

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

FERNANDA COLOMBI CANSIAN



ABORDAGEM FITOQUÍMICA, AVALIAÇÃO FARMACOLÓGICA E ATIVIDADES
BIOLÓGICAS DE *Tynanthus micranthus* CORR. MELLO EX SCHUM.
(BIGNONIACEAE)

CURITIBA
2014

FERNANDA COLOMBI CANSIAN

ABORDAGEM FITOQUÍMICA, AVALIAÇÃO FARMACOLÓGICA E ATIVIDADES
BIOLÓGICAS DE *Tynanthus micranthus* CORR. MELLO EX SCHUM.
(BIGNONIACEAE)

Tese apresentada ao Programa de Pós Graduação em
Ciências Farmacêuticas, Setor de Ciências da Saúde,
Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial para a
obtenção do grau de Doutor (a) em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Marilis Dallarmi Miguel
Co-Orientador: Obdulio Gomes Miguel

CURITIBA
2014

Cansian, Fernanda Colombi

Abordagem fitoquímica, avaliação farmacológica e atividades biológicas de *Tynanthus micranthus* Corr. Mello ex Shum. (Bignoniaceae) Fernanda Colombi Cansian - Curitiba, 2014.

121 f. : il.(algumas color.) ; 30 cm

Orientador: Professora Dra. Marilis Dallarmi Miguel

Coorientador: Professor Dr. Obdulio Gomes Miguel

Tese (doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, Área de Concentração: Insumos, Medicamentos e Correlatos, 2014.

Inclui bibliografia

1. Cipó cravo. 2. Atividade afrodisíaca. 3. Dotriacontane. 4. Atividade antioxidante. 5. Atividade imunológica. I. Miguel, Marilis Dallarmi. II. Miguel, Obdulio Gomes. III. Universidade Federal do Paraná. IV. Título.

CDD 615.32

TERMO DE APROVAÇÃO


FERNANDA COLOMBI CANSIAN


Título: “Abordagem Fitoquímica, Avaliação Farmacológica e Atividades Biológicas de *Tynanthus micranthus* Corr. Mello Ex Schum (Bignoniaceae)”

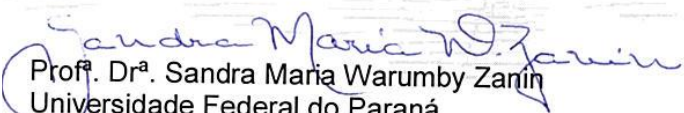
Tese aprovada como requisito parcial para a obtenção de grau de Doutor, no Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, da Universidade Federal do Paraná, área de concentração: Insumos, medicamentos e correlatos.


Profª. Drª. Marilis Dallarmi Miguel
Orientadora


Profª. Drª. Josiane de Fátima Gaspari Dias
Universidade Federal do Paraná


Profª. Drª. Deise Prehs Montrucchio
Universidade Federal do Paraná


Profª. Drª. Camila Aparecida Moraes Marques
Faculdades Integradas do Brasil


Profª. Drª. Sandra Maria Warumby Zanin
Universidade Federal do Paraná

Curitiba, 30 de outubro de 2014.

Dedico esse trabalho a meu Pai Jailson, a minha Mãe Sirlei, ao meu querido esposo Cássio, por estar sempre presente em todos os momentos importantes, e aos meus filhos Eduarda e Augusto que enchem minha vida de alegria.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente à Deus pela minha existência e capacidade de realizar os meus objetivos.

Ao meu esposo Cássio e meus filhos Eduarda e Augusto pelo apoio, incentivo, compreensão, amor e paciência nos momentos desafiantes.

Aos meus pais Jailson e Sirlei que lapidaram minha personalidade e me oferecem todo seu amor incondicional, assim como meus irmãos Clarissa e Juliano.

À Universidade Federal do Paraná e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas pela oportunidade.

À minha orientadora Prof^a Dr^a Marilis Dallarmi Miguel e co-orientador Prof. Dr. Obdulio Gomes Miguel pelos ensinamentos, paciência, confiança e amizade.

Ao Botânico Gert Hatschbach e Biólogo Osmar do S. Ribas pelas informações, identificação e depósito do exemplar da espécie em estudo.

Ao Sr. Eugênio e Sr^a Sara da Fazenda Água Azul de Quinta do Sol/PR pela coleta e envio do material vegetal.

Ao Departamento de Química e Bioquímica da Universidade Federal do Paraná pelos espectros de ressonância magnética nuclear.

À Professora Vera Lucia Lângaro Amaral e seu aluno Rafael Alonso Salvador, da Universidade do Vale do Itajaí, pela ajuda na realização dos experimentos com os animais.

À todos os colegas de mestrado, doutorado e iniciação científica dos laboratórios de farmacotécnica e fitoquímica, pela amizade, companheirismo e auxílio nos experimentos.

À todos os professores do programa e aqueles que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

“A menos que modifiquemos a nossa maneira de pensar, não seremos capazes de resolver os problemas causados pela forma como nos acostumamos a ver o mundo”.

(Albert Einstein)

RESUMO

O presente trabalho teve como objetivo, ampliar os conhecimentos a respeito da constituição química e atividades biológicas da espécie *Tynanthus micranthus* Corr. Mello ex Schum. (Bignoniaceae), além de verificar através de ensaios farmacológicos, a atividade afrodisíaca desta planta, conforme sua utilização popular. Após o preparo dos extratos brutos e frações: isolou-se por cromatografia em coluna da fração hexânica das folhas o Dotriacontane e verificou-se sua atividade imunológica através do ensaio com nitroazul de tetrazólio; avaliou-se a atividade hemolítica dos extratos brutos e frações frente hemácias de carneiro; analisou-se a atividade antioxidante das frações hidroalcoólicas remanescentes através de ensaios enzimáticos; e avaliou-se a influência do extrato bruto do caule e folhas sobre o comportamento sexual de camundongos machos adultos. A substância dotriacontane, identificada por Ressonância Magnética Nuclear, demonstrou ativar neutrófilos em todas as concentrações testadas. A fração hexânica do caule apresentou atividade hemolítica sobre hemácias de carneiro, resultado estatisticamente igual ao controle positivo. A fração hidroalcoólica das folhas protegeu os eritrócitos contra o estresse oxidativo, mantendo o nível das enzimas oxidativas em condições normais na análise antioxidante. Na avaliação da atividade afrodisíaca, os animais tratados com os extratos apresentaram uma diminuição sobre a latência de monta, aumento da frequência de monta e melhora na decisão de monta. Os resultados obtidos confirmam a importância em se aprofundar os estudos sobre esta espécie, pouco estudada, além de agregar indícios para a comprovação de sua utilização como planta afrodisíaca.

Palavras chave: Cipó cravo, Atividade afrodisíaca, Dotriacontane, Atividade antioxidante, Atividade imunológica, Atividade hemolítica.

ABSTRACT

This work aimed to expand knowledge about the chemical constitution and biological activity of the species *Tynanthus micranthus* Corr. Mello ex Schum. (Bignoniaceae), and verify through pharmacological tests, the aphrodisiac activity of this plant, as its popular use. After preparation of the crude extracts and fractions: from the hexane extract of the leaves was isolated by column chromatography the dotriacontane, which was tested for its immune activity by testing with nitroblue tetrazolium; the hemolytic activity of extracts and fractions was evaluated against sheep erythrocytes; the antioxidant activity of the remaining hydroalcoholic fractions was analyzed by enzymatic assays; and it was evaluated the influence of the crude extract of the stem and leaves on the sexual behavior of adult male mice. The dotriacontane substance, identified by Nuclear Magnetic Resonance, demonstrated activate neutrophils at all concentrations tested. The hexane extract of the stem showed hemolytic activity on sheep erythrocytes statistically equal to the positive control. The hydroalcoholic fraction of leaves protected the erythrocytes against oxidative stress maintaining the level of oxidative enzymes normal in antioxidant analysis. In assessing the aphrodisiac activity, animals treated with the extracts showed a decrease on the latency of mounts, increased frequency of mounts and improvement at the decision of mount. The results confirm the importance of deepening the studies on this species, little studied, as well as adding evidence to corroborate its use as an aphrodisiac.

Keywords: Clove vine, Aphrodisiac activity, Dotriacontane, Antioxidant activity, Immune activity, Hemolytic activity.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1 - PERCENTAGENS DOS NÚMEROS DE OCORRÊNCIA DE METABÓLITOS ESPECIAIS ENCONTRADOS EM BIGNONIACEAE.....	22
FIGURA 2 - MAPA DA VEGETAÇÃO DO ESTADO DO PARANÁ.....	30
FIGURA 3 - VISTA DO LOCAL DA COLETA.....	31
FIGURA 4 - ASPECTO GERAL DAS FLORES DE ESPÉCIES DA FAMÍLIA BIGNONIACEAE.....	32
FIGURA 5 - SISTEMA REPRODUTOR MASCULINO.....	33
FIGURA 6 - FISILOGIA NORMAL DA EREÇÃO.....	36
FIGURA 7 - BIOSÍNTESE DA TESTOSTERONA.....	39
FIGURA 8 - ESTRUTURA QUÍMICA DO CITRATO DE SILDENAFIL (VIAGRA®).....	42
FIGURA 9 - DEMONSTRAÇÃO ESQUEMÁTICA DO PLANEJAMENTO DO CITRATO DE SILDENAFIL.....	42
FIGURA 10 - RESULTADOS DA AVALIAÇÃO DA FUNÇÃO SEXUAL MANTIDA POR HOMENS TRATADOS COM SILDENAFIL E PLACEBO.....	43
FIGURA 11 - ESTRUTURAS QUÍMICAS DE CONHECIDAS SUBSTÂNCIAS COM EFEITO ADAPTÓGENO.....	52
FIGURA 12 - FLUXOGRAMA DAS ETAPAS DO TRABALHO.....	60
FIGURA 13 - IMAGEM DE SATÉLITE DO LOCAL DA COLETA.....	61
FIGURA 14 - FOTOGRAFIA DA EXSICATA DE <i>Tynanthus micranthus</i> Corr. Mello ex Schum.....	62
FIGURA 15 - ESPECTRO DE RMN ¹ H (CDCl ₃ , 200 MHz) DO DOTRIACONTANE.....	76
FIGURA 16 - AMPLIAÇÃO DA REGIÃO ENTRE 0,85 – 2,2 ppm DO ESPECTRO DE RMN ¹ H (CDCl ₃ , 200 MHz) DO DOTRIACONTANE COM DETALHE DE CADA DESLOCAMENTO QUÍMICO.....	76
FIGURA 17 - INTEGRAÇÕES DOS HIDROGÊNIO DO ESPECTRO DE	

	RMN ¹ H (CDCl ₃ , 200 MHz) DO DOTRIACONTANE, AMPLIADO NA REGIÃO ENTRE 0,85 – 2,2 ppm.....	77
FIGURA 18 -	ESPECTRO DE RMN ¹³ C (CDCl ₃ , 50 MHz) DO DOTRIACONTANE.....	78
FIGURA 19 -	AMPLIAÇÃO DA REGIÃO ENTRE 12 - 34 ppm DO ESPECTRO DE RMN ¹³ C (CDCl ₃ , 50 MHz) DO DOTRIACONTANE COM DETALHE DE CADA DESLOCAMENTO QUÍMICO.....	78
FIGURA 20 -	FÓRMULA ESTRUTURAL DE DOTRIACONTANE.....	79
FIGURA 21 -	FICHA DE ESPECIFICAÇÃO DO DOTRIACONTANE.....	80
FIGURA 22 -	IMAGENS DA ANÁLISE DE ATIVAÇÃO DE CÉLULAS DO SISTEMA IMUNOLÓGICO REALIZADO COM O DOTRIACONTANE ISOLADO DE <i>Tynanthus micranthus</i>	82
FIGURA 23 -	IMAGENS DA ANÁLISE DE ATIVAÇÃO DE CÉLULAS DO SISTEMA IMUNOLÓGICO REALIZADO COM DOTRIACONTANE COMERCIAL.....	83
FIGURA 24 -	PLACA UTILIZADA NA AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE HEMOLÍTICA DOS EXTRATOS DE <i>Tynanthus micranthus</i>	85
FIGURA 25 -	COMPARAÇÃO ESTATÍSTICA DOS PERCENTUAIS DE HEMÓLISE NA AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE HEMOLÍTICA DOS EXTRATOS BRUTOS E FRAÇÕES DE <i>Tynanthus micranthus</i>	88
FIGURA 26 -	ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DOS EXTRATOS HIDROALCÓLICOS DAS FOLHAS (HAF), CASCAS (HAC) E RAÍZES (HAR), E DOS PADRÕES CATEQUINA E QUERCETINA SOBRE AS ENZIMAS CATALASE, PEROXIDASE, SUPERÓXIDO DISMUTASE (SOD) E GLUTATIONA REDUZIDA (GSH) EM ERITRÓCITOS.....	90
FIGURA 27 -	ATIVIDADE PRÓ-OXIDANTE DOS EXTRATOS HIDROALCÓLICOS DAS FOLHAS (HAF), CASCAS (HAC) E RAÍZES (HAR), E DO OXIDANTE tBHP SOBRE A SOD E GSH EM ERITRÓCITOS.....	91
FIGURA 28 -	AVALIAÇÃO DO COMPORTAMENTO SEXUAL.....	93

FIGURA 29 - EFEITOS DE <i>Tynanthus micranthus</i> SOBRE A LATÊNCIA DE MONTA DE CAMUNDONGOS MACHOS.....	94
FIGURA 30 - EFEITOS DE <i>Tynanthus micranthus</i> SOBRE A DECISÃO DE MONTA DE CAMUNDONGOS MACHOS.....	94
FIGURA 31 - EFEITOS DE <i>Tynanthus micranthus</i> SOBRE O NÚMERO DE MONTAS DE CAMUNDONGOS MACHOS.....	95

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 -	COMPOSIÇÃO QUÍMICA E ESTUDOS RELACIONADOS COM AS ESPÉCIES DO GÊNERO <i>Tynanthus</i>	26
TABELA 2 -	ENQUADRAMENTO TAXONÔMICO DE <i>Tynanthus micranthus</i> CORR. MELLO EX SCHUM.....	28
TABELA 3 -	LOCAIS DE COLETA DE <i>Tynanthus micranthus</i> REGISTRADAS NO MISSOURI BOTANICAL GARDEN.....	29
TABELA 4 -	PLANTAS MUNDIALMENTE UTILIZADAS PARA OTIMIZAR A PERFORMANCE FÍSICA.....	49
TABELA 5 -	PRINCIPAIS PLANTAS BRASILEIRAS USADAS COM EFEITOS SEMELHANTES AOS DE UM ADAPTÓGENO.....	51
TABELA 6 -	UTILIZAÇÃO POPULAR DOS PRINCIPAIS ADAPTÓGENOS....	52
TABELA 7 -	PLANTAS AFRODISÍACAS E SEUS FLAVONOIDES E FENÓIS.....	54
TABELA 8 -	PLANTAS AFRODISÍACAS E SEUS ALCALOIDES, XANTINAS E OUTRAS AMINAS.....	55
TABELA 9 -	DADOS BIOLÓGICOS DE UM CAMUNDONGO SAUDÁVEL.....	58
TABELA 10 -	VALORES DE DESLOCAMENTOS QUÍMICOS (δ) DE RMN ^{13}C E ^1H PARA DOTRIACONTANE.....	79
TABELA 11 -	RESULTADO DAS ABSORBÂNCIAS OBTIDAS NA AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE HEMOLÍTICA DOS EXTRATOS BRUTOS E FRAÇÕES DE <i>Tynanthus micranthus</i>	86
TABELA 12 -	RESULTADO DO PERCENTUAL DE HEMÓLISE NA AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE HEMOLÍTICA DOS EXTRATOS BRUTOS E FRAÇÕES DE <i>Tynanthus micranthus</i>	87
TABELA 13 -	EFEITO DE <i>Tynanthus micranthus</i> NO COMPORTAMENTO DE MONTA DE CAMUNDONGOS (SWISS) MACHOS ADULTOS.....	93

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

AEC	– Fração acetato de etila caule
AEF	– Fração acetato de etila folha
AER	– Fração acetato de etila raiz
APG	– Angiosperm Phylogeny Group
CDCl_3	– Clorofórmio deuterado
CC	– Fração clorofórmio caule
CEUA	– Comitê de Ética no Uso de Animais
CF	– Fração clorofórmio folha
CLAE	– Cromatografia líquida de alta eficiência
COBEA	– Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
CR	– Fração clorofórmio raiz
DHEA	– Dehidroepiandrosterona
DL_{50}	– Dose letal média
DPPH	– 2,2- difenil-1-picril-hidrazila
EBC	– Extrato bruto do caule
EBF	– Extrato bruto da folha
EBR	– Extrato bruto da raiz
ECG	– Gonadotrofina coriônica equina
EDTA	– Ácido etilenodiamino tetra-acético
GSH	– Glutathiona reduzida
Hz	– Hertz
HAC	– Fração hidroalcoólica caule
HAF	– Fração hidroalcoólica folha

HAR	– Fração hidroalcoólica raiz
HC	– Fração hexano caule
HCG	– Gonadotrofina coriônica humana
HF	– Fração hexano folha
HR	– Fração hexano raiz
<i>J</i>	– Constante de acoplamento
λ	– Comprimento de onda
mM	– Milimolar
M	– Molar
N	– Normal
NaCl	– Cloreto de sódio
MBM	– Museu Botânico Municipal
NBT	– Nitroazul de tetrazólio
NO	– Óxido nítrico
PBS	– Tampão salina-fosfato
PDE	– Fosfodiesterase
PMA	– Acetato miristato de forbol
PPM	– Parte por milhão
SOD	– Superóxido dismutase
SPTZ	– Espermatozóide
<i>t</i> BHP	– Hidroperóxido de <i>tert</i> -Butila
RMN ¹³ C	– Ressonância Magnética Nuclear de Carbono 13
RMN ¹ H	– Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio
RPM	– Rotações por minuto
UI	– Unidade internacional

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
1.1 OBJETIVO GERAL.....	19
1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	19
2 REVISÃO DE LITERATURA	20
2.1 FAMÍLIA BIGNONIACEAE.....	20
2.1.1 Constituição química e atividades biológicas da família.....	21
2.2 GÊNERO <i>Tynanthus</i> Miers.....	25
2.3 <i>Tynanthus micranthus</i> CORR. MELLO EX SCHUM.....	27
2.4 FUNÇÃO SEXUAL MASCULINA.....	32
2.4.1 Anatomia e fisiologia sexual masculina.....	33
2.4.2 Espermatogênese.....	34
2.4.3 Ato sexual masculino.....	35
2.4.4 Controle hormonal da função sexual masculina.....	37
2.4.5 Disfunção erétil.....	39
2.4.5.1 Citrato de sildenafil.....	40
2.4.5.1.1 Outras aplicações do citrato de sildenafil.....	45
2.5 AGENTES NATURAIS UTILIZADOS PARA MELHORAR A PERFORMANCE SEXUAL.....	46
2.5.1 Adaptógenos.....	49
2.5.2 Química de plantas afrodisíacas.....	53
2.5.3 Animais de laboratório utilizados na avaliação de comportamento sexual.....	57
3. MATERIAL E MÉTODOS	60
3.1 ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DO COMPOSTO QUÍMICO ISOLADO.....	62
3.2 ATIVIDADE IMUNOLÓGICA DO COMPOSTO ISOLADO.....	63
3.2.1 Preparo das amostras.....	64
3.2.2 Preparo da técnica.....	65
3.3 ATIVIDADE HEMOLÍTICA.....	65
3.4 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE.....	67
3.4.1 Atividade da catalase.....	68

3.4.2 Atividade da peroxidase.....	68
3.4.3 Atividade da superóxido dismutase.....	69
3.4.4 Atividade da glutathiona reduzida.....	69
3.4.5 Calculo da atividade enzimática.....	70
3.4.6 Atividade pró-oxidante.....	70
3.5 AVALIAÇÃO DO COMPORTAMENTO SEXUAL.....	71
3.5.1 Animais e grupos experimentais.....	71
3.5.2 Preparação das fêmeas sexualmente receptivas.....	72
3.5.3 Filmagem dos animais.....	72
3.5.4 Parâmetros analisados.....	73
3.5.5 Análise estatística.....	74
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	75
4.1 IDENTIFICAÇÃO DO DOTRIACONTANE.....	75
4.2 ATIVIDADE IMUNOLÓGICA DO DOTRIACONTANE.....	81
4.3 ATIVIDADE HEMOLÍTICA.....	85
4.4 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE.....	89
4.5 AVALIAÇÃO DO COMPORTAMENTO SEXUAL.....	92
5 CONCLUSÃO.....	98
REFERÊNCIAS.....	100
ANEXOS.....	116

1. INTRODUÇÃO

O Brasil é um país rico na sua biodiversidade. Estima-se a existência de mais de dois milhões de espécies distintas de plantas, animais e microrganismos, sendo que 55.000 espécies vegetais estão catalogadas, de um total estimado entre 350.000 e 550.000 (SIMÕES *et al.*, 2007).

