, a procura por substâncias biologicamente ativas presentes nas fontes vegetais e a sua obtenção são o foco de diversos grupos de pesquisa, no intuito de desenvolver novos medicamentos (BRITO; DANTAS; DANTAS, 2009; COSTA, 2014).

As plantas medicinais são utilizadas em várias patologias devido a sua capacidade de produzir em diferentes partes (folha, caule, semente, fruto) moléculas com atividades terapêuticas oriundas do metabolismo secundário de metabólitos primários (celulose, lignina, proteínas, lipídeos, açúcares) (MENDONÇA; SILVA-MANN; RABBANI, 2014). As propriedades farmacológicas e bioquímicas destas substâncias e as suas aplicações terapêuticas têm sido atribuídas ao padrão de seus grupos funcionais presentes em sua estrutura química (SOUTO-MAIOR et al., 2011; OLIVEIRA et al., 2014).

Para Simões et al. (2007), a origem de todos os metabólitos secundários envolve o metabolismo da glicose via dois intermediários principais: o ácido chiquímico e o acetato. O primeiro é precursor de taninos hidrolisáveis, cumarinas, alcalóides derivados dos aminoácidos aromáticos e fenilpropanóides, ao passo que os derivados do acetato são os aminoácidos alifáticos, compostos fenólicos, terpenóides, esteróides, ácidos graxos e triglicerídeos. Os metabólitos secundários geralmente possuem estrutura complexa, baixo peso molecular e destacam-se na área da farmacologia em virtude de seus efeitos biológicos. Assim, despertam grande interesse das indústrias tanto na área farmacêutica quanto na alimentícia, agrônômica, cosmética, dentre outras (PEREIRA; CARDOSO, 2012).

Nesse sentido, é oportuno explorar as implicações terapêuticas e comerciais provenientes de fontes naturais por meio da associação entre o conhecimento técnico-

científico e produtivo. Isto se dá com o estabelecimento de um fluxo contínuo de informações entre os âmbitos Universidade-Empresa, efetivando a capacitação acadêmica do país na área de P&D de medicamentos e permitindo o desenvolvimento e a disponibilização de novas tecnologias para a sociedade a partir de recursos da biodiversidade (**Figura 2**) (SANTOS; SIANI, 2013).

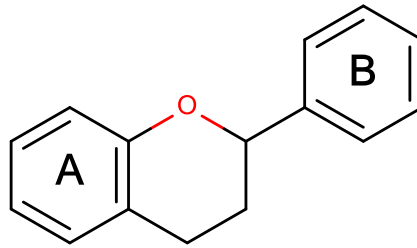


Fonte: Arquivo pessoal.

A presente pesquisa se enquadra no contexto da P&D de novos medicamentos com potencial farmacêutico, visto que o composto estudado origina-se a partir de um produto vegetal, o qual, como discutido em um primeiro momento, são fontes de inúmeras substâncias com propriedades terapêuticas. Esta realidade constitui um dos principais fatores de sobrevivência para as empresas operantes no mercado, no qual, por meio da P&D, as indústrias farmacêuticas, em parceria com instituições de ensino, desenvolvem medicamentos inovadores que podem trazer retorno financeiro aos investidores da propriedade intelectual.

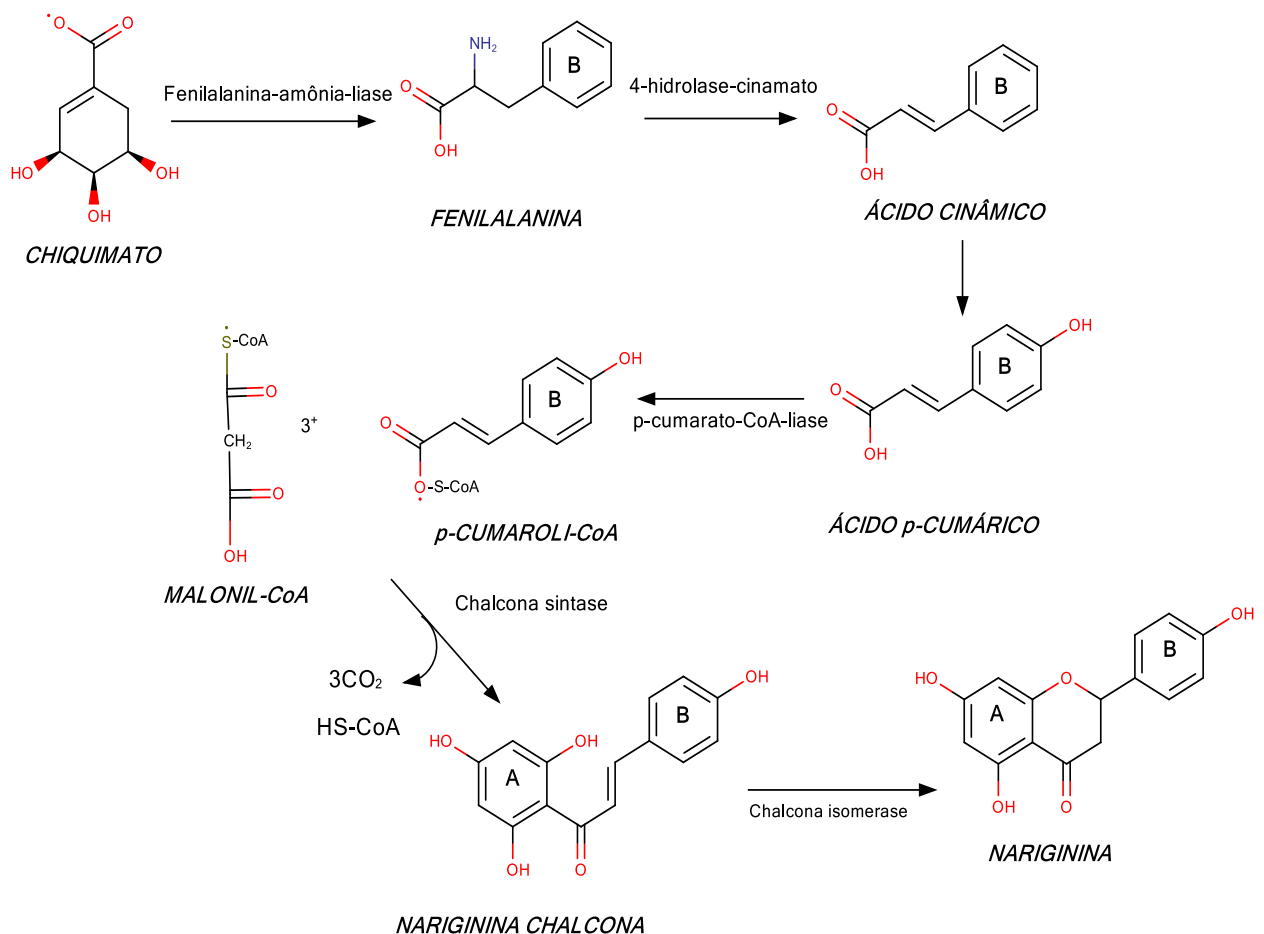
3.2 A importância dos flavonoides como fonte potencial de compostos bioativos

Os flavonoides representam um dos grupos mais generalizados de produtos naturais presentes nas plantas, protegendo-as dos danos produzidos por agentes oxidantes como os raios ultravioletas, poluição ambiental, substâncias químicas, dentre outros. São compostos polifenólicos de baixo peso molecular e sua variedade pode ser decorrente das combinações de grupos metil e hidroxil como substituintes na estrutura química básica dos flavonoides (**Figura 3**) (VOLP et al., 2008; MBAVENG; HAMM, 2014).

Figura 3: Estrutura química básica dos flavonoides.

Fonte: Arquivo pessoal.

A estrutura química dos flavonoides é constituída de dois anéis aromáticos, ligados por uma cadeia de três átomos de carbono que formam um heterociclo oxigenado (**Figura 4**). A diversidade de classes dos flavonoides (antocianinas, flavonóis, flavonas, isoflavonas, flavononas e biflavonoides) está relacionada ao grau de insaturação e de oxidação da cadeia heterocíclica, bem como ao número e natureza dos grupos substituintes ligados aos anéis aromáticos (PAULSEN et al., 2011; KARAM et al., 2013).

Figura 4: Biossíntese dos flavonoides.

Fonte: Adaptado de Marques (2008).

A biossíntese destes compostos fenólicos ocorre por uma via dupla: a do ácido chiquímico e a do acetato (**Figura 4**). O ácido chiquímico é o precursor inicial do composto inicial do flavonoide, a fenilalanina, que depois de desaminada pela fenilalanina-amônia-líase produz ácido cinâmico. Este, por ação da 4-hidroxilase cinamato, é convertido em ácido p-cumárico (KARAM et al., 2013).

Em seguida, ocorre a adição da CoA, catalisada pelo p-cumarato-CoA liase, originando a p-cumaroil-CoA, que por ação da chalcona sintetase reage com três moléculas de malonil-CoA, formando a naringinina chalcona. Por fim, a chalcona isomerase promove a ciclização do anel, dando origem à naringenina (**Figura 4**). Desta forma, nos flavonoides o anel A é formado via acetato, enquanto o B resulta da via chiquimato e os três átomos de carbono que ligam o anel A ao B derivam do fosfoenol piruvato (MARQUES, 2008; KARAN et al., 2013).

Vários flavonoides biologicamente ativos apresentam baixa toxicidade, destacando, assim, seu potencial para uso terapêutico no tratamento do câncer, de processos inflamatórios e em uma variedade de doenças infecciosas, por exemplo (FU et al., 2013; MBAVENG; HAMM, 2014). Sua ingestão está associada com a longevidade e redução na incidência de doenças cardiovasculares, além de apresentarem atividade antioxidante, anti-inflamatória, antitumoral, inibição da agregação plaquetária, neuroprotetora, antiepilética e antidepressiva (VOLP et al., 2008; CHO et al., 2013; GUPTA et al., 2014; LOU et al., 2015; HWANG; SHIH; YEN, 2015).

Uma das classes de flavonoides que possuem importantes atividades biológicas inerentes ao grupo são os biflavonoides. Dentro desta classe, podem ser destacados os compostos agatisflavona, amentoflavona, rhusflavona e rupressuflavona, os quais apresentam $(C_6-C_3-C_6)_2$ como sua estrutura básica e são usados na medicina popular no tratamento de distúrbios gástricos, bem como para o tratamento de doenças inflamatórias e de alguns distúrbios do SNC, como epilepsia, doença de Alzheimer, doença de Parkinson, transtorno depressivo maior, esquizofrenia, entre outras (LIN et al., 2001; FIDELIS et al., 2014).

Condições estressantes estão intimamente relacionadas à geração de radicais livres, o que leva a danos oxidativos e desencadeia alterações no processo de formação de novos neurônios (neurogênese) e em sua neuroplasticidade, ou seja, a capacidade de adaptação do sistema nervoso de ajustar-se às mudanças nas condições do ambiente que ocorrem diariamente na vida dos indivíduos (BORELLA; SACCHELLI, 2009; ARNAIZ; ANTONELLI, 2016). Evidências indicam que a desregulação dos sistemas emocionais cerebrais, mediada pelo estresse oxidativo, um dos componentes chave da fisiopatologia de

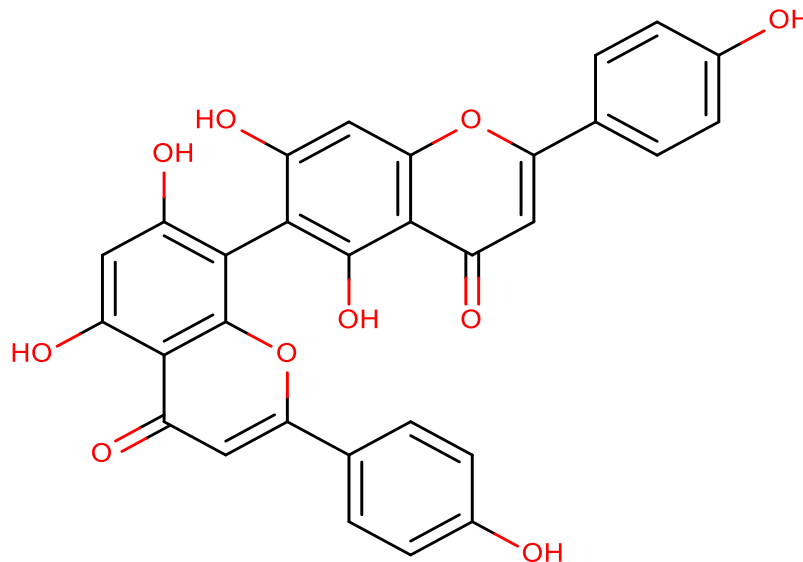
distúrbios do SNC, podem ser revertida e/ou combatida pela ação de compostos naturais como os biflavonoides (ARNAIZ; ANTONELLI, 2016).

Dentre os compostos biflavonoides anteriormente citados, a agatisflavona está entre os menos estudados, principalmente no que se refere à suas propriedades toxicológicas e antioxidantes, sendo, portanto, o foco deste trabalho.

3.3 Biflavonoide agatisflavona

A agatisflavona (8-[5,7-di-hidroxi-2-(4-hidroxifenil) cromen-6-il-4-oxo]-5,7-di-hidroxi-2-(4-hidroxifenil)-cromen-4-ona) (**Figura 5**) demonstrou em estudos não-clínicos (*in vitro*, *in vivo* e *ex vivo*) propriedades antivirais (ARAÚJO et al., 2011; DE SOUSA et al., 2015), antimicrobiana (KONAN et al., 2012; AJILEYE et al., 2015), anticarcinogênica (KONAN et al., 2012; FIDELIS et al., 2014) e neuroprotetora (PAULSEN et al., 2011; (SHRESTHA et al., 2012; SHRESTHA et al., 2013b).

Figura 5: Estrutura química da agatisflavona.



Fonte: Arquivo pessoal.

Poucos estudos são encontrados em relação às propriedades físico-químicas da agatisflavona. Propriedades como peso molecular, densidade, característica organolépticas, dentre outras, estão expostas na **Tabela 1**.

Tabela 1: Propriedades físico-químicas da agatisflavona.

Agatisflavona - 8-[5,7-di-hidroxi-2-(4-hidroxifenil) cromen-6-il-4-oxo]-5,7-di-hidroxi-2-(4-hidroxifenil) cromen-4-ona - C₃₀H₁₈O₁₀	
Massa Molar	538.45792 g/mol
Densidade	1,656 g/cm ³
Cor	Amarela
LogP	5.09
Faixa de fusão	240-242 °C
Índice de refração	1,793
Faixa do comprimento de onda de absorção da luz	200–400 nm (UV)

Fonte: KONAN et al., 2012; NPATC, 2012; SHRESTHA et al., 2013a; PUBCHEM, 2015.

O biflavonoide agatisflavona pode ser obtido a partir de diversas espécies de plantas, de acordo com a **Tabela 2** a seguir.

Tabela 2: Exemplos de fontes vegetais da agatisflavona.

Espécie/ Nome Científico	Nome Popular	Parte da Planta Estudada	Tipo de Extrato	Referências
<i>Campylospermum flavum</i> S.	—	Folhas/Casca	Metanólico	Ndongo et al., 2010
<i>Rhus parviflora</i> R.	Tintidikah	Fruto	Metanólico	Shrestha et al., 2013a, 2013b
<i>Caesalpinia pyramidalis</i> T.	Catingueira, pau-de-rato	Folhas	Dimetil Sulfóxido	Mendes et al., 2000; Fidelis et al., 2014
<i>Anacardium occidentale</i> L.	Cajueiro	Caule, Castanha Folhas	Etanólico	Konan et al., 2012; Ajileye et al., 2015
<i>Rhus pyroides</i> B.	—	Raízes, Folhas	Etanólico	Svenningsen et al., 2006; Stafford et al., 2008
<i>Ouratea parviflora</i> B.	Canela-de-veado, batiputá	Folhas	Diclorometano e methanol	Araújo et al., 2011; Fidelis et al., 2014

Fonte: Autoria própria.

A partir de levantamentos científicos e tecnológicos, pôde ser constatado que uma propriedade pouco explorada da agatisflavona é sua atividade biológica no SNC. A **Tabela 3** expõe resultados obtidos em pesquisas realizadas analisando as ações farmacológicas e toxicológicas da agatisflavona.

Tabela 3: Descrição da agatisflavona quanto aos estudos farmacológicos, toxicológicos e experimentais.

Modelo Experimental ou Protocolo <i>in vitro</i>	Doses <i>ex vivo</i>	Espécies	Concentração <i>In vitro</i>	Referências	Resultados
Citotoxicidade/ Viabilidade celular	—	Células de Hipocampo de ratos	10, 20, 30, 40, 60, 80 μ M	Shrestha et al., 2013b	Diminui neurotoxicidade
Citotoxicidade Carcinoma: Mama, cólon, cervical	—	—	15,20 μ M (agatisflavona - mama).	Shrestha et al., 2012	Inibição da atividade β -secretase, (10 μ M)
Modelagem farmacóforica – afinidade ao R gabaérgico (BZP)	—	—	CI ₅₀ 0,0372 μ M	Svenningsen et al., 2006	Menor afinidade quando comparado com amentoflavona
Células-tronco pluripotentes induzidas (MIPS)	—	(Ratos) células-tronco embrionária	60 μ M	Paulsen et al., 2011	Neurogênese induzida pelo ácido retinóico (AR) é reforçada por agatisflavona
Atividade antiviral HSV-1 HSV-2	—	—	11,2 μ M - 50% da dose eficaz (DE ₅₀)	Araújo et al., 2011	Antiviral contra o <i>Herpes simplex</i>
Avaliação antitumoral humano	—	—	200 μ L	Daniel et al., 2007	Não teve um impacto importante sobre o crescimento das células em quaisquer das linhas celulares testadas
Atividade antiviral	8,5 μ g/mL a 48 μ g/mL	—	—	Lin et al., 1999	Atividade significativa contra o vírus influenza A e B.

Fonte: Autoria própria.

Por apresentar ações farmacológicas neuronais importantes, o biflavonoide agatisflavona é alvo de estudos referentes à suas atividades biológicas em desordens do SNC.

Dentre estas, pesquisadores descreveram que a agatisflavona otimiza o número de neurônios jovens e previne lesões oxidativas induzidas por glutamato (ação neuroprotetora) e diminui a excitabilidade do SNC devido a abertura de canais iônicos de transmembrana por estímulo gerado pelo ácido gama-aminobutírico (GABA), o que permitiu um influxo de íons cloretos (ação antiepiléptica) (SVENNINGSEN et al., 2006).

Porém, poucas pesquisas foram realizadas no intuito de avaliar a toxicidade *in vivo* e *in vitro* da agatisflavona e determinar sua dose de segurança. Diante disto, e devido às características biológicas anteriormente relatadas, o estudo de toxicidade aguda e *in vitro* deste biflavonoide é de grande relevância, tanto para a sociedade quanto para a indústria farmacêutica, visto que subsidiará as possíveis pesquisas, não clínicas e clínicas, acerca de suas propriedades farmacológicas sobre o SNC, bem como auxiliará no desenvolvimento de um novo produto farmacêutico, cujo princípio ativo seja a agatisflavona.

REFERÊNCIAS

- AJILEYE, O. O.; OBUOTOR, E. M.; AKINKUNMI, E. O.; ADEROGBA, M. A. Isolation and characterization of antioxidant and antimicrobial compounds from *Anacardium occidentale* L. (Anacardiaceae) leaf extract. **Journal of King Saud University - Science**, v. 27, n. 3, p. 244–252, 2015.
- ARAÚJO, M. F. DE; SANTOS, C. B.; CAVALCANTI, J. F.; FERNANDA, S.; MENDES, G. S.; WERLE, A. A.; et al. Proposed active compounds from *Ouratea parviflora*. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 5, n. 12, p. 2489–2493, 2011.
- ARNAIZ, G. R. DE L.; ANTONELLI, M. C. In search of concomitant alterations of dopaminergic and neurotensinergic systems in stress conditions. **Neurochemical Research**, 2016.
- ATANASOV, A. G.; WALTENBERGER, B.; PFERSCHY-WENZIG, E.-M.; LINDER, T.; WAWROSCH, C.; UHRIN, P.; et al. Discovery and resupply of pharmacologically active plant-derived natural products: a review. **Biotechnology advances**, v. 14, 2015.
- BARREIRO, E. J.; BOLZANI, V. D. S. Biodiversidade: fonte potencial para a descoberta de fármacos. **Química Nova**, v. 32, n. 3, p. 679–688, 2009.
- BORELLA, M. D. P.; SACCHELLI, T. Os efeitos da prática de atividades motoras sobre a neuroplasticidade. **Revista Neurociencia**, v. 17, n. 2, p. 161-169, 2009.
- BRITO, R. G. **Atividade antinociceptiva e anti-inflamatória do citronelol em roedores**. Aracajú, 2013, 113f. Dissertação (Pós-Graduação em Ciências da Saúde). Universidade Federal de Sergipe, 2013.
- BRITO, V. F. DA S.; DANTAS, I. C. S.; DANTAS, G. D. DOS. Plantas medicinais utilizadas pela comissão de mulheres na zona rural no município de Lagoa Seca –PB. **Revista de Biologia e Farmácia**, v. 03, p. 112–123, 2009.
- CHO, N.; LEE, K. Y.; HUH, J.; CHOI, J. H.; YANG, H.; JEONG, E. J.; et al. Cognitive-enhancing effects of *Rhus verniciflua* bark extract and its active flavonoids with neuroprotective and anti-inflammatory activities. **Food and Chemical Toxicology**, v. 58, p. 355–361, 2013.
- CLEGG, L. E.; GABHANN, F. MAC. Molecular mechanism matters: benefits of mechanistic computational models for drug development. **Pharmacological Research**, v. 99, p. 149–154, 2015.
- COSTA, J. P. **Bioprospecção do diterpenoidefitol com ênfase nas propriedades antioxidante, ansiolítica e antidepressiva**. Teresina, 2014, 274f. Tese (Pós-Graduação em Biotecnologia). Universidade Federal do Piauí, 2014.
- DANIEL, J. F. S. ; ALVES, C. C. F. ; GRIVICICH, I.; DA ROCHA, A. B. ; DE CARVALHO, G. M. Antitumor activity of biflavonoids from *Ouratea* and *Luxemburgia* on human cancer cell lines. **Indian Journal of Pharmacology**, v. 39, n. 4, p. 184–186, 2007.

- DE SOUSA, L. R. F.; WU, H.; NEBO, L.; FERNANDES, J. B.; DA SILVA, M. F. D. G. F.; KIEFER, W.; et al. Flavonoids as noncompetitive inhibitors of Dengue virus NS2B-NS3 protease: inhibition kinetics and docking studies. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 23, n. 3, p. 466–470, 2015.
- FIDELIS, Q. C.; RIBEIRO, T. A. N.; ARAÚJO, M. F.; DE CARVALHO, M. G. *Ouratea* genus: chemical and pharmacological aspects. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 24, n. 1, p. 1–19, 2014.
- FU, Y.; CHEN, J.; LI, Y. J.; ZHENG, Y. F.; LI, P. Antioxidant and anti-inflammatory activities of six flavonoids separated from licorice. **Food Chemistry**, v. 141, n. 2, p. 1063–1071, 2013.
- GUPTA, G.; DUA, K.; KAZMI, I.; ANWAR, F. Anticonvulsant activity of Morusin isolated from *Morus alba*: Modulation of GABA receptor. **Biomedicine & Aging Pathology**, v. 4, n. 1, p. 29–32, 2014.
- HWANG, S.-L.; SHIH, P.-H.; YEN, G.-C. **Citrus flavonoids and effects in dementia and age-related cognitive decline**. In: Diet and Nutrition in Dementia and Cognitive Decline. 1. ed., Elsevier, 2015.
- KARAM, T. K.; DALPOSO, L. M.; CASA, D. M.; DE FREITAS, G. B. R. Carqueja (*Baccharis trimera*): utilização terapêutica e biossíntese. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 15, n. 2, p. 280–286, 2013.
- KONAN, N. A.; LINCOPAN, N.; COLLANTES DÍAZ, I. E.; DE FÁTIMA JACYSYN, J.; TANAE TIBA, M. M.; PESSINI AMARANTE MENDES, J. G.; et al. Cytotoxicity of cashew flavonoids towards malignant cell lines. **Experimental and Toxicologic Pathology**, v. 64, n. 5, p. 435–440, 2012.
- LIN, Y. M.; FLAVIN, M. T.; SCHURE, R.; CHEN, F. C.; SIDWELL, R.; AL, E. Antiviral activities of biflavonoids. **Planta Medica**, v. 65, n. 2, p. 120–125, 1999.
- LIN, Y. M.; FLAVIN, M. T.; CASSIDY, C. S.; MAR, A.; CHEN, F. C. Biflavonoids as novel antituberculosis agents. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v. 11, n. 16, p. 2101–2104, 2001.
- LIU, C.; CONSTANTINIDES, P. P.; LI, Y. Research and development in drug innovation: reflections from the 2013 bioeconomy conference in China, lessons learned and future perspectives. **Acta Pharmaceutica Sinica B**, v. 4, n. 2, p. 112–119, 2014.
- LOU, S.-N.; LAI, Y.-C.; HUANG, J.-D.; HO, C.-T.; FERNG, L.-H. A.; CHANG, Y.-C. Drying effect on flavonoid composition and antioxidant activity of immature kumquat. **Food Chemistry**, v. 171, p. 356–363, 2015.
- MACHADO, K. C.; MACHADO, K. C.; GOMES JÚNIOR, A. L.; DE FREITAS, R. M. Aplicação farmacêutica de inibidores de proteases: uma prospecção tecnológica. **Revista Geintec**, v. 4, n. 2, p. 780–787, 2014.
- MARQUES, O. **Desenvolvimento de formas farmacêuticas sólidas orais de Uncaria tomentosa com atividade antioxidante**. Coimbra, 2008, 210f. Dissertação (Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas). Universidade de Coimbra, 2008.

- MBAVENG, A. T.; HAMM, R. **Harmful and protective effects of terpenoids from African medicinal plants** In: KUETE, V. Toxicological Survey of African Medicinal Plants. 1. ed., Elsevier, 2014.
- MENDES, C. C.; BAHIA, M. .; DAVID, J. M.; DAVID, J. P. Constituents of *Caesalpinia pyramidalis*. **Fitoterapia**, v. 71, p. 211–212, 2000.
- MENDONÇA, V. M.; SILVA-MANN, R.; RABBANI, A. R. C. Prospecção tecnológica de óleo essencial de aroeira-da-praia (*Schinus terebinthifolius* Raddi.). **Revista Geintec**, v. 4, p. 704–715, 2014.
- NDONGO, J. T.; SHAABAN, M.; MBING, J. N.; BIKOBO, D. N.; ATCHADÉ, A. D. T.; PEGNYEMB, D. E.; et al. Phenolic dimers and an indole alkaloid from *Campylospermum flavum* (Ochnaceae). **Phytochemistry**, v. 71, n. 16, p. 1872–1878, 2010.
- NPATC. Naturally Occuring Plant Based Anticancerous Compound-Activity-Target **DataBase. Agathisflavone: physical, elemental and topological properties**. Disponível em: <<http://crdd.osdd.net/raghava/npact/index.html>>. Acesso em: 24 ago. 2015.
- OLIVEIRA, G. L. DA S.; DE FREITAS, R. L. M.; DAVID, J. M.; DE FREITAS, R. M. Neoflavonoides com implicação sobre o sistema nervoso central: uma prospecção tecnológica. **Revista Geintec**, v. 4, p. 575–587, 2014.
- OLIVEIRA, V. B.; ZUCHETTO, M.; MERINO, F. J. Z.; MIGUEL, O. G. *Dicksonia sellowiana* (Presl.) Hook, Dicksoniaceae uma samambaia característica da floresta ombrófila mista: uma revisão. **Visão Acadêmica**, v. 14, n. 3, p. 69–79, 2013.
- ORLANDA, J. F. F. **Estudo da composição química e atividade biológica do óleo essencial de *Ruta graveolens* Linneau (Rutaceae)**. João Pessoa, 2011, 105f. Tese (Doutorado em Química Analítica). Universidade Federal da Paraíba, 2011.
- PAULSEN, B. S.; SOUZA, C. S.; CHICAYBAM, L.; BONAMINO, M. H.; BAHIA, M.; COSTA, S. L.; et al. Agathisflavone enhances retinoic acid-induced neurogenesis and its Receptors α and β in pluripotent stem cells. **Stem Cells and Development**, v. 20, n. 10, p. 1711–1721, 2011.
- PEREIRA, R. J.; CARDOSO, M. D. G. Vegetable secondary metabolites and antioxidants benefits. **Journal of Biotechnology and Biodiversity**, v. 3, n. 4, p. 146–152, 2012.
- PIERONI, J. P.; CAPANEMA, L. X. L.; SILVA, C. R.; DE SOUSA, J. O. B.; DA SILVA, L. G. Terceirização da P&D de medicamentos: panorama do setor de testes pré-clínicos no Brasil. **BNDES Setorial**, n. 29, p. 131–158, 2009.
- PUBCHEM. Pub Chem – Open Chemistry. **Compound Summary for CID 5281599 – agathisflavone**. Disponível em: <www.pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>. Acesso em: 24 ago. 2015.
- SANTOS, P. G.; SIANI, A. C. The research groups consolidation in medicinal plants and phytomedicines in Brazil. **Revista Virtual de Química**, v. 5, n. 3, p. 438–449, 2013.
- SHRESTHA, S.; LEE, D. Y.; PARK, J. H.; CHO, J. G.; LEE, D. S.; LI, B.; et al. Flavonoids from the fruits of *Nepalese sumac* (*Rhus parviflora*) attenuate glutamate-induced

neurotoxicity in HT22 cells. **Food Science and Biotechnology**, v. 22, n. 4, p. 895–902, 2013a.

SHRESTHA, S.; NATARAJAN, S.; PARK, J. H.; LEE, D. Y.; CHO, J. G.; KIM, G. S.; et al. Potential neuroprotective flavonoid-based inhibitors of CDK5/p25 from *Rhus parviflora*. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v. 23, n. 18, p. 5150–5154, 2013b.

SHRESTHA, S.; PARK, J. H.; LEE, D. Y.; CHO, J. G.; CHO, S.; YANG, H. J.; et al. *Rhus parviflora* and its biflavonoid constituent, rhusflavone, induce sleep through the positive allosteric modulation of GABA A-benzodiazepine receptors. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 142, n. 1, p. 213–220, 2012.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMAN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6^o. ed. Florianópolis: Editora da UFSC, 2007.

SOUTO-MAIOR, F. N.; DE CARVALHO, F. L. D.; DE MORAIS, L. C. S. L.; NETTO, S. M.; DE SOUSA, D. P.; DE ALMEIDA, R. N. Anxiolytic-like effects of inhaled linalool oxide in experimental mouse anxiety models. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 100, n. 2, p. 259–263, 2011.

STAFFORD, G. I.; PEDERSEN, M. E.; VAN STADEN, J.; JÄGER, A. K. Review on plants with CNS-effects used in traditional South African medicine against mental diseases. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 119, n. 3, p. 513–537, 2008.

SVENNINGSSEN, A. B.; MADSEN, K. D.; LILJEFORS, T.; STAFFORD, G. I.; STADEN, J. VAN; JÄGER, A. K. Biflavones from *Rhus* species with affinity for the GABAA/benzodiazepine receptor. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 103, n. 2, p. 276–280, 2006.

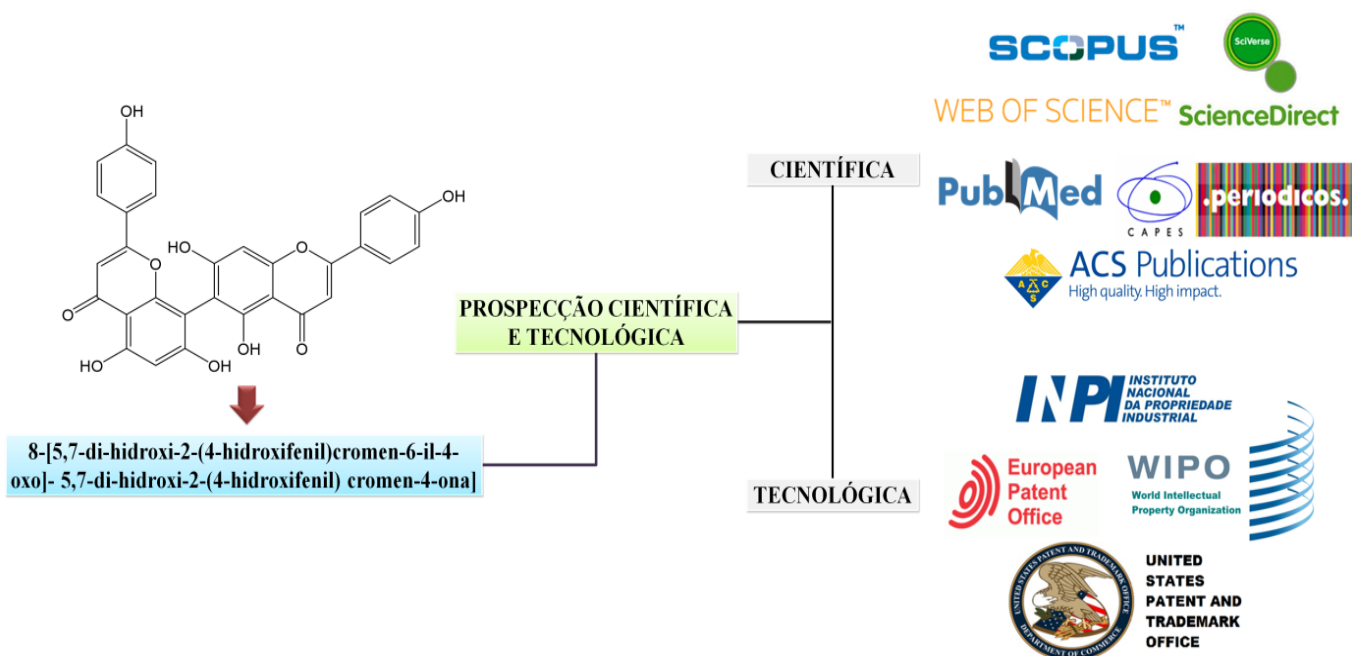
VOLP, A.; RENHE, I.; BARRA, K.; STRINGUETA, P. Flavonóides antocianinas: características e propriedades na nutrição e saúde. **Revista Brasileira de Nutrição**, v. 23, n. 2, p. 141–149, 2008.

WALSH, C. T.; FISCHBACH, M. A. Natural products version 2.0: connecting genes to molecules christopher. **Journal of the American Chemical Society**, v. 132, n. 8, p. 2469–2493, 2010.

4 CAPÍTULO I: Agatisflavona, um biflavonoide com aplicações farmacológicas para o sistema nervoso central: uma revisão

(Artigo submetido à *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*)

Qualis B3



Agatisflavona, um biflavonoide com aplicações farmacológicas para o sistema nervoso central: revisão

Anderson Wilbur Lopes Andrade¹; Jéssica Pereira Costa¹

¹Núcleo de Tecnologia Farmacêutica, Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Piauí – UFPI, Teresina, Piauí, Brasil.

RESUMO

Os compostos fenólicos formam uma das principais classes de metabólitos secundários sintetizados por plantas e, entre estes, é possível destacar os flavonoides. Os biflavonoides, uma das classes de flavonoides, possuem diversas propriedades biológicas inerentes ao grupo, como antioxidante, anti-inflamatória, antitumoral, dentre outras. A agatisflavona é um biflavonoide que demonstrou, em estudos anteriores, atividades: neuroprotetora e antiepiléptica, estudos *in vitro* e *in vivo*. O objetivo desta pesquisa foi realizar uma prospecção científica e tecnológica sobre o biflavonoide agatisflavona e suas aplicações farmacêuticas em algumas patologias relacionadas ao Sistema Nervoso Central (SNC). O *EndNote-X5 software* foi utilizado como referência, com as palavras-chave: agatisflavona, antioxidante, ansiolítico, neuroprotetor, antidepressivo e suas correlações em Inglês e Português. Foram utilizados documentos publicados nos bancos de dados *PubMed*, *Science Direct*, *Scopus*, Periódicos da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, *Web of Science* e *American Chemical Society Publications*, no Banco Europeu de Patentes, da Organização Mundial de Propriedade Intelectual, no Banco Americano de Marcas e Patentes e do Instituto Nacional de Propriedade Industrial do Brasil. Do ponto de vista científico, a agatisflavona apresenta um extenso número de publicações no que se refere à suas atividades farmacológicas (antimicrobiana, antivirais, anticarcinogênica) e se destaca como composto potencialmente ativo sobre o SNC (neurogênese e diminuição da excitabilidade do SNC). Porém, não foram verificados depósitos de patentes que correlacionam o biflavonoide agatisflavona a desordens neurológicas. Este fato, por sua vez, permite o desenvolvimento de pesquisas inovadoras referentes às ações farmacológicas da agatisflavona, em especial ao SNC.

Palavras-chave: Agatisflavona. Flavonoides. Prospecção. Sistema Nervoso Central.

4.1 Introdução

Os compostos fenólicos são metabólitos secundários sintetizados por plantas. Possuem estruturas simples ou complexas essenciais para o crescimento, reprodução e características organoléticas das plantas. Dentre os grupos fenólicos, é possível destacar os flavonoides, cuja variedade e baixa toxicidade evidenciam o seu potencial para uso terapêutico. Este grupo representa mais da metade dos compostos fenólicos, dividido em diferentes classes: antocianinas, flavononas, flavonas, flavonóis, isoflavonas e biflavonoides (LIMA et al., 2014; GUINÉ et al., 2015).

Vários estudos correlacionam o teor de flavonoides com atividade antioxidante (FU et al., 2013; MASUOKA; MATSUDA; KUBO, 2012; LOU et al., 2015), anti-inflamatória (HERRERA-RUIZ et al., 2011; CHO et al., 2012, 2013; FU et al., 2013), anticarcinogênica (CHAHAR et al., 2011; SAK, 2014), neuroprotetora (HWANG; SHIH; YEN, 2012; CHO et al., 2012, 2013), antiepiléptica (GUO et al., 2011; GUPTA et al., 2014), antidepressiva (GUO et al., 2011; ZHENG et al., 2013; HWANG; SHIH; YEN, 2015) e que estes promovem a indução da diferenciação neuronal, de células cardíacas, dos osteoblastos (PAULSEN et al., 2011; BIRT; JEFFERY, 2013). Além disto, podem inibir algumas enzimas como a cicloxigenase, lipoxigenase e fosfolipase A2 e são capazes de produzir complexos com metais, inibindo a formação de radicais livres induzidos por esses (VALENTE et al., 2010; KONAN et al., 2012; MASUOKA; MATSUDA; KUBO, 2012; OBERBAUER et al., 2013).

Neste contexto, uma das classes de flavonoides que apresentam diversas das propriedades supracitadas são os biflavonoides. Estes compostos são homo ou heterodímeros de flavonoides, ligados por um grupo C-O-C ou uma ligação C-C. Um biflavonoide encontrado em um número diversificado de plantas é a agatisflavona ou 8-[5,7-di-hidroxi-2-(4-hidroxifenil)cromen-6-il-4-oxo]-5,7-di-hidroxi-2-(4-hidroxifenil)cromen-4-ona] (**Figura 5**).

Este biflavonoide pode ser isolado a partir dos extratos (metanólicos, etanólicos, acetílicos) de diferentes partes (folha, caule, fruto, raiz) de diversos tipos de plantas (*Caesalpinia pyramidalis* T., *Anacardium occidentale* L., *Rhus parviflora* R., dentre outras). A agatisflavona apresentou em ensaios não-clínicos (*in vitro*, *ex vivo* e *in vivo*) atividades biológicas inerentes ao grupo dos flavonoides, anteriormente citadas, além de atividade antiviral (ARAÚJO et al., 2011), antimicrobiana (KONAN et al., 2012; AJILEYE et al., 2015), antitumoral (FIDELIS et al., 2014; SAK, 2014), hepatoprotetora (ANAND et al., 1992) e neuroprotetora (PAULSEN et al., 2011; SHRESTHA et al., 2012, 2013).

Os estudos prospectivos buscam informações atuais, qualificando as investigações e transformando-as em conhecimentos que subsidiarão a construção de estratégias e a tomada de decisão em pesquisas futuras. A prospecção tecnológica permite um mapeamento sistemático do desenvolvimento científico e tecnológico, sendo capaz de influenciar de forma significativa as indústrias, a economia ou a sociedade como um todo (SERAFINI et al., 2011).

Nesse contexto, o objetivo principal desse trabalho foi realizar uma prospecção científica e tecnológica com o intuito de mapear as tecnologias envolvendo a utilização do biflavonoide agatisflavona e suas aplicações farmacêuticas em patologias relacionadas ao Sistema Nervoso Central (SNC), analisando a participação de diversos países nos depósitos de pedidos de patentes em bancos de inovação e tecnologia nacionais e internacionais nos últimos anos.

4.2 Metodologia

Inicialmente, foi realizado um levantamento científico, mediante a consulta nos bancos de dados nacionais e internacionais, como *PubMed*, *ScienceDirect*, *Scopus*, Periódicos da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), *Web of Science* e *American Chemical Society (ACS) Publications*. Foi consultada a quantidade e o conteúdo dos documentos publicados no período de 1969 a 2015 encontrados nos periódicos. Para análise do conteúdo, foram escolhidos todos os artigos presentes nos bancos de dados supracitados que discutiam as palavras-chave do estudo (em inglês e português) e suas associações e excluíram-se os arquivos com duplicidade e os publicados em fontes de pesquisas diferentes das utilizadas nesta pesquisa.

Em relação às bases tecnológicas, foram utilizadas o Instituto Nacional de Propriedade Industrial (INPI), *World Intellectual Property Organization (WIPO)*, *European Patent Office (EPO)* e *United States Patent and Trademark Office (USPTO)*. A análise dos documentos consistiu na avaliação da distribuição de patentes por país depositário, ano de depósito e Classificação Internacional de Patentes (CIP).

A pesquisa foi realizada utilizando como referência o *software* de gestão *EndNote*[®] (versão X5, Thompson Reuters, CA, EUA) e empregou as seguintes palavras-chave: agatisflavona, antioxidante, ansiolítico, neuroprotetor, antidepressivo e sua associação, em Inglês e Português. Os dados foram coletados nos meses de maio de 2015 a junho de 2015 e para produção dos gráficos e figuras foi utilizado o *software GraphPad Prism*[®] (versão 6.04).

4.3 Resultados e discussão

4.3.1 Prospecção científica sobre a agathisflavona

A Prospecção Científica e a Tecnológica constituem ferramentas rotineiras básicas para a fundamentação nos processos de tomada de decisão e formação de estratégias em diferentes níveis de conhecimento. Tem como propósito delinear possíveis e desejáveis ações que contribuirão de forma positiva na construção de pesquisas futuras. Além disto, são facilitadoras da Propriedade Intelectual, visando melhorar a gestão da inovação ao aumentar o senso crítico e ampliar a visão dos desenvolvimentos tecnológicos (SERAFINI et al., 2011; MACHADO et al., 2014).

Mediante a pesquisa de palavras-chave e suas associações, foi analisado o número de documentos encontrados nas bases de dados científicos. Utilizando o termo “*agathisflavone*” foram encontrados 72 documentos no Periódicos CAPES, 30 *Web of Science*, 64 no *Science Direct*; 18 no *Pub Med*, 07 no *ACS Publications* e 34 no *Scopus* (**Tabela 4**).

Tabela 4: Número de artigos científicos publicados nas bases Periódicos CAPES, *Science Direct*, *Scopus*, *Pub Med* e *ACS Publications* por palavras-chave.

PALAVRAS-CHAVE	Periódicos CAPES	<i>Web of Science</i>	<i>Science Direct</i>	<i>Pub Med</i>	<i>ACS Publications</i>	<i>Scopus</i>
<i>Agathisflavone</i>	72	30	64	18	7	34
<i>Agathisflavone and antioxidant</i>	18	3	20	0	0	3
<i>Agathisflavone and anxiolytic</i>	1	0	9	0	1	0
<i>Agathisflavone and neuroprotective</i>	7	1	7	0	0	1
<i>Agathisflavone and antidepressant</i>	2	1	6	1	1	1

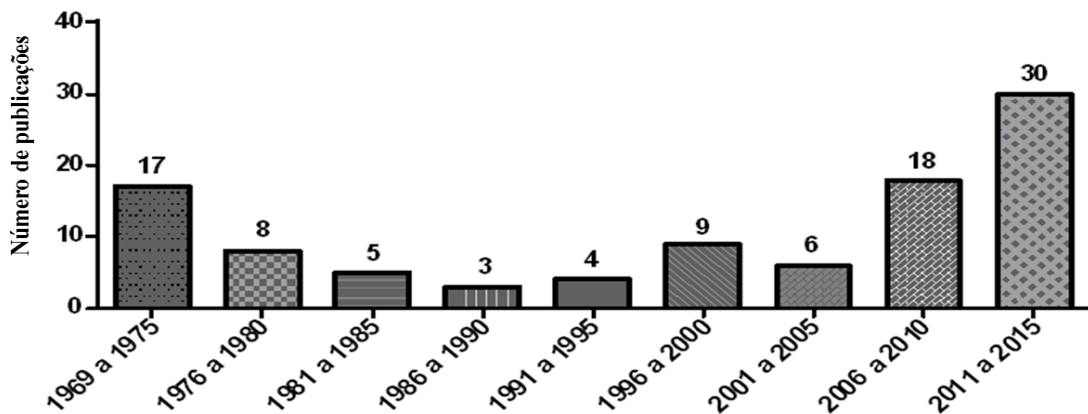
Fonte: Autoria própria.

As associações de termos com maior número de publicações foi “*agathisflavone and antioxidant*” com 18, 03, 20 e 3 documentos no Periódicos CAPES, *Web of Science*, *Science Direct* e *Scopus* e nenhum no *Pub Med* e *ACS Publications* respectivamente. Já nas combinações “*agathisflavone and anxiolytic*”, “*agathisflavone and neuroprotective*” e “*agathisflavone and antidepressant*” pôde-se verificar uma menor quantidade de documentos disponíveis na devida ordem: 01, 07, 02 no Periódicos CAPES, 00, 01, 01 no *Web of Science*, 09, 07 e 06 no *Science Direct*, 00, 00 e 01 no *Pub Med* e 01, 00 e 01 no *ACS Publications*, 00, 01 e 01 *Scopus* (**Tabela 4**).

Foi constatado que as publicações decorriam do ano de 1969 a 2015. Desta forma, é possível inferir que as atividades farmacológicas do biflavonoide agatisflavona são relatadas na literatura científica há certo período, porém, uma quantidade reduzida de artigos é referente às aplicações farmacêuticas deste composto em doenças relacionadas com o SNC em humanos e/ou roedores. É importante ressaltar que os flavonoides, na literatura, são associados à diminuição de lesões oxidativas (aumento de radicais livres) devido a sua ação antioxidante, sendo, portanto, a atividade biológica mais estudada.

Na evolução temporal da quantidade de publicações nas bases de dados científicas (**Figura 6**), é possível observar que no início dos anos 70 houve um número considerável de produções científicas referentes ao biflavonoide agatisflavona, tendo uma diminuição da quantidade de publicações sobre este composto no fim dos anos 80 e começo dos anos 90. Entretanto, desde 2005 é constatado um aumento gradual da quantidade de artigos sobre a agatisflavona, principalmente nos anos de 2011 a 2015 (30 documentos), mostrando, assim, o crescente interesse dos grupos de pesquisa pelo composto. Porém, não é possível determinar a razão deste declínio e aumento no número de publicações na linha temporal analisada.

Figura 6: Evolução temporal das publicações referentes à agatisflavona na base de dados Periódicos CAPES, *Science Direct*, *Web of Science*, *Scopus*, *Pub Med* e *ACS Publications*.



Fonte: Autoria própria.

As pesquisas iniciais visavam mostrar técnicas de isolamentos, síntese e caracterização de biflavonoides em alguns extratos de plantas (folhas, caule, raiz, fruto), principalmente as de origem africana. Esses constataram a presença majoritária da agatisflavona em grande parte destas (*Araucaria excelsa* C., *Rhus succedanea* L., *Rhus parviflora* R., dentre outras). No entanto, o rendimento do material isolado em outras plantas, como *Anacardium occidentale* L. e *Caesalpinia pyramidalis* T. (plantas presentes na América do Sul), é relativamente baixo.

Nos anos 90, grupos de pesquisa realizaram estudos *in vitro* referentes a propriedades hepatoprotetora e antiviral da agatisflavona. Investigações sobre a ação da agatisflavona em vírus que agem no trato respiratório demonstraram que o biflavonoide possui atividade significativa contra o vírus influenza A e B (**Tabela 5**) (LIN et al., 1999a). Porém, Lin e colaboradores (1997a) evidenciaram que o biflavonoide agatisflavona não possui atividade, *in vitro*, anti-HIV (*Human Immunodeficiency Vírus*).

Em 2005, momento em que foi observado o aumento da produção científica sobre a agatisflavona (**Figura 6**), Pegnyemb e colaboradores (2005) descreveram que os extratos da folha de *Ouratea sulcata* K. continham como produtos majoritários 07 biflavonoides, dentre estes a agatisflavona. Este extrato demonstrou, no estudo realizado por Pegnyemb et al. (2005), ação antibacteriana *in vitro* sobre bactérias gram-positivas (*Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Vibrio anguillarum*), entretanto não apresentou atividade contra bactérias gram-negativas (*Escherichia coli*) (**Tabela 5**).

Além disto, nos últimos 10 anos, foi constatada uma crescente no número de publicações no que diz respeito à atividade da agatisflavona sobre SNC. Svenningsen e colaboradores (2006), a partir de trabalhos feitos com diversos vegetais do gênero *Rhus*, espécie tradicionalmente utilizada no sul da África para o tratamento da epilepsia, tentaram evidenciar a afinidade dos compostos presentes nestas plantas ao receptor do ácido gama-aminobutírico A (GABA_A), uma vez que tais receptores estão envolvidos na fisiopatologia destas desordens neurológicas (**Tabela 5**).

Os autores supracitados utilizaram extratos das folhas de *Rhus pyroides* B. e *Rhus dentata* T., obtendo da fração etanólica os compostos agatisflavona e amentoflavona. Os pesquisadores então realizaram testes de ligação dos biflavonoides aos receptores GABA_A, ajustando-os a um modelo 3D-farmacofórico para ligantes de receptores benzodiazepínicos desenvolvido por Zhang et al. (1995) e adaptado por Dekermendjian et al. (1999) e Kahnberg et al. (2002). Os resultados das imagens demonstraram que os dois compostos ligaram-se à interface lipofílica entre subunidade α e γ do receptor de GABA_A.

No ano de 2011, Paulsen e colaboradores (**Tabela 5**) testaram a hipótese de que a neurogênese induzida por ácido retinóico (AR) é reforçada pela agatisflavona. Para isto, os investigadores utilizaram células tronco embrionárias de ratos e células pluripotentes induzidas, tratando-as durante 4 dias com 60 mM de agatisflavona e/ou 2 mM de AR. Estes observaram que o biflavonoide reduziu a morte celular nos grupos tratados com agatisflavona e AR em quase 02 vezes em comparação com o grupo controle (aplicado somente AR) e que a agatisflavona foi capaz de induzir a diferenciação neuronal.

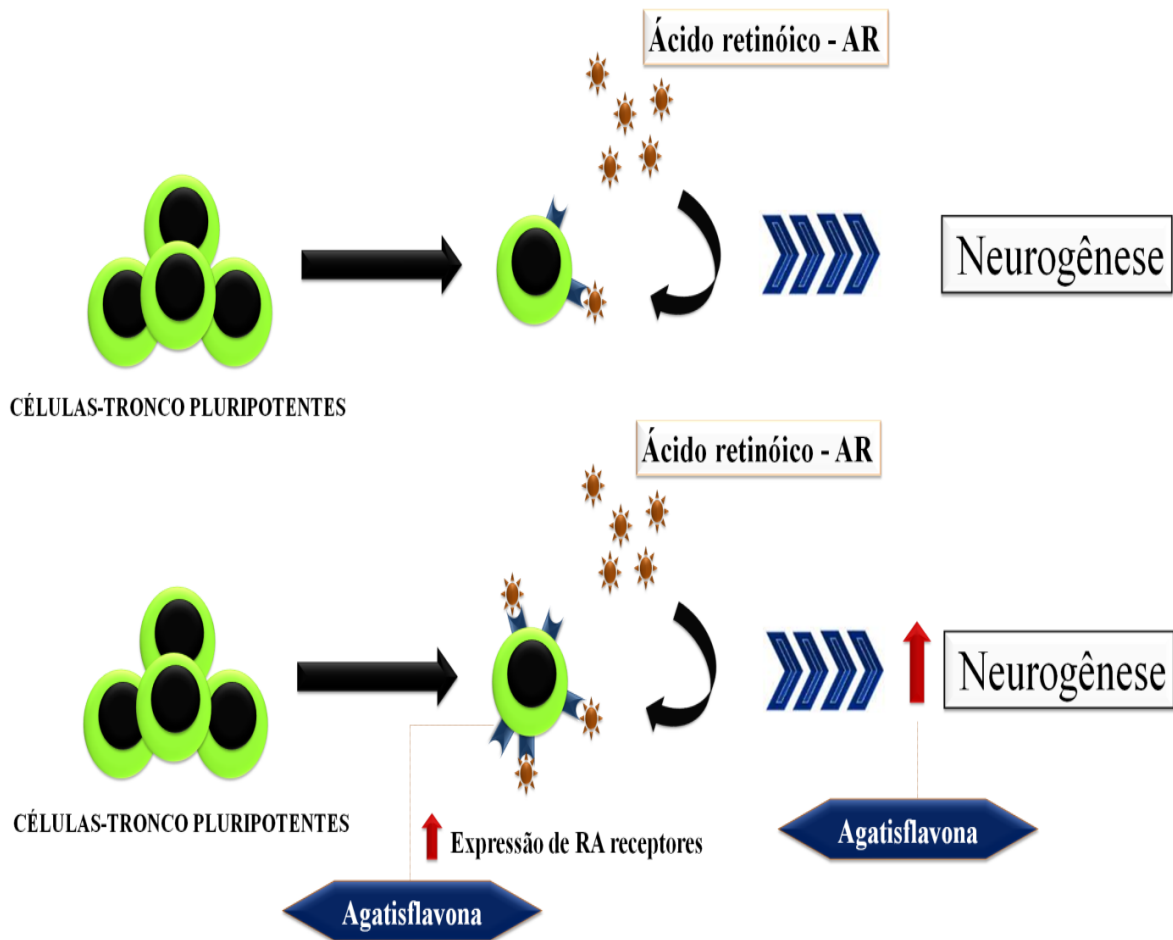
Tabela 5: Publicações nas bases de dados Periódicos CAPES, *ScienceDirect*, *Web of Science*, *Scopus*, *PubMed* e *ACS Publications*, 1999-2015.

Ano/Autor	Título	Composto isolado/Planta	Periódicos	Principais Resultados
Lin et al., 1999a	Antiviral activities of biflavonoids	<i>Rhus succedanea</i> L.	ACS Publications	Os resultados indicaram que agatisflavona exibiu forte efeitos inibidor contra vírus influenza A e influenza B, nos valores de CE ₅₀ menores que 3 µg/mL e 0,3 µg/mL, respectivamente.
Pegnyemb et al., 2005	Antimicrobial biflavonoids from the aerial parts of <i>Ouratea sulcata</i>	<i>Ouratea sulcata</i> K.	Periódicos CAPES	O extrato CH ₂ Cl ₂ /MeOH (1:1) contendo agatisflavona foi testado quanto à sua atividade antimicrobiana contra bactérias Gram-positivas (<i>S. aureus</i> , <i>B. subtilis</i> , <i>V. anguillarum</i>) e gram - negativas (<i>E. coli</i>) <i>in vitro</i> . O extrato mostrou atividades contra todas as cepas Gram-positivas testadas, com concentração inibitória mínima (CIM em µg/mL) < 150. O extrato CH ₂ Cl ₂ /MeOH não demonstrou ser ativa contra a bactéria gram – negativa.
Svenningsen et al., 2006	Biflavones from <i>Rhus</i> species with affinity for the GABA _A /benzodiazepine receptor	<i>Rhus pyroides</i> B. <i>Rhus dentata</i> T.	PubMed	O teor de agatisflavona isolada foi maior em <i>Rhus pyroides</i> do que em <i>Rhus Dentata</i> . Os achados obtidos mostraram que a agatisflavona tem maior afinidade para o receptor GABA/benzodiazepina, visto que, as imagens desmonstram uma ligação entre a subunidade γ e α no receptor de GABA _A .
Paulsen et al., 2011	Agathisflavone Enhances Retinoic Acid-Induced Neurogenesis and Its Receptors α and β in Pluripotent Stem Cells	<i>Caesalpinia pyramidalis</i> T.	Web of Science	A agatisflavona reforçou a neurogênese induzida por ácido retinóico (AR) em células tronco embrionárias de ratos e células pluripotentes induzidas, tratadas durante 4 dias com 60 mM de agatisflavona e/ou 2 mM de AR, uma vez que, o biflavonoide potencializou a expressão de receptores para o AR nas células tronco pluripotentes.
Shrestha et al., 2012	<i>Rhus parviflora</i> and its biflavonoid constituent, rhusflavone, induce sleep through the positive allosteric modulation of GABA _A benzodiazepine receptors	<i>Rhus parviflora</i> R.	ScienceDirect	A agatisflavona foi extraída do fruto de <i>R. parviflora</i> avaliando-se sua afinidade com para o sítio de ligação de benzodiazepina do receptor GABA _A . O extrato de metanol produziu um efeito hipnótico que foi totalmente bloqueada por 3H-Ro 15-1788 flumazenil com um Ki de 0,091 µM.
Shrestha et al., 2013	Flavonoids from the fruits of Nepalese sumac (<i>Rhus parviflora</i>) attenuate glutamate-induced neurotoxicity in HT22 cells	<i>Rhus parviflora</i> R.	Scopus	O biflavonoide mostrou <i>in vitro</i> viabilidade celular (91,5%) considerável e efeito protetor contra a toxicidade induzida por glutamato (40 a 80 µM). A ação neuroprotetor da agatisflavona decorreu de sua propriedade antioxidante, diminuindo o estresse oxidativo. No entanto, o composto não mostrou qualquer capacidade significativa de inibir a CDK5/p25 (CI ₅₀ valor > 20 µM).

Fonte: Autoria própria.

Além disto, o biflavonoide potencializou a expressão de receptores para o AR nas células tronco pluripotentes (**Figura 7**), o que sugere que a disponibilidade dos receptores de AR é um fator limitante do processo de neurogênese induzida pelo AR.

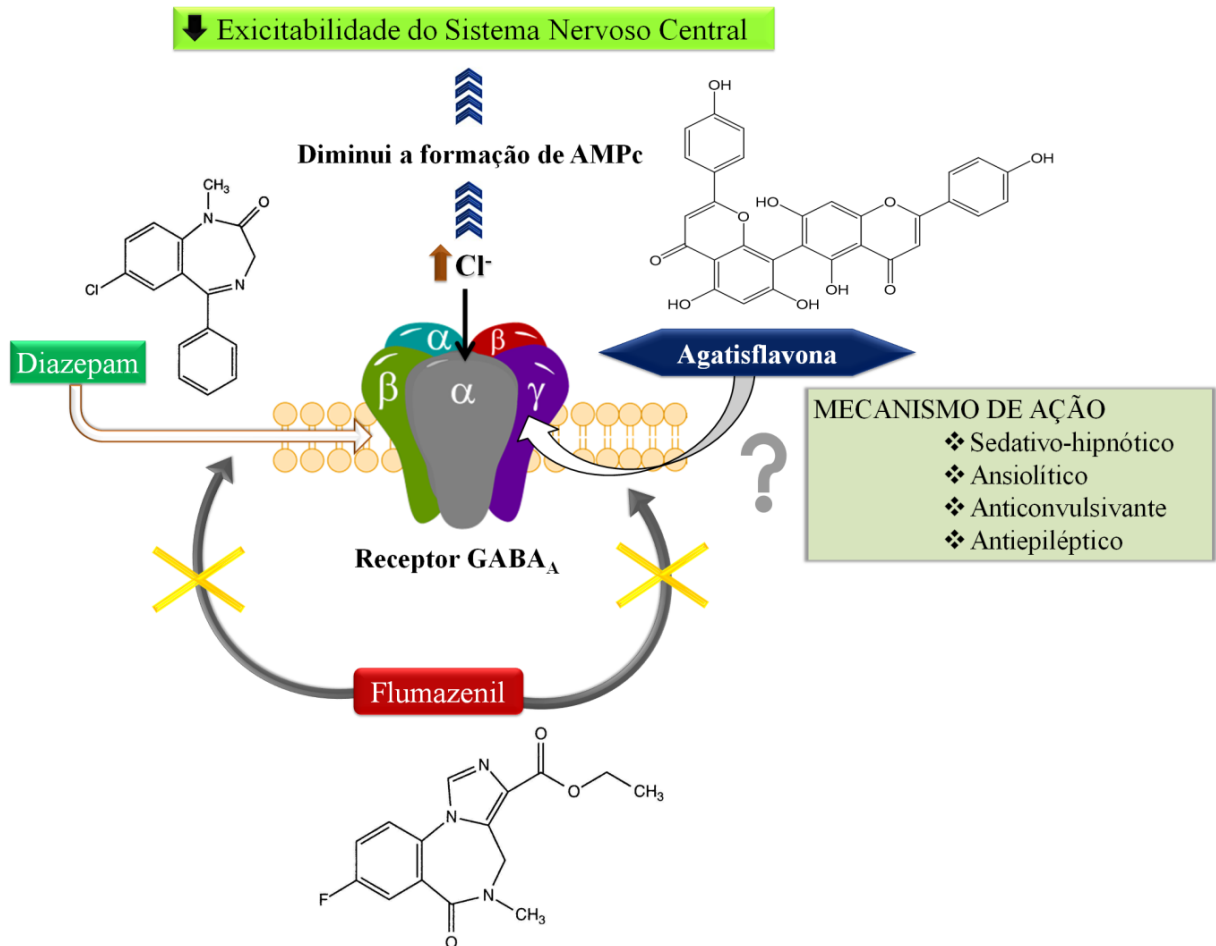
Figura 7: Neurogênese induzida pelo AR potencializada pela agatisflavona.



Fonte: Autoria própria.

Shrestha et al. (2012) investigaram, por meio de modulação alostérica positiva de receptores de GABA_A-benzodiazepínicos, o potencial de *R. parviflora* no tratamento de patologias relacionadas ao SNC. Das frações de acetato de etila e metanólica, os pesquisadores isolaram a agatisflavona, a qual, com bases nos ensaios *in vitro* e *in vivo* realizados, diminui a excitabilidade do SNC por meio da abertura de canais iônicos de transmembrana por estimular os receptores GABA_A-benzodiazepínico, o que permitiu um influxo de íons cloretos, diminuindo por sua vez a formação de adenosina 3',5'-monofosfato cíclico (AMPC) intracelular (**Figura 8**). Este mecanismo está intrinsecamente relacionado às possíveis ações hipnótica, antiepilética e anticonvulsivante dos biflavonoides estudados.

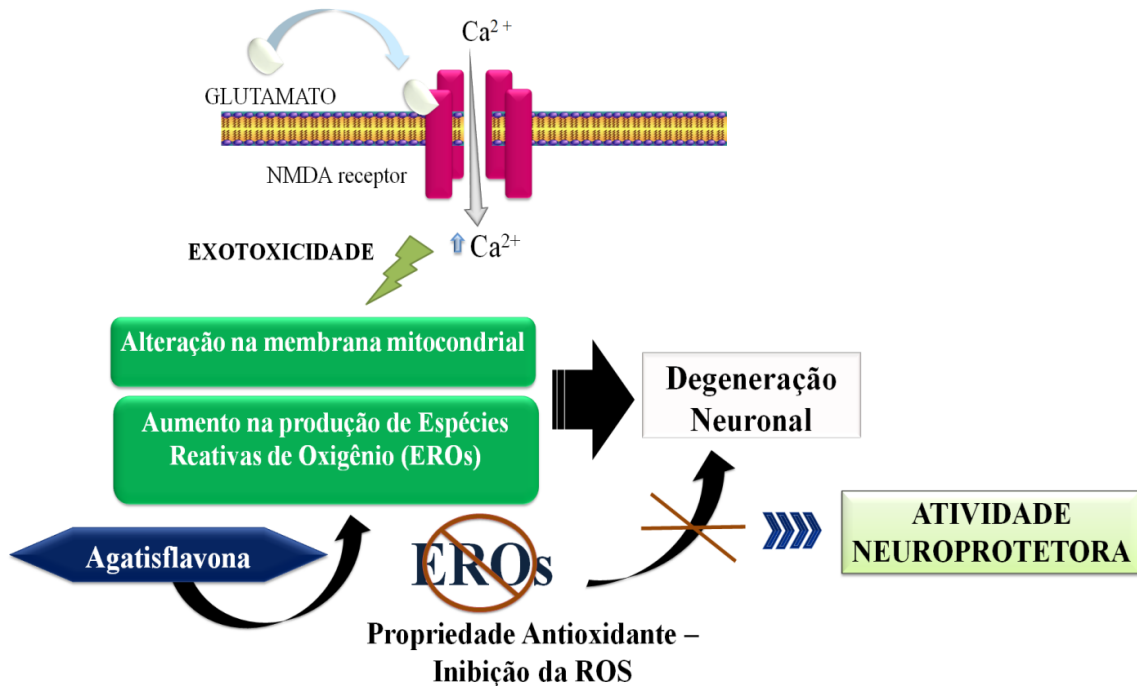
Figura 8: Possível mecanismo de ação sedativo, hipnótico, ansiolítico e antiepilético da agatisflavona.



Em outro estudo realizado por Shrestha e colaboradores (2013), quatro flavonoides foram isolados (fustin, taxifolina, aureusidin e agatisflavona) a partir do fracionamento com acetato de etila dos extratos obtidos do fruto de *R. parviflora*. Os pesquisadores investigaram a citotoxicidade e a eficiência dos compostos isolados na atenuação de morte celular induzida pelo glutamato em células de linhagem HT-22 do hipocampo de roedores por meio do ensaio MTT (brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio) e a capacidade de inibir a cinase 5 dependente de ciclina proteína p25 (CDK5/p25). Além disto, mensuraram os níveis de produção de Espécies Reativas de Oxigênio (EROs) *in vitro*.

Na pesquisa supracitada, foi verificado que o biflavonoide agatisflavona, devido a sua propriedade antioxidante, apresentou efeito protetor contra lesões oxidativas induzidas pelo glutamato (ação neuroprotetora) em células HT-22, decorrente do aumento dos níveis de ROS (**Figura 9**). Porém, o composto não atua sobre a CDK5/p25, onde a aumentada de CDK5 está envolvida na patogênese da Doença de Alzheimer.

Figura 9: Possível mecanismo de ação neuroprotetor da agatisflavona.



Fonte: Autoria própria.

4.3.2 Prospecção tecnológica sobre a agatisflavona

Posteriormente foi realizada a análise das palavras-chave e suas associações nos bancos de dados tecnológicos do INPI, WIPO, EPO, USPTO. Nas bases da WIPO e EPO foi verificada a presença de 09 e 03 patentes respectivamente (**Tabela 6**). Todas mencionam sobre as propriedades antivirais dos biflavonoides. A USPTO foi a base com maior número de depósito de patentes (12), em que, além do tema anteriormente citado, foram encontrados textos referentes aos métodos de extração e a ação antioxidante dos biflavonoides (**Tabela 6**).

Tabela 6: Número de patentes depositadas nos bancos tecnológicos INPI, WIPO, EPO, USPTO por palavras-chave.

PALAVRAS –CHAVE	INPI	WIPO	EPO	USPTO
<i>Agathisflavone</i>	-	9	3	12
<i>Agathisflavone and anxiolytic</i>	-	0	0	0
<i>Agathisflavone and neuroprotective</i>	-	0	0	0
<i>Agathisflavone and antidepressant</i>	-	0	0	0
Agatisflavona	0			
Agatisflavona e ansiolítico	0	-	-	-
Agatisflavona e neuroprotetor	0	-	-	-
Agatisflavona e antidepressivo	0	-	-	-

Fonte: Autoria própria.