Tamanha riqueza biológica torna o Brasil uma fonte de substâncias biologicamente ativas uma vez que a maioria dos fármacos em uso clínico ou são de origem natural ou foram desenvolvidos por síntese química planejada a partir de produtos naturais. Muitos metabólitos secundários extraídos de plantas se tornam matérias primas valiosas para a produção de inúmeros medicamentos contemporâneos comprovando que a parceria entre químicos medicinais e químicos de produtos naturais é estratégica para a descoberta de fármacos inovadores (BARREIRO; BOLZANI, 2009).

A terapia com plantas medicinais e produtos fitoterápicos deixou de ser fundamentada apenas pelo uso tradicional e passou a ser apoiada por estudos científicos envolvendo os aspectos de qualidade, eficácia e segurança (CUNHA; SILVA; ROQUE, 2003). Por isso, a Organização Mundial da Saúde (OMS), tem promovido várias ações para desenvolver critérios que garantam a qualidade do tratamento com produtos naturais, considerando efeitos tóxicos e adversos que os mesmos possam causar ao usuário (BRASIL, 2006).

Uma planta é uma verdadeira usina química capaz de produzir milhares de substâncias diferentes, onde apenas uma ou algumas são responsáveis pela atividade terapêutica ou tóxica. Os testes biológicos e farmacológicos simples são importantes para localizar a atividade procurada no extrato da planta e nas numerosas frações obtidas nas diferentes etapas de purificação e separação (HOSTETTMANN; QUEIROZ; VIEIRA, 2003).

A atividade farmacológica de uma dada espécie geralmente está associada à presença de metabólitos secundários como, compostos fenólicos, alcalóides, terpenoides, entre outros, e esses metabólitos podem ser restritos a determinados taxons podendo caracterizar quimicamente grandes grupos vegetais (JUDD *et al.*, 1999).

Importantes atividades biológicas já foram testadas e confirmadas em diversos integrantes da família Bignoniaceae, e no gênero *Tynanthus*, duas espécies fazem menção ao potencial afrodisíaco, como *Tynanthus panurensis* (PLAZA *et al.*, 2005) e *Tynanthus fasciculatus* (LOPES *et al.*, 2008).

Uma diversidade de plantas vem sendo utilizadas desde tempos remotos com a finalidade de melhorar a performance física de homens e mulheres com alguma disfunção sexual (BUCCI, 2000). Como a busca por tratamentos alternativos para estas disfunções vem acontecendo de forma crescente, diversos estudiosos têm focado seus trabalhos em plantas medicinais utilizadas popularmente como afrodisíacas, na tentativa de comprovar tal atividade a partir de modelos animais (ROWLAND; TAI, 2003).

A deficiência na pesquisa sobre a espécie *Tynanthus micranthus* induziu ao aprimoramento dos estudos em torno da mesma. Este trabalho prioriza, além da avaliação das atividades biológicas, a exploração das propriedades afrodisíacas desta planta. Além disto, tentou-se avaliar os possíveis agentes causadores do efeito sobre o comportamento sexual, comparando-se os resultados dos ensaios fitoquímicos realizados, com evidências científicas de trabalhos semelhantes feitos com outras plantas.

1.1 OBJETIVO GERAL

Aprofundar o estudo fitoquímico e atividades biológicas e avaliar o comportamento sexual de camundongos adultos tratados com extrato bruto das folhas e caule de *Tynanthus micranthus*.

1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Isolar os constituintes químicos presentes na fração hexânica das folhas por meio de cromatografia em coluna;
- Identificar as substâncias isoladas por meio de RMN de ^1H e ^{13}C ;
- Verificar atividade imunológica de substância isolada por meio de ensaio de ativação de neutrófilos com nitroazul de tetrazólio (NBT);
- Avaliar a atividade hemolítica dos extratos brutos e frações frente às hemácias de carneiro;
- Verificar o potencial antioxidante das frações hidroalcoólicas remanescentes pela atividade das enzimas catalase, peroxidase, superóxido dismutase e glutathiona reduzida;
- Verificar o potencial pró-oxidante das frações hidroalcoólicas remanescentes pela atividade das enzimas superóxido dismutase e glutathiona reduzida;
- Avaliar a influência do extrato bruto do caule e das folhas sobre o comportamento sexual de camundongos adultos filmados após 1 e 3 horas do tratamento.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 FAMÍLIA BIGNONIACEAE

A família Bignoniaceae possui ampla distribuição nas regiões tropicais de todo o mundo, especialmente frequente nos trópicos americanos (JOLY *et al.*, 1985) e reúne 82 gêneros e 827 espécies (LOHMANN; ULLOA, 2007), geralmente espontâneas na América do Sul, incluindo árvores, lianas, arbustos e raramente ervas (DI STASI; HIRUMA-LIMA, 2002).

Análises filogenéticas de sequências de cloroplasto foram realizadas para inferir relações evolutivas na família Bignoniaceae e rever sua classificação. Oito grandes grupos ou clades foram reconhecidos, sendo eles Bignonieae, Catalpeae, Coleeae, Crescentieae, Jacarandaeae, Oroxyleae, Tecomeae e Tourrettieae. Duas clades, Bignonieae e Crescentiina, representam mais de 80% das espécies da família. Coleeae e Crescentieae são incluídos em clades maiores, a aliança Paleotropical e aliança Tabebuia, respectivamente (OLMSTEAD *et al.*, 2009).

A história taxonômica da família foi descrita em detalhes por Gentry (1980) e resumidos por Spangler e Olmstead (1999). Em classificação mais recente, Fischer, Theisen e Lohmann (2004) reconheceram sete das oito clades propostas por Gentry (1980): Bignonieae, Coleeae, Crescentieae, Eccremocarpeae, Oroxyleae, Tecomeae e Tourrettieae. Apenas Schlegelieae foi excluída do tratamento (OLMSTEAD *et al.*, 2009).

Esta família possui grande variedade de usos etnobotânicos e econômicos. São importantes para a indústria madeireira e são utilizadas como planta ornamental, além do seu grande potencial medicinal. Há relatos de 36 gêneros de Bignoniaceae que são utilizados na medicina popular, sendo 27 gêneros de lianas e nove de árvores (LOPES *et al.*, 2008).

No Brasil, os gêneros mais comuns são *Tabebuia*, que inclui os Ipês e o Pau-d'arco; *Pyrostegia*, da famosa Flor-de-São-João; a famosa medicinal Unha-de-Gato do gênero *Bignonia* e as várias espécies do gênero *Zeyhera* (DI STASI; HIRUMA-LIMA, 2002).

Destacam-se entre esta família, introduzidos e cultivados pelas lindas flores: *Tecomaria*, a falsa-flor-de-são-joão; *Podranea (Pandorea)*, trepadeira de flores cor-de-rosa; *Spathodea*, originária da África, é uma árvore grande com botões florais e enormes flores vermelhas (JOLY *et al.*, 1985).

Nos cerrados é relativamente comum um arbusto de flores amarelas, conhecido pelo nome popular de bolsa de pastor (*Zeyheria montana*) (SOUZA; LORENZI, 2005).

2.1.1 Constituição química e atividades biológicas da família

Os resultados obtidos em estudo realizado por Cipriani *et al.* (2012), o qual realizou um levantamento de dados sobre o perfil químico da família Bignoniaceae, mostra um gráfico (FIGURA 1) com valores percentuais de ocorrência de metabólitos nas espécies da família, entre eles, terpenoides, derivados aromáticos, quinonas, e flavonoides. Este estudo concluiu que a biossíntese dos metabólitos baseia-se, principalmente, na via do ácido acético, o que está de acordo com o posicionamento da mesma entre as angiospermas mais derivadas, e conclui ainda que, os iridóides se apresentam como verdadeiros marcadores taxonômicos para a família.

Dentre os grupos que tiveram investigações do ponto de vista químico, o Clade Paleotropical, com 20 gêneros e 150 espécies, é o mais estudado, sendo sua química dominada por derivados de cadeia longa da via do ácido acético e derivados aromáticos. Bignoniaceae também apresenta um grande número de registros sendo as principais ocorrências de terpenoides, juntamente com Tecomeae, cuja química também é caracterizada por terpenoides e *Tabebuia alliance*, cujo grupo é dominado por quinonas e terpenoides. Catalpeae apresenta principalmente quinonas na sua constituição química. Oroxyleae já é um grupo menos estudado quimicamente e apresenta, proporcionalmente em relação aos demais, a maior química flavonoídica. Jacarandae também é pouco estudado e caracterizado por terpenoides e derivados aromáticos especiais. Já o grupo Tourrettieae tem somente uma de suas espécies estudadas do ponto de vista químico e apresentou somente terpenoides (CIPRIANI *et al.*, 2012).

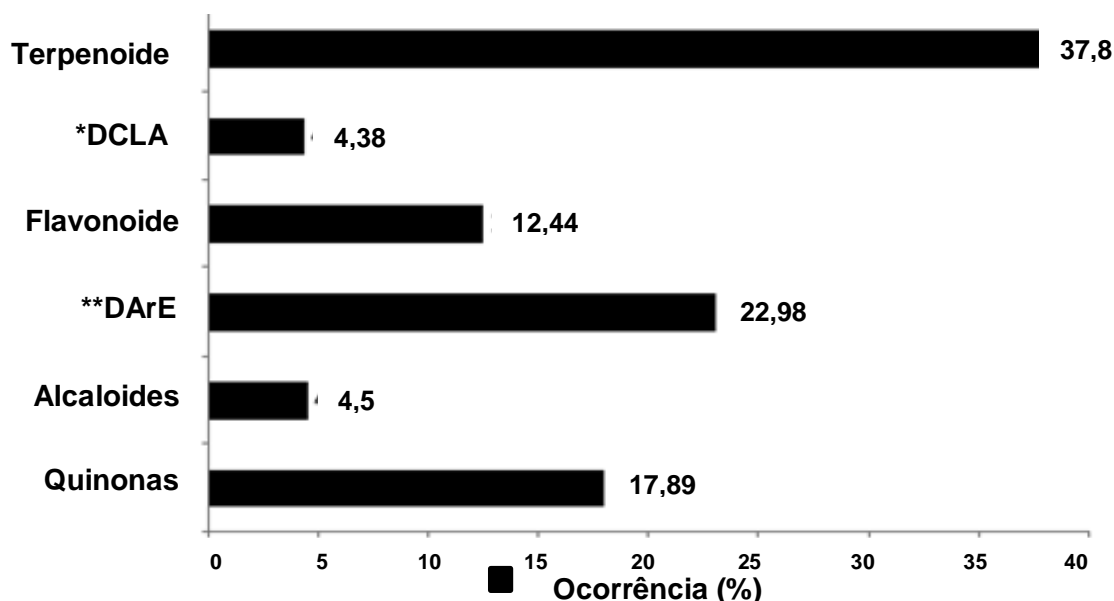


FIGURA 1 - PERCENTAGENS DOS NUMEROS DE OCORRENCIA DE METABOLITOS ESPECIAIS ENCONTRADOS EM BIGNONIACEAE

NOTA: *DCLA: derivados de cadeia longa da via do acetato; **DArE: derivados aromáticos especiais.

FONTE: CIPRIANI *et al.* (2012)

Importantes compostos já foram isolados de integrantes desta família, como o lapachol, que é uma substância de grande ocorrência na família Bignoniaceae, particularmente no gênero *Tabebuia* (*Tecoma*), juntamente com outras quinonas heterocíclicas não menos importantes do grupo (SILVA; FERREIRA; SOUZA, 2003). As diversas atividades biológicas do lapachol, como atividade citostática, bacteriostática, antifúngica, cercaricida, tripanossomicida e antitérmica e de seus produtos de transformações biossintéticas ou químicas despertou grande interesse pela química das plantas da família das Bignoniaceae (OLIVEIRA *et al.*, 1990).

Extratos etanólicos de dezoito espécies vegetais pertencentes à família Bignoniaceae, das quais sete são descritas como de uso medicinal, foram avaliados quanto a atividade citotóxica em células Vero, e antiviral frente aos vírus herpes simplex-tipo 1, vaccinia e encefalomiocardite murina. A maior parte dos extratos não apresentou citotoxicidade até a concentração de 500 µg/mL. Dos 28 extratos testados quatorze (50%) apresentaram atividade antiviral. Somente duas espécies, *Arrabidaea samydoides* e *Callichlamys latifolia*, foram ativas frente aos três vírus. Análises por CLAE mostraram que a mangiferina é o constituinte majoritário em *Arrabidaea samydoides* mas a substância isolada foi menos ativa do que o extrato bruto (BRANDÃO *et al.*, 2010).

Estudos ainda envolvendo *Arrabidaea samydoides* mostram que esta espécie apresenta atividade antitumoral, antifúngica e antioxidante. O estudo de Pauletti e Bolzani (2003), demonstrou que a atividade no reparo do DNA apresentada pelo extrato bruto desta espécie manteve-se até frações semi-purificadas, no entanto, as substâncias isoladas mostraram-se inativas. A investigação fitoquímica de *Arrabidaea samydoides* resultou no isolamento do lupeol, sitosterol, estigmasterol, crisina, $3\beta,16\alpha$ -diidroxi-olean-12-eno, eritrodíol, uvaol e ácido ursólico (PAULETTI; BOLZANI, 2003).

Arrabidaea chica Verlot, popularmente conhecida como “Pariri”, é tradicionalmente indicada para tratar sintomas de inflamações e afecções da pele. Seu extrato etanólico foi quimicamente investigado e testado contra leveduras e fungos dermatófitos, além da atividade tripanocida. O trabalho de Barbosa *et al.* (2008) reporta o isolamento de três flavonoides, o 4'-hidroxi-3,7-dimetoxiflavona, vicenina-2 e kaempferol. Demonstra ainda a inibição total do crescimento de *Trichophyton mentagrophytes* e um significativo efeito tripanocida do extrato etanólico e de suas frações. Não foi detectada qualquer toxicidade aguda relevante, mesmo a uma dose de 1000 mg/kg (BARBOSA *et al.*, 2008).

Jacaranda cuspidifolia Mart. conhecida popularmente como “caroba”, “jacarandá” ou “bolacheira”, é utilizada no tratamento da sífilis e da gonorréia. A atividade antimicobacteriana dessa espécie foi comprovada em ensaios *in vitro* com os extratos metanólicos das cascas e folhas. A análise fitoquímica revelou a presença de taninos, flavonoides, terpenos, cumarinas e esteroides. A análise dos perfis dos extratos metanólicos por cromatografia líquida de alta eficiência registrou a presença de compostos fenólicos derivados do verbascosídeo, sugerindo a provável responsabilidade pela ação antimicobacteriana (ARRUDA *et al.*, 2012).

A espécie *Jacaranda puberula*, conhecida popularmente como “carobinha”, apresentou atividade antibacteriana em parte de seus extratos o que pode justificar seu uso medicinal em feridas infectadas. Na amostra mais ativa, denominada PP1, foi detectada a maior concentração de triterpenos do tipo oleanano e ursano, dentre eles o ácido ursólico que possui atividade antibacteriana comprovada (SANTOS *et al.*, 2006). Estudos com esta mesma espécie foram realizadas por Santos *et al.* (2010) e demonstraram a atividade antioxidante da planta. Com base nos resultados das análises feitas por RMN de ^{13}C e ^1H e CLAE e de acordo com os dados da

literatura, a presença de substâncias fenólicas como o verbascosídeo e o aldeído *cis*-caféico, contribuíram para tal atividade antioxidante observada.

Os resultados obtidos para *Pyrostegia venusta* indicam que os extratos orgânicos (hexano, acetato de etila e metanol) apresentam ação alelopática, interferindo principalmente no desenvolvimento da raiz principal e na formação de raízes secundárias de *Cucumis sativus* (pepino). Por outro lado, o extrato hexano apresentou promissora atividade antimicrobiana contra *Enterococcus hirae* (0,5 mg/mL) enquanto o extrato acetato foi ativo contra *Candida albicans* (0,3 mg/mL) (SILVA *et al.*, 2011).

Na Amazonia Peruana, a espécie *Tynanthus panurensis* tem sido tradicionalmente usada como afrodisíaca, tônica e energizante, bem como analgésica e no tratamento de reumatismo e diabetes (PLAZA *et al.*, 2005). De acordo com Morales *et al.* (2011), o extrato das cascas de *Tynanthus panurensis* revelou possuir propriedades antioxidantes além de reduzir a peroxidação lipídica microsomal, a síntese de ácido úrico e produção de fator de necrose tumoral α . As propriedades anti-inflamatórias foram confirmadas *in vivo* exibindo potente atividade.

A análise fitoquímica do extrato metanólico da casca de *Tynanthus panurensis* levou ao isolamento de um novo glicosídeo fenilpropanóide, o eugenol - O- [â-D-xilopiranosil- (1f5)-O-â-D-apiofuranosil-(1f6)-O-â-D-glucopiranosídeo], aos conhecidos verbascosídeo, leucosceptosídeo e isoverbascosídeo e ao flavonoídeo catequimosídeo (apigenina 8-C-[â-D-xilopiranosil-(1f6)-â-D-glucopiranosídeo). O derivado do eugenol foi o glicosídeo fenilpropanoídeo mais abundantemente encontrado (PLAZA *et al.*, 2005).