A **Tabela 7** mostra que o banco de dados do USPTO, indicado pelo símbolo US e CA, foi o maior detentor de depósito de patentes e que a maioria das invenções encontradas referem-se substancialmente à obtenção e purificação do biflavanoide agatisflavona para o tratamento e/ou prevenção de infecções virais. As patentes com número EP1245230, US20020068757, WO/1998/046238, CA2225341 dos inventores Yuh-Meei Lin, Michael T. Flavin, Ralph Schure, David E. Zembower e Geng-Xian Zhao relatam que os biflavanoides da invenção (dentre estes a agatisflavona), obtidos a partir dos extratos de variadas fontes naturais, apresentam resultados eficazes na inibição da atividade viral e pode ser utilizado para tratamento e/ou prevenção de uma ampla gama de infecções virais, como: influenza A e B, a hepatite B e o HIV-1, Herpes Simplex Vírus type 1 (HSV-1), HSV-2, Vírus Varicela-Zoster e sarampo.

Tabela 7: Patentes relacionadas à atividade farmacológica da agatisflavona depositadas nos bancos tecnológicos WIPO, EPO, USPTO.

PROPRIEDADES BIOLÓGICAS DA AGATISFLAVONA	PATENTES	REFERÊNCIAS
Antiviral	EP1245230-A3	Lin et al., 2002a
	US6399654-B1	Lin et al., 2002b
	US5948918-A	Lin et al., 1999b
	WO/1998/046238-A1	Zembower et al., 1998
	US5773462-A	Lin et al., 1998
	EP0833631-A1	Flavin et al., 1998
	WO/1997/000679-A1	Flavin et al., 1997
Antioxidante	US20140031567-A1	Park; Kwon; Choi, 2014
	US8551537-B2	Park et al., 2013
	US6821508-B2	Zatz; Malhotra, 2004
	US6231875-B1	Sun et al., 1999
	CA2225341-A1	Lin et al., 1997b

Fonte: Autoria própria.

A partir das bases selecionadas, nenhuma patente foi encontrada no que se refere às ações farmacológicas selecionadas para este estudo. Além disto, na busca de patentes nos bancos do INPI nenhum depósito de patente foi encontrado (**Tabela 6**). Este resultado expõe a falta de atividades de inovação e a utilização da propriedade intelectual para promover o investimento em Pesquisa, Desenvolvimento & Inovação tecnológica no Brasil. Isto pode ser resultado do déficit no investimento em infraestrutura básica necessária para o desenvolvimento do conhecimento local e transferência de tecnologia (COSTA et al., 2014).

A classificação uniforme de documentos de patente, segundo o guia de Classificação Internacional de Patentes (2015), tem como objetivos o estabelecimento de uma ferramenta de busca eficaz para a recuperação de documentos de patentes pelos escritórios de propriedade intelectual e demais usuários, ordenar os documentos de patente a fim de facilitar o acesso às informações tecnológicas e legais contidas nos mesmos, investigar o estado da técnica em determinados campos da tecnologia, dentre outros. A **Tabela 8** mostra o número de patentes de acordo com sua classificação internacional.

Tabela 8: Relação das patentes encontradas nos bancos tecnológicos WIPO, EPO, USPTO agrupadas quanto a sua Classificação Internacional de Patentes.

SEÇÃO	CLASSE	SUBCLASSE	GRUPO PRINCIPAL	NÚMEROS DE PATENTES	PATENTES
A	A61	A61P	A6103P1/16	01	EP1245230-A3.
			A61K9/70	02	US6821508-B2; US6231875-B1.
			A61K31/55	02	US6399654-B1; WO/1998/046238-A1.
		A61K	A61K31/352	09	EP1245230-A3; US6399654-B1; US5948918-A; WO/1998/046238-A1; US5773462-A; EP0833631-A1; WO/1997/000679-A1; US8551537-B2; CA2225341-A1.
			A61K38/19	02	US6399654-B1 WO/1998/046238-A1.
			A61K38/20	02	US6399654-B1; WO/1998/046238-A1.
C	C07	C07D	C07D311/30	08	US6399654-B1; WO/1998/046238-A1; US5773462-A; EP0833631-A1; WO/1997/000679-A1; US20140031567-A1; CA2225341-A1.
			C07D311/32	04	US6399654-B1; US5948918-A; WO/1998/046238-A1; CA2225341-A1.

Fonte: Autoria própria.

Na presente investigação, as patentes encontradas são classificadas na seção A (necessidades humanas) e C (química; metalurgia), classe A61 (ciência médica ou veterinária; higiene) e C07 (química orgânica), subclasse A61P (atividade terapêutica específica de compostos químicos ou preparações medicinais), A61K (preparações para finalidades médicas, odontológicas ou higiênicas) e C07D (compostos heterocíclicos) e grupo principal A61P31/16 (anti-infecciosos, isto é, antibióticos, antissépticos, quimioterapêuticos para vírus influenza ou rinoviroses), A61K9/70 (bases para tiras sem-fim, folhas ou filamentos) A61K31/55 (preparações medicinais contendo ingredientes ativos orgânicos: tendo anéis de sete membros), A61K38/19 (preparações medicinais contendo peptídeos: citocinas; linfocinas; interferons), A61K31/352 (preparações medicinais contendo ingredientes ativos orgânicos: condensado com anéis carbocíclicos), A61K38/20 (preparações medicinais contendo peptídeos: interleucinas), C07D311/30 (compostos heterocíclicos, contendo anéis de seis membros tendo um átomo de oxigênio como o único heteroátomo do anel, condensados com outros anéis: não hidrogenados no heteroanel) e C07D311/32 (compostos heterocíclicos, contendo anéis de seis membros tendo um átomo de oxigênio como o único heteroátomo do anel, condensados com outros anéis: derivados 2,3-dihidro) da CIP.

Do ponto de vista científico, o composto apresenta um extenso número de publicações que mostram um leque de atividades terapêuticas relevantes que incluem: antiviral, antimicrobiana, hepatoprotetora, anti-inflamatória, antioxidante, ansiolítica, neuroprotetora, dentre outras. Porém, foi possível observar que até o presente momento houve um número reduzido de patentes envolvendo aplicações farmacêuticas da agatisflavona, além disto, não foram verificados depósitos de patentes que correlacionem as atividades farmacológicas desse composto ao SNC.

4.4 Conclusão

Esta prospecção permitiu analisar os trabalhos publicados em bases científicas e tecnológicas. Os resultados mostram que existe interesse científico na agatisflavona há mais de trinta anos, porém, foi constatado um número reduzido de artigos relacionados ao efeito terapêutico da agatisflavona no SNC. Com relação à prospecção tecnológica não foram encontradas patentes que se refiram às propriedades farmacológicas da agatisflavona em desordens neurodegenerativas. Diante disto, é válido destacar que estes achados estimulam o meio acadêmico e as indústrias farmacêuticas a realizarem pesquisas inovadoras referentes às ações farmacológicas do biflavonoide agatisflavona em desordens neurológicas, na tentativa de ampliar o desenvolvimento tecnológico e o conseqüente crescimento econômico científico de um país.

REFERÊNCIAS

- AJILEYE, O. O.; OBUOTOR, E. M.; AKINKUNMI, E. O.; ADEROGBA, M. A. Isolation and characterization of antioxidant and antimicrobial compounds from *Anacardium occidentale* L. (Anacardiaceae) leaf extract. **Journal of King Saud University - Science**, v. 27, n. 3, p. 244–252, 2015.
- ANAND, K. K.; GUPTA, V. N.; RANGARI, V.; SINGH, B.; CHANDAN, B. K. Structure and hepatoprotective activity of a biflavonoid from *Canariummanii*. **Planta Medica**, v. 58, n. 6, p. 493–495, 1992.
- ARAÚJO, M. F.; DE; SANTOS, C. B.; CAVALCANTI, J. F.; FERNANDA, S.; MENDES, G. S.; WERLE, A. A.; et al. Proposed active compounds from *Ouratea parviflora*. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 5, n. 12, p. 2489–2493, 2011.
- BIRT, D. F.; JEFFERY, E. Flavonoids. **Advances in Nutrition**, v. 4, n. 5, p. 576–577, 2013.
- BRASIL. **Guia: Classificação Internacional de Patentes (IPC)**, Ministério do Desenvolvimento, Indústria e Comércio Exterior, Brasília, DF, p. 1, 2015.
- CHAHAR, M. K.; SHARMA, N.; DOBHAL, M. P.; JOSHI, Y. C. Flavonoids: a versatile source of anticancer drugs. **Pharmacognosy Reviews**, v. 5, n. 9, p. 1–12, 2011.
- CHO, N.; CHOI, J. H.; YANG, H.; JEONG, E. J.; LEE, K. Y.; KIM, Y. C.; et al. Neuroprotective and anti-inflammatory effects of flavonoids isolated from *Rhus verniciflua* in neuronal HT22 and microglial BV2 cell lines. **Food and Chemical Toxicology**, v. 50, n. 6, p. 1940–1945, 2012.
- CHO, N.; LEE, K. Y.; HUH, J.; CHOI, J. H.; YANG, H.; JEONG, E. J.; et al. Cognitive-enhancing effects of *Rhus verniciflua* bark extract and its active flavonoids with neuroprotective and anti-inflammatory activities. **Food and Chemical Toxicology**, v. 58, p. 355–361, 2013.
- COSTA, J. P.; OLIVEIRA, S.; MARIO, L.; JÚNIOR, R.; FREITAS, R. M. DE. Phytol a natural diterpenoid with pharmacological applications on central nervous system: a review. **Recent Patents on Biotechnology**, v. 8, n. 3, p. 194–205, 2014.
- DEKERMENDJIAN, K.; KAHNBERG, P.; WITT, M. R.; STERNER, O.; NIELSEN, M.; LILJEFORS, T. Structure-activity relationships and molecular modeling analysis of flavonoids binding to the benzodiazepine site of the rat brain GABA(A) receptor complex. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 42, n. 21, p. 4343–4350, 1999.
- FIDELIS, Q. C.; RIBEIRO, T. A. N.; ARAÚJO, M. F.; DE CARVALHO, M. G. *Ouratea* genus: chemical and pharmacological aspects. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 24, n. 1, p. 1–19, 2014.

FLAVIN, M. T.; LIN, Y.-M.; SCHURE, R.; ZEMBOWER, D. E.; ZHAO, G.-X. **Biflavonoids and derivatives thereof as antiviral agents**. US. n. WO1997000679. 21 jun. 1996, 9 jan. 1997.

FLAVIN, M. T.; LIN, Y.-M.; SCHURE, R.; ZEMBOWER, D. E.; ZHAO, G.-X. **Biflavonoids and derivatives thereof as antiviral agents**. US. n. EP0833631 A1. 21 jun. 1996, 8 abr. 1998.

FU, Y.; CHEN, J.; LI, Y. J.; ZHENG, Y. F.; LI, P. Antioxidant and anti-inflammatory activities of six flavonoids separated from licorice. **Food Chemistry**, v. 141, n. 2, p. 1063–1071, 2013.

GUINÉ, R. P. F.; JOÃO, M.; GONÇALVES, F. J.; ALVES, M. Artificial neural network modelling of the antioxidant activity and phenolic compounds of bananas submitted to different drying treatments. **Food Chemistry**, v. 168, p. 454–459, 2015.

GUO, J.; XUE, C.; DUAN, J. A.; QIAN, D.; TANG, Y.; YOU, Y. Anticonvulsant, antidepressant-like activity of *Abelmoschus manihot* ethanol extract and its potential active components *in vivo*. **Phytomedicine**, v. 18, n. 14, p. 1250–1254, 2011.

GUPTA, G.; DUA, K.; KAZMI, I.; ANWAR, F. Anticonvulsant activity of Morusin isolated from *Morus alba*: Modulation of GABA receptor. **Biomedicine & Aging Pathology**, v. 4, n. 1, p. 29–32, 2014.

HERRERA-RUIZ, M.; ZAMILPA, A.; GONZÁLEZ-CORTAZAR, M.; REYES-CHILPA, R.; LEÓN, E. Phytomedicine antidepressant effect and pharmacological evaluation of standardized extract of flavonoids from *Byrsonima crassifolia*. **European Journal of Integrative Medicine**, v. 18, n. 14, p. 1255–1261, 2011.

HWANG, S.-L.; SHIH, P.; YEN, G. Neuroprotective effects of citrus flavonoids. **Journal of Agricultural Food Chemistry**, v. 60, p. 877–885, 2012.

HWANG, S.-L.; SHIH, P.-H.; YEN, G.-C. **Citrus flavonoids and effects in dementia and age-related cognitive decline**. In: Diet and nutrition in dementia and cognitive decline. 1^o ed., Elsevier, 2015.

KAHNBERG, P.; LAGER, E.; ROSENBERG, C.; SCHOUGAARD, J.; CAMET, L.; STERNER, O.; et al. Refinement and evaluation of a pharmacophore model for flavone derivatives binding to the benzodiazepine site of the GABA_A receptor. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 45, n. 19, p. 4188–4201, 2002.

KONAN, N. A.; LINCOPAN, N.; COLLANTES DÍAZ, I. E.; DE FÁTIMA JACYSYN, J.; TANAE TIBA, M. M.; MENDES, J. G. P. A. et al. Cytotoxicity of cashew flavonoids towards malignant cell lines. **Experimental and Toxicologic Pathology**, v. 64, n. 5, p. 435–440, 2012.

LIMA, G. P. P.; FABIO, V.; CORRÊA, C. R.; CAMPOS, R. A. DA S.; BORGUINI, M. G. Polyphenols in fruits and vegetables and its effect on human health. **Food and Nutrition Sciences**, v. 5, p. 1065–1082, 2014.

LIN, Y. M.; FLAVIN, M. T.; SCHURE, R.; CHEN, F. C.; SIDWELL, R.A.L. Antiviral activities of biflavonoids. **Planta Medica**, v. 65, n. 2, p. 120–125, 1999a.

LIN, Y. M.; ANDERSON, H.; FLAVIN, M. T.; PAI, Y. H. S.; MATA-GREENWOOD, E.; PENGSUPARP, T. et al. *In vitro* anti-HIV activity of biflavonoids isolated from *Rhus succedanea* and *Garcinia multiflora*. **Journal of Natural Products**, v. 60, n. 9, p. 884–888, 1997a.

LIN, Y.-M.; FLAVIN, M. T.; SCHURE, R.; ZEMBOWER, D. E.; ZHAO, G.-X. **Biflavonoids and derivatives thereof as antiviral agents**. US. n. CA2225341A1. 21 jun. 1996, 09 jan. 1997b.

LIN, Y.-M.; FLAVIN, M. T.; SCHURE, R.; ZEMBOWER, D. E.; ZHAO, G.-X. **Biflavonoids and derivatives thereof as antiviral agents**. US. n. US5773462. 21 jun. 1996, 30 jun. 1998.

LIN, Y.-M.; FLAVIN, M. T.; SCHURE, R.; ZEMBOWER, D. E.; ZHAO, G.-X. **Biflavonoids and derivatives thereof as antiviral agents**. US. n. US5948918. 21 jun. 1996, 07 set. 1999b.

LIN, Y.-M.; SCHURE, R.; FLAVIN, M. T.; ZEMBOWER, D. E.; ZHAO, G.-X. **Amentoflavone as an antiviral agent**. UK. n. EP1245230. 23 de jun. 1996, 02 out. 2002a.

LIN, Y.-M.; ZEMBOWER, D. E.; FLAVIN, M. T.; SCHURE, R.; ZHAO, G. **Biflavonoids and derivatives thereof as antiviral agents**. US. n. US6399654. 15 abr. 1998. 4 jun. 2002b.

LOU, S.-N.; LAI, Y.-C.; HUANG, J.-D.; HO, C.-T.; FERNG, L.-H. A.; CHANG, Y.-C. Drying effect on flavonoid composition and antioxidant activity of immature kumquat. **Food Chemistry**, v. 171, p. 356–363, 2015.

MACHADO, K. C.; MACHADO, K. C.; GOMES JÚNIOR, A. L.; DE FREITAS, R. M. Aplicação farmacêutica de inibidores de proteases: uma prospecção tecnológica. **Revista Geintec**, v. 4, n. 2, p. 780–787, 2014.

MASUOKA, N.; MATSUDA, M.; KUBO, I. Characterisation of the antioxidant activity of flavonoids. **Food Chemistry**, v. 131, n. 2, p. 541–545, 2012.

OBERBAUER, E.; URMANN, C.; STEFFENHAGEN, C.; BIELER, L.; BRUNNER, D.; FURTNER, T. et al. Chroman-like cyclic prenylflavonoids promote neuronal differentiation and neurite outgrowth and are neuroprotective. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 24, n. 11, p. 1953–1962, 2013.

PARK, S.-J.; KIM, K.-H.; SHIN, M.-J.; LEE, S.-S.; KANG, B.-S.; CHOI, W.-C. et al. ***Rhus verniciflua* stokes extract having increased content of active flavonoid compound and method for preparing same**. KR. n. US8551537. 27 dez.2010, 8 out. 2013.

PARK, S.-J.; KWON, S.-P.; CHOI, W.-C. **Method of converting fustin to fisetin**. KR n. US20140031567. 11 set. 2013, 30 jan. 2014.

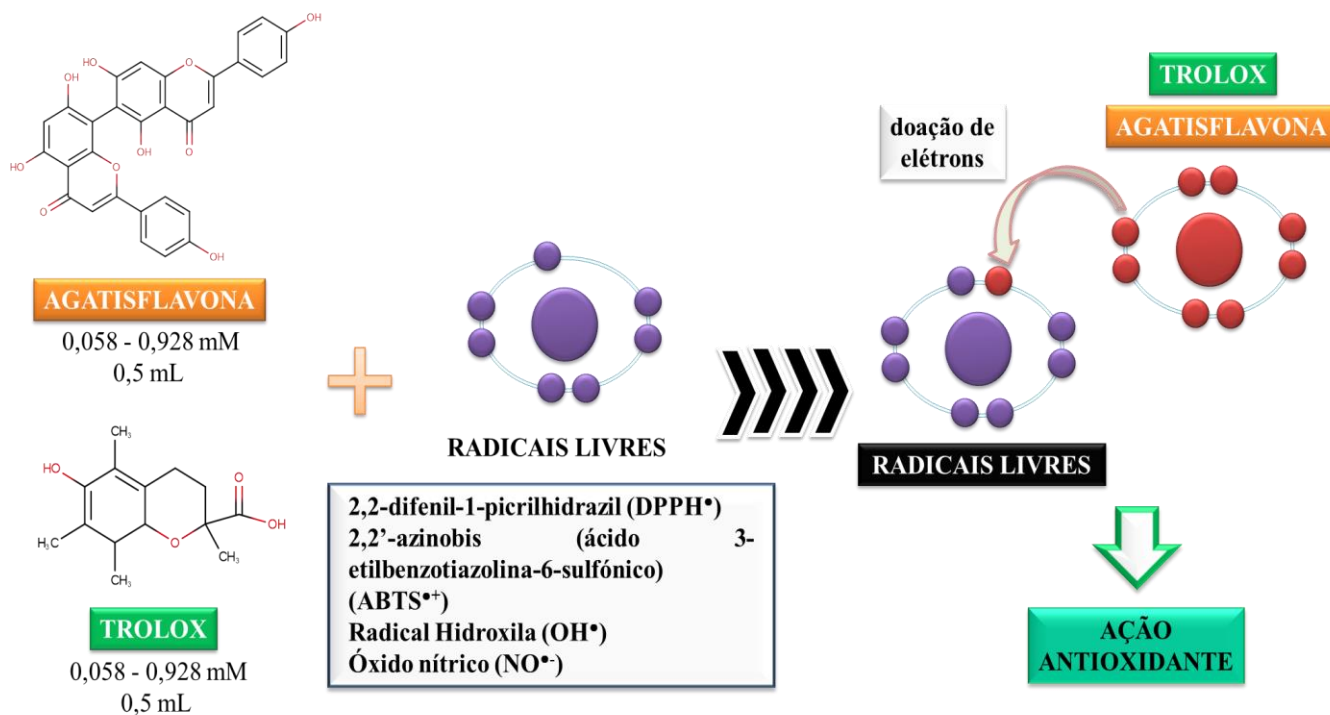
- PAULSEN, B. S.; SOUZA, C. S.; CHICAYBAM, L.; BONAMINO, M. H.; BAHIA, M.; COSTA, S. L. et al. Agathisflavone enhances retinoic acid-induced neurogenesis and its Receptors α and β in pluripotent stem cells. **Stem Cells and Development**, v. 20, n. 10, p. 1711–1721, 2011.
- PEGNYEMB, D. E.; MBING, J. N.; ATCHADÉ, A. D. T.; TIH, R. G.; SONDEGAM, B. L.; BLOND, A.; et al. Antimicrobial biflavonoids from the aerial parts of *Ouratea sulcata*. **Phytochemistry**, v. 66, n. 16, p. 1922–1926, 2005.
- SAK, K. Cytotoxicity of dietary flavonoids on different human cancer types. **Pharmacognosy Reviews**, v. 8, n. 16, p. 122–146, 2014.
- SERAFINI, M. R.; ANTUNES, A.; ARAUJO, D. S.; PATENTES, E. DE. Prospecção tecnológica: *Morinda citrifolia* e indústria farmacêutica. **Revista Geintec**, v. 1, n. 1, p. 22–31, 2011.
- SHRESTHA, S.; LEE, D. Y.; PARK, J. H.; CHO, J. G.; LEE, D. S.; LI, B.; et al. Flavonoids from the fruits of Nepalese sumac (*Rhus parviflora*) attenuate glutamate-induced neurotoxicity in HT22 cells. **Food Science and Biotechnology**, v. 22, n. 4, p. 895–902, 2013.
- SHRESTHA, S.; PARK, J. H.; LEE, D. Y.; CHO, J. G.; CHO, S.; YANG, H. J.; et al. *Rhus parviflora* and its biflavonoid constituent, rhusflavone, induce sleep through the positive allosteric modulation of GABA A-benzodiazepine receptors. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 142, n. 1, p. 213–220, 2012.
- SUN, Y.; LIU, J.-C.; KIMBLETON, E.; WANG, J. C. T. **An acidified composition for topical treatment of nail and skin conditions**. US. n. US6231875. 31 mar. 1998, 09 mar. 1999.
- SVENNINGSSEN, A. B.; MADSEN, K. D.; LILJEFORS, T.; STAFFORD, G. I.; STADEN, J. VAN; JÄGER, A. K. Biflavones from *Rhus* species with affinity for the GABAA/benzodiazepine receptor. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 103, n. 2, p. 276–280, 2006.
- VALENTE, L. M. M.; ADRIANA, C.; PRISCILA, F. P.; SCHEINVAR, L. A.; MOURA, M. R. L.; TINOCO, L. W. et al. Antiradical activity, nutritional potential and flavonoids of the cladodes of *Opuntia monacantha* (Cactaceae). **Food Chemistry**, v. 123, n. 4, p. 1127–1131, 2010.
- ZATZ, J. L.; MALHOTRA, G. G. **Composition and method for topical nail treatment**. US. n. US6821508. 27 jun. 2002, 23 nov. 2004.
- ZEMBOWER, D. E.; LIN, Y.-M.; FLAVIN, M. T.; SCHURE, R.; ZHAO, G.-X. **Biflavonoids and derivatives thereof as antiviral agents**. US. n. WO/1998/046238. 15 abr. 1998, 22 out. 1998.
- ZHANG, W.; KOEHLER, K. F.; ZHANG, P.; COOK, J. M. Development of a comprehensive pharmacophore model for the benzodiazepine receptor. **Drug design and discovery**, v. 12, n. 3, p. 193–248, 1995.

ZHENG, M.; FAN, Y.; SHI, D.; LIU, C. Antidepressant-like effect of flavonoids extracted from *Apocynum venetum* leaves on brain monoamine levels and dopaminergic system. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 147, n. 1, p. 108–113, 2013.

5 CAPÍTULO II: Avaliação das propriedades antioxidantes *in vitro* do biflavonoide agatisflavona.

(Artigo a ser submetido à *Chemico-Biological Interactions*)

Qualis B1



Avaliação das propriedades antioxidantes *in vitro* do biflavonoide agatisflavona.

Anderson Wilbur Lopes Andrade¹; Jéssica Pereira Costa¹; Jorge Maurício David²

¹Núcleo de Tecnologia Farmacêutica, Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Piauí – UFPI, Teresina, Piauí, Brasil.

²Departamento de Química Orgânica, Universidade Federal da Bahia, Salvador, Bahia, Brasil.

RESUMO

Embora os radicais livres sejam componentes vitais para vida celular, há uma variedade de patologias agudas e crônicas as quais estão associados, incluindo alguns transtornos que afetam o sistema nervoso central (SNC). Os biflavonoides compreendem um grupo de compostos com promissora capacidade protetora contra danos oxidativos induzidos pelos radicais livres. O presente estudo buscou descrever as propriedades antioxidantes, *in vitro*, do biflavonoide agatisflavona, por meio da avaliação de sua habilidade em eliminar radicais DPPH[•], ABTS^{•+}, e hidroxila, bem como a sua capacidade para iniciar a transferência de elétrons por meio do potencial redutor, em inibir a peroxidação lipídica pelo método TBARS (substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico) e a produção de óxido nítrico. Em todas as metodologias investigadas, foi demonstrado que a agatisflavona, na maior concentração (0,928 mM), apresenta capacidade antioxidante (concentração eficaz em 50%) semelhante ($p < 0,05$) ao padrão antioxidante, Trolox (0,928 mM), e a de outros compostos fenólicos: miricetina, catequina, fukugisida e morelloflavona, estruturalmente semelhantes à agatisflavona, o que evidencia a importância deste biflavonoide na proteção contra os possíveis danos oxidativos ocasionados por radicais livres. Com isto, os resultados obtidos nesta pesquisa sugerem que o biflavonoide agatisflavona apresenta um grande potencial para o desenvolvimento de um novo produto farmacêutico com atividade antioxidante para possível uso na prevenção e/ou tratamento de doenças relacionadas ao estresse oxidativo. Entretanto, mais investigações são necessárias para elucidar os possíveis mecanismos de ação envolvidos na ação antioxidante da agatisflavona.

Palavras-chave: Agatisflavona. Biflavonoides. Estresse oxidativo. Propriedades antioxidantes. Radicais livres.

5.1 Introdução

Os radicais livres, são definidos como qualquer substância química capaz de doar facilmente seus elétrons para outras moléculas. Estes podem ser classificados em Espécies Reativas de Oxigênio (EROs), os quais são produzidas por meio de uma redução parcial de oxigênio (O₂) e em Espécies Reativa de Nitrogênio (ERNs), sendo estas produzidas por redução parcial de nitrogênio (N₂) (MACHADO et al., 2015; ADEGOKE; FORBES, 2015).

As EROs e ERNs estão envolvidas em vários processos fundamentais a sobrevivência das células, dentre estes a respiração mitocondrial e a regulação, sinalização, proliferação e diferenciação celular. No entanto, qualquer alteração nos níveis celulares das EROs e ERNs induzem danos oxidativos que prejudicam o bom funcionamento de tecidos vivos (AL-GUBORY; FOWLER; GARREL, 2010; ARWA et al., 2015).

Desta forma, a exposição prolongada aos radicais livres resulta em lesões oxidativas a biomoléculas de DNA (ácido desoxirribonucleico) e proteínas, oxidação lipídica da membrana celular e deterioração dos sistemas cardiovascular e nervoso. Essas ações estão diretamente relacionadas à fisiopatologia de doenças graves, como câncer, diabetes, aterosclerose, imunossupressão, inflamação, doenças cardíacas e distúrbios neurodegenerativos e psicossociais (SURVESWARAN et al., 2007; ADEGOKE; FORBES, 2015; JABBARI; JABBARI, 2016).

Diante dessas considerações, diversos pesquisadores têm realizado pesquisas no intuito de obter compostos antioxidantes que sejam capazes de combater os danos oxidativos promovidos por essas exposições acentuadas das células as EROs e ERNs, uma vez que esta propriedade possui implicações positivas em muitas patologias agudas e crônicas, incluindo algumas desordens que afetam o sistema nervoso central (SNC), como esquizofrenia, doença de Alzheimer, doença de Parkinson, ansiedade e depressão (SURVESWARAN et al., 2007; OLIVEIRA; OLIVEIRA; FREITAS, 2014, SHI et al., 2015).

Compostos fenólicos simples como os fenilpropanóides e flavonóides evidenciaram, em pesquisas anteriores, propriedades antioxidantes *in vitro* (GONTIJO et al., 2012; ARWA et al., 2015; BARRECA et al., 2016). Os flavonóides representam o sub-grupo mais comum com atividade antioxidante, sendo que, dentro da classe de derivados dos flavonóides, os biflavonóides compreendem um grupo de compostos com promissora capacidade protetora contra danos oxidativos (FREITAS et al., 2014).

Os biflavonóides constituem um dímero de flavonoide ligados uns aos outros por meio de uma ligação C-C ou C-O-C covalente (YEH et al., 2012). São conhecidos por exibir uma

variedade de atividades biológicas *in vitro* e *ex vivo*, dentre estas propriedades anti-inflamatória (KANG et al., 2005; CASTARDO et al., 2008; JIA et al., 2014), inibição de enzimas do citocromo P450 (VON MOLTKE et al., 2004), atividade antiviral (LIN et al., 1999; FREITAS et al., 2009) e neuroproteção (KANG et al., 2005; GOMES et al., 2009; MBAVENG; HAMM, 2014). A agatisflavona 8-[5,7-di-hidroxi-2-(4-hidroxifenil) cromen-6-il-4-oxo]-5,7-di-hidroxi-2-(4-hidroxifenil)-cromen-4-ona) (**Figura 5**) é um biflavonoide com potenciais atividades biológicas, devido a sua estrutura química assemelhar-se a de outros flavonoides com propriedades farmacológicas.

A agatisflavona, substância de coloração amarela, massa molar igual a 538,457g/mol, densidade de 1,656 g/cm³ e coeficiente de partição com valor de 5,09 (PUBCHEM, 2015), pode ser isolada a partir dos extratos metanólicos, etanólicos, acéticos de diferentes partes com folha, caule, fruto, raiz de diversos tipos de plantas (*Caesalpinia pyramidalis* T., *Anacardium occidentale* L., *Rhus parviflora* R.) (SHRESTHA et al., 2013a, 2013b; FIDELIS et al., 2014; AJILEYE et al., 2015). Investigações anteriores demonstraram que a agatisflavona possui propriedade antiviral (DE SOUSA et al., 2015), antimicrobiana (PEGNYEMB et al., 2005), neuroproterora (PAULSEN et al., 2011; SHRESTHA et al., 2013a), entre outras. Entretanto, poucos estudos foram realizados no intuito de descrever a propriedade antioxidante dessa substância.

Portanto, o presente estudo buscou descrever as propriedades antioxidantes, *in vitro*, do biflavonoide agatisflavona, por meio da avaliação de sua habilidade em eliminar os radicais 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH[•]), 2,2'-azinobis (ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico) (ABTS^{•+}), radical hidroxila (OH[•]) e óxido nítrico (NO[•]), bem como a capacidade de inibir a peroxidação lipídica pelo método TBARS (substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico) e o potencial redutor.

5.2 Materiais e métodos

5.2.1 Reagentes

Os reagentes utilizados foram 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH[•]), 2,2'-azino-bis (ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico) (ABTS⁺⁺), etanol, Trolox (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico), água destilada, ácido tricloroacético, ácido tiobarbitúrico, nitroprussiato de sódio (NPS), 2,20-azobis-2-amidinopropano dicloridrato (AAPH), persulfato de potássio, ferricianeto de potássio, sulfato de ferro II (FeSO₄), cloreto férrico, hidróxido de sódio (NaOH), 2-desoxirribose, peróxido de hidrogênio (H₂O₂), ácido fosfórico, terc-butilamina e tampão fosfato. Todos os produtos químicos e solventes de grau analítico deste estudo foram obtidos na Sigma-Aldrich Co. (St. Louis , MO, EUA).

5.2.2 Obtenção do composto

O biflavonoide foi extraído da espécie *Caesalpinia pyramidalis* T., popularmente conhecida pelo nome de catingueira, por meio da maceração (com metanol em temperatura ambiente com agitação ocasional por dois ciclos de 48 horas) das folhas secas e trituradas (2,2 Kg). Em seguida o conteúdo obtido foi filtrado com papel de filtro comum. O filtrado foi concentrado sobre pressão e agitação controlada em um rotaevaporador obtendo o extrato metanólico.

A próxima etapa consistiu na partição do extrato metanólico bruto em clorofórmio e em seguida, a próxima partição em hexano. O extrato metanólico foi dissolvido em 1 L de solução hidroalcoólica (3:2) e extraído 5 vezes com clorofórmio (300 mL cada extração). A fase clorofórmica obtida foi dissolvida em etanol:água (95:5) e extraída com hexano. A fase hidroalcoólica remanescente (22,4 g) foi submetida à cromatografia em coluna (tendo sílica gel 60 como adsorvente e misturas de clorofórmio, acetato de etila e clorofórmio, metanol como eluentes). Quatro gramas (4 g) de agastiflavona foram isoladas das frações CHCl₃:MeOH (8:2) e recristalizada com metanol:hexano.