Para a espécie *Tynanthus fasciculatus* foi avaliado o efeito da infusão do caule na biometria corporal e nos compartimentos tubular e intertubular do testículo de ratos Wistar, sendo comprovada sua atividade pelo aumento significativo no peso testicular, no peso do parênquima testicular e no volume e comprimento total dos túbulos seminíferos. Promoveu ainda um aumento na produção espermática diária total e na produção espermática por grama de testículo, além de influenciar outros parâmetros celulares avaliados no trabalho de Melo *et al.* (2010).

A espécie *Tynanthus fasciculatus* apresentou, conforme trabalho de Vilegas *et al.* (1993), cumarinas, fenilpropanoídeos e esteroides nos ramos, folhas, raízes e casca da raiz, sendo que um novo constituinte foi isolado, o β -sitosterol- β -D-glucosídeo. As cumarinas estão presentes em todas as partes de *Tynanthus*

fasciculatus e o ácido melilótico e seus derivados, que também estão presentes na planta, podem surgir das cumarinas ou vice versa (VILEGAS *et al.*, 1994). O trabalho de Carvalho *et al.* (2009a) menciona ainda a presença de taninos, flavonoides e heterosídeos cardiotônicos nos extratos estudados e avaliou a toxicidade dos mesmos sobre a *Artemia salina*, comprovando alta toxicidade do extrato aquoso ($DL_{50} = 43,4$ mg/L).

A espécie *Tynanthus guatemalensis*, comumente utilizada para diabetes na região do México (FERRIER *et al.*, 2013), foi avaliada com relação a sua atividade antimicrobiana, confirmando-se tal atividade frente ao *Bacillus cereus* (MIRANDA-CRUZ *et al.*, 2012). Em análise quantitativa dos metabólitos secundários desta planta, realizada pelo mesmo trabalho, destacou-se a presença de saponinas, antocianinas e flavonoides no caule.

A atividade anti-malárica foi avaliada com algumas espécies encontradas no Piemonte Andino da Bolívia incluindo *Tynanthus schumannianus*, tradicionalmente utilizada para estados diarreicos pela população local, e mostrou uma atividade *in vivo* moderada (49% a 510 mg/kg) contra estirpe de *Plasmodium falciparum* resistente à cloroquina e uma excelente atividade *in vitro* (98% a 10 mg/mL) contra *Plasmodium vinckei petteri* (MUÑOZ *et al.*, 2000).

2.2 GÊNERO *Tynanthus* Miers

A palavra *Tynanthus* deriva do grego: *tynnos*=pequeno; *anthos*=flor, com referência às suas flores muito pequenas (SANDWICH; HUNT, 1974).

Tynanthus foi originalmente descrito por Miers (1863), e o tratamento taxonômico mais compreensivo para o gênero foi realizado por Bureau (1868).

De acordo com Missouri Botanical Garden, The New York Botanical Garden e The Board of Trustees of the Royal Botanic Gardens (IPLANTS, 2014), são reconhecidas e registradas 15 espécies neste gênero, relacionadas na TABELA 1, que também mostra um resumo dos compostos químicos encontrados nestas espécies e outros estudos realizados até o momento com as mesmas.

TABELA 1 - COMPOSIÇÃO QUÍMICA E ESTUDOS RELACIONADOS COM AS ESPÉCIES DO GÊNERO *Tynanthus*

Espécie	Composição química	Estudos realizados
<i>Tynanthus cognatus</i> (Cham.) Miers	Sem referência	Morfoanatomia (LIMA; PACE; ANGYALOSSY, 2010). Identificação e localização (LOHMANN; ULLOA, 2007).
<i>Tynanthus croatianus</i> A.H. Gentry	Sem referência	Identificação e localização (LOHMANN; ULLOA, 2007).
<i>Tynanthus elegans</i> Miers	Sem referência	Estudo Fitossociológico (HORA; SOARES, 2002). Identificação e localização (LOHMANN; ULLOA, 2007).
<i>Tynanthus fasciculatus</i> (Vell.) Miers	Taninos, flavonoides e heterosídeos cardiotônicos (CARVALHO <i>et al.</i> , 2009a). Cumarinas, fenilpropanóides e esteroides (β -sitosterol- β -D-glucoside) (VILEGAS <i>et al.</i> , 1993). Coumarina, Estigmasterol, Ester acetil Melilotico, Ácido Melilotico, Ácido-O-B glucopiranoside Melilotico (melilotoside) VILEGAS <i>et al.</i> (1994).	Avaliação do crescimento de mudas (LOPES <i>et al.</i> , 2008). Fitoquímica (CARVALHO <i>et al.</i> , 2009a; VILEGAS <i>et al.</i> , 1993). Morfometria dos órgãos reprodutivos masculinos (MELO <i>et al.</i> , 2010). Identificação e localização (LOHMANN; ULLOA, 2007).
<i>Tynanthus goudotianus</i> Bureau	Sem referência	Identificação e localização (LOHMANN; ULLOA, 2007).
<i>Tynanthus guatemalensis</i> Donn. Sm	Saponinas, antocianinas e flavonoides no caule (MIRANDA-CRUZ, <i>et al.</i> , 2012). Ácido Benzoico derivado, Glicosídeo Fenilpropeno, Flavonoide C-glicosil, Fenilpropeno (FERRIER, 2014). catequimosídeo, verbascosídeo 4-hidroxibenzoato, Ácido salicílico e eugenol (FERRIER, 2014).	Perfil químico e atividade antimicrobiana (MIRANDA-CRUZ <i>et al.</i> , 2012). Diabetes (FERRIER <i>et al.</i> , 2013). Identificação e localização (LOHMANN; ULLOA, 2007).
<i>Tynanthus labiatus</i> (Cham.) Miers	Sem referência	Identificação e localização (LOHMANN; ULLOA, 2007).
<i>Tynanthus macranthus</i> L. O. Williams	Sem referência	Identificação e localização (LOHMANN; ULLOA, 2007).
<i>Tynanthus micranthus</i> Mello ex K. Schum	Isolados: β -sitosterol, apigenina; Grupos químicos: flavonoides (dihidroflavonóis e leucoantocianidinas), esteroides e/ou triterpenos, heterosídeos antraquinônicos, (CANSIAN <i>et al.</i> , 2012). Cumarinas voláteis, catequinas, taninos e saponinas (REICHERT, 2011). Eugenol (CUSTÓDIO <i>et al.</i> , 2010).	Atividade antimicrobiana do óleo essencial (CUSTÓDIO <i>et al.</i> , 2010). Morfoanatomia floral (SOUZA; SANTOS; MOSCHETA, 2010). Fitoquímica e atividades biológicas (CANSIAN <i>et al.</i> , 2012). Atividade alelopática (CANSIAN <i>et al.</i> , 2013). Atividade antioxidante e sobre a tirosinase (CANSIAN <i>et al.</i> , 2014). Identificação e localização (LOHMANN; ULLOA, 2007).
<i>Tynanthus panurensis</i> (Bureau) Sandwith	Glicosídeo fenilpropanóide (eugenol-O-[β -D-xilopiranosil-(1f5)-O- β -D-piofuranosil-(1f6)-O- β -D-glucopiranoside], Verbascoside, Leucosceptoside e Isoverbascoside e Flavonoide katchimoside (apigenina 8-C-[β -D-xilopiranosil-(1f6)- β -D-glucopiranoside]). (PLAZA <i>et al.</i> , 2005).	Atividade anti-oxidante e anti-inflamatória (MORALES <i>et al.</i> , 2011). Fitoquímica (PLAZA <i>et al.</i> , 2005). Identificação e localização (LOHMANN; ULLOA, 2007).
<i>Tynanthus polyanthus</i> (Bureau ex Baill.) Sandwith	Sem referência	Identificação e localização (LOHMANN; ULLOA, 2007).
<i>Tynanthus pubescens</i> A.H. Gentry	Sem referência	Identificação e localização (LOHMANN; ULLOA, 2007).
<i>Tynanthus sastrei</i> A.H. Gentry	Sem referência	Identificação e localização (LOHMANN; ULLOA, 2007).
<i>Tynanthus schumannianus</i> (Kuntze) A.H. Gentry	Sem referência	Atividade anti-malária (MUNOZ <i>et al.</i> , 2000). Identificação e localização (LOHMANN; ULLOA, 2007).
<i>Tynanthus villosus</i> A.H. Gentry	Sem referência	Identificação e localização (LOHMANN; ULLOA, 2007).

As espécies do gênero *Tynanthus* estão distribuídas pela América tropical, principalmente em florestas úmidas, estando presentes desde o México até o sul do Brasil abrangendo diversos países, como Costa Rica, Guatemala, Panamá, República Dominicana, Guiana Francesa, Venezuela, Bolívia, Equador, Peru, Colômbia, Argentina e Paraguai (REITZ, 1974; LOHMANN; ULLOA, 2007).

As plantas pertencentes a este gênero são lianas conhecidas popularmente como cipó-cravo, devido ao forte odor de “cravo-da índia” que exalam dos caules e folhas, quando cortados ou macerados, e são usadas na medicina tradicional, para os mais diversos fins (LOPES *et al.*, 2008), como por exemplo, no tratamento do reumatismo e diabetes, estimulante e afrodisíacos, carminativa e anti-helmintica, entre outras aplicações, sendo muitas destas propriedades já comprovadas por estudiosos do gênero (VILEGAS *et al.*, 1993; BRACK, 1999; FERRIER *et al.*, 2013).

Estas lianas, muito comuns entre as espécies da família Bignoniaceae, podem ser consideradas como plantas vasculares enraizadas no solo, o que mantêm seus caules em posição ereta, utilizando-se de outras plantas para o seu suporte (SOUZA; SANTOS; MOSCHETA, 2010).

Tynanthus fasciculatus e *Tynanthus panurensis* são duas espécies muito conhecidas e utilizadas popularmente no Brasil, já possuindo alguns estudos científicos realizados com as mesmas. A espécie *Tynanthus fasciculatus*, também conhecida como cipó-cravo, apresenta distribuição relativamente restrita, ocorrendo no Sudeste brasileiro, em Minas Gerais, São Paulo e Rio de Janeiro. *Tynanthus panurensis*, conhecida como "Clavo huasca" está presente na Floresta Amazônica e em outras partes tropicais da América do Sul (VILEGAS *et al.*, 1993; PLAZA *et al.*, 2005; LOPES *et al.*, 2008; MORALES *et al.*, 2011).

2.3 *Tynanthus micranthus* CORR. MELLO EX SCHUM.

A espécie *Tynanthus micranthus* é denominada Cipó-Cravo ou Craveiro e não possui sinonímia em levantamentos feitos no Missouri Botanical Garden e no Museu Botânico Municipal de Curitiba.

A TABELA 2 descreve o enquadramento taxonômico da espécie e seu nível de organização sugerido por dois autores, porém, mais recentemente a família Bignoniaceae foi transferida para a ordem Lamiales, com base em dados de filogenia molecular (APG, 2003).

De acordo com o sistema *Angiosperm Phylogeny Group* (APG), a espécie *T. micranthus* pertence ao clado das Angiospermas, divisão Eudicotiledônea Núcleo, grupo Asterideas, subgrupo Euasterideas I, ordem Lamiales e família Bignoniaceae (CHASE; REVEAL, 2009).

TABELA 2 - ENQUADRAMENTO TAXONÔMICO DE *Tynanthus micranthus* CORR. MELLO EX SCHUM

	CRONQUIST (1981)	ENGLER (JOLY, 1998)
Reino	Plantae	Plantae
Divisão	Magnoliophyta	Angiospermae (Anthophyta)
Classe	Magnoliopsida	Dicotyledoneae
Subclasse	Asteridae	Sympetalae (Gamopetalae)
Ordem	Scrophulariales	Tubiflorae
Família	Bignoniaceae	Bignoniaceae
Gênero	<i>Tynanthus</i>	<i>Tynanthus</i>
Espécie	<i>Micranthus</i>	<i>micranthus</i>
Nome	<i>Tynanthus micranthus</i>	<i>Tynanthus micranthus</i>

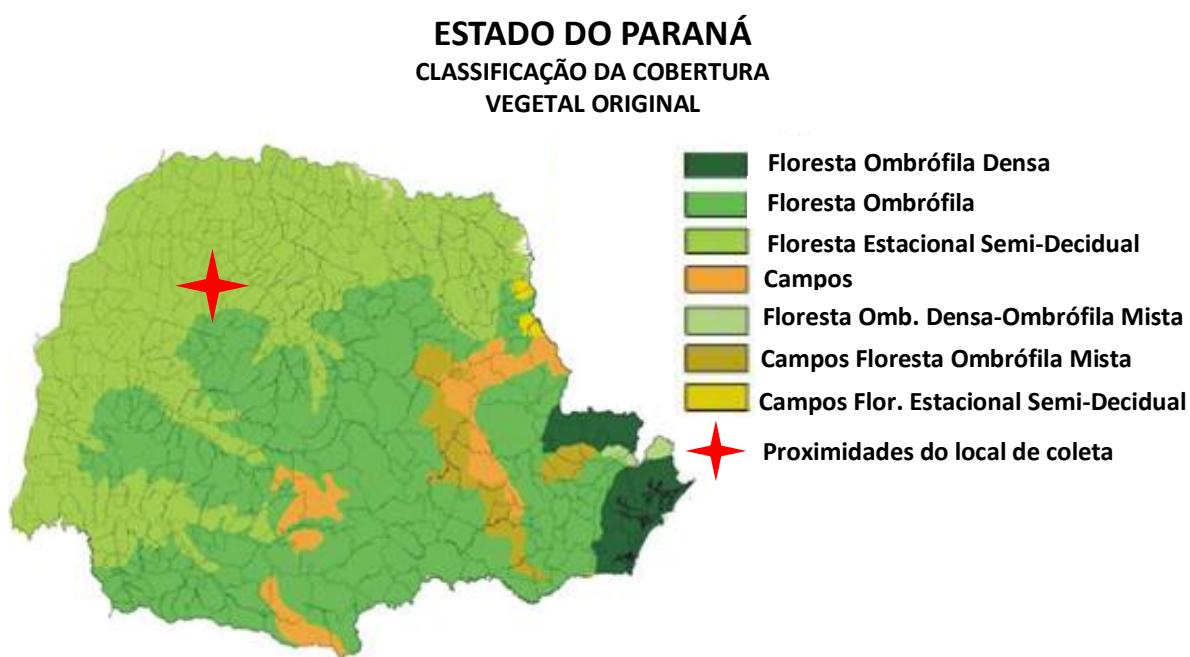
No Brasil, *Tynanthus micranthus* é principalmente encontrada no estado do Paraná e em outras localidades, inclusive Argentina e Paraguai, segundo dados extraídos do Missouri Botanical Garden e representados na TABELA 3.

O local onde foi realizada a coleta, região noroeste do Paraná, pertence ao terceiro planalto paranaense, cuja vegetação compõe a Floresta Estacional Semidecidual pertencente à Mata Atlântica (FIGURA 2).

TABELA 3 - LOCAIS DE COLETA DE *Tynanthus micranthus* REGISTRADAS NO MISSOURI BOTANICAL GARDEN

PAIS	ESTADO	DATA	COLETOR
Argentina	Missões	22/11/1994	Rivera, G. L., Prieto & P.
Argentina	Missões	09/12/1988	Guaglianone, E. R.
Argentina	Missões	11/08/1995	Vanni, R. O. & <i>et al.</i>
Brasil	Mato Grosso Sul	21/10/1987	G. Hatschbach & Silva, J.M.
Brasil	Paraná	24/10/1985	Vieira, A.O.S. <i>et al.</i>
Brasil	Paraná	27/09/1985	Ejasuta, H.
Brasil	Paraná	16/05/2003	O. S. Ribas
Brasil	Paraná	13/10/1962	Gert Hatschbach
Brasil	Paraná	14/10/1965	Gert Hatschbach
Brasil	Paraná	10/1969	Gert Hatschbach
Brasil	Paraná	11/1966	Lindeman, J.C. & Haas
Brasil	Paraná	24/11/1966	Lindeman, J.C. & Haas
Brasil	Paraná	02/10/1985	Chagas, F. & Silva, J.F.
Brasil	Rondônia	18/11/1949	Silva, A. da
Brasil	São Paulo	30/09/1867	Méllo, J.C. de
Brasil	Paraná	22/10/1969	Gert Hatschbach
Paraguai		27/10/1978	Bernardi, A.L.
Paraguai	Alto Paraná	14/10/1996	Schinini, A., Dematteis, M.

FONTE: MOBOT (2012)

FIGURA 2 - MAPA DA VEGETAÇÃO DO ESTADO DO PARANÁ
FONTE: NOWATZKI (2013)

Alguns estudos já envolvem a espécie e referem-se a aspectos fitoquímicos e atividades biológicas. O fitoesteroide β -sitosterol e a flavona apigenina foram isolados das partes de *Tynanthus micranthus* que também indicaram, nos testes preliminares, a presença de grupos químicos como flavonoides (diidroflavonóis e leucoantocianidinas), esteroides e/ou triterpenos e heterosídeos antraquinônicos (CANSIAN *et al.*, 2012). Estudos realizados por Reichert (2011) indicaram ainda a presença de cumarinas voláteis, catequinas, taninos e saponinas.

Algumas atividades biológicas dos extratos brutos e frações de *Tynanthus micranthus* foram testadas, entre elas, atividade alelopática, antibacteriana, antioxidante, toxicidade frente à *Artemia salina* e avaliação frente à enzima tirosinase (CANSIAN, 2010).

Na atividade alelopática verificou-se a influência da fração clorofórmica do caule na germinação e crescimento do hipocótilo das sementes de *Lactuca sativa* (CANSIAN *et al.*, 2013). Algumas frações desenvolveram toxicidade frente à *Artemia salina* em determinadas concentrações além de exercer atividade antioxidante similar à rutina. Na atividade antimicrobiana evidenciou-se a atividade do extrato bruto da raiz contra *E. coli*, do extrato bruto do caule contra *S. aureus*, *P. aeruginosa* e *E. coli* e do extrato bruto das folhas contra *S. aureus* e *P. aeruginosa*, todas com concentração inibitória mínima de 1000 $\mu\text{g/mL}$ (CANSIAN *et al.*, 2012).

Outros estudos realizados com a espécie mostraram que a fração hidroalcoólica remanescente das folhas apresentou atividade estimulatória frente à enzima tirosinase na concentração de 100 $\mu\text{g/mL}$ e a mesma fração mostrou capacidade de proteger eritrócitos contra estresse oxidativo em ensaio antioxidante ezimático (CANSIAN *et al.*, 2014).

Em trabalho realizado por Custódio *et al.* (2010), avaliou-se o óleo essencial de *Tynanthus micranthus*. Os resultados obtidos relatam que sua composição foi semelhante ao obtido para o córtex de *Tynanthus panurensis* (LECLERCQ *et al.*, 2000), que apresentou como único componente o eugenol (99,9%). O teste de bioautografia revelou o eugenol como a substância responsável pela atividade contra o *Cladosporium herbarum* do óleo essencial presente nesta espécie (CUSTÓDIO *et al.*, 2010).

A foto realizada no local no momento da coleta (FIGURA 3) mostra como a espécie se apresenta na vegetação, porém sua visualização torna-se difícil pelo emaranhado que se forma entre os cipós e as árvores vizinhas.



FIGURA 3 - VISTA DO LOCAL DA COLETA
FONTE: A autora (2012)

O estudo de Souza, Santos e Moscheta (2010) relatou características morfoanatômicas florais de três espécies da família *Bignoniaceae* incluindo *Tynanthus micranthus* (FIGURA 4) no estudo comparativo. A seleção das espécies avaliadas baseou-se na relativa abundância de indivíduos em remanescentes florestais da região Noroeste do Paraná e os resultados mostraram que, embora as flores sejam estruturalmente semelhantes, há diferenças significativas em alguns caracteres, como por exemplo, coloração e formato da corola; número de estratos celulares no perianto; tipos de tricomas no perianto, filete e ovário; padrão de formação da parede da antera; células do obturador; vascularização do ovário; tipo de feixe vascular no filete; e tipo de ocorrência/estrutura de nectário.

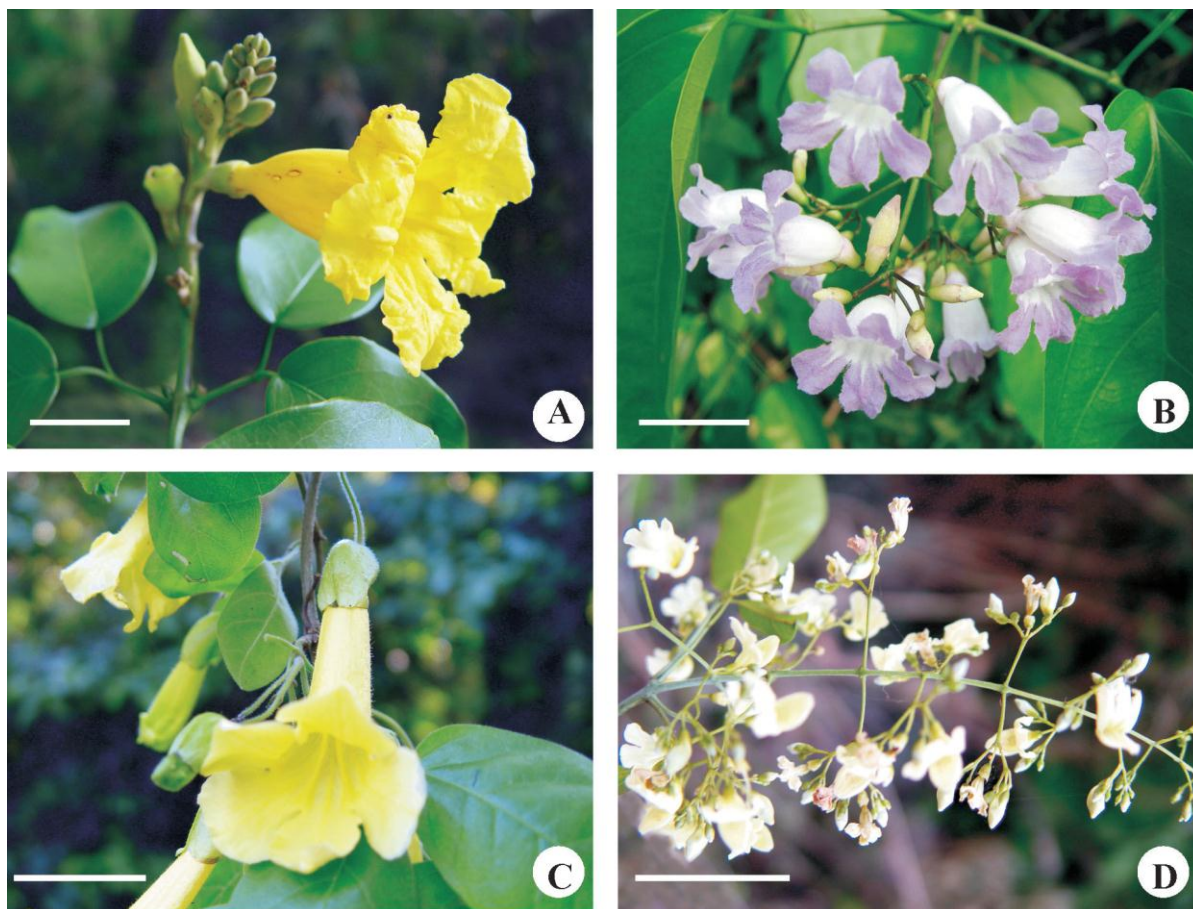


FIGURA 4 - ASPECTO GERAL DAS FLORES DE ESPÉCIES DA FAMÍLIA BIGNONIACEAE
 NOTA: (A) *Adenocalymma marginatum*; (B) *Arrabidaea mutabilis*; (C) *Macfadyena unguis-cati*;
 (D) *Tynanthus micranthus*.
 FONTE: SOUZA; SANTOS; MOSCHETA (2010)

Relatos fornecidos pela comunidade próxima ao local da coleta fazem menção ao efeito afrodisíaco do chá preparado com partes de *Tynanthus micranthus*, o qual é utilizado pouco tempo antes do contato sexual, porém nenhum estudo menciona ou comprova tal atividade.

2.4 FUNÇÃO SEXUAL MASCULINA

A atividade sexual humana tem como principal objetivo a reprodução e determina um processo fundamental para a manutenção e perpetuação das espécies. Tal atividade é composta pela interação de componentes fisiológicos, psicológicos e comportamentais. As funções reprodutivas masculinas podem ser

divididas em três grupos principais: espermatogênese, ato sexual masculino e regulação hormonal e neural da função reprodutiva (GUYTON; HALL, 2002).

2.4.1 Anatomia e fisiologia sexual masculina

O sistema reprodutor masculino (FIGURA 5) é formado pelos testículos, epidídimos, canais deferentes, ducto ejaculador, uretra, pênis e pelas glândulas acessórias (vesículas seminais, próstata e glândulas uretrais) que são responsáveis por produzir, transportar e eliminar os espermatozoides, além de produzirem e secretarem a testosterona, hormônio sexual masculino (GUYTON; HALL, 2002).

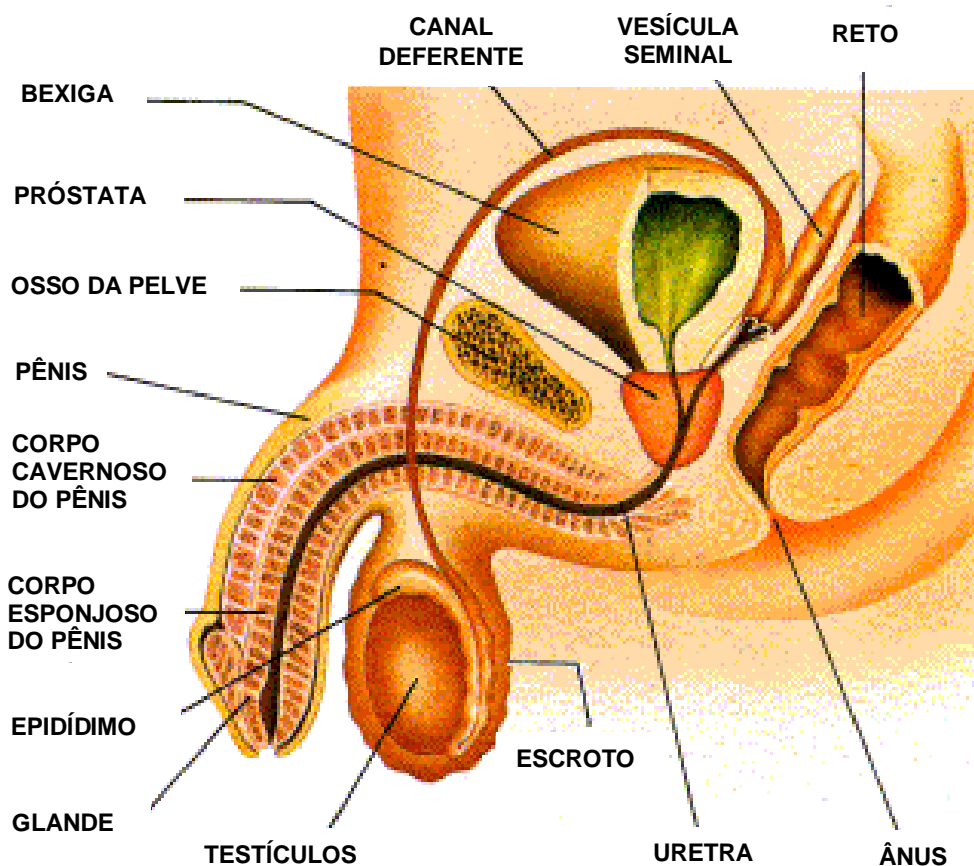


FIGURA 5 - SISTEMA REPRODUTOR MASCULINO
 FONTE: GOWDAK; GOWDAK (1989)

Os testículos são glândulas formadas por tecido intersticial (células de Leydig) e túbulos seminíferos (células de Sertoli), responsáveis pela produção de testosterona e pela espermatogênese, respectivamente (ANTUNES-RODRIGUEZ; FAVARETTO, 1999).

Diariamente são formados em média 120 milhões de espermatozoides, que são lançados nos epidídimos e armazenados por um período de aproximadamente 18 a 24 horas. É nos epidídimos que adquirem a capacidade de se locomoverem. Saindo dos epidídimos, os espermatozoides vão para o canal deferente onde ficam até o momento da ejaculação. Durante o ato sexual, os espermatozoides percorrem o canal deferente e caem no ducto ejaculador aonde recebem o conteúdo das vesículas seminais e da próstata. Posteriormente passam do canal ejaculador para a uretra e, finalmente, para o meio externo (GUYTON; HALL, 2002).

2.4.2 Espermatogênese

A espermatogênese constitui um processo que ocorre nos túbulos seminíferos durante a vida sexual ativa do homem que se inicia por volta dos 13 anos de idade e prossegue durante a maior parte da vida. Através de várias divisões celulares, as células epiteliais germinativas denominadas espermatogônias, presentes nos túbulos seminíferos, formam ao final de aproximadamente 75 dias os espermatozoides (MOORE; PERSAUD, 2008).

Durante um período de 24 horas, cada espermatogônia migra entre as células de Sertoli, que fornecem suportes estruturais, nutricionais e regulatórios para as células germinativas, e através de várias divisões mitóticas formam mais espermatogônias (período germinativo). Cada uma dessas células torna-se, então, progressivamente modificada e aumentada (período de crescimento) passando a ser chamada de espermatócito primário. Em seguida, estas células sofrem divisão celular meiótica e formam os espermatócitos secundários, que por sua vez também se dividem e formam as espermátides (período de maturação), que acabam se modificando e transformando-se em espermatozoides (período de diferenciação) (GUYTON; HALL, 2002).

Os espermatozoides são compostos de cabeça e cauda. A cabeça é constituída por três componentes: o núcleo condensado e alongado; o saco acrossomal vinculado ao acroplaxoma, que é formado principalmente por enzimas que desempenham papel importante durante a fertilização; e a membrana plasmática. A peça de conexão cabeça-cauda, ou colo, contendo um par de centríolos e proteínas associadas, liga a cabeça à cauda do espermatozoide. A cauda denomina-se flagelo e contém um grande número de mitocôndrias responsáveis pelo fornecimento de energia que gera o batimento do flagelo e a motilidade dos espermatozoides (KIERSZENBAUM, 2012).

Todo o processo de espermatogênese é controlado por vários hormônios dentre eles o hormônio liberador de gonadotrofina (GnRH), o hormônio folículo estimulante (FSH), o hormônio luteinizante (LH) e a testosterona (GUYTON; HALL, 2002), ou seja, necessita da integridade do eixo hipotálamo-hipófise-gônadas (ANTUNES-RODRIGUEZ; FAVARETTO, 1999).

2.4.3 Ato sexual masculino

O ato sexual é caracterizado por eventos que determinam o ciclo de resposta sexual humana constituído de quatro fases chamadas de estimulação sexual (libido), excitação sexual (fase de estimulação associada a alterações fisiológicas), orgasmo (contrações rítmicas dos músculos do períneo e órgãos reprodutores) e resolução (fase de relaxamento muscular e sensação de bem-estar geral) (DSM-IV, 2002).

Os fatores que desencadeiam o estímulo sexual podem ser de origem psicogênica, quando envolvem impulsos que chegam ao cérebro vindos de áreas sensoriais como visão, olfato, paladar e imaginação de fantasias sexuais. Os fatores chamados reflexogênicos estão relacionados com a estimulação direta dos órgãos genitais ou de áreas eróticas como os mamilos e o períneo (LEVIN; RILEY, 2007).

A ereção constitui o primeiro efeito da excitação sexual masculina causada por impulsos parassimpáticos que partem da porção sacra da medula espinhal, através dos nervos pélvicos, até o pênis. Essas fibras parassimpáticas secretam, além de acetilcolina, o óxido nítrico. Este relaxa, principalmente, as artérias e o

tecido erétil (corpo cavernoso e esponjoso) do pênis. Esse tecido erétil é formado por uma rede trabecular de fibras musculares e por vários sinusóides que, em condições normais, estão relativamente vazios, mas que ficam enormemente dilatados quando o sangue arterial flui para o seu interior, sob pressão, enquanto ocorre oclusão parcial do efluxo venoso. Além disso, os corpos eréteis são circundados por fortes túnicas fibrosas. Assim, a pressão elevada no interior dos sinusóides provoca a expansão do tecido erétil em grau tão acentuado que o pênis fica rígido e alongado, constituindo o fenômeno da ereção (GUYTON; HALL, 2002).

A FIGURA 6 representa o mecanismo fisiológico normal de uma ereção, mostrando a liberação de óxido nítrico no músculo liso do pênis diretamente do terminal axonal dos nervos cavernosos e através de células endoteliais penianas.

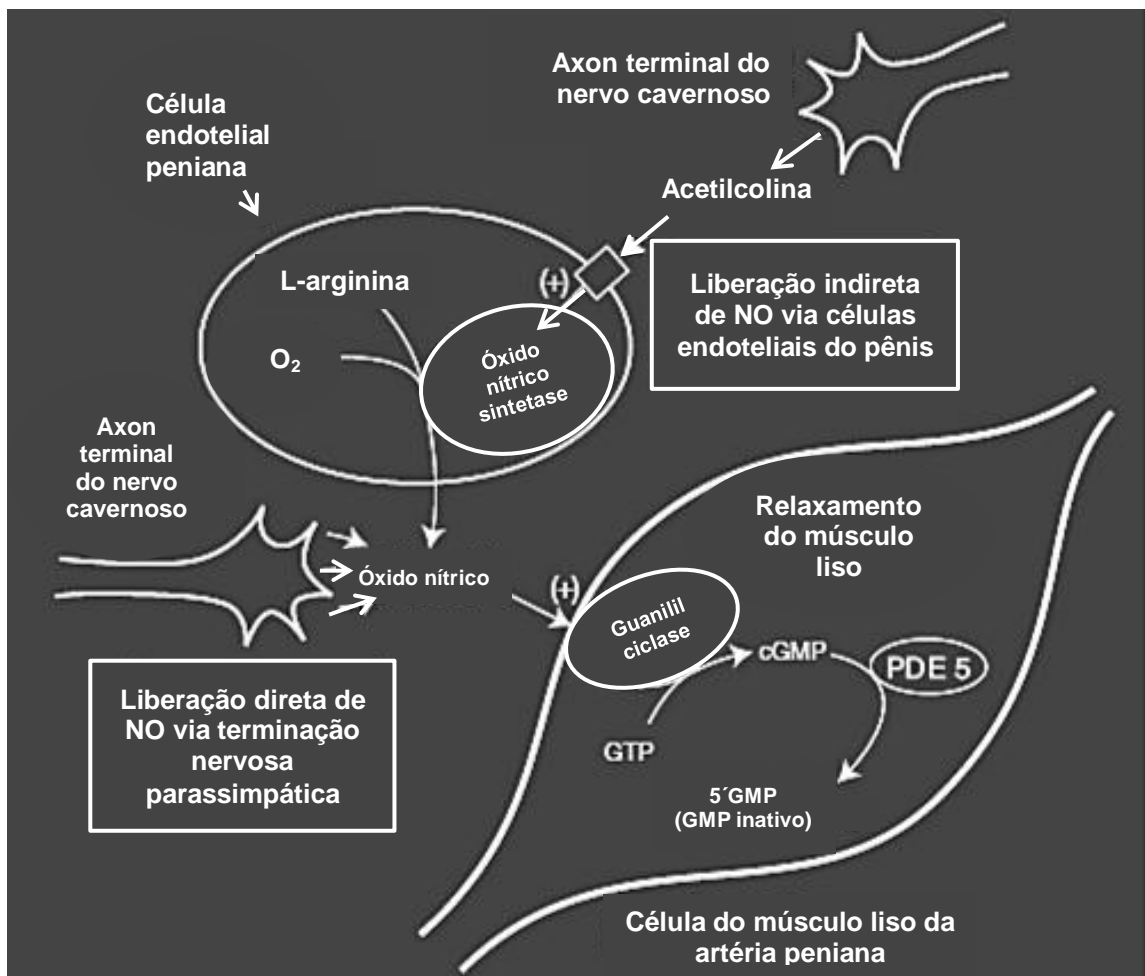


FIGURA 6 - FISILOGIA NORMAL DA EREÇÃO
 FONTE: Adaptado de MACKAY (2004)

A emissão e a ejaculação constituem a culminação do ato sexual masculino e esse período é denominado de orgasmo. Quando o estímulo sexual fica extremamente intenso, os centros reflexos da medula espinhal começam a emitir impulsos simpáticos, que partem da região toracolombar da medula, e dirigem-se para os órgãos genitais pelos plexos simpáticos hipogástrico e pélvico, para iniciar a emissão, o precursor da ejaculação. A emissão começa com a contração do canal deferente para causar a expulsão dos espermatozoides para a uretra interna. A seguir, ocorrem contrações nas paredes musculares da vesícula seminal e da próstata, que expõem seus líquidos também para a uretra, forçando os espermatozoides para frente. Todos esses líquidos misturam-se ao muco na uretra formando o sêmen (GUYTON; HALL, 2002).