5.2.3 Avaliação da capacidade antioxidante da agastiflavona por *scavenging* do radical DPPH[•]

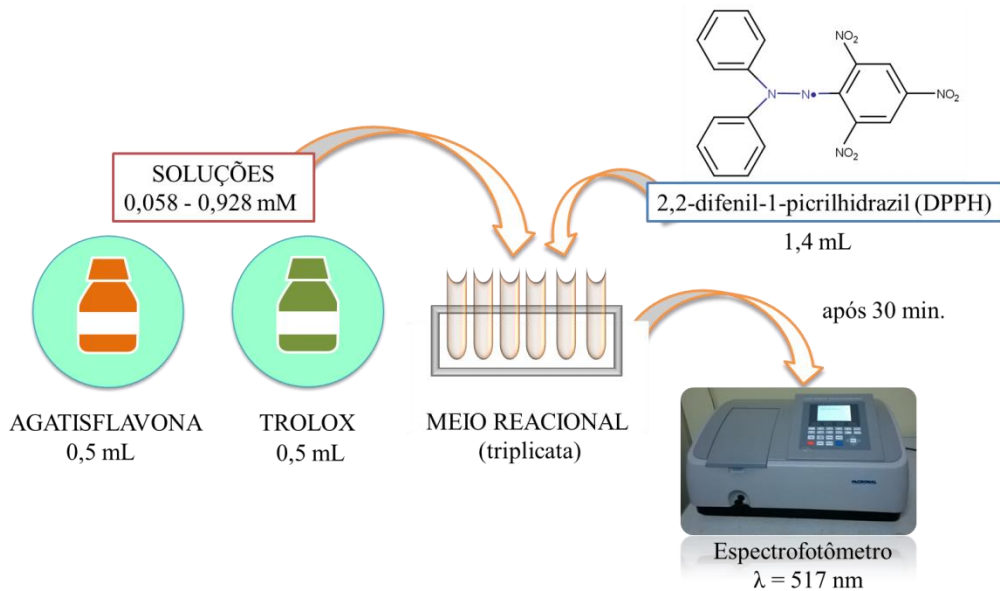
Para a avaliação da capacidade antioxidante contra o radical DPPH[•], a metodologia descrita por Silva et al. (2005) e adaptada por Freitas et al. (2014) e Machado et al. (2015) foi

utilizada. Resumidamente, uma mistura reacional contendo 0,5 mL de agatisflavona a 0,058, 0,116, 0,232, 0,464 e 0,928 mM com 1,4 mL de DPPH[•] foi agitada vigorosamente e incubada à 37°C e em ambiente escuro durante 30 min (**Figura 10**). A avaliação da atividade antioxidante foi realizada em triplicata e os valores de absorbância foram expressos como percentagem de inibição de DPPH[•] pela seguinte equação:

$$\% \text{ de inibição de DPPH}^{\bullet} = \{(Abs_{\text{controle}} - Abs_{\text{mistura reacional}}) \times 100 / Abs_{\text{controle}}\}$$

Em que Abs_{controle} é a absorbância da solução etanólica de DPPH[•] sem a amostra (agatisflavona) e $Abs_{\text{mistura reacional}}$ é a absorbância da mistura da agatisflavona (0,058 - 0,928 mM) o radical DPPH[•] no tempo de 30 minutos. A concentração eficaz (CE_{50}) necessária para inibição de 50% do radical DPPH[•] a 734 nm foi determinada. O mesmo procedimento experimental foi utilizado com o controle positivo Trolox, um análogo sintético da vitamina E (0,058, 0,116, 0,232, 0,464 e 0,928 mM) (**Figura 10**).

Figura 10: Reação antioxidante da agatisflavona por *scavenging* do radical DPPH[•].



Fonte: Arquivo pessoal.

5.2.4 Avaliação da capacidade antioxidante da agatisflavona por *scavenging* do radical ABTS^{•+}

Para este teste, foi seguida a metodologia descrita por Re et al. (1999) e adaptada por Freitas et al. (2014) e Machado et al. (2015). Inicialmente, os cátions de ABTS^{•+} radical foi gerado pela reação de 5 mL de uma solução de 7 mM de ABTS com 88 µl de persulfato de

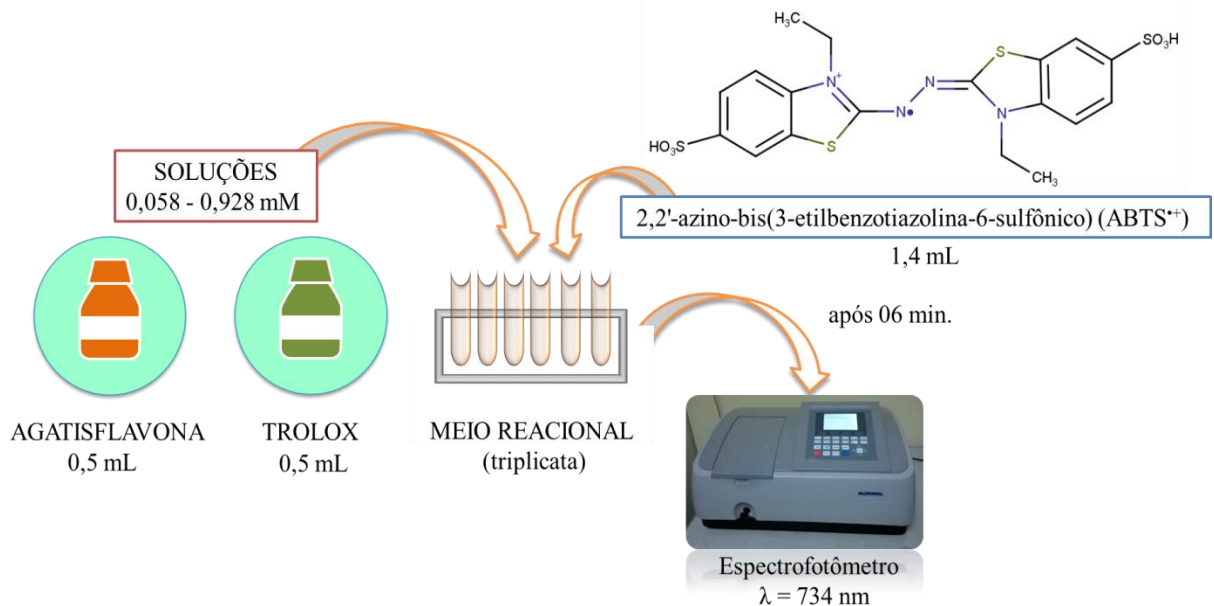
potássio 2,45 mM ($K_2S_2O_8$). A mistura reacional foi incubada à temperatura ambiente e na ausência de luz durante 16 horas. Após este tempo, diluiu-se a solução $ABTS^{•+}$ em etanol para obter uma solução com uma absorvância de 1,00 ($\pm 0,05$) a 734 nm (**Figura 11**).

Em um local escuro e à temperatura ambiente, uma mistura de reacional contendo 0,5mL de agatisflavona (0,058, 0,116, 0,232, 0,464 e 0,928 mM) e 1,96 mL de radical $ABTS^{•+}$ foi preparada. Os procedimentos experimentais foram efetuados em triplicata, registrando-se as leituras de absorvância após 6 minutos em um espectrofotômetro ($\lambda = 734$ nm) (**Figura 11**). Os resultados foram expressos como uma porcentagem de inibição do radical $ABTS^{•+}$ pela seguinte equação:

$$\% \text{ de inibição do radical } ABTS^{•+} = \{(Abs_{\text{controle}} - Abs_{\text{mistura reacional}}) \times 100\} / A_{\text{controle}}$$

Na qual Abs_{controle} é a absorvância do radical $ABTS^{•+}$ sem a amostra (agatisflavona) e $Abs_{\text{mistura reacional}}$ é a absorvância da mistura da agatisflavona (0,058 - 0,928 mM) com o radical $ABTS^{•+}$ no tempo de 6 minutos. A concentração eficaz (CE_{50}) de agatisflavona necessária para inibir 50% de radicais $ABTS^{•+}$ a 734 nm foi determinada. O mesmo procedimento experimental foi utilizado com o controle positivo Trolox (0,058 - 0,928 mM).

Figura 11: Reação antioxidante da agatisflavona por *scavenging* do radical $ABTS^{•+}$.



Fonte: Arquivo pessoal.

5.2.5 Avaliação da capacidade antioxidante da agatisflavona por *scavenging* do radical hidroxila (OH^{\bullet})

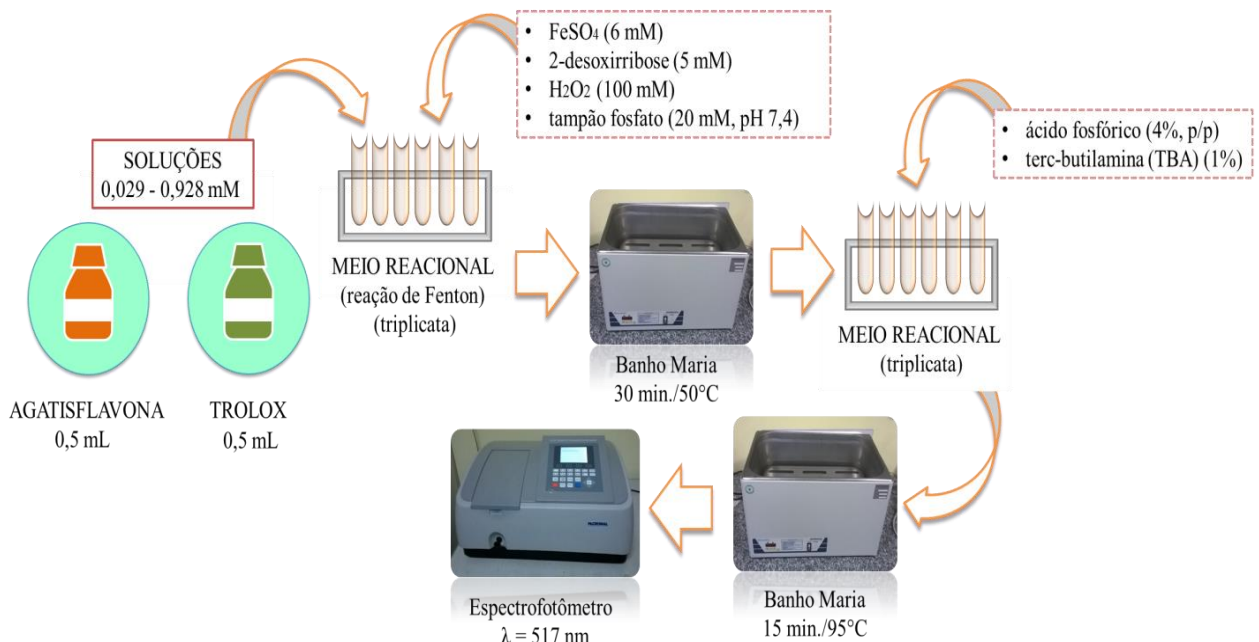
Para a avaliação da capacidade antioxidante contra o radical hidroxila gerado pela reação de Fenton, foi utilizada a metodologia descrita por Lopes; Schulman; Hermes-Lima (1999) adaptada por Machado et al. (2015). Para isto, foram empregadas diferentes concentrações da agatisflavona (0,058, 0,116, 0,232, 0,464 e 0,928 mM) adicionadas ao meio reacional (reação de Fenton) contendo sulfato de ferro II (FeSO_4) (6 mM), 2-desoxirribose (5 mM), H_2O_2 (100 mM) e tampão fosfato (20 mM, pH 7,4) (**Figura 12**).

A mistura foi deixada a reagir durante 30 minutos à temperatura ambiente e foi terminada pela adição de ácido fosfórico (4%, p/p), seguido de 1% de terc-butilamina (TBA) (solução aquosa a 50 mM, NaOH). Posteriormente, a mistura reacional foi aquecida a 95°C durante 15 minutos, deixando arrefecer em seguida (**Figura 12**). Os resultados foram expressos como percentagem de degradação de 2-desoxirribose pela seguinte equação:

$$\% \text{ de inibição da degradação 2-desoxirribose} = \{(\text{Abs}_{\text{controle}} - \text{Abs}_{\text{mistura reacional}}) \times 100 / \text{Abs}_{\text{controle}}\}$$

Na qual $\text{Abs}_{\text{controle}}$ corresponde a radical hidroxila sem agatisflavona e $\text{Abs}_{\text{mistura reacional}}$ a absorvância inicial contendo as concentrações de agatisflavona (0,058 - 0,928 mM). A concentração eficaz (EC_{50}) de agatisflavona necessária para inibir 50% da degradação de 2-desoxirribose a 517 nm foi determinada. O mesmo procedimento experimental foi utilizado com o controle positivo Trolox (0,058 - 0,928 mM) (**Figura 12**).

Figura 12: Reação antioxidante da agatisflavona por *scavenging* do radical OH^\cdot .



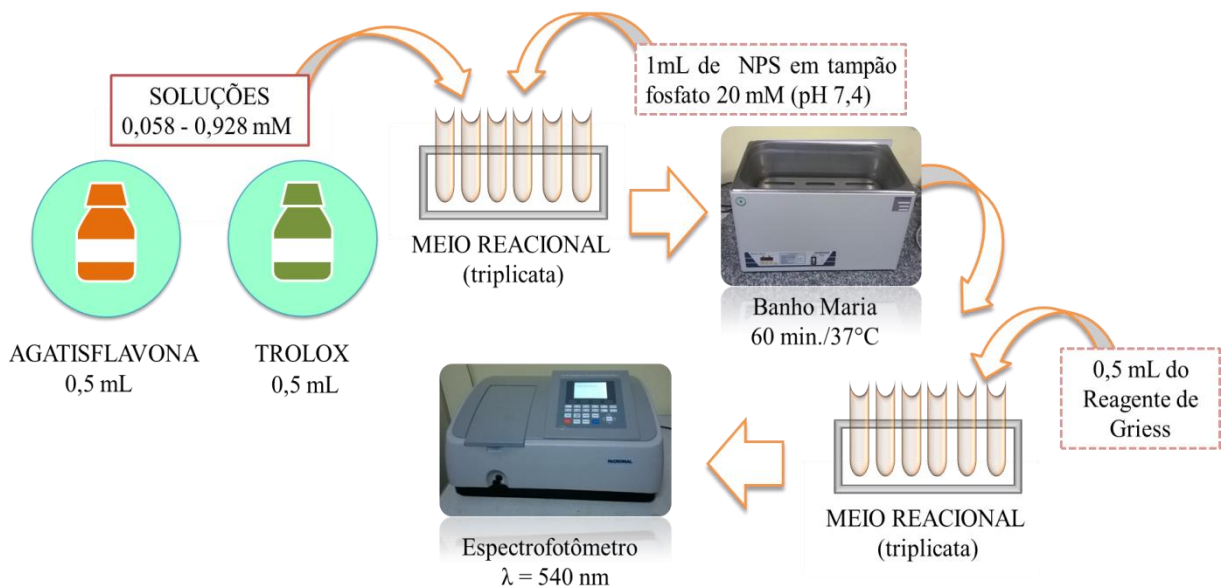
Fonte: Arquivo pessoal.

5.2.6 Avaliação da capacidade antioxidante da agatisflavona por *scavenging* óxido nítrico (NO)

Nesta avaliação, o NO foi produzido a partir da decomposição espontânea de nitroprussiato de sódio (NPS) em tampão fosfato 20 mM (pH 7,4). Uma vez gerado, o NO interage com o O₂ para produzir íons nitrito, os quais foram medidos por meio da reação de Griess de acordo com o método de Basu; Hazra (2006) adaptado por Li (2012). A mistura reacional contendo 1 mL de NPS em tampão de fosfato a 20 mM e 0,5 mL de agatisflavona (0,058, 0,116, 0,232, 0,464 e 0,928 mM) foi incubada a 37 °C durante 1 hora (**Figura 13**).

Uma alíquota de 0,5 mL foi retirada e homogeneizada com 0,5 mL de reagente de Griess. A absorbância do cromóforo foi medida a 540 nm num espectrofotômetro e os resultados foram expressos como percentagem de inibição de íons nitrito. A concentração eficaz (CE₅₀) do composto requerido para 50% de inibição de óxido nítrico a 540 nm foi determinada. O mesmo procedimento experimental foi utilizado com o controle positivo Trolox (0,058 - 0,928 mM) (**Figura 13**).

Figura 13: Reação antioxidante da agatisflavona por *scavenging* do NO.



Fonte: Arquivo pessoal.

5.2.7 Avaliação da capacidade antioxidante da agatisflavona por inibição da peroxidação lipídica

O método TBARS (substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico), descrito por Guimarães e colaboradores (2010), foi empregado para a avaliação da capacidade antioxidante pela inibição da peroxidação lipídica. De forma resumida, uma alíquota de 0,5

mL de homogenato de gema de ovo (5% p/v em tampão fosfato 50 mM, pH 7,4) foi misturado com 0,5 mL de agatisflavona em várias concentrações (0,058 - 0,928 mM) (**Figura 14**).

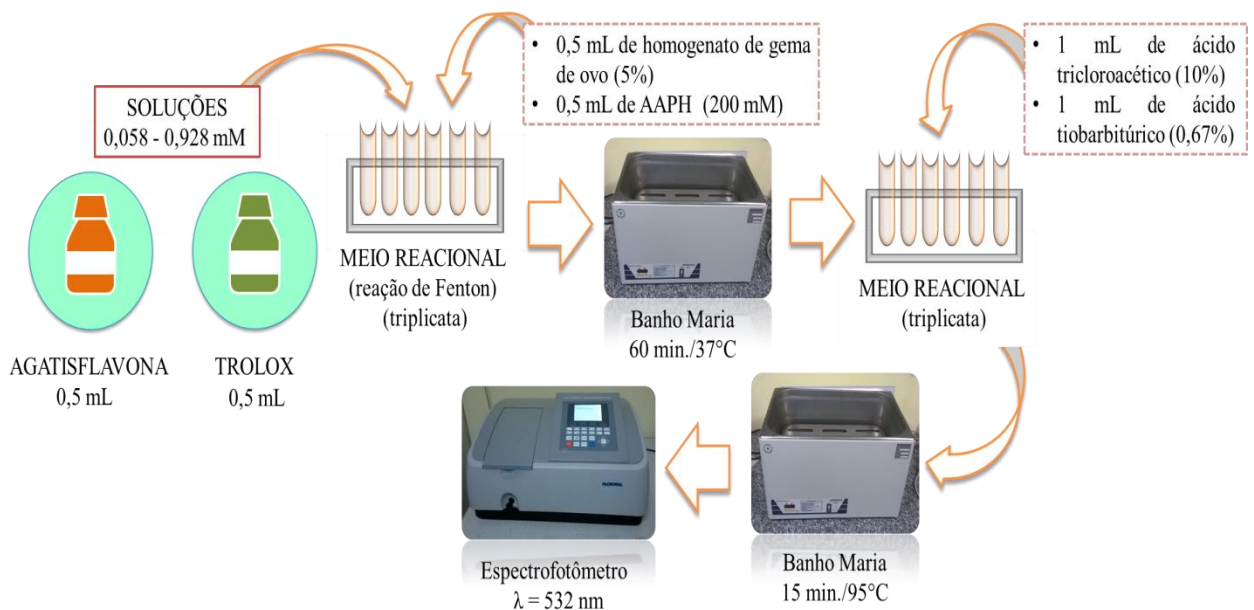
A peroxidação lipídica foi induzida pela adição de 0,5 mL de 2,2'-azobis-2-amidinopropano-dicloridrato (AAPH, 200 mM) durante 60 min a 37 °C. Em seguida, foram adicionados 1 mL de ácido tricloroacético (10%) e 1 mL de ácido tiobarbitúrico (0,67%) aquecendo o sistema a 97°C durante 15 min. Transcorrido esse tempo, a mistura reacional foi centrifugada e a absorbância do sobrenadante medida a 532 nm (**Figura 14**).

A extensão da peroxidação lipídica foi estimada por níveis de TBARS formado e os resultados foram expressos como percentagem de inibição da peroxidação lipídica:

$$\% \text{ de inibição} = \{(Abs_{\text{controle}} - Abs_{\text{mistura reacional}}) \times 100 / Abs_{\text{controle}}\}$$

Em que a Abs_{controle} corresponde a absorvância da peroxidação lipídica induzida por APPH sem agatisflavona (100% de nível de TBARS) e $Abs_{\text{mistura reacional}}$ a absorvância inicial contendo as concentrações de agatisflavona (0,058 - 0,928 mM). A concentração eficaz (CE_{50}) necessária para inibir 50% da formação de TBARS em 532 nm foi determinada. O mesmo procedimento experimental foi utilizado com o controle positivo Trolox (0,058 - 0,928 mM) (**Figura 14**).

Figura 14: Reação antioxidante da agatisflavona por inibição da peroxidação lipídica.

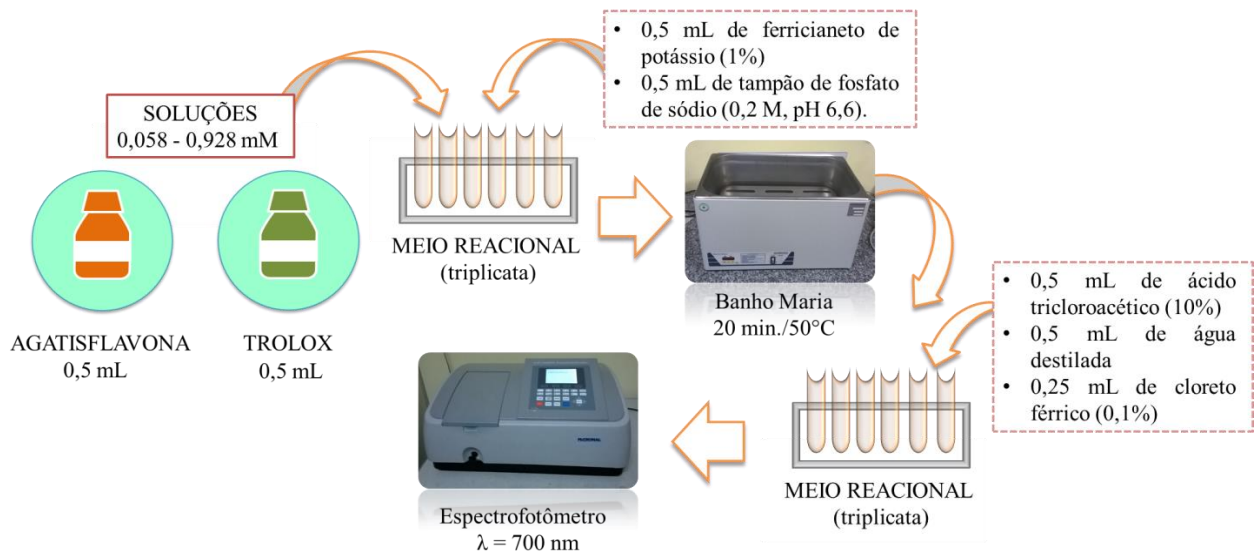


Fonte: Arquivo pessoal.

5.2.8 Avaliação da capacidade antioxidante da agatisflavona por potencial redutor

Para a determinação da potencial redutor da agatisflavona, a metodologia descrita por Singhal, Paul e Singh (2014) foi utilizada com modificações. Inicialmente, uma mistura de reação contendo 0,5 mL da agatisflavona em várias concentrações (0,058, 0,116, 0,232, 0,464 e 0,928 mM), 0,5 mL de ferricianeto de potássio a 1% e 0,5 mL de tampão de fosfato de sódio (0,2 M, pH 6,6) foi preparada. Em seguida, o meio reacional foi incubado a 50°C por 20 min, seguido pela adição de 0,5 mL de ácido tricloroacético (10%), 0,5 mL de água destilada e 0,25 mL de cloreto férrico (0,1%). A absorbância da mistura reacional foi medida a 700 nm contra o branco que continha apenas tampão fosfato. A concentração de agatisflavona, que prevê um aumento de 0,5 de absorção (CE_{50}), foi determinada. O mesmo procedimento experimental foi utilizado com o controle positivo Trolox (0,058 - 0,928 mM) (Figura 15).

Figura 15: Reação antioxidante da agatisflavona por potencial redutor.



Fonte: Arquivo pessoal.

5.2.9 Análises estatísticas

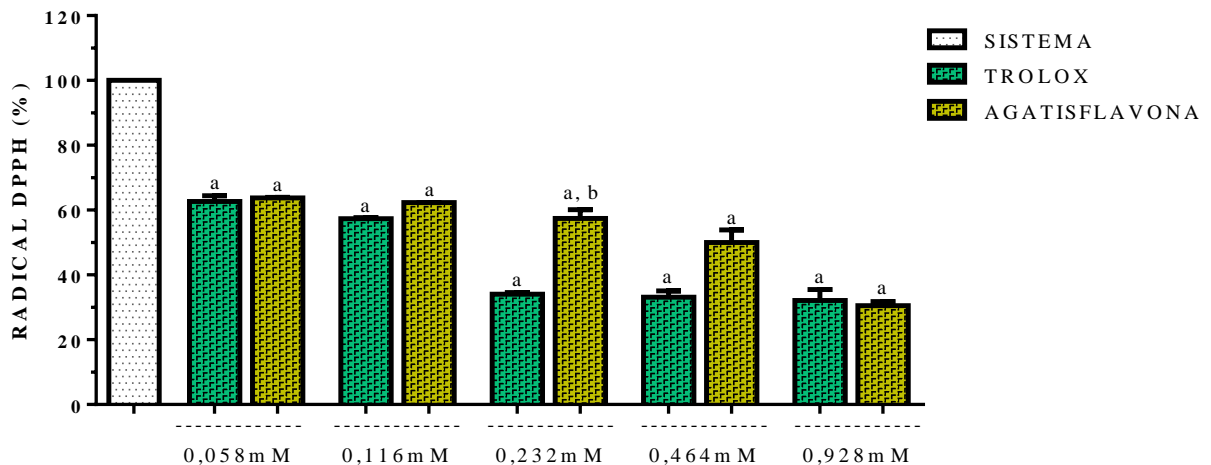
Todos os resultados foram apresentados como a média \pm erro padrão da média (E.P.M.). A análise estatística foi realizada utilizando ANOVA seguida pelo teste de *Student Newman-Keuls* como teste *post hoc*. Os resultados foram considerados estatisticamente significativos quando $p < 0,05$. Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando o *GraphPad Prism*® 6.0 (San Diego, CA, EUA). A CE_{50} da agatisflavona e do Trolox, em cada testes realizado, foi determinada por análise de *Probit* através do *software GraphPad Prism*®, versão 6.0, com 95 % de intervalo de confiança.

5.3 Resultados

5.3.1 Capacidade antioxidante por *scavenging* do radical DPPH^{*}

A propriedade antioxidante da agatisflavona nas concentrações 0,058, 0,116, 0,232, 0,464 e 0,928 mM, em remover o radical DPPH^{*} foram respectivamente 63,74±0,2, 62,32±0,04, 57,46±2,66, 50,02±3,9 e 30,49±1,29%, o que demonstra uma redução significativa ($p < 0,05$) do radical DPPH^{*} em relação ao sistema (100% de DPPH^{*}) (**Figura 16**). O Trolox, em iguais concentrações da agatisflavona (0,058 - 0,928 mM), também reduziu de modo significativo ($p < 0,05$) a porcentagem de radical DPPH^{*} em relação ao sistema, sendo que suas médias e E.P.M. corresponderam a 62,68±1,73, 57,31±0,38, 34,08±0,49, 33,11±1,92 e 32,13±3,36%, respectivamente (**Figura 16**). Ambos compostos demonstraram concentração dependência.

Figura 16: Capacidade antioxidante da agatisflavona em diferentes concentrações sobre o radical DPPH^{*}.



Legenda: Os valores representam a média ± E.P.M. dos resultados de inibição *in vitro*, $n = 3$, dos experimentos realizados em triplicata. ^a $p < 0,05$ quando comparado ao sistema (100% de radical DPPH^{*}). ^b $p < 0,05$ quando comparado ao Trolox (padrão antioxidante; 0,058 mM a 0,928 mM) (ANOVA e teste de *Student Newman-Keuls* como teste *post hoc*).

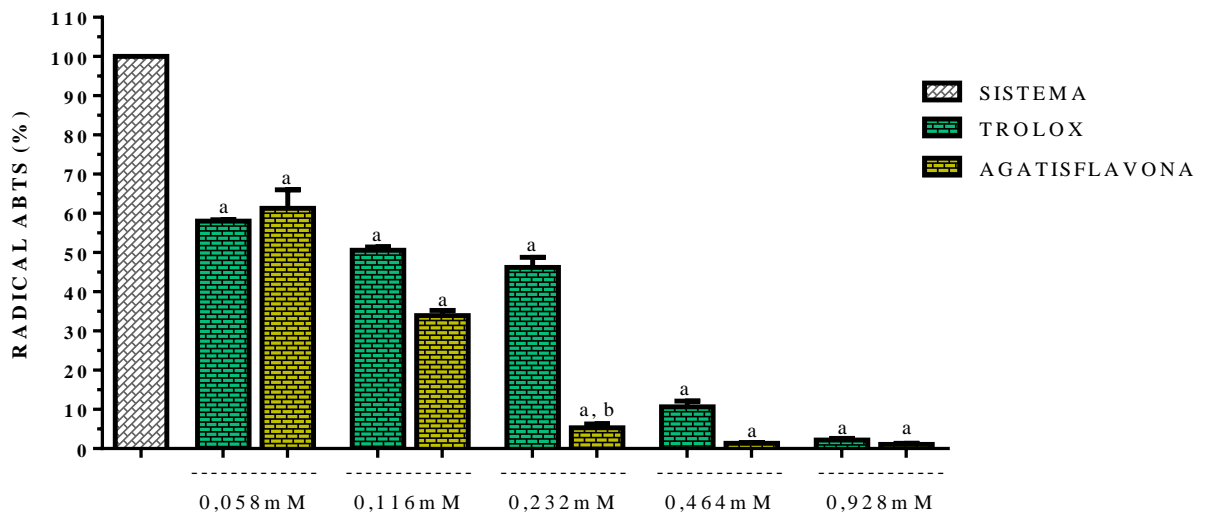
Ao comparar os resultados da agatisflavona (0,058 - 0,928 mM) com o Trolox (0,058 - 0,928 mM) a capacidade de eliminar radicais DPPH^{*} do biflavonoide e do padrão utilizado foram semelhantes ($p > 0,05$), exceto na média da concentração 0,232 mM, uma vez que o Trolox diminuiu a quantidade de radical DPPH^{*} de modo significativo que a agatisflavona ($p < 0,05$) (**Figura 16**). O valor da concentração da agatisflavona capaz de eliminar 50% (CE₅₀)

do radical DPPH[•] foi de 0,474 mM variando de 0,399 para 0,564 mM e do padrão antioxidante foi de 0,149 mM variando de 0,129 para 0,173 mM, com o intervalos de confiança de 95%.

5.3.2 Capacidade antioxidante por *scavenging* do radical ABTS^{•+}

Os resultados correspondentes à ação antioxidante da agatisflavona, em distintas concentrações, contra radical ABTS^{•+} estão expostos na **Figura 17**. Nas concentrações 0,058, 0,116, 0,232, 0,464 e 0,928 mM, o biflavonoide agatisflavona diminuiu significativamente ($p < 0,05$) a porcentagem de radical ABTS^{•+} em relação ao sistema (100% de ABTS^{•+}) com médias e E.P.M. de 61,29±4,74, 33,96±1,29, 5,3±0,98, 1,32±0,25 e 1,07±0,29%, respectivamente. O Trolox, em iguais concentrações as da agatisflavona (0,058 - 0,928 mM), também reduziu de modo significativo ($p < 0,05$) os níveis de radical ABTS^{•+} em relação ao sistema, sendo 57,99±0,41, 50,60±0,81, 46,19±2,6, 10,69±1,45 e 2,2±0,38%, simultaneamente (**Figura 17**).

Figura 17: Capacidade antioxidante da agatisflavona em diferentes concentrações sobre o radical ABTS^{•+}.



Legenda: Os valores representam a média ± E.P.M. dos resultados de inibição *in vitro*, $n = 3$, dos experimentos realizados em triplicata. ^a $p < 0,05$ quando comparado ao sistema (100% de radical ABTS^{•+}). ^b $p < 0,05$ quando comparado ao Trolox (padrão antioxidante; 0,058 mM a 0,928 mM) (ANOVA e teste de *Student Newman-Keuls* como teste *post hoc*).

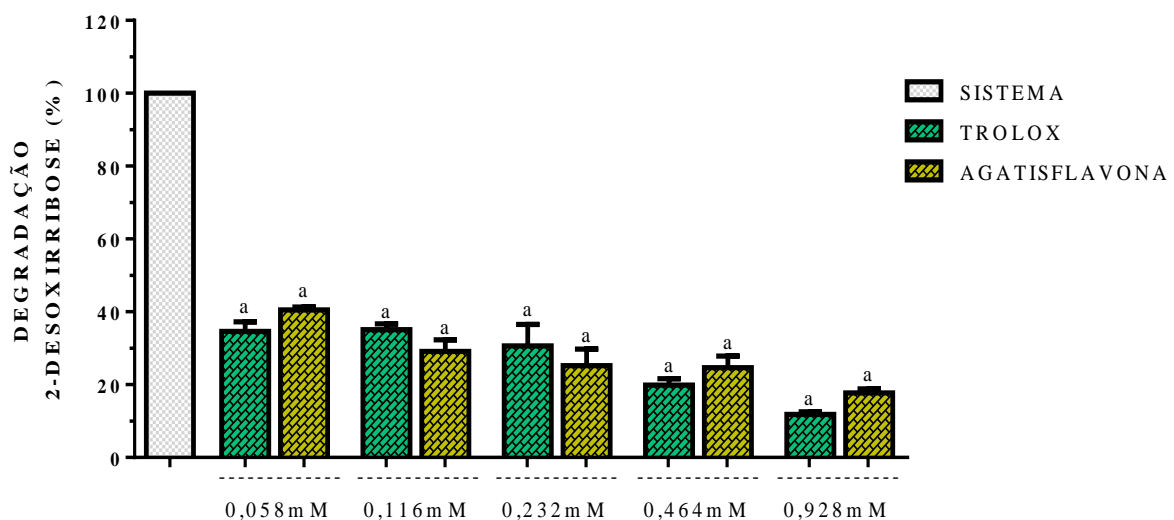
Como demonstrado na **Figura 17**, as propriedades antioxidante da agatisflavona e do Trolox contra radical ABTS^{•+} foram proporcionais ao aumento da concentração. Em iguais

concentrações (0,058 - 0,928mM), a capacidade redutora de radical ABTS⁺ do biflavonoide estudado foi semelhante ($p > 0,05$) a do controle positivo (Trolox), exceto na concentração 0,232 mM, onde a agatisflavona reduziu de modo mais significativo ($p < 0,05$) a quantidade de radical ABTS⁺ em relação ao padrão antioxidante (**Figura 17**). De acordo com os resultados, o valor da concentração da agatisflavona capaz de eliminar 50% (CE₅₀) do radical ABTS⁺ foi de 0,179 mM variando de 0,137 para 0,234 mM e do Trolox foi de 0,311 variando de 0,283 para 0,341 mM, com o intervalos de confiança de 95%.

5.3.3 Capacidade antioxidante por *scavenging* do radical OH[•]

Como exposto na **Figura 18**, o biflavonoide agatisflavona e o controle positivo (Trolox) inibiram a degradação da 2-desoxirribose por meio da eliminação significativa ($p < 0,05$) do radical OH[•] quando comparado ao sistema (100% de degradação da 2-desoxirribose). Nas concentrações 0,058, 0,116, 0,232, 0,464 e 0,928 mM, a capacidade antioxidante contra radical OH[•] da agatisflavona e do Trolox medido apresentaram médias \pm E.P.M. de 40,50 \pm 0,84, 29,09 \pm 3,2, 25,25 \pm 4,51, 24,69 \pm 3,17 e 17,69 \pm 1,19% (agatisflavona, 0,058 a 0,928 mM) e 34,62 \pm 2,6, 35,11 \pm 1,61, 30,68 \pm 5,83, 19,90 \pm 1,74 e 11,85 \pm 0,7% (Trolox, 0,058 a 0,928 mM), respectivamente. Ambos compostos demonstraram concentração dependência.