O enchimento da uretra interna com sêmen desencadeia sinais sensoriais que são transmitidos pelos nervos pudendos, para a região sacra da medula espinhal, dando a sensação de súbita plenitude nos órgãos genitais internos. Além disso, esses sinais excitam ainda mais a contração rítmica dos órgãos sexuais internos e também produzem a contração dos músculos isquiocavernoso e bulbocavernoso que comprimem as bases do tecido erétil peniano. Esses efeitos em conjunto causam aumento rítmico da pressão do tecido erétil do pênis e dos ductos genitais e da uretra, que ejaculam o sêmen da uretra para o exterior. Ao mesmo tempo, as contrações rítmicas dos músculos pélvicos e, até mesmo, de alguns dos músculos do tronco, causam movimento de propulsão da pelve e do pênis, que também ajudam a propelir o sêmen. Ao seu término, a excitação sexual masculina desaparece quase por completo dentro de 1 a 2 minutos e a ereção peniana cessa, processo denominado de resolução (GUYTON; HALL, 2002).

2.4.4 Controle hormonal da função sexual masculina

Os testículos secretam vários hormônios sexuais masculinos, chamados androgênios, que incluem a testosterona, a diidrotestosterona e androstenediona, sendo a testosterona o mais abundante e principal hormônio masculino, cuja concentração plasmática gira em torno de 500 a 800 ng/dL (GUYTON; HALL, 2002).

A testosterona é sintetizada pelas células de Leydig a partir da molécula de colesterol (ANTUNES-RODRIGUEZ; FAVARETTO, 1999). O hormônio luteinizante (LH) é o principal estímulo à produção e secreção de testosterona nos homens. Esse hormônio é secretado pela hipófise anterior e essa secreção é regulada positivamente pelo hormônio de liberação de gonadotrofina (GnRH) e, negativamente pela própria testosterona, por meio de uma alça de retroalimentação negativa. O hormônio LH liga-se a receptores presentes na membrana das células de Leydig e desencadeia, através da ativação de proteínas quinases, uma série de reações intracelulares que culminam com a síntese dos andrógenos (SNYDER, 2006).

Uma vez liberados na circulação, os hormônios andrógenos têm efeitos sobre vários tecidos andrógeno-dependentes e um dos mecanismos pelos quais são mediados esses efeitos variados é o metabolismo da testosterona em dois outros esteroides ativos, a diidrotestosterona e o estradiol (ANTUNES-RODRIGUEZ; FAVARETTO, 1999).

Os efeitos biológicos da testosterona podem ser considerados conforme o receptor que ela ativa e os tecidos nos quais esses efeitos ocorrem, ligando-se a receptores androgênicos-NR3A, após conversão em diidrotestosterona pela enzima 5 α -redutase, a qual pode ocorrer na próstata, vesícula seminal e epidídimo. A testosterona pode atuar ainda como um estrogênio, mediante conversão em estradiol pela enzima aromatase, através da ligação do estradiol ao receptor de estrogênios, que ocorre principalmente no hipotálamo, hipófise e nas mamas (ANTUNES-RODRIGUEZ; FAVARETTO, 1999).

Após ser secretada, a testosterona é responsável por induzir a espermatogênese, produzir os efeitos de virilização masculina e controlar os comportamentos relacionados ao ato sexual masculino (HULL; DOMINGUEZ, 2007).

Faz parte da biossíntese da testosterona (FIGURA 7) a substância com a sigla DHEA, derivada do inglês, a qual se refere à *Dehidro-Epi-Androsterona*, também denominada deidro-iso-androsterona. DHEA, produzido na glândula supra-renal e nas gônadas, é o esteroide precursor quase direto (mas não o mais importante) da testosterona e do estradiol, entretanto, ele próprio possui fraca ação androgênica. Em maior quantidade, os principais precursores da testosterona são a pregnenolona, progesterona e hidroxiprogesterona (GEBARA *et al.*, 2002; SAMARAS *et al.*, 2013).

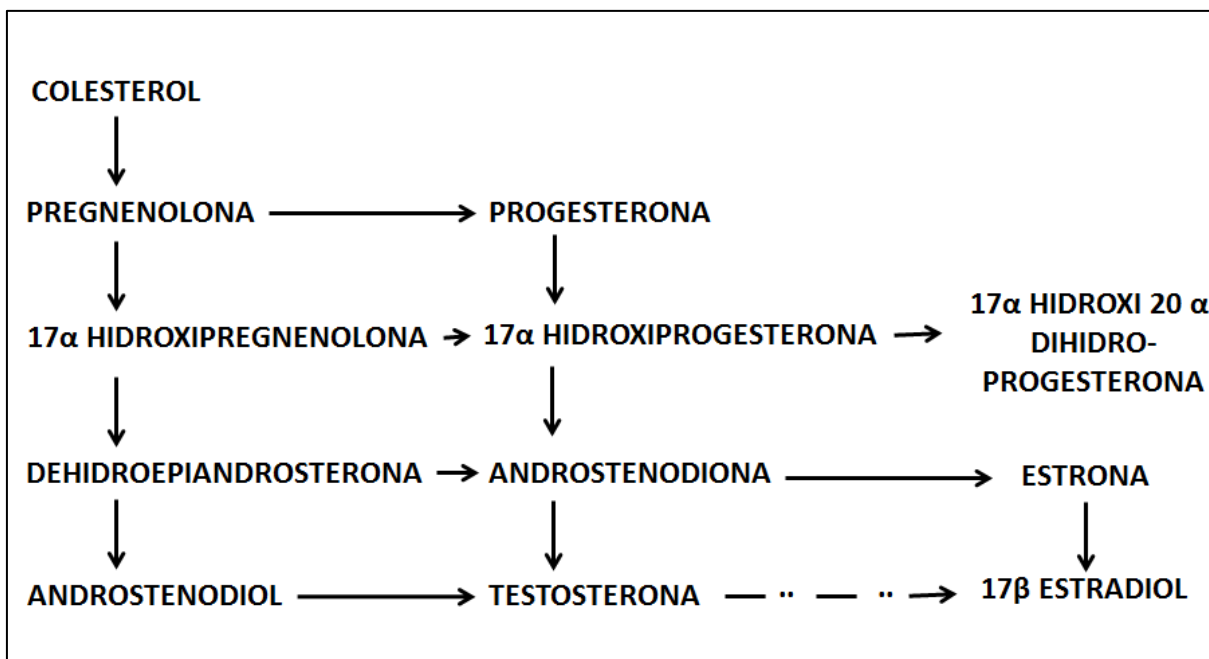


FIGURA 7 - BIOSÍNTESE DA TESTOSTERONA
 FONTE: Modificado de GEBARA *et al.* (2002)

2.4.5 Disfunção erétil

A impotência sexual ou disfunção erétil (DE), embora seja uma patologia que não comprometa a vida das pessoas, interfere diretamente na qualidade de vida do homem e de suas parceiras. Pode-se defini-la como a incapacidade em se obter ou manter uma rigidez peniana adequada que permita uma relação sexual satisfatória (MACKAY, 2004).

No Brasil um estudo realizado através de questionários com homens de 18 a 80 anos demonstrou que a prevalência encontrada de DE foi de 45,1% (31,2% mínima, 12,2% moderada e 1,7% grave). Indivíduos com DE apresentaram comprometimento da auto-estima, dos relacionamentos interpessoais, menos relações sexuais por semana, mais relações extra conjugais, queixas de falta de desejo sexual e ejaculação rápida. Comparados aos homens com idades entre 18 e 39 anos, aqueles com 60 a 69 têm 2,2% mais risco para DE, enquanto para aqueles com 70 anos ou mais, a chance triplica (ABDO *et al.*, 2006).

Devido ao avanço nos conhecimentos sobre a fisiopatologia e terapêutica dos problemas relacionados à virilidade, existem atualmente, algumas opções válidas de tratamento que irão depender do tipo e gravidade das queixas, presença

de contra-indicações ou intolerância ao tratamento proposto, além das condições sócio-econômicas do paciente. O tratamento para disfunção erétil é individualizado de acordo com a causa apresentada pelo indivíduo que pode ser de origem psicológica ou resultante de uma disfunção orgânica (HATZIMOURATIDIS *et al.*, 2010).

Os medicamentos orais, como por exemplo, os inibidores da fosfodiesterase 5 (PDE-5), Sildenafil (Viagra[®]), Vardenafil (Levitra[®]) e Tadalafil (Cialis[®]), constituem hoje a terapia oral mais utilizada e atuam promovendo o relaxamento da célula muscular do tecido cavernoso, condição necessária para obtenção da ereção. Estes medicamentos devem ser utilizados sob demanda e na presença de desejo e estímulo sexual (ABDO *et al.*, 2006).

A autoinjeção peniana utiliza medicamentos como, por exemplo, prostaglandinas, aplicados na parte lateral do pênis antes da atividade sexual, fazendo aumentar o fluxo sanguíneo no membro e conseqüentemente a ereção (CLARO *et al.*, 1996), como é o caso também da terapia intra-uretral aonde o medicamento é inserido na uretra.

A nível psicológico, o aconselhamento sexual ou terapia sexual são consultas realizadas por profissionais capacitados que ajudam a identificar, compreender e lidar com os problemas sexuais, fazendo com que o paciente controle as situações de stress durante o ato sexual, aumentando os estímulos e focando a atenção no prazer e na intimidade do casal (SANTAMARÍA, 2010).

A prótese peniana é sugerida ao doente quando nenhum dos outros tratamentos foi bem sucedido. É mais indicada para disfunção erétil de fundo orgânico, quando medicamentos orais ou injetáveis não são eficazes (AL-ENEZI; AL-KHADHARI; AL-SHAJI, 2011).

2.4.5.1 Citrato de Sildenafil

Dentre os PDE-5, o citrato de sildenafil é considerado um tratamento de primeira linha para a disfunção erétil e foi o primeiro medicamento oral lançado no mercado para tratamento desta patologia, tendo como nome comercial, Viagra (WEINERT; PEZZA; PEZZA, 2008).

O citrato de sildenafil é quimicamente designado como citrato de 1- [[3-(6,7-diidro- 1-metil- 7- oxo- 3- propil- 1H- pirazol- [4,3- d] pirimidin- 5- il)- 4- etóxfenil] sulfonil]- 4- metilpiperazina1 (FIGURA 8).

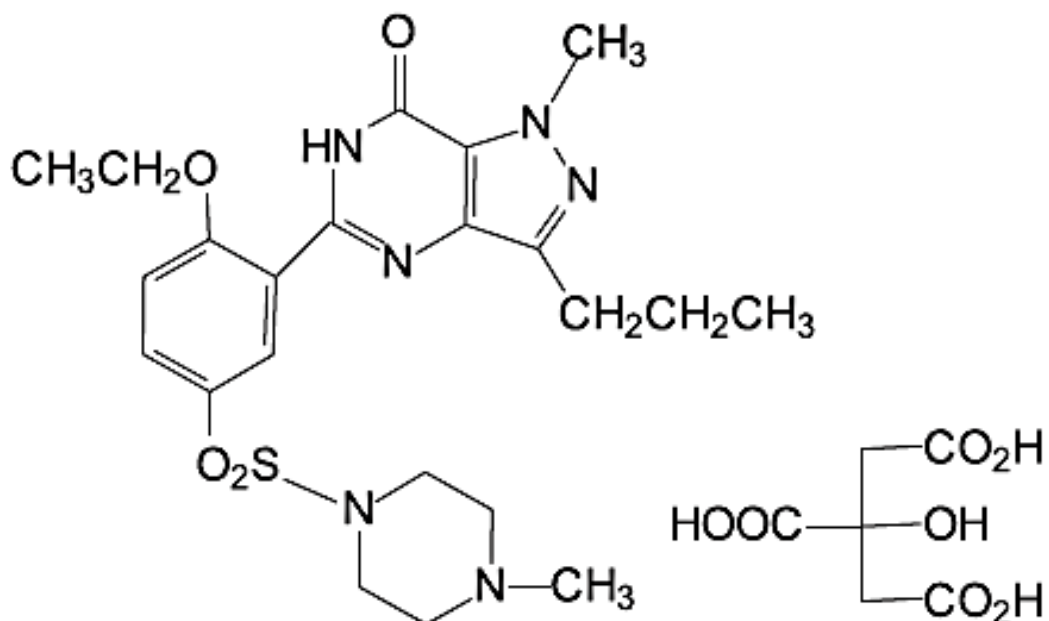


FIGURA 8 - ESTRUTURA QUÍMICA DO CITRATO DE SILDENAFIL (VIAGRA[®])
 FONTE: WEINERT; PEZZA; PEZZA (2008)

A cafeína (FIGURA 9 A), uma trimetilxantina natural descrita como inibidora de fosfodiesterases, é responsável pelas propriedades de potencializar a vigília e contribuiu para a descoberta do sildenafil (FIGURA 9 B), desenvolvido pelo Laboratório Pfizer e lançado no Brasil em 1999, o qual teve sua estrutura planejada a partir do zaprinaste (FIGURA 9 C), um derivado triazolopirimidinônico e inibidor de fosfodiesterase (PDE) mais seletivo que a trimetilxantina que o inspirou (BARREIRO; BOLZANI, 2009).

Os pesquisadores da Pfizer, liderados por Simon Campbell, buscavam inibidores de PDE-3 capazes de serem empregados no tratamento da angina. Entretanto, pesquisando nas substâncias sildenafil e zaprinaste outras propriedades relatadas em estudos de ensaios clínicos referentes à provocação de ereções persistentes, detectaram a isoforma-5 como sendo o alvo do composto

desenvolvido, o citrato de sildenafil que possui o núcleo pirazolo-pirimidinônico, isómero híbrido do zaprinaste e da cafeína (BARREIRO; BOLZANI, 2009).

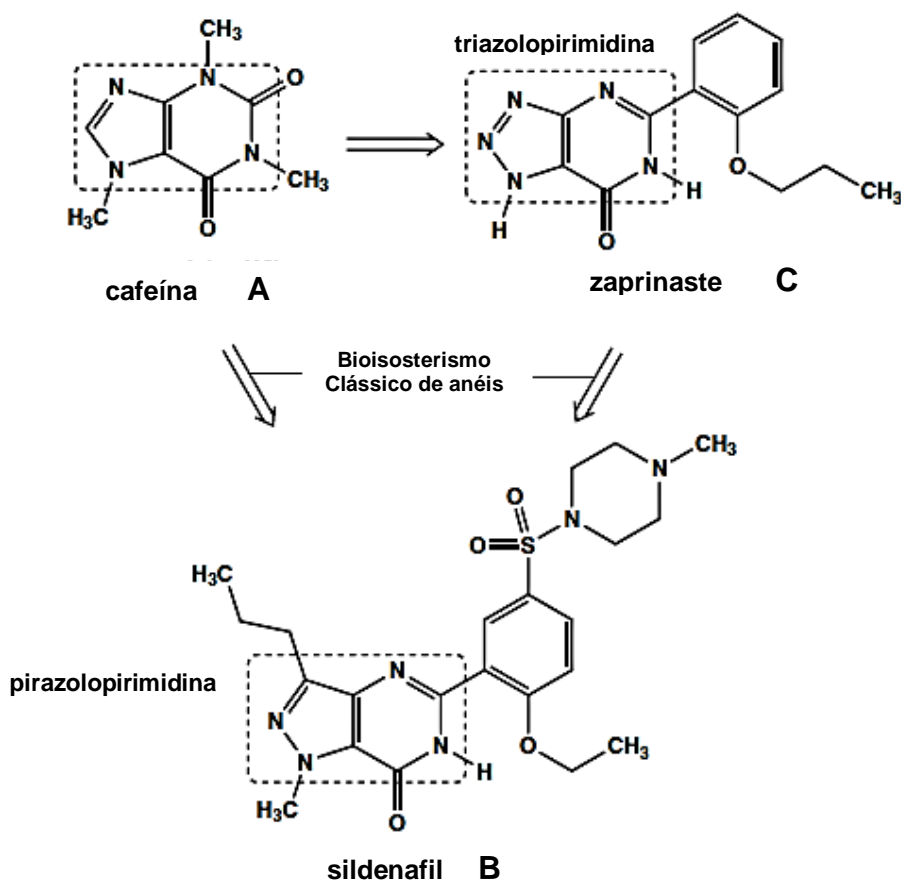


FIGURA 9 - DEMONSTRAÇÃO ESQUEMÁTICA DO PLANEJAMENTO DO CITRATO DE SILDENAFIL
 FONTE: BARREIRO; BOLZANI (2009)

Um artigo publicado em 1998 por Goldstein e colaboradores, mostra a eficácia do citrato de sildenafil testado em homens com disfunção erétil de causa orgânica, psicogênica ou ambas. A FIGURA 10 mostra os números médios de ereções de grau 3 e grau 4, durante as últimas 4 semanas de tratamento na vigésima quarta semana do estudo dose-resposta em 205 homens que receberam placebo, 97 homens que receberam 25 mg de sildenafil, 105 homens que receberam 50 mg de sildenafil, e 102 homens que receberam 100 mg de sildenafil. Grau 1 indica que o pênis é maior, mas não é duro; grau 2, que é duro mas não o suficiente para a penetração; grau 3, que é duro o suficiente para a penetração, mas não

completamente duro; e grau 4, que é completamente duro e rígido. Os asteriscos indicam $p < 0,001$ para a comparação com placebo.

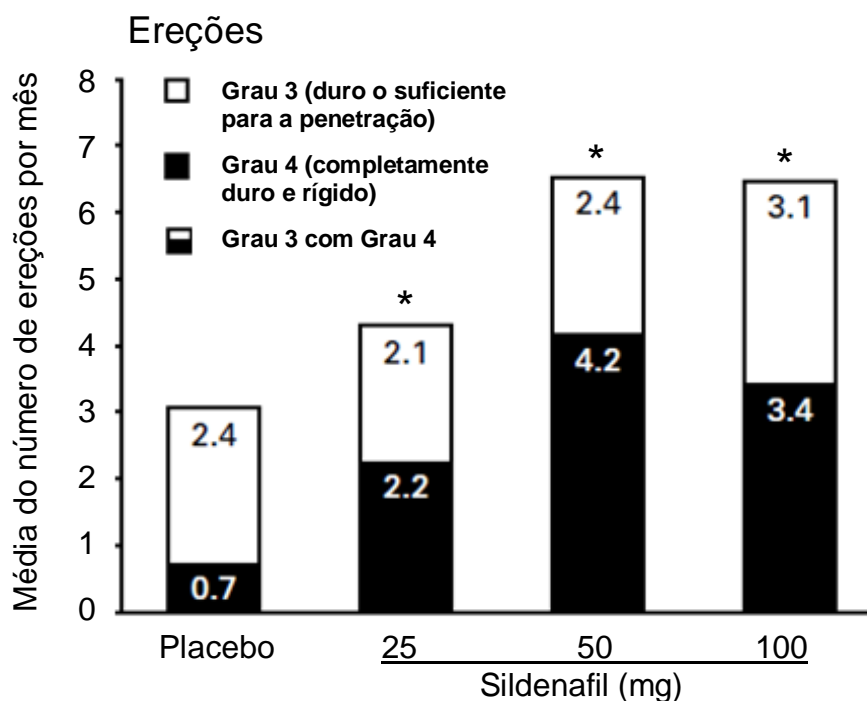


FIGURA 10 – RESULTADOS DA AVALIAÇÃO DA FUNÇÃO SEXUAL MANTIDA POR HOMENS TRATADOS COM SILDENAFIL E PLACEBO
 FONTE: GOLDSTEIN *et al.* (1998)

Vários outros estudos comprovam a eficácia do sildenafil para o tratamento da disfunção erétil, mas deve-se considerar a contra-indicação do seu uso para diversos tipos de pacientes, como alerta a bula do Viagra®. Foi demonstrado que o medicamento potencializa o efeito hipotensor dos nitratos de uso agudo ou crônico, estando, portanto, contra-indicada a administração a pacientes usuários de qualquer forma doadora de óxido nítrico, nitratos orgânicos ou nitritos orgânicos; tanto os de uso frequente quanto os de uso intermitente. O sildenafil é contra-indicado para uso por mulheres e menores de 18 anos (VIAGRA, 2013).