Figura 18: Capacidade antioxidante da agatisflavona em diferentes concentrações na inibição da degradação da 2-desoxirribose por remoção de radical OH[•].



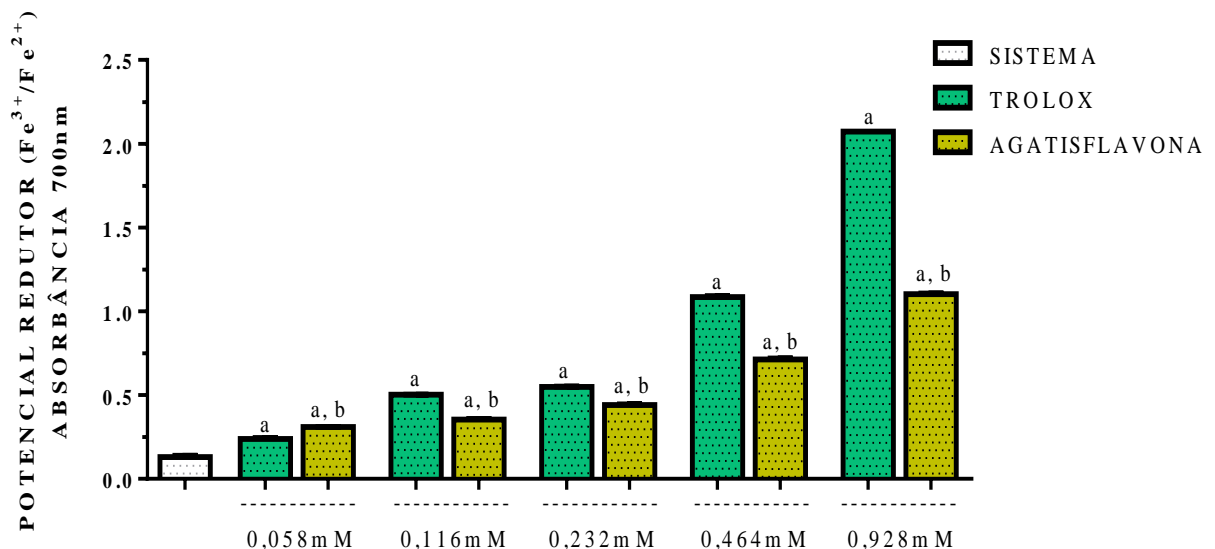
Legenda: Os valores representam a média \pm E.P.M. dos resultados da degradação da 2-desoxirribose, *in vitro*, $n = 3$, dos experimentos realizados em triplicata. Padrão antioxidante: Trolox (0,058 mM a 0,928 mM). ^a $p < 0,05$ quando comparado ao sistema (100% de radical OH[•]) (ANOVA e teste de *Student Newman-Keuls* como teste *post hoc*).

A agatisflavona inibiu a degradação 2-desoxirribose por remoção de radical OH^\bullet de modo semelhante ($p > 0,05$) ao padrão antioxidante (Trolox) em iguais concentrações (0,058 - 0,928 mM) (**Figura 18**). Conforme os dados encontrados, o valor da concentração da agatisflavona capaz de eliminar 50% (CE_{50}) do radical OH^\bullet foi de 0,163 mM variando de 0,101 para 0,263 mM e do controle positivo foi de 0,372 variando de 0,280 para 0,496 mM, com o intervalos de confiança de 95%.

5.3.4 Capacidade antioxidante pelo potencial redutor

O potencial redutor da agatisflavona, em diferentes concentrações, está representado na **Figura 19**. O aumento da absorbância a 700 nm nas concentrações 0,058, 0,116, 0,232, 0,464 e 0,928 mM evidencia a capacidade antioxidante da agatisflavona. Foi constatado que ocorreu um aumento significativo ($p < 0,05$) da absorbância a 700 nm nos grupos contendo crescentes concentrações (0,058 - 0,928 mM) de agatisflavona ($0,3087 \pm 0,0006$, $0,3537 \pm 0,0046$, $0,4407 \pm 0,0038$, $0,7130 \pm 0,0051$ e $1,103 \pm 0,0029$) e Trolox ($0,2390 \pm 0,005$, $0,5020 \pm 0,0005$, $0,5483 \pm 0,0031$, $1,085 \pm 0,0066$ e $2,073 \pm 0,0$), quando comparado ao sistema ($0,1293 \pm 0,0052$) (**Figura 19**). Ambos compostos demonstraram concentração dependência.

Figura 19: Potencial redutor ($\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}$) da agatisflavona em diferentes concentrações.



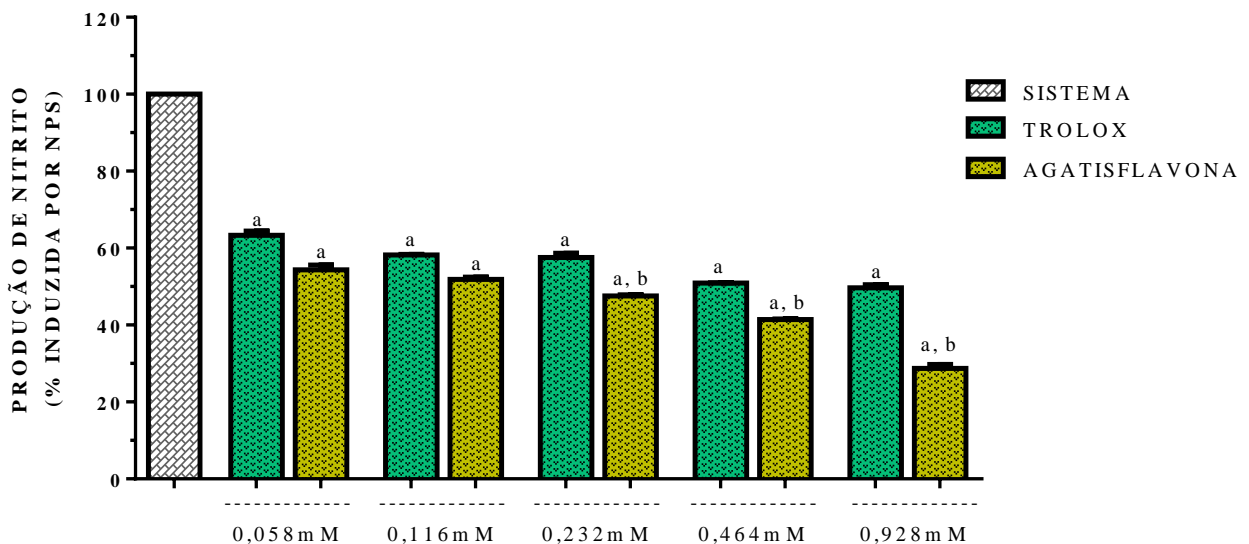
Legenda: Os valores representam a média \pm E.P.M. dos resultados de inibição *in vitro*, $n = 3$, dos experimentos realizados em triplicata. ^a $p < 0,05$ quando comparado ao sistema (sem agatisflavona e trolox). ^b $p < 0,05$ quando comparado ao Trolox (padrão antioxidante; 0,058 mM a 0,928 mM) (ANOVA e teste de *Student Newman-Keuls* como teste *post hoc*).

O capacidade da agatisflavona em reduzir o ferricianeto de potássio (cor amarelo) para formar ferrocianeto de potássio (cor verde) (redução do Fe^{3+} em Fe^{2+}) foi estatisticamente inferior ($p < 0,05$) ao antioxidante padrão, exceto na menor concentração (0,058 mM), onde o Trolox, reduziu o Fe^{3+} em Fe^{2+} de forma menos significativa (**Figura 19**).

5.3.5 Capacidade antioxidante por *scavenging* do NO

Os resultados correspondentes à inibição de NO (formação de íons nitrito) devido à ação antioxidante da agatisflavona estão apresentados na **Figura 20**. A porcentagem de íons nitrito produzidos pela decomposição espontânea do NPS na presença da agatisflavona nas seguintes concentrações 0,058, 0,116, 0,232, 0,464 e 0,928 mM foi, respectivamente, $54,36 \pm 1,2$, $51,89 \pm 0,55$, $47,54 \pm 0,27$, $41,42 \pm 0,17$ e $28,74 \pm 1,02\%$, evidenciando uma significativa redução ($^a p < 0,05$) da produção de íons nitrito quando confrontada ao sistema (100% de indução da produção de íons nitrito por NPS).

Figura 20: Capacidade antioxidante da agatisflavona em diferentes concentrações sobre a formação a geração de íons nitrito.



Legenda: Os valores representam a média \pm E.P.M. dos resultados de inibição *in vitro*, $n = 3$, dos experimentos realizados em triplicata. $^a p < 0,05$ quando comparado ao sistema (100% de íons nitrito). $^b p < 0,05$ quando comparado ao Trolox (padrão antioxidante; 0,058 mM a 0,928 mM) (ANOVA e teste de *Student Newman-Keuls* como teste *post hoc*).

O Trolox (0,058 - 0,928mM) também reduziu de modo significativo ($p < 0,05$), a concentração de íons nitrito ($63,30 \pm 1,11$, $58,24 \pm 0,1$, $57,56 \pm 1,11$, $50,88 \pm 0,07$ e $49,64 \pm 0,82\%$) (**Figura 20**) e ambos compostos demonstraram concentração dependência. Entretanto, foi

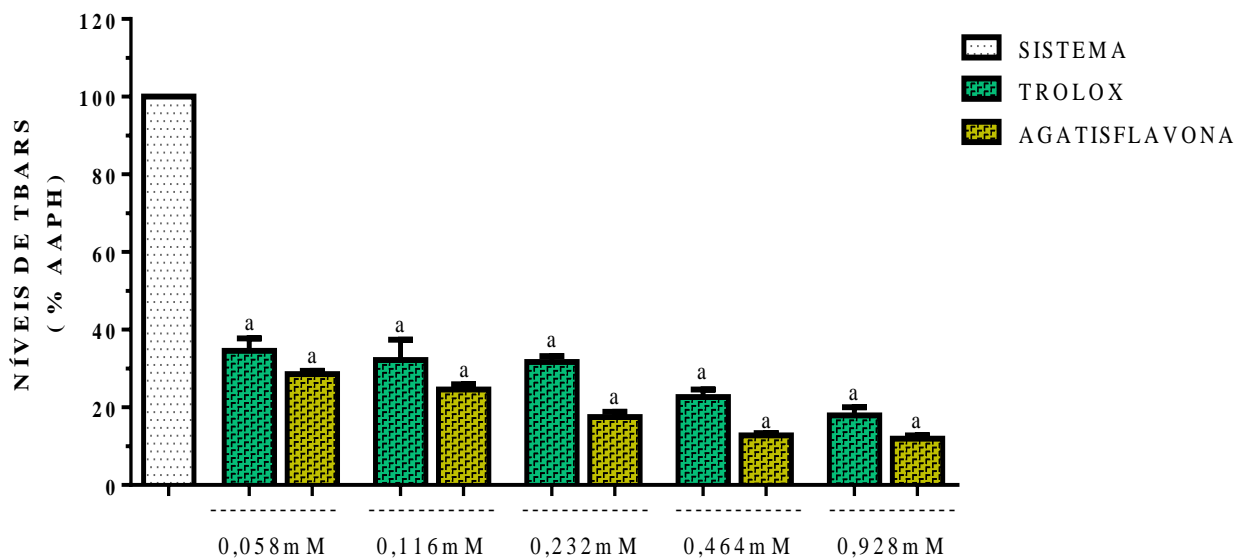
observado que a capacidade da agatisflavona em inibir a produção de íons nitrito pela decomposição espontânea do NPS foi semelhante ($p > 0,05$) a do Trolox nas menores concentrações 0,058 e 0,116 e nas maiores concentrações (0,232, 0,464 e 0,928 mM) a agatisflavona evidenciou ser estatisticamente ($p < 0,05$) mais potente e eficaz em reduzir a quantidade de íons nitrito produzidos do que o padrão antioxidante (**Figura 20**).

A CE_{50} da agatisflavona necessária para impedir a produção de íons nitrito pela decomposição espontânea do NPS foi de 0,209 mM variando de 0,162 para 0,2682 mM e do padrão antioxidante (Trolox) foi de 0,456 mM variando de 0,415 para 0,493 mM, com o intervalos de confiança de 95%.

5.3.6 Capacidade antioxidante por inibição da peroxidação lipídica

A atividade antioxidante do biflavonoide agatisflavona em impedir a peroxidação lipídica por meio da diminuição dos níveis de TBARS em diferentes concentrações é apresentada na **Figura 21**. Os valores da porcentagem de redução dos níveis de TBARS devido a ação da agatisflavona nas concentrações de 0,058, 0,116, 0,232, 0,464 e 0,928 mM, foram $28,58 \pm 0,85$, $24,57 \pm 1,37$, $17,50 \pm 1,34$, $12,75 \pm 0,63$ e $11,94 \pm 0,88$, respectivamente.

Figura 21: Capacidade antioxidante da agatisflavona em diferentes concentrações por redução dos níveis de TBARS.



Legenda: Os valores representam a média \pm E.P.M. dos resultados de inibição *in vitro*, $n = 3$, dos experimentos realizados em triplicata. ^a $p < 0,05$ quando comparado ao sistema (100% de níveis de TBARS). ^b $p < 0,05$ quando comparado ao Trolox (padrão antioxidante; 0,058 mM a 0,928 mM) (ANOVA e teste de *Student Newman-Keuls* como teste *post hoc*).

A agatisflavona aumentou significativamente ($p < 0,05$) a inibição da peroxidação lipídica em decorrência do decaimento dos níveis de TBARS gerados pela presença do AAPH. O Trolox (0,058 - 0,928 mM) também diminuiu significativamente ($p < 0,05$) os níveis de TBARS induzidos pelo AAPH, apresentando uma porcentagem de redução de TBARS de $34,57 \pm 3,2$, $32,22 \pm 5,16$, $31,70 \pm 1,47$, $22,67 \pm 1,95$ e $17,94 \pm 2,08$, respectivamente (**Figura 21**).

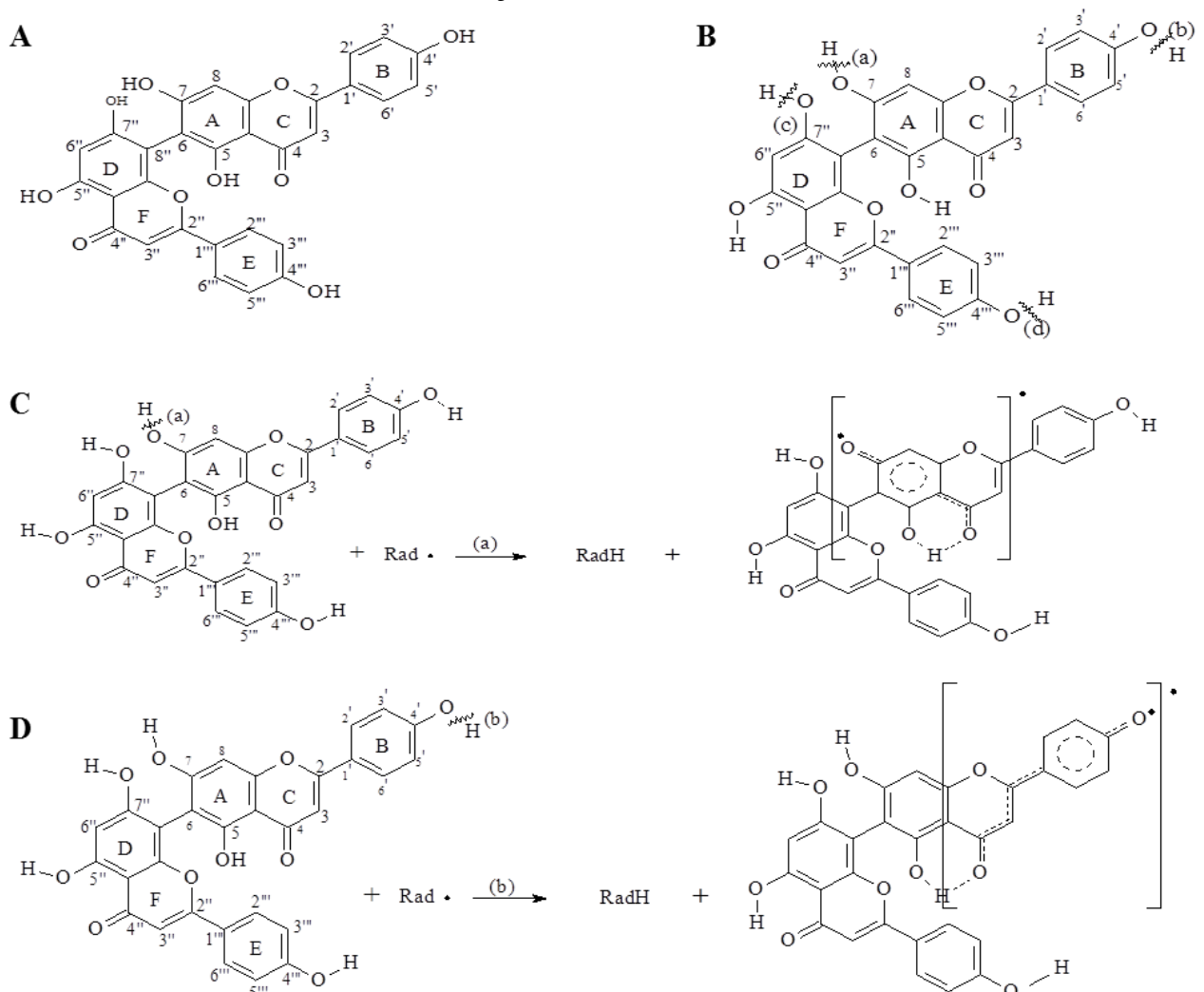
Ambos os compostos demonstraram concentração dependência e a propriedade inibitória da peroxidação lipídica, *in vitro*, da agatisflavona foi semelhante ($p > 0,05$) a do padrão antioxidante, em iguais concentrações (0,058 - 0,928 mM) (**Figura 21**). De acordo com resultados encontrados, foi constatado que a CE_{50} da agatisflavona capaz de diminuir os níveis de TBARS foi de 0,179 mM variando 0,154 para 0,208 mM e do Trolox foi de 0,352 mM variando de 0,233 para 0,530 mM, com o intervalos de confiança de 95%

5.4 Discussão

Como relatado anteriormente, poucos trabalhos descrevem a capacidade antioxidante do biflavonoide agatisflavona. Esta pesquisa contribui para o aumento do conhecimento sobre as propriedades antioxidantes *in vitro* da agatisflavona, um biflavonoide que, com base nos resultados alcançados, demonstrou ser um composto antioxidante.

De acordo com a **Figura 22**, a agatisflavona (**Figura 22A**) possui 4 hidroxilas: 4' – OH, 7 – OH, 7'' – OH e 4''' – OH (**Figura 22B**) que potencialmente doam H[•] (hidrogênio radicalar) para reduzir os radicais gerados nos meios reacionais testados, formando, assim, radicais estabilizados na biflavona por conjugação. Apenas as duas hidroxilas (5'' – OH e 5 – OH) queladas com os oxigênios das carbonilas (C – 4'' e C- 4) não são potencialmente doadoras de H[•].

Figura 22: Propostas de mecanismos de atividade antioxidante da agatisflavona por doação de H[•] e elétrons.



Fonte: Arquivo pessoal.

A formação de radicais estabilizados pode ocorrer pelas clivagens nas posições (a), (b), (c) e (d) (**Figura 22B**), sendo que a clivagem em (a) gera um radical estabilizado pela deslocalização do elétron do oxigênio ligado ao C-7 do anel (A) até a carbonila do C-4 do anel (C) (**Figura 22C**). Na clivagem na posição (b), ocorre deslocalização do elétron do oxigênio ligado ao C-4' pelo anel (B) até a carbonila C-4 no anel (C) (**Figura 22D**). O mesmo acontece com as clivagens (c) e (d) das hidroxilas ligadas nas posições 7'' e 4''' respectivamente.

Resultados de diversas investigações sobre a capacidade de substâncias (isoladas ou presentes em extratos vegetais) em reduzir radicais DPPH[•] e/ou ABTS^{•+}, OH[•] e óxido nítrico, bem como sua habilidade em inibir a peroxidação lipídica pelo método TBARS e seu potencial redutor, *in vitro*, evidenciam que um grande número de compostos flavonoides com elevada propriedade antioxidante possuem mecanismos de ação semelhantes ao da agatisflavona, proposto por este estudo (SAXENA et al., 2010; TAN et al., 2016).

Dentre as técnicas que mensuram a capacidade de eliminação de radicais, os métodos que envolvem a remoção do radical DPPH[•] e ABTS^{•+} são os mais amplamente utilizados na avaliação da capacidade antioxidante de diversas substâncias. Isto se deve a sua rapidez, sensibilidade, simplicidade e facilidade de execução de cada teste e, ambos os métodos, baseiam-se na redução ou perda da absorvância da solução alcoólica de DPPH[•] e ABTS^{•+} (KEDARE; SINGH, 2011; MUSA; ABDULLAH; AL-HAIQI, 2016).

Ao relacionar os resultados do teste radical DPPH[•] (CE₅₀ = 0,895 mM) com ensaio radical ABTS^{•+} (CE₅₀ = 0,123 mM) é possível observar um melhor potencial antioxidante da agatisflavona contra radical ABTS^{•+}. Assim, é possível sugerir que o mecanismo de ação antioxidante do biflavonoide agatisflavona ocorre principalmente pela doação de elétrons, relacionada na literatura a redução da formação de radical ABTS^{•+}, o que permitiu a formação de radical ABTS^{•+}, além da transferência de átomos de hidrogênio (**Figura 22**), que possibilitou a formação de uma molécula estável de DPPH-H não radicalar (GULCIN et al., 2010; MUSA et al., 2013).

Os resultados obtidos neste estudo assemelham-se aos encontrados por Ye et al. (2012), em que o biflavonoide (não identificado) presente no extrato metanólico das conchas da *Camellia oleifera* Abel, e com estrutura química semelhante a da agatisflavona, apresentou atividade de eliminação de radicais DPPH[•] e ABTS^{•+}, porém com melhor potencial antioxidante contra radical ABTS^{•+}, devido ao grande número de hidroxilas em sua estrutura polifenólica.

Ajileye e colobaradores (2015) isolaram, a partir do extrato da folha *Anacardium occidentale* L., compostos flavonoides e após caracterização por métodos espectroscópicos identificaram a agatisflavona. Em um segundo momento, os autores determinaram a capacidade antioxidante dos compostos isolados por meio do ensaio do radical DPPH[•]. O valor da CE₅₀ constatado no trabalho de Ajileye e colobaradores (2015) foi igual a 366,37±32,59 µg/mL o que equivale a 0,679±0,06 mM. Este valor foi superior ao encontrado no presente trabalho. Essa diferença provavelmente se deve a variação de concentração de radical DPPH[•] no meio testado nos estudos. Entretanto, ambas as investigações comprovam a relevante propriedade antioxidante *in vitro* da agatisflavona, uma vez que os valores da CE₅₀ da agatisflavona estão próximos a CE₅₀ encontrado nos grupos contendo os padrões antioxidantes utilizados em cada experimento.

Freitas et al. (2014) e Machado et al. (2015) relatam que os compostos que apresentam grande quantidade de grupos hidroxilas (livres) em sua estrutura química possuem maior potencial redutor. No trabalho de Gontijo e colaboradores (2012) a atividade antioxidante de biflavonoides naturais (morelloflavona-4000-O-b-D-glicosil, fukugisida e morelloflavona) isolados a partir do extrato de acetato de etila dos frutos secos da planta *Garcinia brasiliensis*, foi realizada por meios de ensaios *in vitro*, dentre eles o teste do potencial redutor.

Assim como o composto avaliado neste estudo, os biflavonoides isolados por Gontijo e colaboradores (2012) mostraram potencial redutor, afirmação esta evidenciada pelo aumento dos valores de absorbância a 700 nm após a adição de cloreto de ferro III (concentração dependência). Esta mudança de coloração ocorre devido a um processo de eletrotransferência, que serve como um indicador importante da capacidade antioxidante de diferentes compostos, o que corrobora com os resultados encontrados no ensaio com radical ABTS^{•+} desta investigação, fortalecendo, assim, a hipótese de que o mecanismo de ação antioxidante da agatisflavona é principalmente pela doação de elétrons.

O radical OH[•] é um potente agente oxidante e a sua presença no meio testado promoveu a degradação da 2-desoxirribose. A agatisflavona, nas concentrações 0,058, 0,116, 0,232, 0,464 e 0,928 mM, reagiu com o radical OH[•], diminuindo a velocidade de degradação do monossacarídeo utilizado e dos valores de absorbância a 532 nm (ABAD et al., 2013, MACHADO et al., 2015). E, com base na comparação entre o valor da CE₅₀ da agatisflavona e do padrão antioxidante (Trolox) em inibir a degradação de 2-desoxirribose, este biflavonoide pode ser considerada como um potente captador de radicais hidroxilas, dados estes promissores, considerando que os radicais hidroxilas são as EROs mais reativas capazes

de induzir graves danos a biomoléculas importantes tais como proteínas, lipídeos e DNA (WOJTUNIK-KULESZA et al., 2016).

A capacidade da agatisflavona em captar radicais hidroxilas equipara-se a de vários flavonoides avaliados em diferentes estudos. Barreca et al. (2016) verificaram que 12 flavonoides pertencentes a classes distintas do biflavonoide agatisflavona (flavonas, flavonona e flavonóis) e isolados do suco da fruta do *Citrus sinensis* L. são poderosos sequestrantes de radicais livres (neutros ou carregados negativamente ou positivamente). Os flavonoides identificados, dentre eles lucenina, vicentina, stellarina-2, derivados da quercetina e hesperidina, cujas estruturas químicas assemelham-se as da agatisflavona, apresentaram atividade antioxidante, a qual foi atribuída principalmente à capacidade de redução e captação de radicais OH^\bullet destes compostos. Estes resultados são similares aos alcançados nesta pesquisa.

A partir dos dados encontrados no ensaio que possibilitou a determinação da atividade antioxidante de inibição do NO (*in vitro*) da agatisflavona, é oportuno relatar que em baixas concentrações o biflavonoide agatisflavona diminuiu significativamente os níveis, *in vitro*, de NO, apresentando CE_{50} inferior a do padrão antioxidante (Trolox). Resultado este relevante visto que, em condições patológicas, a geração excessiva de NO tem sido implicada na morte de células neuronais em doenças neurodegenerativas, uma vez que geram radicais livres altamente citotóxicos, tais como peroxinitrito, que causa danos oxidativos intracelular (KANG et al., 2005; WOJTUNIK-KULESZA et al., 2016).

Na pesquisa feita por Sueishi e Hori (2013), a propriedade antioxidante de compostos fenólicos: miricetina, epigallocatequina galato, catequina, epicatequina, resveratrol e kaempferol, substâncias estruturalmente semelhantes ao biflavonoide agatisflavona, foi determinada por meios de técnicas espectroscópicas. Os pesquisadores calcularam a taxa de eliminação de radicais livres e verificaram que os flavonoides que apresentaram potente atividade antioxidante contra o radical $\text{ABTS}^{+\bullet}$ demonstraram relevante capacidade de reduzir os níveis de NO quando comparados ao Trolox. Porém, o efeito antioxidante desses compostos contra as ERNs foi menor quando comparada às EROs, achados estes semelhantes ao encontrado neste estudo.

O método TBARS, ensaio que analisa a extensão da peroxidação lipídica que ocorre por meio da oxidação de ácidos graxos insaturados a partir de uma fonte rica em lipídeos (por exemplo, gema de ovo), tem sido extensivamente e amplamente utilizado por diversos pesquisadores (OAKES; VAN DER KRAAK, 2003; EZZAHER et al., 2012; FREITAS et al., 2014). Neste estudo, o decaimento dos níveis de TBARS mostrou que a agatisflavona exerceu

um efeito antioxidante significativo contra os radicais peroxilas gerados pelo AAPH, protegendo os lipídios da oxidação em todas as concentrações e demonstrou uma CE_{50} inferior ao do controle positivo (Trolox). Dados estes relevantes, visto que a peroxidação lipídica promove danos oxidativos em proteínas e DNA, os quais são fatores importantes no desenvolvimento de diversas patologias (TSAI; HUANG, 2015).

Conforme Arwa e colaboradores (2015), os biflavonoides procianidina, fukugetina, amentoflavona e podocarpusflavona isolados do extrato de aceto de etila das folhas do vegetal *Garcinia brasiliensis* apresentaram na concentração de 10 μ M (equivalente a 0,01 mM) percentagens de inibição média de 28, 42, 37 e 30%, respectivamente, valores estes menores do que o constatado no grupo com quercetina (100 μ M; 47%). Na presente pesquisa, a média da porcentagem de inibição da agatisflavona e do controle positivo (Trolox) na maior concentração (0,928 mM) foi de 88 e 82%, respectivamente.

Os autores discutem ainda que os biflavonoides identificados em seu estudo provaram ter, por meio do ensaio de eliminação de radicais peróxidos, moderado efeito inibitório da peroxidação lipídica induzida por oxidantes como AAPH, quando comparado ao padrão antioxidante (ARWA et al., 2015). Resultado este diferente ao encontrado nesta investigação, na qual o biflavonoide agatisflavona apresentou capacidade antioxidante contra radicais peróxidos superior ao do controle positivo.

5.5 Conclusão

A avaliação das propriedades antioxidantes da agatisflavona, por meio de ensaios *in vitro*, permitiu concluir que o referido biflavonoide pode retardar ou prevenir significativamente a oxidação de lipídios ou de outras moléculas induzida por radicais livres, visto que o composto estudado demonstrou uma elevada capacidade antioxidante quando comparado ao padrão antioxidante (Trolox) contra os radicais DPPH[•], ABTS^{•+}, OH[•], peróxidos, NO e potencial redutor.

Dados estes relevantes, uma vez que, os danos oxidativos são amplamente considerados como responsáveis pela degeneração cerebral ou por danos em outros órgãos, fato que ressalta o grande potencial da agatisflavona como um novo produto farmacêutico com atividade antioxidante para possível uso na prevenção ou redução de doenças relacionadas com o estresse oxidativo, dentre essas, alguns transtornos do SNC como, depressão, esquizofrenia, doença de Parkinson e Alzheimer.

Dessa forma, este trabalho fornece subsídios para novas e futuras pesquisas sobre o efeito antioxidante da agatisflavona.

REFERÊNCIAS

- ABAD, L. V.; RELLEVE, L. S.; RACADIO, C. D. T.; ARANILLA, C. T.; ROSA, M. DE. Antioxidant activity potential of gamma irradiated carrageenan. **Applied Radiation and Isotopes**, v. 79, p. 73–79, 2013.
- ADEGOKE, O.; FORBES, P. B. C. Challenges and advances in quantum dot fluorescent probes to detect reactive oxygen and nitrogen species: a review. **Analytica Chimica Acta**, v. 862, p. 1–13, 2015a.
- ADEGOKE, O.; FORBES, P. B. C. Challenges and advances in quantum dot fluorescent probes to detect reactive oxygen and nitrogen species: a review. **Analytica Chimica Acta**, v. 862, p. 1–13, 2015b.
- AJILEYE, O. O.; OBUOTOR, E. M.; AKINKUNMI, E. O.; ADEROGBA, M. A. Isolation and characterization of antioxidant and antimicrobial compounds from *Anacardium occidentale* L. (Anacardiaceae) leaf extract. **Journal of King Saud University - Science**, v. 27, n. 3, p. 244–252, 2015.
- AL-GUBORY, K. H.; FOWLER, P. A.; GARREL, C. The roles of cellular reactive oxygen species, oxidative stress and antioxidants in pregnancy outcomes. **International Journal of Biochemistry and Cell Biology**, v. 42, n. 10, p. 1634–1650, 2010.
- ARWA, P. S.; ZERAIK, M. L.; XIMENES, V. F.; DA FONSECA, L. M.; BOLZANI, V. DA S.; SILVA, D. H. S. Redox-active biflavonoids from *Garcinia brasiliensis* as inhibitors of neutrophil oxidative burst and human erythrocyte membrane damage. **Journal of Ethnopharmacology**, 2015.
- BARRECA, D.; GATTUSO, G.; LAGANÀ, G.; LEUZZI, U.; BELLOCCO, E. C- and O-glycosyl flavonoids in *Sanguinello* and *Tarocco* blood orange (*Citrus sinensis* L.) *Osbeck* juice: identification and influence on antioxidant properties and acetylcholinesterase activity. **Food Chemistry**, v. 196, p. 619–627, 2016.
- BASU, S.; HAZRA, B. Review of pharmacological effects of *Glycyrrhiza* radix and its bioactive compounds. **Phytotherapy Research**, v. 34, n. 21, p. 2695–2700, 2006.
- BONDET, V.; BRAND-WILLIAMS, W.; BERSET, C. Kinetics and mechanisms of antioxidant activity using the DPPH free radical method. **LWT - Food Science and Technology**, v. 615, p. 609–615, 1997.
- CASTARDO, J. C.; PRUDENTE, A. S.; FERREIRA, J.; GUIMARÃES, C. L.; MONACHE, F. D.; FILHO, V. C.; et al. Anti-inflammatory effects of hydroalcoholic extract and two biflavonoids from *Garcinia gardneriana* leaves in mouse paw oedema. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 118, n. 3, p. 405–411, 2008.
- DE SOUSA, L. R. F.; WU, H.; NEBO, L.; FERNANDES, J. B.; DA SILVA, M. F. D. G. F.; KIEFER, W.; et al. Flavonoids as noncompetitive inhibitors of Dengue virus NS2B-NS3 protease: inhibition kinetics and docking studies. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 23, n. 3, p. 466–470, 2015.

EZZAHER, A.; HAJ MOUHAMED, D.; MECHRI, A.; NEFFATI, F.; DOUKI, W.; GAHA, L.; et al. TBARs and non-enzymatic antioxidant parameters in Tunisian bipolar I patients. **Immuno-Analyse et Biologie Specialisee**, v. 27, n. 6, p. 315–324, 2012.

FIDELIS, Q. C.; RIBEIRO, T. A N.; ARAÚJO, M. F.; DE CARVALHO, M. G. Ouratea genus: chemical and pharmacological aspects. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 24, n. 1, p. 1–19, 2014.