As reações adversas mais relatadas foram cefaleia e rubor, ambas ocorrendo em mais que 10% dos pacientes estudados. Outras reações adversas foram listadas por sistemas e órgãos e classificadas pela frequência. As frequências são definidas como: reação muito comum ($> 1/10$) e reação comum ($> 1/100$ e $< 1/10$) (VIAGRA, 2013).

- Sistema Nervoso: Muito Comuns: cefaleia (sildenafil: 10,8% e placebo: 2,8%). Comuns: tontura (sildenafil: 2,9% e placebo: 1,0%).
- Vascular: Muito Comuns: vasodilatação (rubor) (sildenafil: 10,9% e placebo: 1,4%).
- Ocular: Comuns: visão anormal (visão turva, sensibilidade aumentada à luz) (sildenafil: 2,5% e placebo: 0,4%) e cromatopsia (leve e transitória, predominantemente distorção de cores) (sildenafil: 1,1% e placebo: 0,03%).
- Cardíaco: Comuns: palpitação (sildenafil: 1,0% e placebo: 0,2%).
- Respiratório, torácico e mediastinal: Comuns: rinite (congestão nasal) (sildenafil: 2,1% e placebo: 0,3%).
- Gastrointestinal: Comuns: dispepsia (sildenafil: 3,0% e placebo: 0,4%).

Nas doses acima da variação de dose recomendada, eventos adversos foram semelhantes àqueles detalhados acima, mas foram relatados com mais frequência. Os seguintes efeitos foram relatados durante o período pós-comercialização (VIAGRA, 2013):

- Sistema imune: reação de hipersensibilidade (incluindo rash cutâneo).
- Sistema Nervoso: convulsão, convulsão recorrente.
- Cardíaco: taquicardia.
- Vascular: hipotensão, síncope, epistaxe.
- Gastrointestinal: vômito.
- Ocular: dor ocular, olhos vermelhos.
- Sistema reprodutivo e mama: ereção prolongada e/ou priapismo.

Para a maioria dos pacientes, a dose recomendada é de 50 mg em dose única, administrada quando necessária e aproximadamente 1 hora antes da relação sexual. De acordo com a eficácia e tolerabilidade, a dose pode ser aumentada para uma dose máxima recomendada de 100 mg ou diminuída para 25 mg. A frequência máxima recomendada de Viagra[®] é de 1 vez ao dia (VIAGRA, 2013).

2.4.5.1.1 Outras aplicações do citrato de sildenafil

O Sildenafil é principalmente utilizado no tratamento da disfunção erétil, porém estudos tem mostrado sua importância no tratamento de uma outra doença chamada hipertensão arterial pulmonar (HAP), definida como uma anormalidade circulatória caracterizada pelo aumento da resistência vascular na pequena circulação, em geral por meio de mecanismos mistos, envolvendo vasoconstrição, remodelamento da parede arterial e trombose *in situ*. O aumento progressivo da resistência vascular pulmonar (RVP) leva à insuficiência ventricular direita (IVD) e morte precoce (CALLOU; RAMOS, 2009).

A droga promove a inibição da PDE-5 impedindo a degradação de monofosfato de guanosina cíclico (GMPc), abundante nos pulmões. O GMPc é um mensageiro intracelular do óxido nítrico, com isso, ocorre uma consequente vasodilatação pulmonar (OLIVEIRA; AMARAL, 2005). O sildenafil melhora a hemodinâmica nos pulmões e a tolerância ao esforço, utilizado em doses que variam de 25-75 mg de 8/8h. Apresenta meia-vida de 4 horas e pico de ação em uma hora (CALLOU; RAMOS, 2009).

O estudo de Oliveira *et al.* (2005) indica o uso do sildenafil para facilitar a retirada de óxido nítrico inalado (ONi) em pós-operatório de hérnia diafragmática. ONi é a droga de escolha para tratar crises de hipertensão pulmonar, causada pelo aumento súbito da hipertensão arterial pulmonar, usualmente acompanhada de broncoespasmo, redução do débito cardíaco e saturação sistêmica de oxigênio, podendo causar sequelas irreversíveis. Alguns pacientes tornam-se dependentes do ONi, aumentando o tempo de internação hospitalar, e o uso de sildenafil mostrou facilitar sua retirada e evitar recidiva de crise de hipertensão pulmonar causada pela ausência do ONi.

Inibidores da PDE-5, como sildenafil, tadalafil e vardenafil, foram citados em trabalho de Serafini *et al.* (2006) por agirem como moduladores de resposta imune anti-tumoral. Testados em ratos com diversos modelos de tumor, inibidores da PDE-5 mostraram-se capazes de atrasar substancialmente a progressão do tumor.

2.5 AGENTES NATURAIS UTILIZADOS PARA MELHORAR A PERFORMANCE SEXUAL

Diversas drogas vegetais são amplamente utilizadas ao longo da história com a finalidade de melhorar a performance física de indivíduos que sofrem de algum tipo de disfunção sexual através de diferentes mecanismos de ação (BUCCI, 2000).

Apesar dos avanços significativos na medicina sexual masculina nos últimos anos, a atração por tratamentos com produtos naturais continua muito forte, interesse este que pode vir do fato de que as plantas medicinais são mais fáceis de serem obtidas, são mais baratas em comparação com os medicamentos de prescrição e os usuários não só podem vê-los como uma forma mais natural de lidar com o seu problema, mas também podem agregar benefícios de saúde além dos especificamente relacionados ao desempenho sexual (ROWLAND; TAI, 2003).

Dentre os agentes naturais utilizados para melhorar a performance sexual inclui-se a L-arginina. Esta substância é considerada como um precursor biológico de óxido nítrico (NO), o qual está envolvido em uma variedade de efeitos fisiológicos endotelio-dependentes. Uma grande variedade de estados patológicos, como por exemplo, problemas cardiovasculares e cerebrais, doenças inflamatórias e infecciosas, podem estar relacionadas com um baixo ou alto nível de óxido nítrico no organismo (QUEIROZ, 1999).

Estudo realizado por Chen *et al.* (1999), avaliou que a administração oral humana de L-arginina, em doses elevadas, causou melhora significativa da função sexual em homens com DE orgânica, desde que tenham decréscimo na excreção ou produção de NO. O estudo ainda mostra que a hemodinâmica do corpo cavernoso não mostrou alteração pela L-arginina via oral na dose avaliada.

A ioimbina é um alcaloide derivado da árvore africana *Pausinystalia yohimbe* e tem sido usada como um agente farmacológico para o tratamento de DE por mais de 70 anos. A droga é caracterizada farmacologicamente como um antagonista do receptor alfa-2-adrenérgico. Sua atividade é mediada pelo bloqueio pré-sináptico alfa-2-adrenérgico no cérebro, o que subsequentemente aumenta a liberação de NO dos nervos penianos. Estudos em animais mostraram que a ioimbina tem um efeito positivo no desempenho sexual masculino (MACKAY *et al.*, 2004).

Panax ginseng, é uma planta utilizada desde muito tempo como estimulante da performance física. Estudos realizados mostraram que a planta melhora as anormalidades vasculares endoteliais, aumentando a produção de óxido nítrico (NO). Vários estudos sugerem ainda que *Panax ginseng* possui propriedades antioxidantes e ação órgão protetora associada com o aumento da síntese de NO no endotélio do rim, coração, pulmão e corpo cavernoso. Seus principais componentes ativos são os glicosídeos de saponina, ginsenosídeos, que demonstraram causar um relaxamento dose-dependente do músculo liso do corpo cavernoso de coelhos por liberação crescente do NO (GILLIS, 1997).

Tribulus terrestris possui um agente fitoquímico chamado protodioscina, o qual teve clinicamente comprovada sua atividade de melhorar o desejo sexual e a ereção através da conversão de protodioscina em dehidroepiandrosterona (DHEA) (ADIMOELJA, 2000). Existe uma relação inversa entre os níveis séricos de DHEA e a incidência de disfunção erétil, havendo um aumento da prevalência da DE com o aumento da idade. Um estudo realizado em homens com DE e baixos níveis de DHEA tratados durante seis meses com uma dose de 50 mg por dia de DHEA, mostrou melhora do desempenho sexual após este período de tratamento (FELDMAN *et al.*, 1994).

Maca (*Lepidium meyenii*) é uma raiz vegetal cultivada nos Andes do Peru. As raízes secas de maca são ricas em aminoácidos, iodo, ferro, e magnésio e é tradicionalmente utilizada na região andina com a finalidade de usufruir de suas supostas propriedades afrodisíacas e/ou de aumento da fertilidade (ROWLAND; TAI, 2003). Estudos realizados por Zheng *et al.* (2000), concluíram que a administração oral de M-01 e M-02, duas formulações padronizadas contendo macaene e macamide, substâncias presentes nesta espécie, melhoraram a função sexual de camundongos e ratos, evidenciado por um aumento no número de intromissões completas e uma diminuição no período de latência de ereção em ratos machos, comprovando pela primeira vez a atividade afrodisíaca de *L. meyenii*.

Marapuama (*Ptychopetalum olacoides*) vem de um pequeno arbusto encontrado nas florestas tropicais do Brasil onde, preferencialmente, as cascas e as raízes, são utilizadas popularmente para problemas gastrointestinais, reumatismo, problemas musculares e disfunção sexual. Os efeitos sobre a função sexual de marapuama estão reforçados em dois estudos, ambos realizados pela mesma equipe de pesquisa. Waynberg (1994) demonstrou que mais de 60% de uma

amostra de 262 homens com queixa de perda do desejo sexual, indicaram melhora quando tratados com 1-1,5 g por dia de extrato de marapuama. Estudos mais recentes que o anterior (WAYNBERG; BREWER, 2000) demonstraram os efeitos sexuais de algumas ervas em um produto comercial contendo marapuama e ginkgo, em mulheres com queixas de baixa libido. Em torno de 65% das participantes relataram maior frequência e intensidade do desejo sexual e capacidade de atingir o orgasmo.

Um estudo realizado por Siqueira *et al.* (2003) sugere ainda a utilização do extrato etanólico de *P. olacoides* para a recuperação da memória em pacientes com Alzheimer. A triagem fitoquímica do extrato da planta indica a presença de marapuamina, ácidos graxos livres de cadeia longa, cumarina, alcaloides, saponinas, flavonoides, campesterol, β -sitosterol e óleos essenciais (SIQUEIRA *et al.*, 2003). O estudo fitoquímico do lenho desta árvore, realizado por Montrucchio e Miguel (2002), revelou a presença majoritária de vários ácidos graxos, esteroides e xantinas, sendo eles: ácido palmítico, ácido esteárico, β -sitosterol, estigmasterol, lupeol, glutinol, a-amirina, cafeína, teobromina e adenina.

Park *et al.* (2006) avaliaram uma mistura de nove ervas orientais, entre elas *Tribulus terrestris*, *Panax Ginseng*, *Dioscorea batatas*, *Crataegus pinnatifida*, entre outras. Testes *in vitro* e *in vivo* em animais de laboratório foram realizados a fim de determinar o efeito desta mistura sobre o comportamento sexual e ereção do pênis. Os resultados indicaram uma melhora geral dos parâmetros de comportamento copulatório nos ratos tratados e significativo aumento na proporção da pressão intracavernosa para a pressão arterial média, sugerindo que a mistura melhora a atividade sexual e função erétil.

A TABELA 4 cita algumas plantas mundialmente utilizadas com a finalidade de melhorar a performance física, mencionando os possíveis mecanismos de ação das mesmas e alguns problemas que ocorrem com sua utilização. Além das substâncias e plantas citadas no item 2.5, muitas outras espécies podem ser relacionadas a este grupo, além de uma variedade de combinações que podem ser feitas entre elas com a finalidade de melhorar o desempenho físico.

TABELA 4 - PLANTAS MUNDIALMENTE UTILIZADAS PARA OTIMIZAR A PERFORMANCE FÍSICA

Planta	Razão para uso	Perigos potenciais ou conhecidos
Arctic rose (<i>Rhodiola crenulata</i> , <i>R. rósea</i>)	Propriedades adaptogenicas (anti-estresse), aumento de resistência e força	Hipertensão ocasional
Ashwagandha (<i>Withania somnifera</i>)	Propriedades adaptogenicas (anti-estresse), aumento de resistência e força	Pode potencializar o efeito de barbitúricos
Ginseng asiático (também chinês e coreano) <i>Panax ginseng</i>	Propriedades adaptogenicas (anti-estresse), aumento de resistência e força	Contraindicado em pacientes com hipertensão
β -sitosterol e outros esteroides (soja, alfafa, e outras plantas)	Efeito similar à testosterona (anabólico)	Sem descrição
Efedra Chinesa (mahuang) (<i>Ephedra sinica</i>)	Estimulate do sistema nervoso central, aumento de resistência e força e perda de gordura corporal	Não recomendado para longos períodos de uso
Cordyceps (<i>Cordyceps sinensis</i>)	Propriedades adaptogenicas (anti-estresse), aumento de resistência e força	Sem descrição
Saw palmetto (<i>Serenoa repens</i>)	Efeito similar à testosterona (anabólico)	Raros casos de desconforto estomacal.
Smilax (salsaparrilha) (<i>Smilax officinalis</i> ou <i>medica</i>)	Efeito similar à testosterona (anabólico)	Irritação gástrica e insuficiência renal temporária
Suma (<i>Pfaffia paniculata</i>)	Efeito similar à testosterona (anabólico)	Sem referência
<i>Tribulus terrestres</i>	Aumento de testosterona (efeitos anabólicos)	Sem referência
Ioimbina	Agonista α -adrenérgico, potencializador do efeito da cafeína e efedrina, aumento da performance masculina	Não recomendado por longos períodos de uso

FONTE: BUCCI (2000)

2.5.1 Adaptógenos

Quando se fala de substâncias afrodisíacas, não se pode deixar de mencionar os “Adaptogens” ou “Adaptógenos”, termo atribuído em 1947 por um médico e cientista soviético chamado Nikolai Lazarev, que deu este nome a um grupo de substâncias que podem melhorar a resistência inespecífica do organismo quando expostos a vários fatores estressantes, promovendo um estado de adaptação à situação provocada (MENDES, 2011).

Os termos afrodisíaco, estimulantes da memória, anti-estresse, fortificantes, estimulante sexual, neurotônicos, entre outros, se referem a substâncias com ação adaptogênica. No Brasil estas substâncias são genericamente chamadas de tônicas e fortificantes (MENDES, 2011), e muitas delas são provenientes de plantas medicinais.

As plantas adaptógenas são distintamente diferentes no que diz respeito às suas propriedades químicas, não podendo o seu efeito ser atribuído a uma única classe de substâncias. De modo geral, o conjunto de princípios ativos de uma ou mais classes, por interação sinérgica, podem produzir o efeito benéfico das plantas adaptogênicas, entretanto, pode-se destacar algumas substâncias já estudadas e que apresentam efeito comprovado, como os ginsenosídeos (triterpenos glicosídeos) encontrados no *Panax ginseng*, os eleuterosídeos (fenilpropanóide ou derivados cumarínicos) do Ginseng siberiano, os ginkgolídeos e bilobalídeos (terpenóides) de *Ginkgo biloba*, entre outros (MENDES, 2011).

A maioria das classes de medicamentos tem mecanismos de ação bem estabelecidos, porém os adaptógenos parecem atuar através de sistemas diferentes, onde a combinação dessas ações resulta na ação benéfica e protetora, uma vez que estas substâncias atuam ativando ou desativando mediadores de resposta ao estresse, como corticosteróides, catecolaminas e óxido nítrico (PANOSSIAN; WIKMAN, 2005). Adaptógenos também podem atuar de forma inespecífica, através de suas atividades antioxidantes, imunomoduladoras, entre outras (MENDES, 2011).

A atividade antioxidante é um efeito que contribui para o conjunto de ações benéficas destas plantas mesmo que não seja observada em todas as espécies consideradas adaptógenas. O papel dos antioxidantes na prevenção de doenças neurodegenerativas e outras relacionadas ao envelhecimento reforça a importância dessa atividade por diminuir os défices resultantes do envelhecimento. Podem-se citar neste grupo de adaptógenos, com atividade antioxidante considerável, as espécies *Ginkgo biloba*, *Schisandra chinensis*, *Rhodiola rosea*, *Eleutherococcus senticosus* (MENDES, 2011) e *Tribullus terrestris* (ZHELEVA-DIMITROVA; OBRESHKOVA; NEDIALKOV, 2012).

A TABELA 5 mostra algumas plantas brasileiras utilizadas por provocarem efeitos semelhantes aos de um adaptógeno, sua localização no Brasil e sua utilização popular.

TABELA 5 - PRINCIPAIS PLANTAS BRASILEIRAS USADAS COM EFEITOS SEMELHANTES AOS DE UM ADAPTÓGENO

Planta	Região onde é encontrada	Uso popular
Buriti – <i>Mauritia flexuosa</i> L. f., Arecaceae	Cerrado, regiões pantanosas e matas ciliares	O óleo e a polpa são usados como energéticos e fortificantes
Cacau – <i>Theobromma cacao</i> L., Sterculiaceae	Nativa de florestas tropicais da América Central e América do Sul; incluindo a Bahia	As matérias-primas do chocolate, as sementes e polpa são utilizadas como um poderoso energético e para fornecer maior resistência contra baixas temperaturas
Catuaba - <i>Anemopaegma arvense</i> (Vell.) Stellfeld ex de Souza, Bignoniaceae	Cerrado do Brasil Central	A raiz é considerada um poderoso tônico, afrodisíaco, utilizado para tratar a neurastenia e dificuldade de concentração
Catuaba - <i>Trichilia catigua</i> A. Juss., Meliaceae	Cerrado brasileiro, principalmente na Bahia	A parte usada é a casca, indicada como a espécie acima mencionada
Cipó-caboclo - <i>Davilla rugosa</i> Poir., Dilleniaceae	Presente principalmente na Mata Atlântica, mas espalha-se por todo o Brasil tropical	Toda a planta é usada como estimulante e afrodisíaca
Cipó-cravo - <i>Tynanthus elegans</i> Miers, Bignoniaceae	Ampla distribuição geográfica, incluindo o Sudeste do Brasil e da Bolívia	A planta inteira é usada através da infusão ou decocção (raízes) contra fraqueza, cansaço e impotência
Damiana - <i>Turnera diffusa</i> Willd. ex Schult., Turneraceae	Do sul da Califórnia Argentina. No Brasil, é encontrada principalmente no agreste e no sertão nordestino	Folhas e partes aéreas da planta são usadas como tônica e afrodisíaca
Fáfia / ginseng brasileiro - <i>Pfaffia glomerata</i> (Spreng.) Pedersen, Amaranthaceae, e outras espécies	Regiões de clima tropical. Pode ser encontrada em todo o Brasil e em abundância no Paraná	As raízes de algumas espécies de fáfia são utilizadas como tônico e afrodisíaco como substituto do ginseng coreano, fazendo parte de adulterações de alguns produtos vendidos como <i>Panax ginseng</i>
Guaraná - <i>Paullinia cupana</i> Kunth, Sapindaceae	Principalmente Amazônia mas cresce em muitas outras áreas	O pó de semente é usado como tônico geral, estimulante, e no combate a exaustão física e mental
Mate - <i>Ilex paraguariensis</i> A. St.-Hil, Aquifoliaceae	Pampas (terras baixas da América do Sul), no Sul do Brasil e América do Sul, principalmente em áreas altas	As folhas são usadas para proporcionar uma melhoria da disposição geral. Normalmente usado no preparo do chimarrão (um tipo de infusão) ou tereré (como um chá frio)
Muirapuama - <i>Ptychopetalum olacoides</i> Benth., Olacaceae	Amazônia	Raízes e cascas são considerados poderosos tônicos neuromusculares e também são usados como afrodisíacos
Nó-de-cachorro - <i>Heteropterys aphrodisiaca</i> O. Mach, Malpigiaceae	Pantanal (zonas úmidas) e Cerrado	As raízes são usadas para o preparo de garrafadas utilizadas como tônico sexual e no combate a fraqueza

FONTE: MENDES, 2011

A TABELA 6 compara os usos populares das principais plantas brasileiras com os clássicos adaptógenos bem estabelecidos na literatura. Pode-se observar que estas plantas são utilizadas principalmente como afrodisíacas, enquanto adaptógenos clássicos são indicados, principalmente, pela sua propriedade anti-estresse. Entre as plantas brasileiras, o guaraná é o mais conhecido internacionalmente, sendo indicado como tônico, estimulante, para melhorar a memória, entre outros usos (MENDES, 2011).

TABELA 6 - UTILIZAÇÃO POPULAR DOS PRINCIPAIS ADAPTÓGENOS

Planta	Uso Popular				
	Anti-estresse	Melhoramento da capacidade mental	Aumento da resistência e performance física	Afrodisíaca	Anti-envelhecimento
<i>Panax ginseng</i> C.A. Meyer, Araliaceae	++	+	++	+	+
Ginseng siberiano <i>Eleutherococcus</i> <i>senticosus</i> (Rupr. & Maxim.) Maxim., Araliaceae	++	+	++	+	+
<i>Rodiola rosea</i> L. (Crassulaceae)	++	+	+	O	O
<i>Ginkgo biloba</i> L., Ginkgoaceae ¹	+	++	+	O	++
Guaraná <i>Paulinia</i> <i>cupana</i> Kunth, Sapindaceae	+	++	++	+	+
Fália <i>Pfaffia</i> sp., Amaranthaceae	+	+	+	++	+
Muirapuama <i>Ptychopetalum</i> <i>olacoides</i> Benth., Olacaceae	+	+	+	++	+
Catuaba ²	+	+	+	++	+
Damiana <i>Turnera diffusa</i> Willd. ex Schult., Turneraceae	O	O	+	++	O
Nó-de-cachorro <i>Heteropterys</i> <i>aphrodisiaca</i> O. Mach, Malpigiaceae	+	+	+	++	+

NOTA: *(+) Usos populares descritos; (++) Principais usos; (O) Planta não utilizada para esse fim, ou pouco utilizada. ¹*Ginkgo biloba* não é considerado um adaptógeno clássico, mas está incluído nesta tabela devido seus efeitos serem similares a eles. ²As espécies *Anemopaegma arvense* (Vell.) Stellfeld ex de Souza (Bignoniaceae) e *Trichilia catigua* A. Juss. (Meliaceae) são popularmente conhecidas como Catuaba.

FONTE: MENDES (2011)

Estudos realizados com jovens voluntários (KENNEDY *et al.* 2004), demonstraram um aumento no desempenho cognitivo em parâmetros de atenção, memória de trabalho e precisão, após o tratamento com guaraná, ginseng, ou uma combinação das duas plantas. Um estudo posterior mostrou que um suplemento multivitamínico contendo guaraná reduziu a fadiga mental dos voluntários após testes de esforço mental (KENNEDY *et al.*, 2008).

Como os adaptógenos atuam melhorando o desempenho cognitivo acredita-se que eles podem atuar modulando o sistema colinérgico e outros sistemas de neurotransmissão. Alguns estudos que ressaltam esta hipótese sugerem que o *P. ginseng* e *G. biloba* interferem na neurotransmissão colinérgica e monoaminérgica, exercendo efeitos favoráveis sobre a aprendizagem e memória (PETKOV; BELCHEVA; PETKOV, 2003; MENDES, 2011).

2.5.2 Química de plantas afrodisíacas

Um trabalho de revisão elaborado por Silva, Borges e Velozo (2012), menciona a composição química das plantas brasileiras mais utilizadas pela população para fins afrodisíacos, buscando a racionalização entre a estrutura química e suas atividades biológicas. O trabalho sugere a separação dos compostos químicos em três grupos principais, de acordo com a semelhança das estruturas: flavonoides e outros compostos fenólicos; alcaloides, xantinas e outras aminas; e saponinas.

Os flavonoides são estruturas polifenólicas encontrados naturalmente nas plantas. São os responsáveis pelo aspecto colorido das folhas e flores, porém estão presentes em todas as partes da planta. Já foram identificados mais de 8000 flavonoides que surgem da ampla variação de combinações de grupos metil e hidroxil como substituintes na estrutura química básica destes compostos (VOLP *et al.*, 2008). Possuem grande potencial terapêutico e diversas propriedades biológicas como: antioxidantes, anti-inflamatórias, hepatoprotetora, cardio-protetora, anti-úlceras, anti-cancerígenas, antimutagênicas, antiespasmódicas, anti-alérgicas, anti-viral, entre outras (SILVA; BORGES; VELOZO, 2012).

A TABELA 7 mostra alguns flavonoides presentes em plantas afrodisíacas, porém sem atribuir tal atividade ao composto citado.

TABELA 7 - PLANTAS AFRODISÍACAS E SEUS FLAVONOIDEOS E FENÓIS

Espécie (Família)	Flavonoides e Fenóis
<i>Achyrocline satureioides</i> (Asteraceae)	Quercetina, 3-O-Metil Quercetina, Luteolina, Ácidos Cafeico, Clorogênico e Isoclorogênico
<i>Anacardium occidentale</i> (Anacardiaceae)	Miricetina, Quercetina, Ácido Aracônico e derivados
<i>Anemopaegma arvense</i> (Bignoniaceae)	Catuabina A, Cinchonain e Kandelin
<i>Arrabidaea chica</i> (Bignoniaceae)	Vicenina A, Carajuruflavona, Acacetina, Carajurina, 6,7,3',4'-tetrahidroxi-5-metoxiflavilium, 6,7,4'-trihidroxi-5-metoxiflavilium, 4'-hidroxi-3,7-dimetoxiflavona, Kaempferol
<i>Davilla rugosa</i> (Dilleniaceae)	Quercetina
<i>Mimosa tenuiflora</i> (Fabaceae)	Tenuiflorina A, Tenuiflorina B, Tenuiflorina C, 6-Dimetoxicapilarisina, 6-Dimetoxi-4'-O-metilcapilarisina
<i>Nymphaea ampla</i> (Nymphaeaceae)	Derivados de Quercetina (glicosídeos)
<i>Passiflora sp.</i> (Passifloraceae)	Vitexina, Scoparina, Isoorientina, Orientina, Isovitexina, Chrisin (<i>P. caeruleae</i>), Apigenina e Luteolina derivados (<i>P. edulis</i>)
<i>Paulinia cupana</i> (Sapindaceae)	Epicatequinas, Catequinas
<i>Schinus terebinthifolius</i> (Anacardiaceae)	Quercetina, Miricetina, Kaempferol e derivados
<i>Trichilia catiguá</i> (Meliaceae)	Ácido Clorogênico, Catequina e Epicatequina
<i>Turnera diffusa</i> (Turneraceae)	Tricina, Crisoeriol, Equinacina, Luteolina, Apigenina, Quercetina, Orientina e Vitexina derivados

FONTE: SILVA; BORGES; VELOZO (2012)

O trabalho de Ko *et al.* (2004), estabelece uma relação entre a estrutura de alguns flavonoides e seus efeitos inibitórios sobre fosfodiesterases (PDE), dentre as quais a PDE-5 possui forte relação com a atividade afrodisíaca. O estudo afirma que a luteolina apresentou maior atividade entre os flavonoides investigados, comprovando a importância de uma ligação dupla entre C-2 e C-3 para a inibição de PDE-5. Os resultados sugerem ainda que é possível sintetizar drogas úteis a partir de alterações feitas na estrutura de flavonoides, permitindo assim, a inibição seletiva da PDE-5 (KO *et al.*, 2004).

Os alcaloides são outra classe de metabólitos secundários naturais, derivados não somente de plantas como também de fungos e bactérias, muito encontrada em plantas afrodisíacas. Possuem em sua estrutura basicamente nitrogênio, oxigênio, hidrogênio e carbono e são especialmente interessantes devido

à heterogeneidade do grupo funcional e ao grande potencial bioativo, particularmente como inibidores de PDE (SILVA; BORGES; VELOZO, 2012).

As metilxantinas são bases de purina e têm semelhança estrutural com o cAMP e cGMP, portanto, ligam-se competitivamente aos sítios das diversas PDE. Eles são considerados inibidores não seletivos, como a cafeína encontrada em sementes de *Paullinia cupana* e teobromina e adenina de *Ptychopetalum olacoides*, as quais justificam o seu efeito afrodisíaco (SILVA; BORGES; VELOZO, 2012).

A TABELA 8 relaciona os alcaloides, xantinas e outras amins encontradas em algumas plantas consideradas afrodisíacas.

TABELA 8 - PLANTAS AFRODISÍACAS E SEUS ALCALOIDES, XANTINAS E OUTRAS AMINAS

Espécie (Família)	Alcaloides, Xantinas e outras Amins
<i>Aristolochia cymbifera</i> (Aristolochiaceae)	Magnoflorina
<i>Erythroxylum viceniifolium</i> (Erythroxylaceae)	Catuabina, Vaccinina e derivados
<i>Hippeastrum psittacinum</i> (Amaryllidaceae)	Galantamina, Montanina, Hipeastrina, Pretazetina, Licorina e Licosinina
<i>Mimosa pudica</i> (Fabaceae)	Mimopudina, Mimosiina e Feniletilamina
<i>Mimosa tenuiflora</i> (Fabaceae)	L-dopa, Yuremamina, 5-Hidroxitriptamina e N-dimetiltriptamina
<i>Passiflora sp.</i> (Passifloraceae)	Harman, Harmol, Harmin, Harmalol e Harmalin
<i>Paulinia cupana</i> (Sapindaceae)	Cafeína
<i>Ptychopetalum olacoides</i> (Oleaceae)	Adenina, Cafeína, Muirapuamina e Teobromina

FONTE: SILVA; BORGES; VELOSO (2012)

Enquanto muitas β -carbolinas têm efeito como inibidor seletivo de PDE-5, os alcaloides de *Passiflora* parecem ter efeito como inibidores de recaptação de serotonina e, portanto, agem como antidepressivos. Recentemente, a harmina e numerosos derivados de β -carbolina relacionados, foram mencionados como inibidores potentes e específicos de quinases dependentes de ciclina (CDKs), e a análise de relação estrutura atividade demonstrou que o grau de aromaticidade do anel tricíclico e o posicionamento de substituintes, eram cruciais para a atividade inibitória (SILVA; BORGES; VELOZO, 2012).

Outro grupo de substâncias químicas citadas em extratos com indicação afrodisíaca são as saponinas, compostos sem nitrogênio, em geral glicosídeos de esteroides ou terpenos policíclicos, amplamente distribuídos em plantas superiores. Suas propriedades surfactantes são o que distinguem estes compostos de outros,

além de serem solúveis em água e formarem soluções coloidais com formação de espuma mediante agitação. As saponinas possuem grande variedade de atividades biológicas, incluindo hemolítica, hepatoprotetora, antimutagênica, antiviral, leishmanicida e anti-inflamatória (SILVA; BORGES; VELOZO, 2012).

Alguns estudos sugerem que determinados constituintes químicos presentes em plantas adaptógenas e afrodisíacas mimetizam hormônios, como por exemplo as saponinas e outros constituintes triterpênicos, com estrutura muito similar à de hormônios esteroides, tais como o ginsenosídeo Rb1 (FIGURA 11-1) e ginsenosídeo Rg3 (FIGURA 11-2), cujos mecanismos de ação são parcialmente atribuídos a esta similaridade, como podemos comparar na (FIGURA 11-3) o cortisol. Por outro lado, alguns constituintes fenólicos, como lignanas e fenilpropanóides, tais como o Eleutherosídeo B (também chamado siringin) (FIGURA 11-4), são estruturalmente semelhantes às catecolaminas, como a noradrenalina (FIGURA 11-5), importantes mediadores da ativação do sistema nervoso simpático (MENDES, 2011).

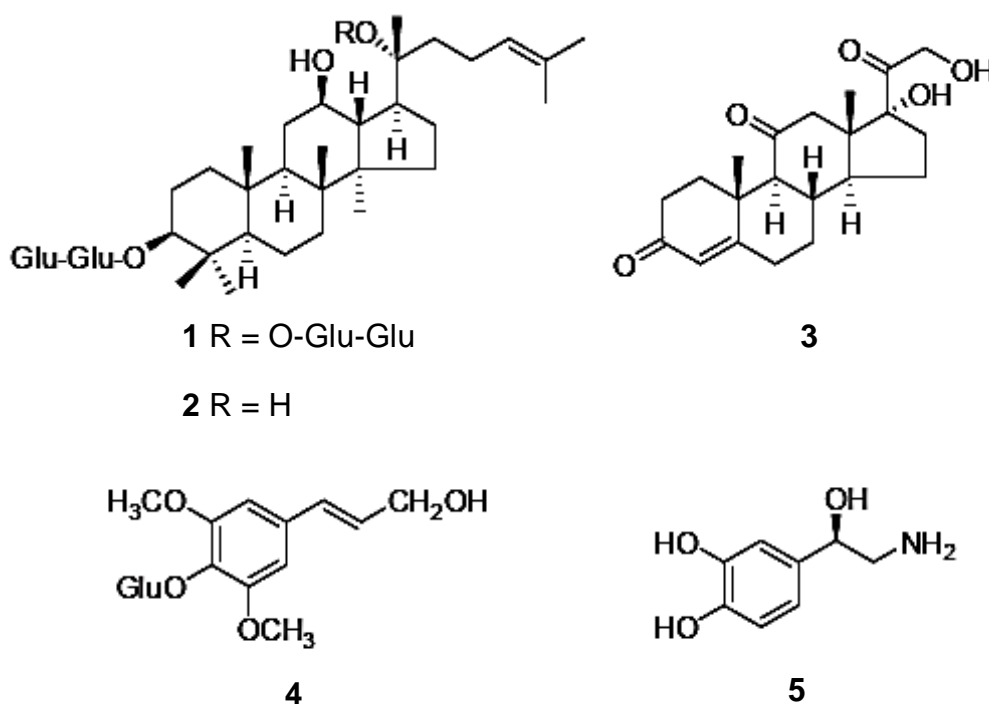


FIGURA 11 - ESTRUTURAS QUÍMICAS DE CONHECIDAS SUBSTÂNCIAS COM EFEITO ADAPTÓGENO

NOTA: (1) Ginsenosídeo Rb1; (2) Ginsenosídeo Rg3; (3) Cortisol; (4) Siringin; (5) Noradrenalina.

FONTE: MENDES (2011)

A protodioscina é um exemplo de saponina esteroidal. Presente no *Tribulus terrestris*, teve clinicamente comprovada sua atividade de melhorar o desejo sexual e a ereção através da sua conversão em DHEA, precursor da testosterona (ADIMOELJA, 2000).

Yam mexicano (*Discoreae villosa*), também conhecido como Inhame selvagem, possui na sua composição química saponinas esteroidais, principalmente pertencentes às classes espirostanol e furostanol, muito presentes nas espécies do gênero *Discoreae*, servindo como importantes marcadores químicos para o controle de qualidade de produtos a base destas plantas (DONG *et al.*, 2013) A Diosgenina, obtido após hidrólise de saponinas do Inhame selvagem, é utilizada como material de partida para a síntese industrial parcial de fármacos esteroidais, por exemplo, progesterona e testosterona (HU *et al.*, 2007).

A investigação das classes de metabolitos presentes nas plantas pode auxiliar na avaliação da relação entre a estrutura e possível atividade das substâncias afrodisíacas o que pode contribuir para o desenvolvimento e produção de novas drogas, eficazes e seguras, derivadas de produtos naturais.

2.5.3 Animais de laboratório utilizados na avaliação de comportamento sexual

Por mais de um século, os animais de laboratório vem sendo utilizados na pesquisa biomédica para os mais diversos tipos de estudos envolvendo anatomia, fisiologia, imunologia e virologia, dentre outros, e permitiram um avanço considerável no desenvolvimento da ciência e tecnologia (ANDRADE; PINTO; OLIVEIRA, 2002).

Os modelos animais podem ser utilizados em todos os campos da pesquisa biológica e são importantes por possuírem mecanismos patológicos suficientemente similares àqueles de uma doença humana, sendo por isso, utilizados como modelos experimentais. Esse modelo animal, obrigatoriamente, deve permitir a avaliação de fenômenos biológicos naturais, induzidos ou comportamentais, que possam ser comparados aos fenômenos humanos em questão (FERREIRA *et al.*, 2005).

Nos primórdios dos estudos experimentais envolvendo animais de laboratório, não existiam critérios de seleção de animais, ou não eram bem definidos. A seletividade veio em decorrência do número de trabalhos realizados e da

identificação dos animais com os temas estudados (CHORILLI; MICHELIN; SALGADO, 2007).

Animais de várias espécies estão sendo utilizados ao longo desses últimos dois séculos de desenvolvimento científico, porém os camundongos são atualmente os mais usados. Sua introdução como animal de laboratório se deve principalmente ao fato de ser pequeno, muito prolífero, ter período de gestação curto e por ser de fácil domesticação e manutenção (CHORILLI; MICHELIN; SALGADO, 2007).