FREITAS, R. L. M. DE; GEORGE, L.; OLIVEIRA, S.; FREITAS, R. M. DE; BARREIROS, A. L. B. S.; DAVID, J. P.; et al. *In vitro* effects of Arylhydrocoumarin on free radicals and oxidative stress in erythrocytes and *Saccharomyces cerevisiae*. **Current Pharmaceutical Biotechnology**. p. 1069–1082, 2014.

FREITAS, A. M.; ALMEIDA, M. T. R.; ANDRIGHETTI-FRÖHNER,

C. R.; CARDOZO, F. T. G. S.; BARARDI, C. R. M.; FARIAS, M. R.; et al. Antiviral activity-guided fractionation from *Araucaria angustifolia* leaves extract. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 126, n. 3, p. 512–517, 2009.

GOMES, N. G. M.; CAMPOS, M. G.; ÓRFÃO, J. M. C.; RIBEIRO, C. A F. Plants with neurobiological activity as potential targets for drug discovery. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 33, n. 8, p. 1372–1389, 2009.

GONTIJO, V. S.; JUDICE, W. A. S.; CODONHO, B.; PEREIRA, I. O.; ASSIS, D. M.; JANUÁRIO, J. P.; et al. Leishmanicidal, antiproteolytic and antioxidant evaluation of natural bi flavonoids isolated from *Garcinia brasiliensis* and their semisynthetic derivatives. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 58, p. 613–623, 2012.

GUIMARÃES, A. G.; OLIVEIRA, G. F.; MELO, M. S.; CAVALCANTI, S. C. H.; ANTONIOLLI, A. R.; BONJARDIM, L. R.; et al. Bioassay-guided evaluation of antioxidant and antinociceptive activities of carvacrol. **Basic and Clinical Pharmacology and Toxicology**, v. 107, n. 6, p. 949–957, 2010.

GULCIN, I.; ZUBEYR, H.; ELMASTAS, M.; ABOUL-ENEIN, H. Y. Radical scavenging and antioxidant activity of tannic acid. **Arabian Journal of Chemistry**, p. 43–53, 2010.

JABBARI, M.; JABBARI, A. Aspects Antioxidant potential and DPPH radical scavenging kinetics of water-insoluble flavonoid naringenin in aqueous solution of micelles. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering**. v. 489, p. 392–399, 2016.

JIA, B.-X.; ZENG, X.-L.; REN, F.-X.; JIA, L.; CHEN, X.-Q.; YANG, J.; et al. Baeckeins F–I, four novel C-methylated biflavonoids from the roots of *Baekkea frutescens* and their anti-inflammatory activities. **Food Chemistry**, v. 155, p. 31–37, 2014.

KANG, S. S.; LEE, J. Y.; CHOI, Y. K.; SONG, S. S.; KIM, J. S.; JEON, S. J.; et al. Neuroprotective effects of naturally occurring biflavonoids. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v. 15, n. 15, p. 3588–3591, 2005.

KEDARE, S. B.; SINGH, R. P. Genesis and development of DPPH method of antioxidant assay. **Journal of Food Science and Technology**, v. 48, n. August, p. 412–422, 2011.

- LI, X. Improved pyrogallol autoxidation method: a reliable and cheap superoxide-scavenging assay suitable for all antioxidants. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, n. 25, p. 6418–6424, 2012.
- LIN, Y. M.; FLAVIN, M. T.; SCHURE, R.; CHEN, F. C.; SIDWELL, R.; AL, E. Antiviral activities of biflavonoids. **Planta Medica**, v. 65, n. 2, p. 120–125, 1999.
- LIN, Y. M.; ANDERSON, H.; FLAVIN, M. T.; PAI, Y. H. S.; MATA-GREENWOOD, E.; PENGSUPARP, T.; et al. In vitro anti-HIV activity of biflavonoids isolated from *Rhus succedanea* and *Garcinia multiflora*. **Journal of Natural Products**, v. 60, n. 9, p. 884–888, 1997.
- LOPES, G. K. B.; SCHULMAN, H. M.; HERMES-LIMA, M. Polyphenol tannic acid inhibits hydroxyl radical formation from Fenton reaction by complexing ferrous ions. **Biochimica et Biophysica ACTA-general subjects**, v. 1479, n. 1-2, 1999.
- MACHADO, K. C.; OLIVEIRA, G. L. S.; DE SOUSA, É. B. V.; COSTA, I. H. F.; MACHADO, K. C.; DE SOUSA, D. P.; et al. Spectroscopic studies on the *in vitro* antioxidant capacity of isopentyl ferulate. **Chemico-Biological Interactions**, v. 225, p. 47–53, 2015.
- MBAVENG, A. T.; HAMM, R. **Harmful and protective effects of terpenoids from African medicinal plants** In: KUETE, V. Toxicological Survey of African Medicinal Plants. 1. ed., Elsevier, 2014.
- MUSA, K. H.; ABDULLAH, A.; AL-HAIQI, A. Determination of DPPH free radical scavenging activity : application of artificial neural networks. **Food Chemistry**, v. 194, p. 705–711, 2016.
- MUSA, K. H.; ABDULLAH, A.; KUSWANDI, B.; HIDAYAT, M. A. A novel high throughput method based on the DPPH dry reagent array for determination of antioxidant activity. **Food Chemistry**, v. 141, n. 4, p. 4102–4106, 2013.
- OAKES, K. D.; VAN DER KRAAK, G. J. Utility of the TBARS assay in detecting oxidative stress in white sucker (*Catostomus commersoni*) populations exposed to pulp mill effluent. **Aquatic Toxicology**, v. 63, n. 4, p. 447–463, 2003.
- OLIVEIRA, G. L. DA S.; OLIVEIRA, F. R. DE A. M. DE; FREITAS, R. M. Potential involvement of oxidative stress in induction of neurodegenerative diseases : Actions , mechanisms and neurotherapeutic potential of natural antioxidants. **African Journal of Pharmacy and Pharmacology**. v. 8, n. May, p. 685–700, 2014.
- PAULSEN, B. S.; SOUZA, C. S.; CHICAYBAM, L.; BONAMINO, M. H.; BAHIA, M.; COSTA, S. L.; et al. Agathisflavone enhances retinoic acid-induced neurogenesis and its Receptors α and β in pluripotent stem cells. **Stem Cells and Development**, v. 20, n. 10, p. 1711–1721, 2011.
- PEGNYEMB, D. E.; MBING, J. N.; ATCHADÉ, A. D. T.; TIH, R. G.; SONDEGAM, B. L.; BLOND, A.; et al. Antimicrobial biflavonoids from the aerial parts of *Ouratea sulcata*. **Phytochemistry**, v. 66, n. 16, p. 1922–1926, 2005.
- PUBCHEM. Pub Chem – Open Chemistry. **Compound Summary for CID 5281599 – agathisflavone**. Disponível em: <www.pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>. Acesso em: 24 ago.

2015.

RE, R.; PELLEGRINI, N.; PROTEGGENTE, A.; PANNALA, A.; YANG, M.; RICE-EVANS, C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 26, n. 9-10, p. 1231–1237, 1999.

SAXENA, A.; SAXENA, A. K.; SINGH, J.; BHUSHAN, S. Natural antioxidants synergistically enhance the anticancer potential of AP9-cd, a novel lignan composition from *Cedrus deodara* in human leukemia HL-60 cells. **Chemico-Biological Interactions**, v. 188, n. 3, p. 580–590, 2010.

SHRESTHA, S.; LEE, D. Y.; PARK, J. H.; CHO, J. G.; LEE, D. S.; LI, B.; et al. Flavonoids from the fruits of *Nepalese sumac* (*Rhus parviflora*) attenuate glutamate-induced neurotoxicity in HT22 cells. **Food Science and Biotechnology**, v. 22, n. 4, p. 895–902, 2013a.

SHRESTHA, S.; NATARAJAN, S.; PARK, J. H.; LEE, D. Y.; CHO, J. G.; KIM, G. S.; et al. Potential neuroprotective flavonoid-based inhibitors of CDK5/p25 from *Rhus parviflora*. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v. 23, n. 18, p. 5150–5154, 2013b.

SILVA, C. G.; HERDEIRO, R. S.; MATHIAS, C. J.; PANEK, A. D.; SILVEIRA, C. S.; RODRIGUES, V. P.; et al. Evaluation of antioxidant activity of Brazilian plants. **Pharmacological Research**, v. 52, n. 3, p. 229–233, 2005.

SINGHAL, M.; PAUL, A.; SINGH, H. P. Synthesis and reducing power assay of methyl semicarbazone derivatives. **Journal of Saudi Chemical Society**, v. 18, n. 2, p. 121–127, 2014.

SUEISHI, Y.; HORI, M. Nitric oxide scavenging rates of solubilized resveratrol and flavonoids. **Nitric Oxide**, v. 29, p. 25–29, 2013.

SURVESWARAN, S.; CAI, Y. Z.; CORKE, H.; SUN, M. Systematic evaluation of natural phenolic antioxidants from 133 Indian medicinal plants. **Food Chemistry**, v. 102, n. 3, p. 938–953, 2007.

TAN, L.; ZHANG, D.; WANG, G.; YU, B.; ZHAO, S.; WANG, J.; et al. Comparative analyses of flavonoids compositions and antioxidant activities of Hawk tea from six botanical origins. **Industrial Crops and Products**, v. 80, p. 123–130, 2016.

TSAI, M.; HUANG, T. Thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) is a state biomarker of oxidative stress in bipolar patients in a manic phase. **Journal of Affective Disorders**, v. 173, p. 22–26, 2015.

VON MOLTKE, L. L.; WEEMHOFF, J. L.; BEDIR, E.; KHAN, I. A.; HARMATZ, J. S.; GOLDMAN, P.; et al. Inhibition of human cytochromes P450 by components of *Ginkgo biloba*. **The Journal of pharmacy and pharmacology**, v. 56, n. 8, p. 1039–44, ago. 2004.

WOJTUNIK-KULESZA, K. A.; ONISZCZUK, A.; ONISZCZUK, T.; WAKSMUNDZKA-HAJNOS, M. The influence of common free radicals and antioxidants on development of Alzheimer's Disease. **Biomedicine et Pharmacotherapy**, v. 78, p. 39–49, 2016.

YE, Y.; GUO, Y.; LUO, Y.; WANG, Y. Isolation and free radical scavenging activities of a

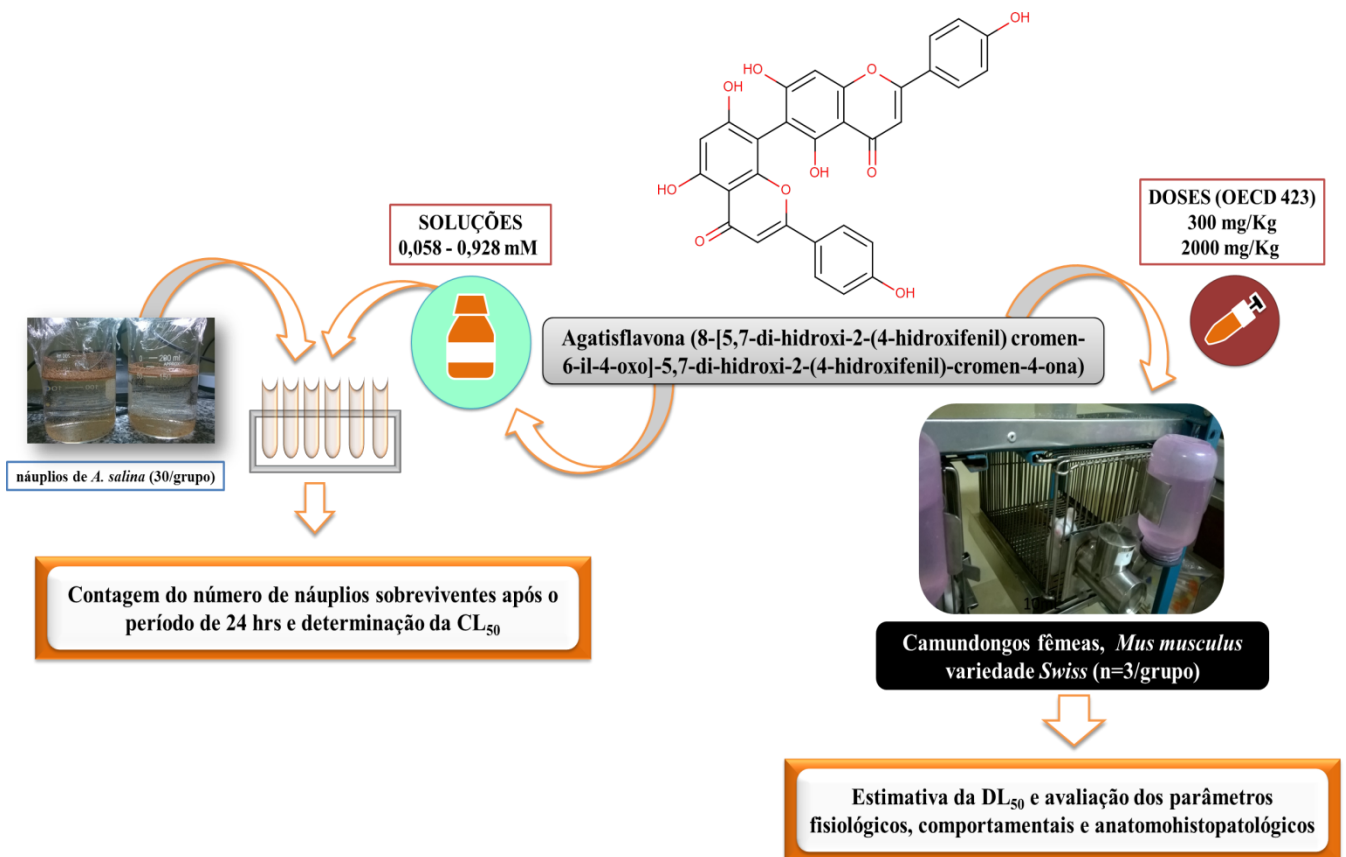
novel biflavonoid from the shells of *Camellia oleifera* Abel . **Fitoterapia**, v. 83, n. 8, p. 1585–1589, 2012.

YEH, P.-H.; SHIEH, Y.-D.; HSU, L.-C.; KUO, L.-M. Y.; LIN, J.-H.; LIAW, C.-C.; et al. Naturally occurring cytotoxic [3'→8'']-biflavonoids from *Podocarpus nakaii*. **Journal of Traditional and Complementary Medicine.**, v. 2, n. 3, p. 220–226, 2012.

6 CAPÍTULO III: Avaliação toxicológica do biflavonoide agatisflavona: teste de toxicidade aguda e *in vitro* frente à *Artemia salina*

(Artigo a ser submetido à *Food and Chemical Toxicology*)

Qualis B1



Avaliação toxicológica do biflavonoide agatisflavona: teste de toxicidade aguda e *in vitro* frente à *Artemia salina*

Anderson Wilbur Lopes Andrade¹; Jéssica Pereira Costa¹; Jorge Maurício David²; Adriana Maria Viana Nunes³

¹Núcleo de Tecnologia Farmacêutica, Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Piauí – UFPI, Teresina, Piauí, Brasil.

²Departamento de Química Orgânica, Universidade Federal da Bahia, Salvador, Bahia, Brasil.

³Departamento de Biofísica e Fisiologia Universidade Federal do Piauí, Teresina, Piauí, Brasil.

RESUMO

A agatisflavona é um biflavonoide particularmente interessante, visto que apresentou em ensaios *in vitro* e *in vivo* propriedades antioxidante, antimicrobiana e neuroprotetora. Entretanto, não se encontra na literatura investigações que descrevam os possíveis efeitos toxicológicos da agatisflavona. Este estudo objetivou estimar a dose letal mediana 50% (DL₅₀) e avaliar a toxicidade aguda sobre os parâmetros anátomo e histopatológicos (peso, alimentação, excreção, bioquímicos e hematológicos) e comportamentais do composto estudado em camundongos *Swiss* fêmeas, bem como sua citotoxicidade frente à *Artemia salina*. Durante o tratamento, nenhuma morte foi registrada nas doses de 300 e 2000 mg/Kg (n = 03/grupo), o que permite, de acordo com *Organisation for Economic Co-operation and Development* (OECD) *Guideline* 423, estimar que a DL₅₀ da agatisflavona seja maior ou igual a 5000 mg/Kg. O biflavonoide não alterou os parâmetros analisados nos animais que receberam a dose de 300 e 2000 mg/Kg e não foi verificada diferença significativa (p > 0,05) nos resultados obtidos em relação ao grupo controle (Tween 80 0,05% dissolvido em solução salina 0,9%). O estudo revelou que, em 24 horas, a agatisflavona nas maiores concentrações (0,464 e 0,928 mM) apresentou de moderada a elevada taxa de letalidade, havendo uma diferença estatisticamente significativa em relação ao controle negativo (p < 0,05). O estudo toxicológico *in vitro* e não clínico com agatisflavona revelou que este biflavonoide possui toxicidade frente ao *A. salina.*, baixa toxicidade aguda por via oral e não produz alterações hematológicas, bioquímicas e histopatológicas ou sequer modificações comportamentais e fisiológicas em camundongos adultos.

Palavras-chave: Agatisflavona. *Artemia salina*. Biflavonoide. Toxicidade aguda.

6.1 Introdução

A ausência de informações sobre os danos causados ao organismo por compostos potencialmente farmacológicos e obtidos a partir de um produto vegetal estimulam e conduzem uma infinidade de pesquisas na área de toxicologia. Os estudos de toxicidade *in silico*, *in vitro* e *testes in vivo* padronizados e em comum acordo com diretrizes determinadas por legislações e instituições como a *Organisation for Economic Co-operation and Development* (OECD) possibilitam conclusões mais transparentes, confiáveis e a reprodutibilidade dos resultados de investigações sobre toxicidade de qualquer material testado (ROBERTS et al., 2015; WARHEIT; BROWN; DONNER, 2015).

Estudos toxicológicos não clínicos e clínicos fornecem mecanismos de toxicidade e/ou permitem postular um curso de tempo de desenvolvimento patológico após exposições. Os dados gerados a partir desses tipos pesquisas, padronizadas e corretamente executadas, são comumente utilizados por agências reguladoras e internamente pela indústria farmacêutica com o intuito de estabelecer limites de exposição aceitáveis e gerir os riscos para seres humanos, animais selvagens e ao ambiente que, por ventura, seus produtos finais possam ocasionar (ROBERTS et al., 2015; WARHEIT; BROWN; DONNER, 2015, VILLAIN et al., 2016).

O guia para a condução de estudos não clínicos de toxicologia e segurança farmacológica necessário ao desenvolvimento de medicamentos da Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA (2013), cuja elaboração foi baseada em documentos de agências reconhecidas pela vigilância sanitária de medicamentos e de instituições de interesse na área, discute que os estudos não clínicos realizados na obtenção e a confiabilidade de informações referentes à segurança da substância a ser testada, incluem: estudos de toxicidade de dose única (Aguda), toxicidade de doses repetidas, toxicidade reprodutiva, genotoxicidade, tolerância local e carcinogenicidade, além de estudos de interesse na avaliação da segurança farmacológica e toxicocinética (administração, distribuição, metabolismo e excreção), além de outros que avaliem a segurança da substância-teste, conforme o caso.

A identificação de novas moléculas com propriedades farmacológicas desprovidas de efeitos tóxicos têm sido um desafio contínuo para a indústria farmacêutica. Nesse contexto, a agatisflavona (8-[5,7-di-hidroxi-2-(4-hidroxifenil)cromen-6-il-4-oxo]-5,7-di-hidroxi-2-(4-hidroxifenil)cromen-4-ona) (**Figura 5**) é particularmente interessante porque, como relatado anteriormente, pertence à classe dos flavonoides, os quais evidenciam baixa toxicidade, e por apresentar em ensaios *in vitro*, *ex vivo* e *in vivo*, propriedades antioxidante, antiviral,

antimicrobiana, antitumoral e neuroprotetora (ARAÚJO et al., 2011; PAULSEN et al., 2011; SAK, 2014; AJILEYE et al., 2015). Entretanto, não há na literatura investigações que determinem a DL_{50} (dose letal 50% - dose que mata 50% dos animais) ou descrevam os possíveis efeitos toxicológicos produzidos pela agatisflavona em ensaios não clínicos e clínicos.

A presente investigação avaliou a segurança, *in vitro* e *in vivo*, do biflavonoide agatisflavona por meio do ensaio de letalidade de substância frente à *Artemia salina*, que consiste na estimativa da concentração de uma substância por meio da medida de uma resposta biológica envolvendo apenas um parâmetro (vida ou morte) e do estudo de toxicidade aguda (HAL et al., 2005). Este, conforme ANVISA (2013), tem como objetivo conhecer a toxicidade produzida por uma substância teste, administrada em uma ou mais doses durante um período não superior a 24 horas, seguido de observação dos animais por 14 dias após tratamento. Além disto, métodos alternativos podem ser utilizados para estimar a dose letal, tais como os preconizados nos guias da OECD.

Portanto, este estudo teve como objetivo estimar a dose letal mediana 50% (DL_{50}) baseado no Guia da Organização para Cooperação e Desenvolvimento Econômico OECD 423, a fim de avaliar a toxicidade aguda sobre os parâmetros anatohistopatológicos bioquímicos, hematológicos, fisiológicos e comportamentais do composto estudado em camundongos *Swiss* fêmeas, bem como avaliar sua citotoxicidade frente ao microcrustáceo *A. salina*, determinando a Concentração letal média (CL_{50}).

6.2 Metodologia

6.2.1 Animais e substância

Foram utilizados camundongos fêmeas, albinos (*Mus musculus*), da variedade *Swiss* e adultos com 2 meses de idade, com peso variando de 25 a 30 g, provenientes do Biotério Central do Centro de Ciências Agrárias - CCA da Universidade Federal do Piauí (UFPI).

Durante todos os experimentos, os animais foram mantidos em gaiolas de acrílico 30x30 cm², em condições controladas (temperatura ambiente de 24-25°C e umidade de 50 a 60%), com ciclo claro e escuro alternado de 12 horas (07:00 am a 07:00 pm) e sistema de exaustão, recebendo ração padrão tipo Purina e água filtrada *ad libitum*. A assepsia das caixas foi realizada 3 vezes por semana com álcool a 70%. Os experimentos propostos foram previamente submetidos à avaliação do Comitê de Ética em Experimentação com Animal da UFPI e aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da UFPI com o número de protocolo 041/15.

O biflavonoide foi extraído da espécie *Caesalpinia pyramidalis* T., popularmente conhecida pelo nome de catingueira, por meio da maceração (com metanol em temperatura ambiente com agitação ocasional por dois ciclos de 48 horas) das folhas secas e trituradas (2,2 Kg). Em seguida, o conteúdo obtido foi filtrado com papel de filtro comum. O filtrado foi concentrado sobre pressão e agitação controlada em um rotavapor obtendo o extrato metanólico.

A próxima etapa consistiu na partição do extrato metanólico bruto em clorofórmio e, em seguida, a próxima partição em hexano. O extrato metanólico foi dissolvido em 1 L de solução hidroalcoólica (3:2) e extraído 5 vezes com clorofórmio (300 mL cada extração). A fase clorofórmica obtida foi dissolvida em etanol:água (95:5) e extraída com hexano. A fase hidroalcoólica remanescente (22,4 g) foi submetida à cromatografia em coluna (tendo sílica gel 60 como adsorvente e misturas de clorofórmio, acetato de etila e clorofórmio, metanol como eluentes). Quatro gramas (4 g) de agastiflavona foram isoladas das frações CHCl₃:MeOH (8:2) e recristalizada com metanol:hexano.

6.2.2 Avaliação toxicológica: *screening* hipocrático e estimativa da DL₅₀

As propriedades toxicológicas *in vivo* da agastiflavona foram investigadas de acordo com *Organisation for Economic Co-operation and Development* (OECD) *Guideline* 423,

consistindo de estudo de toxicidade oral aguda, dose única, por um período de 14 dias (JONSSON et al., 2013). Para o *screening* hipocrático, 09 animais foram divididos em três grupos (n =3): grupo controle negativo que recebeu 0,3 mL de Tween 80 0,05% dissolvido em solução salina 0,9%, e dois grupos teste, os quais receberam as doses de 300 e 2000 mg/kg (volume de 0,3 mL). Os camundongos foram mantidos sob monitoramento durante 14 dias, em gaiolas metabólicas (**Figura 23**), as quais permitiram, por animal, o monitoramento do consumo de água e ração e da excreção renal e fecal.

Figura 23: Equipamento de monitorização do consumo de água e ração e dos parâmetros fisiológicos dos animais em estudo.



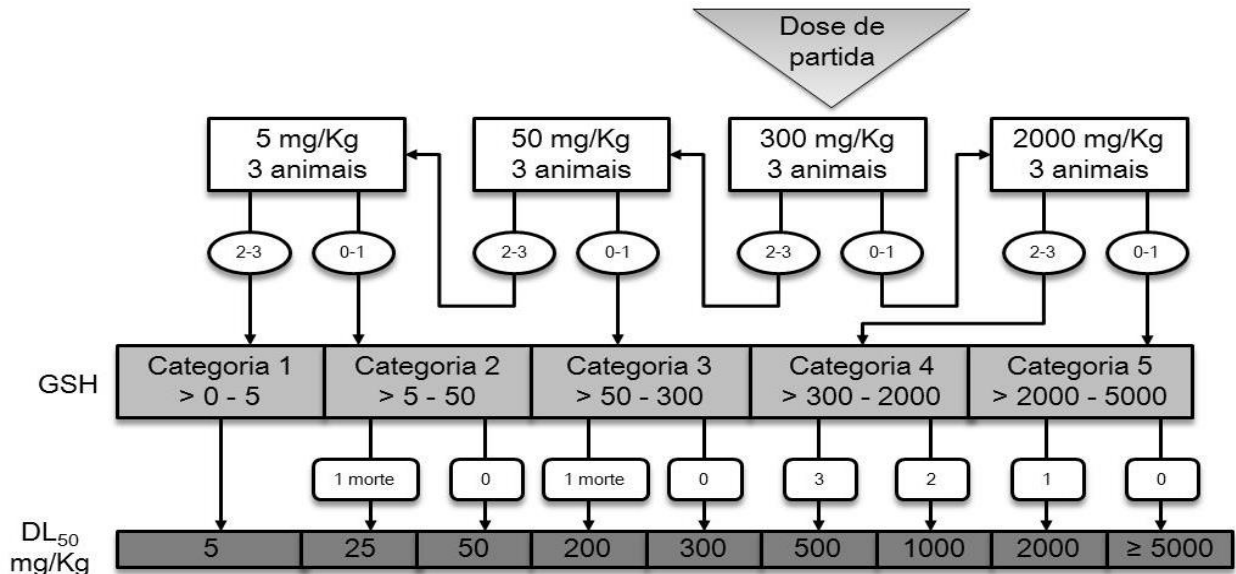
Fonte: Arquivo pessoal.

Segundo o guia da OECD 423 de 17 de dezembro de 2001, recomenda-se que os grupos testes sejam divididos em 4 grupos de 3 animais por etapa, e estes devem receber por via oral (v.o.) e em dose única as doses de 5, 50, 300 e 2000 mg/Kg. Entretanto, quando não existem informações sobre a substância a ser testada, o guia recomenda utilizar a dose inicial de 300 mg/Kg, dose de partida adotada neste estudo.

O Guia da OECD apresenta boa reprodutibilidade, utiliza poucos animais e é capaz de classificar as substâncias em cinco categorias de acordo com sistemas internacionalmente aceitos (*Globally Harmonised System - GHS*), estimando a dose letal mediana (DL₅₀) (**Figura 24**). O guia também recomenda o uso de fêmeas para esse teste; embora não costume haver diferença entre os gêneros, nos poucos casos em que esta ocorreu, as fêmeas foram mais sensíveis que os machos (OECD, 2001).

A **Figura 24** mostra de forma esquematizada a adaptação do guia 423 da OECD utilizada para realização da toxicidade *in vivo* da agatisflavona na presente pesquisa.

Figura 24: Esquematização do procedimento de ensaio de toxicidade aguda *in vivo* com uma dose inicial de 300 mg/Kg de peso corporal.



Fonte: Adaptado de OECD, 2001.

O comportamento geral dos camundongos foi monitorado durante os 30 minutos iniciais e avaliado 1, 2 e 4 horas depois do tratamento e diariamente durante 14 dias através do “*screening* hipocrático” descrito por Malone e Robichaud (1962). Por meio deste, foi possível realizar uma estimativa geral da toxicidade da agatisflavona sobre o estado consciente e disposição geral do animal, bem como a atividade e coordenação do sistema motor, reflexos e ações sobre o sistema nervoso central e sobre o sistema nervoso autônomo (MALONE; ROBICHAUD, 1983).

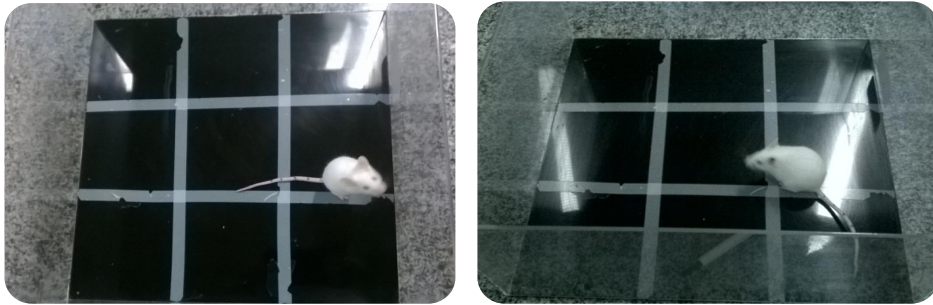
Os parâmetros analisados foram: atividade geral, frêmito vocal, irritabilidade, resposta ao toque, aperto da cauda, contorção abdominal, reflexo de endireitamento, tônus corporal, força para agarrar, reflexo corneal, ataxia, tremores, convulsões, lacrimação, fenômenos de “*Straub*”, ptose, micção, defecação, piloereção, respiração, sedação, hipnose e anestesia (MALONE; ROBICHAUD, 1962).

6.2.3 Avaliação comportamental

Após o tratamento com 0,3 mL da agatisflavona nas doses de 300 e 2000 mg/Kg e do veículo (0,3 mL de Tween 80 0,05% dissolvido em salina a 0,9%; v.o.), os grupos de animais foram submetidos aos testes comportamentais de campo aberto e barra giratória (*rota rod*). Os testes foram realizados três vezes durante o período de observação: dia 01 (administração da droga), dia 07 (dia intermediário) e dia 14 (dia final).

O teste campo aberto foi realizado em uma caixa de acrílico (paredes transparentes e piso preto, 30x30x15 cm), dividida em nove quadrantes iguais (**Figura 25**). Esse teste foi utilizado para avaliar a atividade exploratória do animal. No primeiro dia, após 30 minutos dos tratamentos (agatisflavona nas doses de 300 e 2000 mg/Kg e o veículo), foram observados o número de: cruzamentos com as quatro patas (*crossings*), de comportamento de autolimpeza (*groomings*) e de levantamentos (*rearings*), sem encostar-se à parede, sendo avaliados durante o tempo de 5 minutos. Estes mesmos parâmetros foram observados no 7° e 14° dia após os tratamentos. Após cada sessão de teste individual, o campo foi limpo com álcool 70% para remover qualquer vestígio deixado pelos animais.

Figura 25: Teste comportamental Campo Aberto



Fonte: Arquivo Pessoal.

O equipamento *rota rod* (**Figura 26**) foi utilizado para a avaliação da coordenação motora e relaxamento muscular produzido por drogas em animais. Sessenta minutos após a finalização do teste de campo aberto, os animais do grupo controle (veículo) e dos grupos testes (agatisflavona; 300 e 2000 mg/Kg) foram colocados com as 4 patas sobre uma barra giratória de 2,5 cm de diâmetro, elevada a 25 cm do piso, em uma rotação de 17 rpm, por um período de 3 minutos registrando-se o número de quedas, com três reconduções, no máximo.

Figura 26: Teste comportamental com a Barra Giratória (*rota rod*)



Fonte: Arquivo pessoal.

6.2.4 Estudos da toxicidade aguda da agatisflavona em parâmetros bioquímicos e hematológicos

Após 14 dias do tratamento agudo, os animais foram anestesiados com pentobarbital sódico 60 mg/Kg, intraperitoneal (i.p.) realizando em seguida 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 determinar os parâmetros hematológicos e o outro sem anticoagulante para obtenção do soro para avaliação dos parâmetros bioquímicos.

O material foi centrifugado a 3500rpm durante 10 min para análise bioquímica determinando, em seguida, os parâmetros de glicose, ureia, creatinina, aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT) e colesterol total. Os ensaios foram realizados em aparelho automático Labmax 240 com sistemas comerciais da LABTEST[®].

Imediatamente após a coleta, a análise hematológica foi executada por meio do analisador automático de células hematológicas Advia 120/hematology (Siemens) a partir do qual poderá determinar os seguintes parâmetros hematológicos: eritrócitos, leucócitos, plaquetas, hemoglobina, hematócrito e os índices hematimétricos (volume corpuscular médio (VCM), hemoglobina corpuscular média (HCM) e a concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM)). Foi realizada a contagem diferencial de leucócitos corados com May-Grünwald-Giemsa, sendo analisado e contado, em cada ensaio, um número de 100 células (MALONE, 1977; AL-HABORI et al., 2002).

6.2.5 Estudo da toxicidade aguda da agatisflavona em parâmetros anátomo e histopatológicos

Completados 14 dias de observação, todos os animais foram eutanasiados por deslocamento cervical após anestesia geral induzida pela administração do pentobarbital sódico, na dose de 60 mg/Kg, por via i.p., e em seguida, tiveram seus cérebros, fígados, rins, pâncreas, corações e pulmões removidos, pesados, processados e analisados com auxílio do Atlas de Histologia Veterinária Bacha & Bacha (2003).

Os órgãos foram embebidos em parafina, seccionados no plano sagital em cortes com 7 mm de espessura e montados em lâminas cobertas de gelatina. Os cortes foram ser desparafinizados, hidratados em uma série de soluções de etanol, tratados primeiro com hidróxido de sódio (NaOH) 1 N e depois com tampão borato de sódio 1 N, durante 20 minutos cada tratamento, e então lavados com tampão fosfato de sódio.

Após tratamento com soro, os cortes foram incubados por 2 horas com uma solução 1:500 de anticorpos monoclonais anti-BrdU (Sigma, St. Louis, MO, B-5002), por 1 hora com uma solução 1:200 de anticorpos secundários anti-ratos (Vector, Burlingame, CA, BA-9400), e então vitratados com um complexo avidina-biotina (Vector) e com 3,3'-diaminobenzidine (Sigma, St. Louis, MO, D-5637). Os cortes ficaram cobertos com Entellan. Os cortes dos tecidos de ratos tratados e não tratados também permaneceram corados com hematoxilina e eosina, sendo analisados posteriormente com auxílio de um microscópio óptico em um aumento de 40 vezes.

6.2.6 Avaliação da toxicidade *in vitro* da agatisflavona frente à *Artemia salina*

A avaliação da toxicidade frente à *A. salina* foi realizada segundo metodologia descrita por McLaughlin e Rogers (1998). Inicialmente, foram preparados 500 mL de solução de sal marinho (30 g/L), a qual foi posteriormente adicionada em água mineral não clorada na proporção 1:1 (água marinha artificial) para incubação dos ovos de *A. salina* (10 mg/L). Estes foram expostos à luz artificial (lâmpada incandescente de 60 watts) a 25 °C, com aeração constante, durante 24 horas para que houvesse a eclosão das larvas (náuplios).

Para efetuar o ensaio, foram colocados, em triplicata, dez exemplares de náuplios em tubos de ensaio contendo 10 mL de água marinha artificial e 1 mL da agatisflavona (dissolvido em água marinha artificial), nas seguintes concentrações: 0,058 mM, 0,116 mM, 0,232 mM, 0,464 mM e 0,928 mM. Grupos controle também foram preparados, sem a presença da agatisflavona (controle negativo) e com o dicromato de potássio (dissolvido em água marinha artificial) nas concentrações: 0,058 - 0,928 mM (controle positivo). Após o período de 24 horas, foi realizada a contagem do número de náuplios sobreviventes.

6.2.7 Análises estatísticas

Os valores obtidos nos grupos, os quais utilizaram os camundongos, estão 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 $p < 0,05$.

Os valores obtidos da letalidade da *A. salina* (24 horas) 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 $p < 0,05$. Os dados de toxicidade em *A. salina* foram analisados a fim de determinar os valores de Concentração Letal Média (CL₅₀) e as médias de sobrevivência para cada concentração por análise de *Probit* através do software *GraphPad Prism*[®], versão 6.0, com 95 % de intervalo de confiança.

6.3 Resultados

6.3.1 *Screening* hipocrático, estimativa da DL₅₀ e avaliação dos parâmetros fisiológicos e comportamentais

Este estudo demonstrou que não foram constatados sinais e sintomas de toxicidade nos animais experimentais durante e após o tratamento com biflavonoide agatisflavona no decorrer do período de observação (14 dias) e nenhuma morte foi registrada nas doses de 300 e 2000 mg/Kg (**Tabela 9**). Resultados estes que evidenciam que a administração v.o da agatisflavona, de forma geral, não produz efeitos tóxicos que levem a morte do animal.

Tabela 9: Resultados da determinação da dose letal 50% (DL₅₀) em camundongos Swiss, tratados com agatisflavona por via oral

Grupos	Doses mg/Kg	Nº de animais por grupo	Nº de mortes por grupo	Sinais e sintomas de toxicidade
Controle	0	3	0	-
Agatisflavona	300	3	0	-
Agatisflavona	2000	3	0	-

Legenda: Determinação da dose letal 50% (DL₅₀) em camundongos fêmeas Swiss, tratados por via oral de forma aguda com veículo (Controle, n = 03) e com agatisflavona nas doses 300 e 2000 mg/Kg (n = 03) observados durante 14 dias.

Diante disto, e de acordo com o Guia da OECD, que classifica as substâncias com base nos sistemas internacionalmente aceitos (GHS) e estima a DL₅₀ (**Figura 24**), é possível inferir que a agatisflavona enquadra-se na Categoria 5 de periculosidade do GHS, na qual as substâncias em ensaios condizentes a esta categoria são consideradas com toxicidade aguda relativamente baixa, mas que, sob certas circunstâncias, podem representar perigo para populações vulneráveis (OECD, 2001). Além disto, estima-se que a DL₅₀ da agatisflavona seja igual ou superior a 5000 mg/Kg.

Verificaram-se também parâmetros como: peso corporal, consumo de água e ração e a eliminação renal e fecal de cada camundongo, no 1º, 3º, 5º, 7º 9º, 11º, 13º e 14º dia. A média dos dados obtidos estão expostos na **Tabela 10**. Não foi observada diferença estatisticamente ($p > 0,05$) entre os grupos de animais que receberam agatisflavona em relação ao grupo controle.

Tabela 10: Variação de peso corporal, do consumo de água e ração e da eliminação renal e fecal em camundongos durante 14 dias de observação após administração aguda por via oral da agatisflavona

Parâmetros	Grupo Controle (C.N.)	300 mg/Kg	2000 mg/Kg
Massa Corporal (g)	24,79±0,204	26,77±0,300	24,83±0,196
Consumo de ração (g)	3,778±0,224	3,703±0,168	3,303±0,231
Consumo de água (mL)	18,29±0,777	16,92±1,033	17,54±0,946
Diurese (mL)	0,31±0,0503	0,35±0,088	0,24±0,061
Massa fecal (g)	0,795±0,0299	0,755±0,049	0,607±0,031

Legenda: Os valores representam à média e E.P.M. da massa corporal (A), peso da ração consumida (B), volume de água consumido (C), massa fecal excretada (D) e volume de urina excretado (E), n = 03. n – representa o número de animais em cada grupo. p < 0,05 teste *versus* grupo controle (C.N.) (ANOVA e *Neuman-Keuls* como *post hoc* teste).

A excreção urinária dos camundongos demonstrou pequenas variações no decorrer dos 14 dias. Entretanto, não houve diferença estatisticamente significativa ($p > 0,05$) na eliminação renal, assim como na excreção fecal, entres os grupos dos animais que receberam agatisflavona (300, 2000 mg/Kg) e o grupo controle (Tween 80 0,05% dissolvido em solução salina 0,9%), o que propõe que estas oscilações ocorreram, possivelmente, por variáveis relacionadas a fatores individuais do animal, estresse e/ou consumo de água (WAN et al., 2015).

Como relatado anteriormente, os dados mostram que o tratamento v.o da agatisflavona não produz efeitos tóxicos que levem a morte do animal em teste. Além disto, as doses elevadas não ocasionaram depressão do sistema nervoso central (SNC), o que influenciaria o comportamento dos camundongos *Swiss* adultos. Resultados estes confirmados pelos achados obtidos no 1°, 7° e 14° dia, pelo teste de campo aberto e da barra giratória (*rota rod*) (**Tabela 11**).

Como evidenciado na **Tabela 11**, a agatisflavona, nas doses de 300 e 2000 mg/Kg (v.o), não possui efeito significativo ($p > 0,05$) nos parâmetros analisados no teste campo aberto (número de cruzamento, de auto-limpeza e levantamento) e na barra giratória (número de quedas) quando comparado ao grupo controle. Isto aponta que, nos dias em que se realizou os testes (1°, 7° e 14° dia após tratamento), o biflavonoide estudado não demonstrou efeito importante no comportamento do animal em relação à ansiedade, exploração, estresse e conflito com o ambiente novo e em sua coordenação motora.

Tabela 11: Resultados do teste campo aberto e teste de barra giratória (*rota rod*) realizados por camundongos *Swiss* após administração oral única da agatisflavona

TESTE	CAMPO ABERTO			ROTA-ROD
	Número de:	Cruzamento	Levantamento	Autolimpeza
Grupo Controle (C.N.)				
1° Dia	49±6,360	16,67±2,728	5±1,856	0±0,0
7° Dia	78±1,202	20,00±4,726	8±0,577	1±0,666
14° Dia	53±2,517	23,33±7,513	12±1,453	0±0,0
Grupo 300 mg/Kg				
1° Dia	75±1,453	18,33±2,404	4±1,202	1±0,333
7° Dia	94±5,608	26,33±4,485	8,±1,155	1±0,0
14° Dia	84±0,333	22,67±3,712	9±0,577	1±0,333
Grupo 2000 mg/Kg				
1° Dia	61±8,743	12,67±0,881	10±1,453	0±0,0
7° Dia	77±8,888	13,00±1,732	7±1,155	0±0,0
14° Dia	74±1,155	13,33±3,756	9±1,732	0±0,0

Legenda: Avaliação comportamental realizado no 1°, 7° e 14° dia, por meio do teste campo aberto em camundongos fêmeas *Swiss*, tratados por v.o de forma aguda com veículo (Controle, n = 03) e com agatisflavona nas doses 300 e 2000 mg/Kg (n = 03). n – representa o número de animais em cada grupo. Os valores representam a média e E.P.M. do número de comportamentos de autolimpeza (A), de levantamentos (B), de cruzamentos (C) e de quedas em 03:00 minutos (*rota rod*) (D). $p < 0,05$ teste *versus* grupo controle (C.N.) (ANOVA e *Neuman-Keuls* como *post hoc* teste).

6.3.2 Toxicidade aguda em parâmetros bioquímicos e hematológicos

A avaliação dos parâmetros bioquímicos nos camundongos foi realizada por meio da determinação de seus níveis séricos: uréia, creatinina, alanina aminotransferase (ALT ou TGP), aspartato aminotransferase (AST ou TGO), glicose, colesterol total e ácido úrico; os mesmos não foram alterados nos animais tratados com agatisflavona, independente da dose.

A **Tabela 12** expõe os valores obtidos da avaliação dos parâmetros bioquímicos em camundongos *Swiss* submetidos aos ensaios toxicológicos não-clínicos, por v.o. Foram considerados como referência para avaliação dos dados os achados obtidos no grupo controle.

Houve pequenas alterações nos parâmetros analisados, principalmente na média do valor do ácido úrico do grupo que recebeu a dose de agatisflavona 2000 mg/Kg. Dessa forma, apesar de não se observar diferença estatisticamente significativa ($p > 0,05$) entre os grupos teste (agatisflavona 300 e 2000 mg/Kg) e o grupo controle (C.N.) (**Tabela 12**), essas variações possuem indicativos de importância clínica.

Tabela 12: Resultados dos parâmetros bioquímicos de camundongos *Swiss*, tratados com agatisflavona por via oral.

Parâmetros	Controle (n=3)	Agatisflavona 300 mg/Kg (n=3)	Agatisflavona 2000mg/Kg (n=3)
Glicose (mg/dL)	193,70±14,71	210,00±8,327	190,30±4,807
Ureia (mg/dL)	40,67±1,453	38,33±8,647	34,67±7,796
Creatinina (mg/dL)	0,23±0,0	0,26±0,015	0,22±0,014
Ácido úrico (mg/dL)	1,99±0,701	1,65±0,700	4,04±0,554
AST/TGO (UI/L)	166,30±13,93	167,70±14,22	165,3±11,57
ALT/TGP (UI/L)	55,33±8,819	65,00±6,429	44,33±4,631
Colesterol total	71,00±7,095	83,67±7,881	76,67±6,566

Legenda: Parâmetros bioquímicos obtidos do soro de camundongos fêmeas *Swiss*, tratados de forma aguda por via oral com veículo (Controle, n = 03) e com agatisflavona nas doses 300 mg/Kg (n =03) e 2000 mg/Kg (n =03). 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–Newman–Keuls* como *post hoc* teste).

Após 14 dias da administração da substância (v.o), foi observado nos animais que receberam a dose de 2000 mg/Kg da agatisflavona um aumento nos níveis séricos de ácido úrico (4,04±0,554 mg/dL) em relação aos camundongos que receberam veículo (1,99±0,701 mg/dL). Porém, estes animais apresentaram diminuição nos níveis de ureia (34,67±7,796 mg/dL) e creatina (0,22±0,014 mg/dL) em comparação ao controle (40,67±1,453 mg/dL; 0,23±0,0 mg/dL, respectivamente) (**Tabela 12**).

A análise de parâmetros sanguíneos foi relevante para a avaliar as possíveis alterações do sistema hematológico promovidas pela agatisflavona. A **Tabela 13** exhibe os valores dos resultados encontrados do hemograma (eritrograma e leucograma) no material coletado dos animais.

Os camundongos *Swiss* tratados com as doses de 300 e 2000 mg/Kg (v.o) da agatisflavona apresentaram todos os parâmetros hematológicos próximos aos do grupo de referência (veículo; Tween 80 0,05% dissolvido em solução salina 0,9%). Entretanto, embora não se constatar diferença estatisticamente significativa (p > 0,05) entre os grupos, pôde-se observar alterações relevantes no valor das plaquetas, dos linfócitos e segmentados (diminuição) nos grupos testes (agatisflavona 300 e 2000 mg/Kg) e uma elevação no nível de glicose em todos os animais testados, após 14 dias da administração do composto e veículo.

Tabela 13: Resultados dos parâmetros hematológicos de camundongos Swiss, tratados com agatisflavona por via oral

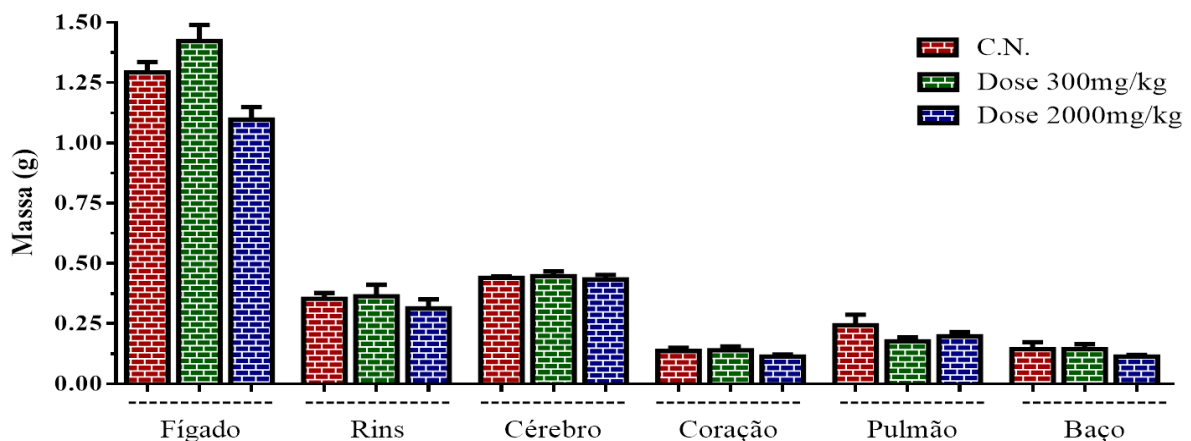
Parâmetros	Controle (n=3)	Agatisflavona 300mg/Kg (n=3)	Agatisflavona 2000mg/Kg (n=3)
Hemácias ($\times 10^6/\mu\text{L}$)	8,05 \pm 0,254	8,35 \pm 0,498	8,94 \pm 0,758
Hemoglobina (g/dL)	11,87 \pm 0,845	12,03 \pm 0,333	12,50 \pm 0,862
Hematócrito (%)	36,00 \pm 2,517	37,33 \pm 2,333	39,27 \pm 4,148
VCM (fL.)	44,33 \pm 1,764	44,67 \pm 0,333	43,67 \pm 1,764
CHCM (g/dL)	35,63 \pm 3,590	32,43 \pm 1,534	35,93 \pm 3,795
Plaquetas ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	871,00 \pm 34,27	664,00 \pm 36,35	495,00 \pm 34,11
Leucócitos totais	3300,00 \pm 400	3233,00 \pm 470,2	2057,00 \pm 144,5
Segmentados (%)	37,33 \pm 9,615	14,33 \pm 1,453	18,00 \pm 2
Linfócitos (%)	61,67 \pm 10,74	84,67 \pm 1,764	78,67 \pm 4,372

Legenda: Parâmetros hematológicos obtidos de camundongos fêmeas Swiss, tratados de forma aguda por via oral com veículo (Controle, n = 03) e com agatisflavona nas doses 300mg/Kg (n =03) e 2000 mg/Kg (n =03). 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-Newman-Keuls* como *post hoc* teste).

6.3.3 Estudo da toxicidade aguda da agatisflavona em parâmetros anátomo e histopatológicos

A **Figura 27** mostra as variações da massa (g) dos órgãos coletados em camundongos Swiss fêmeas após 14 dias da administração aguda da agatisflavona por v.o. Foram considerados como referência para avaliação dos dados os achados obtidos no grupo controle.

Figura 27: Variação do peso absoluto dos órgãos coletados em camundongos Swiss após 14 dias da administração aguda da agatisflavona por via oral

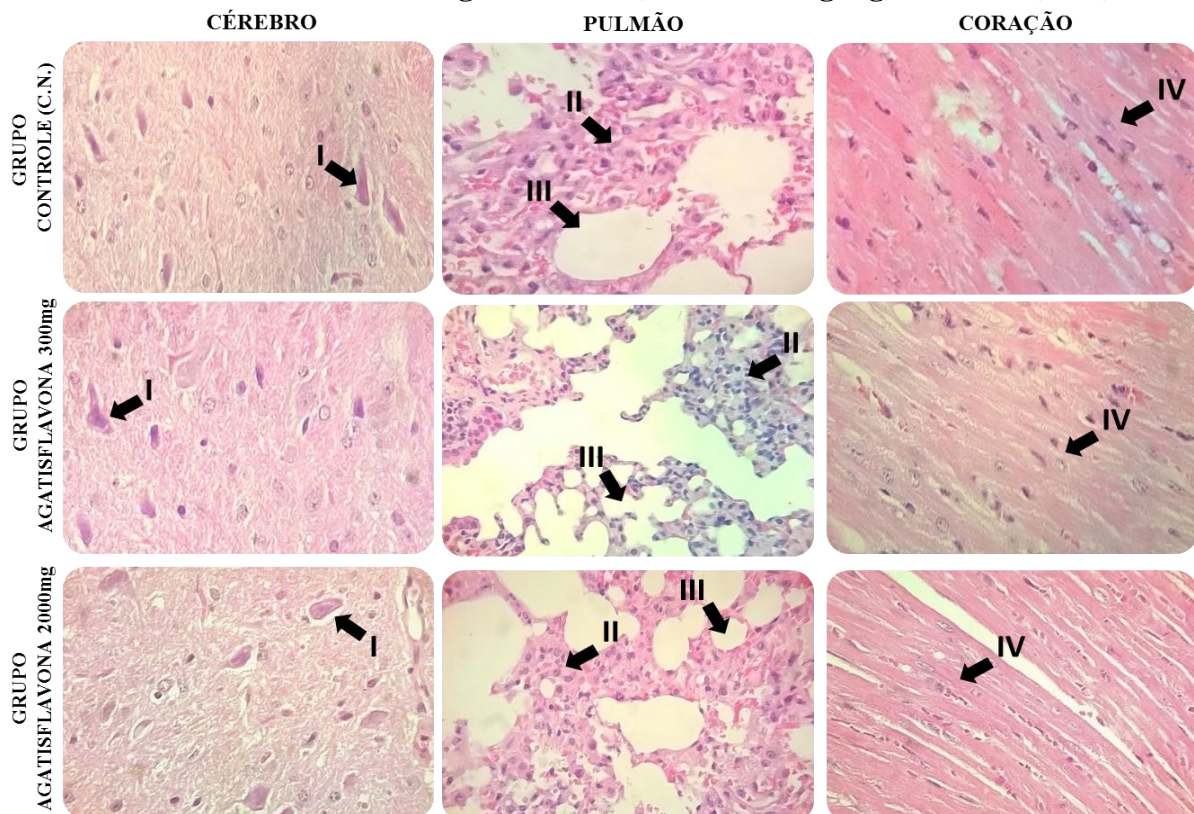


Legenda: Análise do peso dos órgãos coletados em camundongos fêmeas Swiss, tratados por via oral de forma aguda com veículo (Controle, n = 03) e com agatisflavona nas doses 300 e 2000 mg/Kg (n = 03). n – representa o número de animais em cada grupo. Os valores representam a média e E.P.M. da massa (g) dos órgãos coletados após 14 do tratamento. p < 0,05 teste *versus* grupo controle (C.N.) (ANOVA e *Neuman-Keuls* como *post hoc* teste).

Embora demonstre uma diminuição relativa no valor da média da massa (g) do fígado no grupo tratado com agatisflavona na dose de 2000 mg/Kg em relação ao grupo controle (veículo), não foi constatada nenhuma diferença significativa ($p > 0,05$) entre as massas dos órgãos coletados dos grupos testes, agatisflavona 300 mg/Kg (fígado: $1,42 \pm 0,066$ g, rins: $0,36 \pm 0,083$ g, cérebro: $0,44 \pm 0,022$ g, coração: $0,14 \pm 0,015$ g, pulmão: $0,17 \pm 0,016$ g e baço: $0,14 \pm 0,021$ g) e 2000 mg/Kg (fígado: $1,09 \pm 0,052$ g, rins: $0,31 \pm 0,065$ g, cérebro: $0,43 \pm 0,018$ g, coração: $0,11 \pm 0,008$ g, pulmão: $0,19 \pm 0,018$ g e baço: $0,11 \pm 0,006$ g) quando comparados ao controle (C.N.; fígado: $1,29 \pm 0,043$ g, rins: $0,35 \pm 0,041$ g, cérebro: $0,44 \pm 0,005$ g, coração: $0,13 \pm 0,013$ g, pulmão: $0,24 \pm 0,043$ g e baço: $0,14 \pm 0,029$ g) (**Figura 27**).

Nas amostras histopatológicas dos órgãos coletados tanto dos camundongos, nos quais foram tratados (v.o) com uma dose de 300 mg/Kg (n=3) e 2000 mg/Kg (n=3) do biflavonoide agatisflavona, quanto nos animais que receberam somente o veículo (n=3), não foram observados, após 14 dias da administração (v.o), alterações morfológicas ou lesões relevantes nos fígados, rins, corações, cérebros, baços e pulmões (**Figura 28 e 29**).

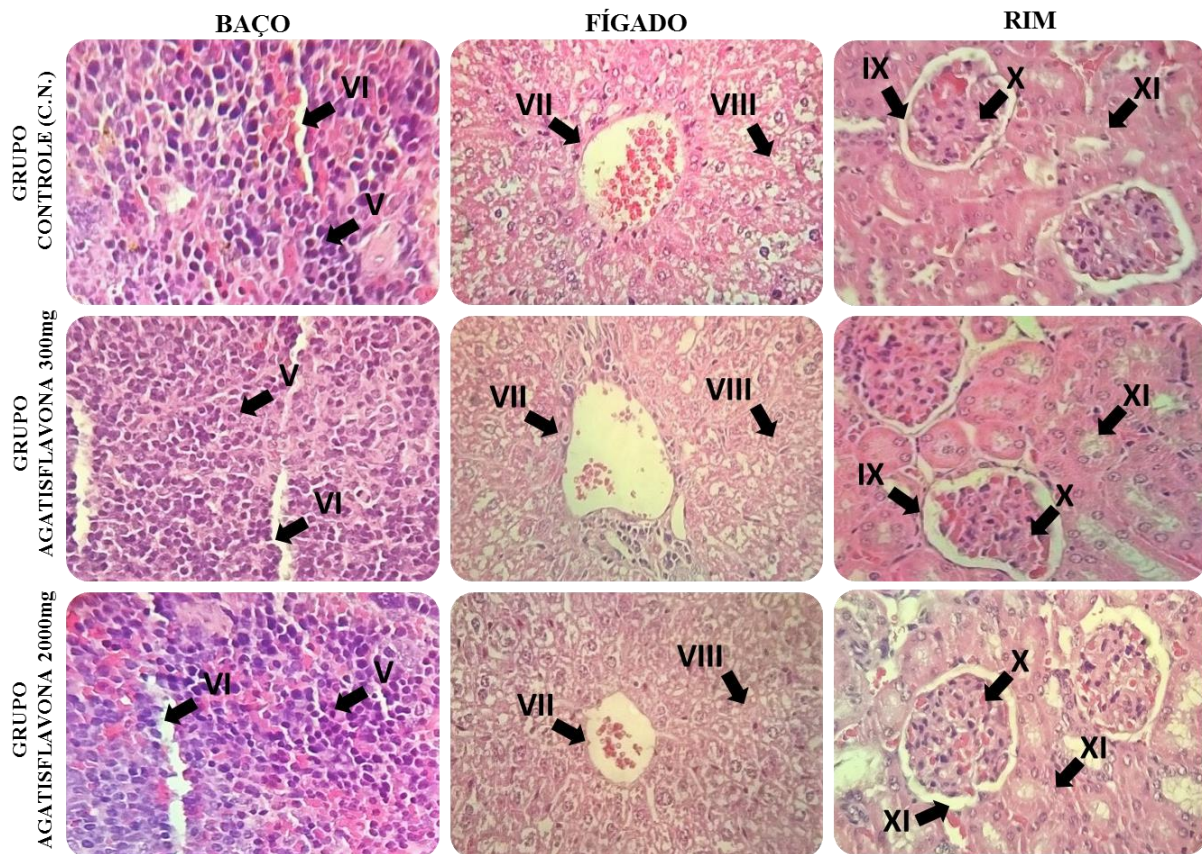
Figura 28: Avaliação histopatológica dos órgãos (cérebro, pulmão e coração) coletados dos animais tratados com agatisflavona (300 e 2000 mg/Kg) e veículo (C.N.).



Legenda: Morfologia do cérebro, pulmão e coração dos camundongos observados por 14 dias, não apresentando alterações histopatológicas após administração do veículo (Tween 80 0,05% dissolvido em solução salina 0,9%) e agatisflavona nas doses de 300 e 2000 mg/kg (v.o; n=3; Hematoxilina – Eosina (HE) X40; Barra de Escala = 10 μ m).

Na **Figura 28** é possível observar no tecido nervoso (substância cinzenta) a presença do corpo de neurônio (soma neuronal) com núcleo aparente e nucléolo não aparente (**I**). Além disto, no tecido respiratório verificam-se os bronquíolos respiratórios (**II**) com um epitélio cúbico simples, e os alvéolos (**III**), os quais constituem as últimas porções da árvore brônquica. O tecido cardíaco apresentou parênquima predominantemente formado de fibras musculares cardíacas (**IV**) com estriações transversais e núcleo central.

Figura 29: Avaliação histopatológica dos órgãos (baço, fígado e rim) coletados dos animais tratados com agatisflavona (300 e 2000 mg/Kg) e veículo (C.N.).



Legenda: Morfologia do baço, fígado e rim dos camundongos observados por 14 dias, não apresentando alterações histopatológicas após administração do veículo (Tween 80 0,05% dissolvido em solução salina 0,9%) e agatisflavona nas doses de 300 e 2000 mg/kg (v.o; n=3; Hematoxilina – Eosina (HE) X40; Barra de Escala = 10 µm).

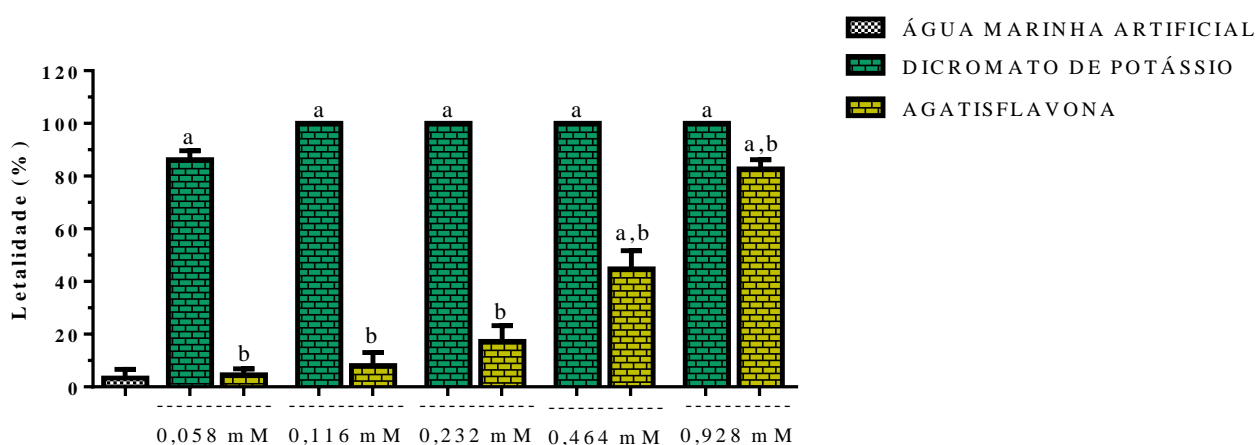
Nas amostras do baço, é visível a polpa vermelha com cordões de Billroth (**V**) e seios esplênicos (Sinusóides) (**VI**). No tecido hepático foi observada a região central do lóbulo hepático, composta principalmente pela veia centro-lobular (**VII**) com células epiteliais agrupadas em placas interconectadas e entre os cordões de hepatócitos (**VIII**) encontram-se os capilares sinusóides compondo o estroma hepático. Por fim, foi constatado no tecido urinário o corpúsculo renal formado pela cápsula de Bowman (**IX**) e pelo glomérulo de Malpighi (**X**)

repleto de hemácias e túbulo contorcido proximal com células cúbicas simples (XI) (Figura 29).

6.3.4 Citotoxicidade frente ao microcrustáceo *Artemia salina*

A taxa de letalidade (quantidades de larvas expostas x mortas) da exposição da *A. salina* às cinco concentrações (0,058 a 0,928 mM) da agatisflavona e dicromato de potássio no decorrer de 24 horas estão descritos na Figura 32.

Figura 30: Taxa de letalidade de *A. salina* em 24 horas na presença da agatisflavona e dicromato de potássio em diferentes concentrações.



Legenda: Os valores representam a média dos valores de mortes e E.P.M. das larvas, *in vitro*, $n = 10$, experimentos realizados em triplicata. ^a $p < 0,05$ teste *versus* grupo contendo somente água marinha artificial (controle negativo). ^b $p < 0,05$ teste *versus* grupo controle positivo (dicromato de potássio).

As médias de morte/letalidade das larvas para agatisflavona nas concentrações 0,058 mM, 0,116 mM, 0,232 mM, 0,464 mM e 0,928 mM foram, respectivamente, de $4,6 \pm 2,30\%$, $8 \pm 5,01\%$, $17,24 \pm 5,97\%$, $44,83 \pm 6,89\%$, $82,76 \pm 3,45\%$ em 24 hrs (Figura 30), apresentando concentração dependência. Quanto ao controle positivo (dicromato de potássio), apresentou 100% de letalidade (24 hrs) em todas as concentrações testadas, com exceção da concentração 0,058 mM ($86,21 \pm 3,45\%$ de letalidade, em 24 hrs).

Foi observado que em 24 horas a agatisflavona foi menos tóxica a *A. salina* do que o controle positivo, uma vez que, nas mesmas concentrações, verificou-se uma maior média de letalidade no grupo tratado com dicromato de potássio em comparação a média de letalidade no grupo tratado com agatisflavona ($p > 0,05$) (Figura 30).

O estudo revelou ainda que a agatisflavona, dentro do universo amostral, apresentou baixo número de mortes em 24 horas nas concentrações de 0,058 a 0,232 mM, não apresentando diferença estatisticamente significativa com o grupo controle negativo ($p \geq 0,05$). Porém, nas maiores concentrações testadas (0,464 e 0,928mM), é constatada de moderada a elevada a taxa de letalidade, havendo uma diferença estatisticamente significativa em relação ao controle negativo ($p < 0,05$) (**Figura 30**).

A partir destes dados é determinada então a CL_{50} (**Tabela 14**). Esta é definida como a concentração de um agente que em um meio causa a mortalidade ou inibe em cinquenta por cento (50%) a população exposta, durante um determinado período de tempo, podendo ser matematicamente calculada a partir da curva de concentração-efeito (GAD, 2014).

Tabela 14: Concentração letal média (CL_{50}) da agatisflavona e dicromato de potássio.

COMPOSTO	CL_{50} (mM)
Agatisflavona	0,400
Dicromato de Potássio	0,026

Esta mortalidade é decorrente de efeitos adversos resultantes da interferência da substância testada nas estruturas e/ou processos celulares essenciais para a sobrevivência, proliferação e/ou função comum a todas as células do organismo (GAD, 2014; EL FELS; HAFIDI; OUHDOUCH, 2016). O valor da CL_{50} encontrada neste estudo foi de 0,400 mM (**Tabela 14**) com o intervalo de confiança de 95%, variando de 0,292 para 0,548 mM.

6.4 Discussão

Nas condições desta pesquisa, a agatisflavona foi classificada na categoria 5 da GSH e estimado que sua DL_{50} seja maior ou igual a 5000 mg/Kg, podendo afirmar, assim, que a agatisflavona não possui toxicidade letal em baixas dosagens. Pongphasuk (2005) e Acuña (2012), em parceria com outros pesquisadores, realizaram estudos sobre o extrato metanólico dos frutos da espécie *Garcinia mangostana* Linn. Acuña e seus colaboradores (2012) efetuaram a identificação e classificação das substâncias presentes no extrato do fruto da *G. mangostana*. Os autores detectaram no extrato a presença de dois biflavonoides, a fukugesida e a fukugetina.

Pongphasuk, Khunkitti, Chitcharonthum (2005) realizaram um estudo de toxicidade subcrônica do extrato de *G. mangostana*. Para isto, os investigadores utilizaram ratos albinos divididos em 5 grupos de 7 animais (machos). Nos animais, durante de 30 dias, foram tratados (v.o), continuamente, 0,5 mL do extrato dissolvido em solução salina a 0,9%, nas doses de 1000, 2000, 4000 e 8000 mg/Kg. A DL_{50} foi estimada por análise de regressão linear e a partir da curva obtida os autores determinaram que DL_{50} do extrato de *G. mangostana*, o qual contém os biflavonoides fukugesida e a fukugetina como constituintes majoritários, foi de 9370 mg/Kg. Resultado este, assim como os encontrados na presente pesquisa e em outros estudos (HOSSEINZADEH et al., 2002; SREEKANTH et al., 2006; TCHAMADEU et al., 2011), confirma a ausência de efeitos tóxicos dos compostos biflavonoides (em baixas doses), dentre eles a agatisflavona, que levem a morte de modelos animais experimentais.

Nesta investigação, os testes do campo aberto (**Figura 25**) e *rota rod* (**Figura 26**) foram empregados para avaliar a atividade exploratória dos animais e a coordenação (incoordenação) motora e relaxamento muscular produzido pela agatisflavona nos camundongos *Swiss* (TOMAZ et al., 2014). Dessa forma, os valores dos parâmetros comportamentais analisados, como: os números de comportamento de autolimpeza, de levantamento, de cruzamentos e de quedas do animal na barra giratória (período de três minutos) dos camundongos tratados com agatisflavona na dose de 300 e 2000 mg/Kg foram semelhantes aos do grupo padrão (C.N.; veículo), indicando, portanto, que o composto testado não apresenta toxicidade a nível de SNC, visto que não inferiu alterações na coordenação motora (marcha e reflexo) e na “emocionalidade”, como: ansiedade, depressão e medo nos modelos experimentais (BIAGIONI et al., 2016).

Além das variações comportamentais, a toxicidade sistêmica de um composto pode ser manifestada por meio de alterações no desenvolvimento ponderal dos animais experimentais,

redução do consumo de água e ração e alterações na excreção de urina e fezes (PINTO et al., 2007). Partindo deste princípio e, ao verificar que quando comparados os dados do grupo controle com os grupos testes (agatisflavona nas doses de 300 e 2000 mg/Kg) nenhuma alteração referente aos parâmetros supracitados foi observada.

Do mesmo modo, os parâmetros hematológicos (hemácias, hemoglobina, hematócrito, VCM, CHCM, plaquetas, leucócitos totais, segmentados e linfócitos), cujos índices normais são critérios importantes para avaliar a extensão da homeostase, das alterações resultantes de processos patológicos e da toxicidade (OKONKWO et al., 2016), e bioquímicos (glicose, ureia, creatinina, ácido úrico, AST, ALT, e colesterol total) dos camundongos fêmeas *Swiss* tratados com a agatisflavona (300 e 2000 mg/Kg), não foi constatado diferença estatisticamente significativa ($p > 0,05$) entre os grupos.

Porém, foi constatado variações relevantes, quando comparados aos animais dos grupos referência (veículo), nos níveis de ácido úrico, plaquetas, leucócitos totais e segmentados, resultados que impedem a afirmativa de que o referido composto não apresenta toxicidade sistêmica aguda nas doses iguais ou inferiores a 2000 mg/Kg quando administrado oralmente. Dessa forma, faz-se necessária a realização de outros estudos de toxicidade, cujo tratamento com a substância seja por um período mais prolongado para afirmar se os resultados dos testes bioquímicos e hematológicos dos animais que receberam agatisflavona apresentam ou não relevância clínica.

O uso do biflavonoide agatisflavona, de forma aguda, não induziu lesões hepáticas, uma vez que não foram observadas alterações expressivas nos níveis séricos de AST e ALT, enzimas consideradas sensíveis sinalizadores de dano hepatocelular (BINDER et al., 2016) e nas amostras histológicas do fígado, implicando que a agatisflavona não é hepatotóxica. Efeitos estes condizentes com o exposto por Anand e colaboradores (1992), os quais investigaram a planta *Canarium manii* (Burseraceae) e relataram pela primeira vez nesta espécie a presença do biflavonoide agatisflavona. Os pesquisadores verificaram que, farmacologicamente, a agatisflavona em doses de 50 e 100 mg administrados v.o, apresentou atividade hepatoprotetora (dose dependente) contra lesões induzidas experimentalmente por tetracloreto de carbono (substância hepatotóxica) em ratos *Charles foster*.

Os valores do ácido úrico, juntamente com a da ureia e creatinina, forneceram indícios da função renal dos animais experimentais, cuja elevação de seus níveis plasmáticos indicam sinais de sobrecarga renal, insuficiência renal aguda ou, ainda, de aumento no catabolismo proteico (ADEBAYO et al., 2003). Apesar de ter constatado um aumento nos níveis de ácido úrico no grupo em tratados com a dose de 2000 mg/Kg, quando comparado ao grupo de

referência (veículo), os resultados encontrados no doseamento da ureia e creatinina e das análises das amostras histológicas dos rins permitem destacar que o biflavonoide agatisflavona nas doses iguais ou inferiores a 2000 mg/Kg não é uma substância nefrotóxica e, conseqüentemente, não promove danos e sobrecarga renal no modelo animal utilizado.

Os resultados da análise anátomo e morfológica do fígado, rins, cérebro, coração, pulmão e baço dos camundongos observados por 14 dias, não demonstram alterações relevantes após administração do veículo (Tween 80 0,05% dissolvido em solução salina 0,9%) e agatisflavona nas doses de 300 e 2000 mg/kg, dados estes que equiparam-se aos encontrados por Konan e Bacchi (2007). Os autores realizaram um estudo de toxicidade aguda em camundongos *Swiss*, machos e fêmeas, do extrato hidroalcoólico da folha do *Anacardium occidentale* L., na qual foi isolado outro biflavonoide com estrutura química semelhante a da agatisflavona, a amentoflavona. Os animais deste estudo não apresentaram sintomas tóxicos ou morte e a autópsia dos animais sobreviventes no final do período experimental não revelou alteração macro e microscópicas nos órgãos vitais coletados.

Todos estes achados assemelham-se aos de outras pesquisas feitas em roedores, com extratos contendo diferentes biflavonoides, por exemplo, o estudo feito por Tchamadeu e colaboradores (2011), os quais verificaram a toxidade aguda e subcrônica do extrato aquoso da casca da planta *Pterocarpus soyauxii* Taub em ratos *Wistar* saudáveis. Este extrato continha os biflavonoides santalina A, santarubinas A e B, os isoflavonoides pterocarpina, formononetina e prunetina, as isoflavonas vestitol e mucronulatol, dentre outros flavonoides. Os pesquisadores constataram que a administração v.o subcrônica do extrato aquoso de *P. soyauxii* nas doses de 150, 300 e 600 mg/Kg não demonstraram efeitos relevantes sobre o comportamento do animal e alterações histomorfológicas do pâncreas, fígado, rins e pulmão, nos índices hematológicos e bioquímicos, na ingestão de alimentos e água, na eliminação de fezes e urina nos ratos, exceto no peso dos animais (ganho de peso).

Em relação a esses parâmetros, os resultados encontrados pelos pesquisadores, assim como os da presente investigação, não apresentaram diferenças significativas ($p > 0,05$) entre os grupos que receberam as crescentes doses em relação ao controle negativo (dose 0 mg/Kg), o que corrobora a prerrogativa de que os flavonoides são compostos seguros em baixas doses.

Vários métodos aplicados para testar a toxicidade *in vitro* são úteis para predizer a toxicologia em geral. O bioensaio de toxicidade com *A. salina* (crustáceo da ordem Anostraca (sem carapaça) que vive em salinas e lagos de água salgada) é um teste simples, rápido, sensível e de baixo custo. Esse ensaio é atualmente aceito pela comunidade científica, pois permite uma avaliação preliminar da toxicidade de produtos naturais com potencial atividade

biológica, além de possibilitar a determinação de suas CL_{50} (CALDWELL; BENTLEY; OLIVE, 2003; EL FELS; HAFIDI; OUHDOUCH, 2016).

Quanto maior o valor de uma CL_{50} , menos tóxica é a substância frente a um organismo-teste. Segundo os valores da CL_{50} resultante dos trabalhos de Guimarães et al. (2010), Martins et al. (2014) e Gad (2014), são consideradas tóxicas, as substâncias que apresentam valores de CL_{50} abaixo de 1000 $\mu\text{g/mL}$ utilizando o organismo teste *A. salina*. A agatisflavona apresentou nesta pesquisa um valor da CL_{50} igual a 0,400 mM, variando de 0,292 para 0,548 mM o que equivale a 215,51 $\mu\text{g/mL}$, variando de 157,32 a 295,25 $\mu\text{g/mL}$.

Dessa forma, com base nas condições de estudo, a agatisflavona apresentou toxicidade frente a *A. salina*, sugerindo que esse biflavonoide possui alto potencial para atividades biológicas, visto que, o bioensaio com *A. salina* tem demonstrado em investigações anteriores uma boa correlação com a atividade antioxidante, citotóxica contra tumores humanos e ação contra o *Trypanosoma cruzi*, protozoário causador da doença de Chagas (ZANI et al., 1995; SANTOS PIMENTA et al., 2003; RAGHAVENDRA et al., 2010; MARTINS et al., 2014).

Miceli et al. (2011) avaliaram a citotoxicidade do extrato metanólico do fruto da planta *Juniperus drupacea* L. contra *A. salina*, cujo um dos componentes majoritário é o biflavonoide amentoflavona (mais de 60% dos compostos fenólicos totais). Os autores diluíram o extrato em água do mar artificial, obtendo soluções nas concentrações de 10, 100, 500 e 1,000 $\mu\text{g/mL}$. Uma alíquota de cada solução foi adicionado em frascos contendo 10 náupilos do microcrustáceo e 5mL de água artificial marinha.

Após 24 horas de incubação os frascos foram observados utilizando com auxílio de uma lupa e os náupilos sobreviventes foram contados e a CL_{50} foi determinada utilizando o método de análise probit. Miceli e seus colaboradores (2010) verificaram que extrato metanólico do *Juniperus drupacea* com alto percentual de amentoflavona apresentou moderada letalidade contra *A. salina* e CL_{50} igual a $489,47 \pm 27,8 \mu\text{g/mL}$, resultado este, assim como no presente estudo, sugere que os compostos analisados apresentam propriedades citotóxicas frente a *A. salina*.

Por fim, é interessante destacar que nenhuma investigação anterior a esta buscou avaliar a segurança do biflavonoide agatisflavona em modelos animais e *in vitro*, sendo este o primeiro trabalho a estimar a DL_{50} e a realizar o teste de toxicidade aguda com o referido composto, o que enfatiza a relevância desta pesquisa. Além disto, os dados encontrados auxiliarão no desenvolvimento de novos trabalhos sobre as potenciais propriedades farmacológicas da agatisflavona e/ou estudos toxicológicos desse biflavonoide.

6.5 Conclusão

O presente estudo fornece informações valiosas sobre os perfis de toxicidade aguda do biflavonoide agatisflavona. Conhecimentos estes que subsidiarão futuros estudos pré-clínicos e clínicos sobre a segurança e as potencialidades farmacológicas na via de administração estudada (via oral) de um produto farmacêutico desenvolvido, cujo princípio ativo seja a agatisflavona.

No teste *Artemia salina* a CL_{50} foi utilizada para revelar a concentração tóxica da agatisflavona. Este biflavonoide apresentou CL_{50} abaixo de 1000 $\mu\text{g/mL}$, demonstrando consequentemente a toxicidade frente aos náupilos de *A. salina*. Entretanto, é necessária a realização de mais investigações abordando outros modelos de toxicidade que corroborem os resultados deste estudo.

Nas doses de 300 e 2000 mg/Kg, administradas por via oral, a agatisflavona demonstrou ser não tóxica em camundongos *Swiss*, uma vez que não foi observada nenhuma morte nos grupos testes, além do fato de a agatisflavona não produzir alterações hematológicas, bioquímicas, comportamentais, fisiológicas e anátomo e histopatológicas estatisticamente significativas, quando comparadas ao grupo controle. Assim, este biflavonoide apresenta uma ampla margem de segurança para utilização por via oral no modelo animal utilizado.

REFERÊNCIAS

- ACUÑA, U. M.; DASTMALCHI, K.; BASILE, M. J.; KENNELLY, E. J. Quantitative high-performance liquid chromatography photo-diode array (HPLC-PDA) analysis of benzophenones and biflavonoids in eight *Garcinia* species. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 25, n. 2, p. 215–220, 2012.
- ADEBAYO, J. O.; YAKUBU, M. T.; EGWIM, E. C.; OWOYELE, V. B.; ENAIBE, B. U. Effect of ethanolic extract of *Khaya senegalensis* on some biochemical parameters of rat kidney. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 88, n. 1, p. 69–72, 2003.
- AJILEYE, O. O.; OBUOTOR, E. M.; AKINKUNMI, E. O.; ADEROGBA, M. A. Isolation and characterization of antioxidant and antimicrobial compounds from *Anacardium occidentale* L. (Anacardiaceae) leaf extract. **Journal of King Saud University - Science**, v. 27, n. 3, p. 244–252, 2015.
- 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.
- ANAND, K. K.; GUPTA, V. N.; RANGARI, V.; SINGH, B.; CHANDAN, B. K. Structure and hepatoprotective activity of a biflavonoid from *Canarium manii*. **Planta medica**, v. 58, n. 6, p. 493-5, 1992.
- ANVISA. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Resolução-RE N° 90, de 16 de março de 2004. Determina a publicação do guia para a realização de estudos de toxicidade pré-clínica de fitoterápico. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 2004.
- ANVISA. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Guia para a condução de estudos não clínicos de toxicologia e segurança farmacológica necessária ao desenvolvimento de medicamentos**. Gerência de Avaliação de Segurança e Eficácia, Brasília, DF, p. 1–48, 2013.
- ARAÚJO, M. F. DE; SANTOS, C. B.; CAVALCANTI, J. F.; FERNANDA, S.; MENDES, G. S.; WERLE, A. A.; et al. Proposed active compounds from *Ouratea parviflora*. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 5, n. 12, p. 2489–2493, 2011.
- BACHA, W.; BACHA, L. **Atlas color de Histología Veterinaria**. 2. ed. Madrid: Interamerican, 2003.
- BIAGIONI, A. F.; ANJOS-GARCIA, T. D.; ULLAH, F.; FISHER, I. R.; FALCONI-SOBRINHO, L. L.; FREITAS, R. L.; et al. Neuroethological validation of an experimental apparatus to evaluate oriented and non-oriented escape behaviours: comparison between the polygonal arena with a burrow and the circular enclosure of an open-field test. **Behav Brain Res**, v. 298, p. 65–77, 2016.
- BINDER, C.; KNIBBE, K.; KREISSL, A.; REPA, A.; THANHAEUSER, M.; GREBER-PLATZER, S.; et al. Does acute alcohol intoxication cause transaminase elevations in children and adolescents? **Alcohol**, v. 51, p. 57–62, 2016.

CALDWELL, G. S.; BENTLEY, M. G.; OLIVE, P. J. W. The use of a brine shrimp (*Artemia salina*) bioassay to assess the toxicity of diatom extracts and short chain aldehydes. **Toxicon**, v. 42, n. 3, p. 301–306, 2003.

EL FELS, L.; HAFIDI, M.; OUHDOUCH, Y. *Artemia salina* as a new index for assessment of acute cytotoxicity during co-composting of sewage sludge and lignocellulose waste. **Waste Management**, 2016.

GAD, S. C. LD50/LC50 (Lethal Dosage 50/Lethal Concentration 50). **Encyclopedia of Toxicology**, p. 58–60, 2014.

GUIMARÃES, A. G.; OLIVEIRA, G. F.; MELO, M. S.; CAVALCANTI, S. C. H.; ANTONIOLLI, A. R.; BONJARDIM, L. R.; et al. Bioassay-guided evaluation of antioxidant and antinociceptive activities of carvacrol. **Basic and Clinical Pharmacology and Toxicology**, v. 107, n. 6, p. 949–957, 2010.

HAL, W. M. L. G. G.; BLAAUBOER, B. J.; BARENTSEN, H. M.; HOITINK, M. A. An alternative approach for the safety evaluation of new and existing chemicals , an exercise in integrated testing q. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 42, p. 284–295, 2005.

HOSSEINZADEH, H.; RAMEZANI, M.; FADISHEI, M.; MAHMOUDI, M. Antinociceptive, anti-inflammatory and acute toxicity effects of *Zhumeria majdae* extracts in mice and rats. **Phytomedicine**, v. 9, n. 2, p. 135–141, 2002.

JONSSON, M.; JESTOI, M.; NATHANAIL, A. V; KOKKONEN, U.; ANTTILA, M.; KOIVISTO, P.; et al. Application of OECD Guideline 423 in assessing the acute oral toxicity of moniliformin. **Food and Chemical Toxicology**, v. 53, p. 27–32, 2013.

KONAN, N. A.; BACCHI, E. M. Antiulcerogenic effect and acute toxicity of a hydroethanolic extract from the cashew (*Anacardium occidentale* L.) leaves. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 112, p. 237–242, 2007.

KONAN, N. A.; LINCOPAN, N.; COLLANTES DÍAZ, I. E.; DE FÁTIMA JACYSSYN, J.; TANAE TIBA, M. M.; MENDES, J. G. P. A.; et al. Cytotoxicity of cashew flavonoids towards malignant cell lines. **Experimental and Toxicologic Pathology**, v. 64, n. 5, p. 435–440, 2012.

MALONE, M. H. **Pharmacological approaches to natural product screening and evaluation**. In: *New Natural Products and Plant Drugs with Pharmacological, Biological or Therapeutical Activity Proceedings in Life Sciences*.

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

MALONE, M. H.; ROBICHAUD, R. C. A. The pharmacological evaluation of natural products - General and specific approaches to screening ethnopharmaceuticals. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 8, p. 127–147, 1983.

MARTINS, R.; ARANTES, S.; CANDEIAS, F.; TERESA, M. Antioxidant , antimicrobial and toxicological properties of *Schinus molle* L . essential oils. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 151, n. 1, p. 485–492, 2014.

MCLAUGHLIN, J. L.; ROGERS, L. L. The use of biological assays to evaluate botanicals. **Drug Information Journal**, v. 32, p. 513–524, 1998.

MICELI, N.; TROVATO, A.; MARINO, A.; BELLINGHIERI, V.; MELCHINI, A.; DUGO, P.; et al. Phenolic composition and biological activities of *Juniperus drupacea* Labill. berries from Turkey. **Food and Chemical Toxicology**, v. 49, n. 10, p. 2600–2608, 2011.

OECD. ORGANISATION FOR ECONOMIC COOPERATION AND DEVELOPMENT. **Guidelines for the Testing of Chemicals, OECD 423. Acute oral toxicity: acute toxic class method.** Paris: Organisation for Economic Cooperation and Development, 2001.

OKONKWO, C. O. J.; EHILEBOH, A. D.; NWOBODO, E.; DIKE, C. C. The effects of acute gasoline vapour inhalation on some haematological indices of albino *Wistar* rats. **Journal of Acute Disease**, v. 5, n. 2, p. 123–125, 2016.

PAULSEN, B. S.; SOUZA, C. S.; CHICAYBAM, L.; BONAMINO, M. H.; BAHIA, M.; COSTA, S. L.; et al. Agathisflavone enhances retinoic acid-induced neurogenesis and its Receptors α and β in pluripotent stem cells. **Stem Cells and Development**, v. 20, n. 10, p. 1711–1721, 2011.

PINTO, V. M.; MELLO, F. B. DE; ROBERTO, J.; MELLO, B. DE. Avaliação toxicológica de preparação fitoterápica contendo *Piper methysticum* Forst Piperaceae (Kava Kava ®) sobre o desenvolvimento pré-natal em ratos *Wistar*. **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 26, n. 6, p. 818–824, 2007.

PONGPHASUK, N.; KHUNKITTI, W.; CHITCHAROENTHUM, M. Anti-inflammatory and analgesic activities of the extract from *Garcinia mangostana* Linn.. **Acta Horticulturae**, n. 680, p. 125–130, 2005.

RAGHAVENDRA, H. .; PRASHITH, K. T. .; VALLEESHA, N. .; SUDHARSHAN, S. .; CHINMAYA, A. Screening for cytotoxic activity of methanol extract of *Putranjiva roxburghii* Wall (Euphorbiaceae) seeds. **Pharmacognosy Journal**, v. 2, n. 10, p. 335–337, jun. 2010.

ROBERTS, R.; CALLANDER, R.; DUFFY, P.; JACOBSEN, M.; KNIGHT, R.; BOOBIS, A. Target organ pro files in toxicity studies supporting human dosing : Does severity progress with longer duration of exposure. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 73, n. 3, p. 737–746, 2015.

SAK, K. Cytotoxicity of dietary flavonoids on different human cancer types. **Pharmacognosy Reviews**, v. 8, n. 16, p. 122–146, 2014.

SANTOS PIMENTA, L. P.; PINTO, G. B.; TAKAHASHI, J. A; E SILVA, L. G. F.; BOAVENTURA, M. A D. Biological screening of *Annonaceous* Brazilian medicinal plants using *Artemia salina* (brine shrimp test). **Phytomedicine : international journal of phytotherapy and phytopharmacology**, v. 10, n. 2-3, p. 209–212, 2003.

SREEKANTH, P.; NARAYANA, K.; SHRIDHAR, N. B.; BHAT, A. Toxicity studies of *Calycopteris floribunda* Lam. in calf, rabbit and rat. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 107, n. 2, p. 229–233, 2006.

TCHAMADEU, M. C.; DZEUFIET, P. D. D.; NANA, P.; NOUGA, C. C. K.; TSOFAK, F.

N.; ALLARD, J.; et al. Acute and sub-chronic oral toxicity studies of an aqueous stem bark extract of *Pterocarpus soyauxii* Taub (Papilionaceae) in rodents. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 133, n. 2, p. 329–335, 2011.

TOMAZ, V. S.; CORDEIRO, R. C.; COSTA, A. M. N.; DE LUCENA, D. F.; NOBRE JÚNIOR, H. V.; DE SOUSA, F. C. F.; et al. Antidepressant-like effect of nitric oxide synthase inhibitors and sildenafil against lipopolysaccharide-induced depressive-like behavior in mice. **Neuroscience**, v. 268, p. 236–246, 2014.

VILLAIN, J.; MINGUEZ, L.; HALM-LEMEILLE, M.; DURRIEU, G. Acute toxicities of pharmaceuticals toward green algae . mode of action , biopharmaceutical drug disposition classification system and quantile regression models. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 124, p. 337–343, 2016.

WAN, D.; ZHOU, X.; XIE, C.; SHU, X.; WU, X.; YIN, Y. Toxicological evaluation of ferrous N-carbamylglycinate chelate: acute , sub-acute toxicity and mutagenicity. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 73, n. 2, p. 644–651, 2015.

WARHEIT, D. B.; BROWN, S. C.; DONNER, E. M. Acute and subchronic oral toxicity studies in rats with nanoscale and pigment grade titanium dioxide particles. **Food and Chemical Toxicology**, v. 84, p. 208–224, 2015.

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

ZANI, C. L.; CHAVES, P. P. G.; QUEIROZ, R.; DE OLIVEIRA, A. B.; CARDOSO, J. E.; ANJOS, A. M. G.; et al. Brine shrimp lethality assay as a prescreening system for anti-Trypanosoma cruzi activity. **Phytomedicine**, v. 2, n. 1, p. 47–50, 1995.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O biflavonoide agatisflavona possui propriedades antioxidantes contra radicais livres e agentes oxidantes, incluindo radicais DPPH[•], ABTS^{•+}, OH⁻, íons peróxidos, NO e demonstrou potencial redutor. Este biflavonoide revelou possuir toxicidade frente aos náupilos de *Artemia salina*, apresentando CL₅₀ igual a 0,400 mM.

O tratamento agudo com agatisflavona permitiu estimar que sua DL₅₀ seja maior ou igual a 5000 mg/Kg. Os resultados indicam ausência de toxicidade aguda, uma vez que a agatisflavona não produz alterações hematológicas, bioquímicas e histopatológicas no cérebro, fígado, pulmão, coração, rins e baço ou sequer modificações comportamentais no consumo de água e ração, no peso e excreção renal e fecal em camundongos adultos.

Dessa forma, este trabalho fornece subsídios para futuras pesquisas inovadoras sobre o efeito farmacológico, *in vivo* e *in vitro*, da agatisflavona, sobretudo no tratamento de distúrbios neurológicos como: depressão, esquizofrenia, doença de Parkinson e Alzheimer. Isso porque os danos oxidativos são amplamente considerados como um dos principais responsáveis pela degeneração cerebral ou por danos em outros órgãos.

Contudo, é necessária a realização de mais estudos abordando diferentes modelos de toxicidade e/ou animais experimentais que contribuam e reforcem os resultados obtidos nesta investigação, com o intuito de definir de forma mais precisa a dose segura desse biflavonoide em seres humanos.

8 PERSPECTIVAS

1. Os resultados obtidos configuram como estímulo e subsídio às pesquisas congêneres futuras em nível de graduação e pós-graduação que ampliem os achados científicos, trazendo novas experiências e desenvolvam novos estudos que possam reforçar a toxicidade da agatisflavona e elucidar os mecanismos de ação e a melhor aplicação desta substância.
2. Considerando-se a prospecção científica e os testes da atividade antioxidante *in vitro* da agatisflavona realizados neste estudo, é interessante aprofundar por meio de avaliações não-clínica e clínica a análise das propriedades desse composto em desordens que envolvam o sistema nervoso central como depressão, ansiedade, epilepsia, doença de Alzheimer, doença de Parkinson, ampliando assim as investigações farmacológicas desta substância, embasando o desenvolvimento de produtos derivados da agatisflavona.
3. A partir deste estudo pode-se avaliar a aplicação da agatisflavona a outras atividades farmacológicas e as citadas por esta investigação, ampliando o desenvolvimento tecnológico, e conseqüentemente o crescimento econômico científico do país, visto que são poucos os depósitos de patente de invenção em banco de dados tecnológicos nacional e internacionais.

9 PRODUÇÃO CIENTÍFICA NA VIGÊNCIA DO MESTRADO

Prêmios

- Menção Honrosa pela apresentação do trabalho na modalidade de Comunicação Oral em seção pública realizada durante VII Encontro Nacional de Farmácias Universitárias, Universidade Federal do Piauí. 2015.
- Menção Honrosa na Categoria: Qualidade Gráfica em seção pública realizada durante I Workshop Integração em Ciências Farmacêuticas e Saúde e I Congresso Nacional de Farmácia no Piauí (CONFARPI), CONFARPI. 2015.

Artigos completos publicados em periódicos

- ANDRADE, A.W.L.; MEIRELLES, L.M.A.; LINO, C.C.; COSTA, J.P. A importância das farmácias escolas em ações de farmacovigilância. Boletim Informativo Geum, v. 6, p. 78-81, 2015.
- ANDRADE, A.W.L.; MEIRELLES, L.M.A.; LIMA, E.F.B; SILVA, J.S.E.; COSTA, J.P. Síntese verde de nanopartículas de óxido de zinco utilizando extrato da flor de *Hibiscus sabdariffa* L.: uma revisão. Revista Integrada de Ciências Farmacêuticas e Saúde, v. 2, 2015.

Resumos expandidos publicados em anais de congressos

- COSTA, J. P.; SANTOS, P. S.; ANDRADE, A.W.L.; SOUSA, D.P.; FREITAS, R.M. Fitol um diterpenóide natural com aplicações farmacológicas para o sistema nervoso central: uma revisão. In: II Encontro Estratégico em Ciências Farmacêuticas e II Seminário Ibero Americano de P&D de Medicamentos, 2015, Teresina. Anais do II Encontro Estratégico em Ciências Farmacêuticas e II Seminário Ibero Americano de P&D de Medicamentos.. Teresina: EDUFPI, 2015. v. 2. p. 431-432.
- ANDRADE, A.W.L.; MEIRELLES, L.M.A.; COSTA, J.P. Application of nanostructured systems for release of drugs that act on the central nervous system: a review. In: I International Symposium on Drug Delivery Systems, 2015, Maringá. Ist International Symposium on Drug Delivery Systems: Proceedings. Maringá-PR, 2015. v. 1. p. 45-45.
- ANDRADE, A.W.L.; SANTOS, P.S.; FREITAS, R.M. ; COSTA, J.P. Agatisflavona um biflavonoide com aplicações farmacológicas para o sistema nervoso central: uma revisão. In: II Encontro Estratégico em Ciências Farmacêuticas e II Seminário Ibero Americano de P&D de Medicamentos, 2015, Teresina. Anais do II Encontro Estratégico em Ciências Farmacêuticas e II Seminário Ibero Americano de P&D de Medicamentos. Teresina: EDUFPI, 2015. v. 2. p. 369-370.

Apresentações de Trabalho


- ANDRADE, A.W.L.; SANTOS, P.S. ; FREITAS, R.M.; COSTA, J. P. Agatisflavona um biflavonoide com aplicações farmacológicas para o sistema nervoso central: uma revisão. 2015. (Apresentação de Trabalho/Congresso).

- ANDRADE, A.W.L.; MEIRELLES, L.M.A.; COSTA, J.P. Application of nanostructured systems for release of drugs that act on the central nervous system: a review. 2015. (Apresentação de Trabalho/Simpósio).
- ANDRADE, A.W.L.; MEIRELLES, L.M.A.; LINO, C.C.; COSTA, J.P. A importância das farmácias escolas em ações de farmacovigilância. 2015. (Apresentação de Trabalho/Congresso).
- ANDRADE, A.W.L.; COSTA, J.P.; LIMA, E.F.B.; SILVA, J.S.E.; MEIRELLES, L. M.A. Síntese verde de nanopartículas de óxido de zinco utilizando extrato da flor de *hibiscus sabdariffa*, uma revisão. 2015. (Apresentação de Trabalho/Congresso).
- ANDRADE, A.W.L.; REZENDE JUNIOR, L.M.; FREITAS, R.M.; COSTA, J.P. Avaliação da toxicidade da agatisflavona por meio do bioensaio com *Artemia salina*. 2015. (Apresentação de Trabalho/Workshop).


Produção técnica

- ANDRADE, A.W.L.; CARVALHO, R.M.; ARAUJO, R.F.M.; ALENCAR, M.V.O. B.; FREITAS, R.M. Anais do II Encontro Estratégico em Ciências Farmacêuticas e II Seminário Ibero Americano de P&D de Medicamentos. 2015. (Editoração/Anais).
- ANDRADE, A.W.L. II Encontro Estratégico em Ciências Farmacêuticas II Seminário Ibero Americano de P & D de Medicamentos I Simpósio Internacional de Farmácia Clínica. 2015. (Organização de Congresso).
- ANDRADE, A. W. L. IV Workshop de Projetos e Dissertações. 2015. (Organização de Evento).

ANEXOS

ANEXO A – Carta de aprovação do comitê de ética em experimentação animal - UFPI

MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA
COMITÊ DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL

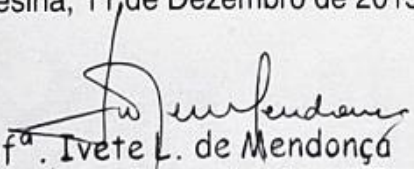


Campus Universitário Ministro Petrônio Portela, Bairro Ininga, Teresina, Piauí, Brasil; CEP: 64049-550
Telefone (86) 3215-5734 _e-mail: ceeapi@ufpi.edu.br

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "**Avaliação das propriedades farmacológicas sobre o sistema nervoso central de camundongos tratados com agatisflavona**", protocolo nº **041/15**, sob a responsabilidade da **Profa. Dra. JÉSSICA PEREIRA COSTA** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de Pesquisa Científica - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **Aprovado** pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFPI) da Universidade Federal do Piauí, em Reunião na presente data 11/12/2015.

Teresina, 11 de Dezembro de 2015.



Prof.ª Ivete L. de Mendonça
Comitê de Ética em Experimentação Animal-UFPI
Coordenadora

ANEXO B – Confirmação de submissão de artigo ao *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Science* (Qualis B3)

INTERNATIONAL JOURNAL OF PHARMACY AND PHARMACEUTICAL SCIENCES

[HOME](#) | [ABOUT](#) | [USER HOME](#) | [CURRENT](#) | [ARCHIVES](#) | [EDITORIAL BOARD](#) | [SUBMISSION](#) | [INSTRUCTIONS TO AUTHORS](#) | [CONTACT US](#)

Home > User > Author > Submissions > #7938 > Summary



INTERNATIONAL JOURNAL OF PHARMACY AND PHARMACEUTICAL SCIENCES

Current Issue
Past Issues
Articles in Press

Impact (Cites per doc)- 0.55 (SCImago, SJR 2014)- For details visit www.scimagojr.com and see option Journal Search
ICV (2011)- 5.00



Journal Metrics

Source Normalized Impact per Paper (SNIP): 0.643

Impact per Publication (IPP): 0.609

SCImago Journal Rank (SJR): 0.300

ISSN: 0975-1491

#7938 Summary

SUMMARY REVIEW EDITING SUBMISSION

Authors	Anderson Wilbur Lopes Andrade
Title	AGATHISFLAVONE, A BIOFLAVONOID WITH PHARMACOLOGY APPLICATIONS TO THE CENTRAL NERVOUS SYSTEM: THE CURRENT OVERVIEW
Original file	7938-24233-1-SM.PDF 2015-07-13
Supp. files	7938-24234-1-SP.PDF 2015-07-13 ADD A SUPPLEMENTARY FILE 7938-24235-1-SP.PDF 2015-07-13
Submitter	Sr. Anderson Wilbur Lopes Andrade
Date submitted	July 13, 2015 - 02:44 PM
Section	Review Article(s)
Editor	Editor IJPPS
Author comments	Dear Editor, We have just uploaded the file of our original manuscript entitled "Agathisflavone one biflavonoide with pharmacological applications for the central nervous system: A current overview", by First Author Andrade et al., for consideration of publication in the Journal as original article. By submitting the manuscript to the Journal, the authors understand that the material presented in this paper has not been published before nor has it been submitted for publication to another scientific journal or being considered for publication elsewhere. I attest that this work has been approved by all co-authors. The authors also understand that should the submitted material be accepted for publication in the journal, they will automatically transfer the copyright to the publisher. I hope that the reviewing process finds the manuscript acceptable for publication in the journal.

STATUS

Status	In Review
Initiated	2016-02-05
Last modified	2016-02-05

User

You are logged in as...
andersonwilbur

- [My Profile](#)
- [Log Out](#)

International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences

Indicator	2007-2014	Value
SJR		0.3
Cites per doc		0.55
Total cites		1715

www.scimagojr.com

[Back Issues](#)

[Subscription](#)

[Articles in Press](#)

Journal Content

Search


Search Scope

All

Browse

- [By Issue](#)
- [By Author](#)
- [By Title](#)

ANEXO C – Confirmação de submissão de artigo ao *Chemico-Biological Interactions Journal* (Qualis B1)

Chemico-Biological Interactions Contact us  Help ?  Maintenance outage on 14 August 2016 ... [more](#)
'My EES Hub' available for consolidated users ... [more](#)

home | [main menu](#) | [submit paper](#) | [guide for authors](#) | [register](#) | [change details](#) | [log out](#) Username: andersonwilbur@outlook.com
Switch To: [Author](#) Go to: [My EES Hub](#) Version: EES

Submissions Being Processed for Author Anderson Wilbur Lopes Andrade

Page: 1 of 1 (1 total submissions)

Display results per page.

 Action 	Manuscript Number 	Title 	Initial Date Submitted 	Status Date 	Current Status 
Action Links		Evaluation of the in vitro antioxidant properties of biflavonoid agathisflavone	Aug 13, 2016	Aug 13, 2016	Submitted to Journal

Page: 1 of 1 (1 total submissions)

Display results per page.
[<< Author Main Menu](#)