Os camundongos tornam-se aptos à reprodução aos 60 dias de idade, sendo que os efeitos hormonais iniciais já estão presentes em ambos os sexos ao redor dos 30 dias de idade. O ciclo estral completo dura de quatro a cinco dias, ou seja, a cada cinco dias ocorre a ovulação (CHORILLI; MICHELIN; SALGADO, 2007). Por esses motivos, esses modelos experimentais são muito utilizados em pesquisas de comportamento sexual principalmente de extratos vegetais com indicação terapêutica afrodisíaca e estimulante sexual, as quais são embasadas na análise de parâmetros como latência e quantidade de monta, pela observação do macho em relação a fêmea, após serem tratados com os extratos analisados (SURESH-KUMAR; SUBRAMONIAM; PUSHANGADAN, 2000; ZHENG *et al.*, 2000; TAJUDDIN; LATIF; QASMI, 2003; PANDE; PATHAK, 2009).

A TABELA 9 relaciona os dados biológicos de um camundongo saudável, animais estes geralmente utilizados em ensaios farmacológicos para a avaliação dos efeitos de extratos obtidos a partir de espécies vegetais.

TABELA 9 - DADOS BIOLÓGICOS DE UM CAMUNDONGO SAUDÁVEL

Dados Biológicos	Valores Normais
Peso corpóreo do adulto (g)	20-40
Expectância de vida (anos)	1,5 a 3
Consumo de alimentos (g/dia - adulto)	5
Consumo de água (mL/dia - adulto)	6
Maturidade sexual do macho (dias)	50
Maturidade sexual da fêmea (dias)	50-60
Período de gestação (dias)	19-21
Temperatura corpórea (°C)	36-37
Frequência cardíaca (bpm)	500-600
Frequência respiratória (min ⁻¹)	84-230

FONTE: BIOTERIO CENTRAL UFC (2014)

Além dos camundongos, outro modelo muito utilizado em ensaios de avaliação do comportamento sexual de animais tratados com extratos de plantas são os ratos, geralmente da espécie Wistar, e estes por serem maiores, permitem a avaliação de parâmetros que são mais difíceis de serem observados em camundongos, como por exemplo, a latência e o número de intromissões (ESTRADA-REYES; CARRO-JUAREZ; MARTINEZ-MOTA, 2013; SINGH; GUPTA, 2011).

3. MATERIAL E MÉTODOS

A FIGURA 12 ilustra as fases do trabalho, as quais estão descritas em detalhes em cada item deste capítulo. As etapas de coleta, identificação, preparo da planta e seus extratos brutos e frações, foram realizadas numa primeira etapa conforme descrito na dissertação, Cansian (2010).

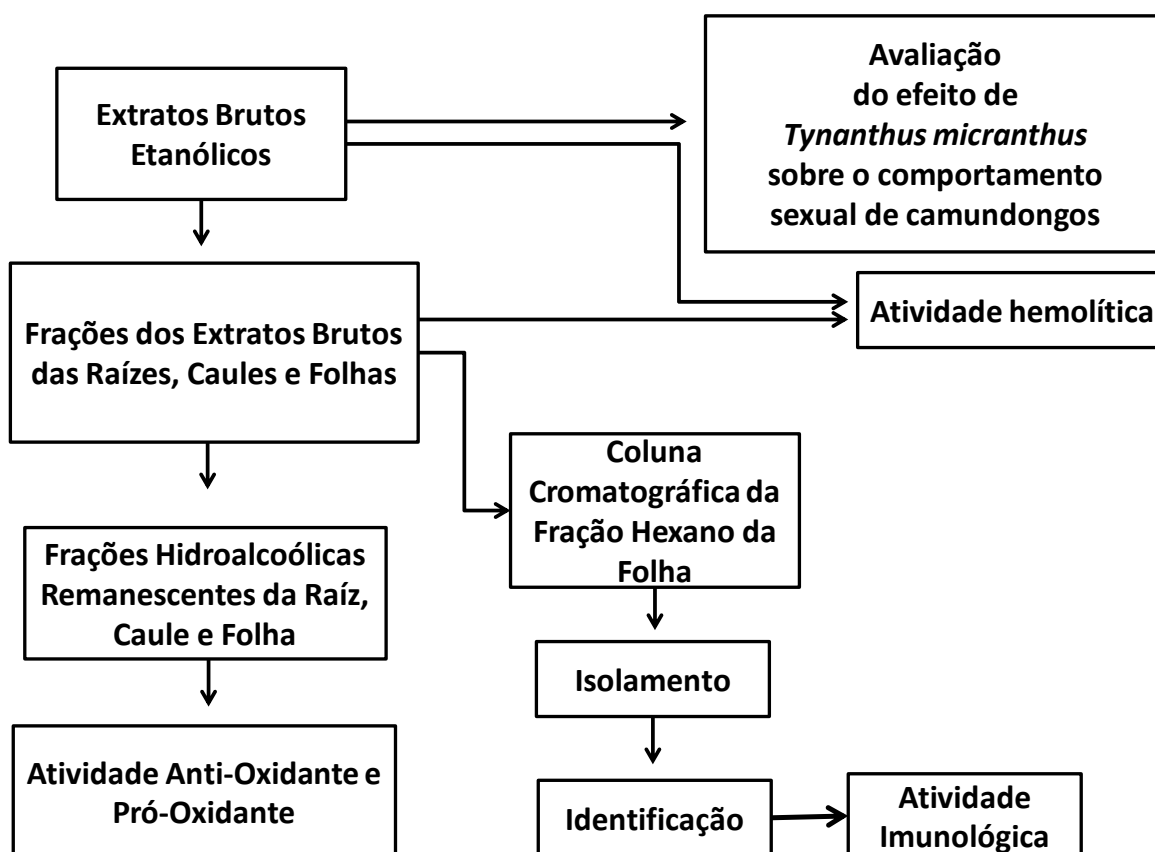


FIGURA 12 – FLUXOGRAMA DAS ETAPAS DO TRABALHO

A espécie *Tynanthus micranthus* foi coletada na Fazenda Água Azul localizada no município de Quinta do Sol no Estado do Paraná, coordenadas geográficas: Latitude: S23°55.530 Longitude: W052°06.650, conforme foto via satélite (FIGURA 13).



FIGURA 13 - IMAGEM DE SATÉLITE DO LOCAL DA COLETA
FONTE: GOOGLE EARTH (2013)

O acesso ao patrimônio genético foi avaliado pelo *CNPq* (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico), cuja autorização concedida está registrada sob número 010393/2013-7. Antes disso, fez-se o registro para coleta de material botânico, fúngico e microbiológico através do IBAMA (Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis), cadastrado sob o número 28497-1, conforme mostram os ANEXOS 1 e 2.

A identificação da espécie vegetal foi realizada pelos botânicos especialistas, Dr. Gert Hatschbach e Osmar dos Santos Ribas, do Museu Botânico Municipal (MBM) de Curitiba-PR. A análise foi feita por comparação com a exsicata (FIGURA 14) depositada e registrada sob o número 231.071.

As partes da planta coletadas foram raiz, caule e folhas e foram secas e estabilizadas na estufa por 48 horas a uma temperatura de 40°C. Posteriormente foram rasuradas para serem utilizadas no preparo dos extratos brutos e frações.

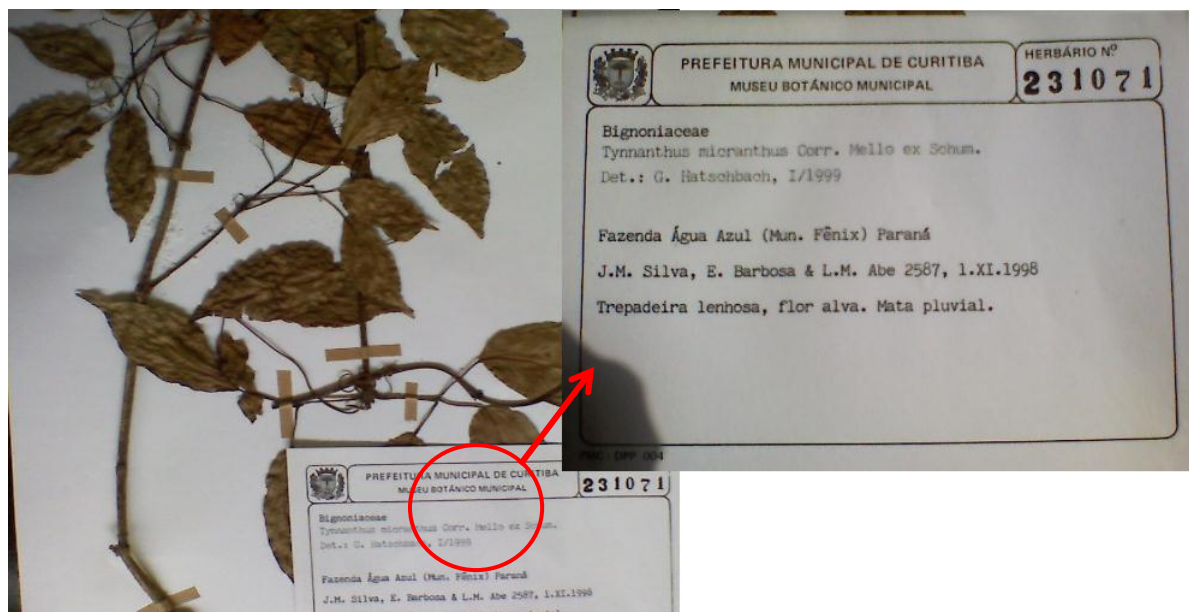


FIGURA 14: FOTOGRAFIA DA EXSICATA DE *Tynanthus micranthus* Corr. Mello ex Schum.
 FONTE: a autora (2009)

3.1 ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DO COMPOSTO QUÍMICO ISOLADO

Após a obtenção dos extratos brutos e frações, partiu-se para a realização de coluna cromatográfica, que consiste em separar substâncias químicas presentes no extrato, seguindo alguns princípios básicos como: montagem de coluna ou placa; aplicação da amostra; passagem do solvente escolhido (fase móvel) através da fase estacionária; revelação e visualização das diferentes zonas de separação dos compostos; e extração das substâncias retidas na fase estacionária (SIMÕES *et al.*, 2007).

A fração trabalhada para o isolamento do composto foi a hexânica das folhas, a qual foi filtrada após seu preparo e o resíduo da filtração (10,65g) submetido a cromatografia em coluna. Para isso, inicialmente preparou-se uma pastilha (amostra diluída + sílica gel 60F-254) na proporção de 1:5 e levou-se à secura em banho-maria a 50°C sob constante homogeneização. Em uma coluna de vidro, colocou-se a fase estacionária que utilizou sílica-gel 60 Merck 0,063 – 0,200 mm na proporção de 5 partes em relação à quantidade de pastilha, adicionada logo acima da fase estacionária. Como fase móvel, utilizou-se hexano e acetato de etila em gradiente que variou de 100% de hexano até 100% de acetato de etila. Conforme este eluente

foi passando pela coluna preparada, as amostras foram sendo recolhidas em frascos de aproximadamente 20 mL e levadas à secura em temperatura ambiente.

Como foi observada, através de placas cromatográficas, uma mistura de compostos nas sub-frações analisadas, houve a necessidade de separá-los através de cromatografia de camada delgada em escala preparativa. Sendo assim, com a ajuda de um capilar, aplicou-se a quantidade reunida das sub-frações de 1 a 8 em placas cromatográficas de sílica-gel GF254 (20 cm de largura e 10 cm de altura). Após a aplicação, que foi realizada em forma de linha ou barra, a placa foi colocada em contato com a fase móvel em um recipiente fechado contendo tolueno e acetato de etila (93:7), até sua saturação. Ao final da corrida cromatográfica, as placas foram observadas sob luz UV, a qual permitiu a visualização da área de demarcação do composto em questão. Esta região foi raspada, o resíduo obtido foi solubilizado em clorofórmio e filtrado para separar a sílica proveniente da placa cromatográfica. Finalmente, o solvente foi removido por evaporação para a obtenção do isolado purificado.

O isolado obtido foi identificado através da análise dos espectros obtidos por espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN), em equipamento Bruker DPX 200, operando a 4,7 Tesla, observando os núcleos de ^1H e ^{13}C a 200,13 e 50,32 MHz, respectivamente.

3.2 ATIVIDADE IMUNOLÓGICA DO COMPOSTO ISOLADO

Para a análise qualitativa dos neutrófilos sob a influência do composto isolado, utilizou-se o método adaptado e modificado de Park, Fikrig, Smithwick (1968), Park, Good (1970), Levinsky *et al.* (1983), Markert, Andrews, Babior (1984) e Abreu *et al.* (2009). O teste, de fácil execução e baixo custo, utilizou o *nitroblue tetrazolium* (NBT), que reflete a ativação dos neutrófilos através da geração de ânion superóxido.

O NBT é um corante amarelo que, após sofrer redução, passa a azul-escuro, formando um precipitado insolúvel chamado formazan, que se deposita no citoplasma dos neutrófilos, dando uma coloração azul forte às células ativadas, facilmente observado ao microscópio (KLEMPNER, *et al.*, 1979).

O ensaio *in vitro* permite saber se o extrato vegetal, ou substâncias dele isoladas, provocam a ativação celular, pela demonstração histoquímica da redução intracitoplásmica do NBT em neutrófilos.

Como a técnica faz uso de sangue humano, as análises foram submetidas à aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa, do Setor de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Paraná, cujo número de registro é CEP/SD: 1033.158.10.11, CAAE: 0090.0.091.000-10 (ANEXO 3). O sangue foi coletado de voluntários no dia do teste, reservando-o com heparina até a realização da técnica.

Para a obtenção da suspensão de neutrófilos utilizados no ensaio, misturou-se 36 mL de água destilada e 3mL de sangue e homogenizou-se durante 30 segundos. Em seguida, adicionou-se 12 mL de tampão PBS (*phosphate buffered saline*, Serva Electrophoresis[®]), homogeneizou-se durante 15 segundos e centrifugou-se por 10 minutos a 2000 rpm. Desprezou-se o sobrenadante e ressuspendeu-se delicadamente o sedimento em 3 mL de PBS. Em um tubo cônico colocou-se 3 mL de ficoll (Lymphopred[®]) e adicionou-se o sedimento sobre o mesmo com cuidado para não misturá-lo. Centrifugou-se por 25 minutos a 1500 rpm. Os neutrófilos ficam no sedimento, por isso, retirou-se o sobrenadante e ressuspendeu-se o sedimento em 3 mL de PBS. Centrifugou-se por 10 minutos a 2000 rpm. Ressuspendeu-se o sedimento em 1 mL de PBS, o que permite uma concentração de neutrófilos superior a 3×10^6 /mL.

3.2.1 Preparo das amostras

A amostra do composto isolado dotriacontane, resultante do procedimento descrito no capítulo 3.1, foi dissolvido primeiramente em DMSO (dimetilsulfoxido - 1mg/mL). Desta primeira diluição retirou-se 250 μ L e acrescentou-se a 750 μ L de água destilada (concentração resultante de 250 μ g/mL). Em seguida, retirou-se desta segunda solução 10, 20, 40 e 60 μ L e completou-se com 990, 980, 960 e 940 μ L de água destilada, ficando, respectivamente, as soluções nas concentrações de 2,5 - 5,0 – 10,0 e 15,0 μ g/mL.

O *acetato miristato de forbol* (PMA), utilizado como controle positivo de ativação celular, foi diluído em DMSO (1mg/mL), assim como a amostra do

composto isolado, repetindo-se o seguinte passo com 250 μL da diluição em 750 μL de água destilada. Por fim, 40 μL desta última diluição (250 $\mu\text{g}/\text{mL}$) foi acrescentada a 960 μL de água, resultando numa solução com concentração de 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

Para confirmar a atividade do dotriacontane isolado de *Tynanthus micranthus*, fez-se em paralelo a análise do dotriacontane adquirido comercialmente da marca Sigma-Aldrich®.

3.2.2 Preparo da Técnica

Desenhou-se um círculo com aproximadamente 1 cm de diâmetro no fundo de uma lâmina de vidro. Adicionou-se e espalhou-se no centro de cada círculo o PMA (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) e o dotriacontane nas concentrações de 2,5, 5, 10 e 15 $\mu\text{g}/\text{mL}$. A placa ficou em repouso à temperatura ambiente para secagem durante 2 dias.

Adicionou-se a suspensão de neutrófilos em PBS no centro do círculo e incubou-se a 37°C em câmara úmida por 20 minutos. Após a incubação, lavou-se 10 vezes a placa com PBS, adicionou-se 1 ou 2 gotas de corante NBT 4mM (Peso Molecular do NBT = 817,7g; 4mM = 3,2mg/mL de PBS) e incubou-se por 15 minutos a 37°C em câmara úmida. Lavou-se 3 vezes com PBS e secou-se ao ar.

Corou-se a placa com safranina por 10 minutos, após lavou-se 3 vezes com água e secou-se ao ar. Posteriormente a placa foi examinada ao microscópio para a observação das células coradas em azul.

3.3 ATIVIDADE HEMOLÍTICA

A avaliação da atividade hemolítica dos extratos brutos e frações foi realizada segundo a metodologia descrita por Asthana, Yadav e Ghosh (2004), com algumas modificações. Esta técnica teve como objetivo complementar a avaliação da toxicidade dos extratos brutos e frações da planta aliado aos resultados preliminares obtidos pelo método de avaliação da toxicidade frente à *Artemia salina*.

Primeiramente preparou-se o sangue de carneiro (Newprov[®]) que foi homogeneizado através de leve agitação manual. Após transferiu-se 5 mL para um tubo de ensaio e centrifugou-se por 5 minutos a 3000 rpm. Desprezou-se o sobrenadante, lavou-se com PBS (*phosphate buffered saline*, Serva Electrophoresis[®]) gelado centrifugando-se por 5 minutos a 3000 rpm, no mínimo 3 vezes, até a observação de que o sobrenadante descartado era incolor. O volume da papa de eritrócitos lavados foi diluído a 10% em PBS.

Para o ensaio, utilizaram-se eppendorfs divididos da seguinte forma:

- Eppendorfs testes: 200 µL de cada amostra (extratos brutos e frações) diluídas em PBS nas concentrações, 1000, 500, 200 e 100 µg/mL + 200 µL de solução de eritrócitos a 10% em triplicatas.
- Eppendorfs branco: 200 µL de PBS + 200 µL de solução de eritrócitos a 10% em triplicatas.
- Eppendorfs controle positivo (hemólise 100%): 200 µL de H₂O + 200 µL de solução de eritrócitos a 10% em triplicatas.

Após o preparo dos eppendorfs com as devidas diluições, homogeneizou-se uniformemente com leve agitação manual e incubou-se por 3 horas em estufa com temperatura controlada a 37°C. Posteriormente centrifugou-se os eppendorfs por 5 minutos a 3000 rpm e retirou-se o sobrenadante dos tubos pipetando-os para placas de ELISA onde foram realizadas as leituras em espectrofotômetro de placa em 540 nm.

Visualmente a hemólise pode ser detectada através da coloração vermelha do sobrenadante, porém para a sua quantificação calculou-se o valor em porcentagem, considerando-se 100% a absorbância lida no tubo de hemólise total, seguindo a equação, onde *A* = Absorbância e *HT* = hemólise total:

$$(A \text{ amostra} - A \text{ branco} / (A \text{ HT} - A \text{ branco}) \times 100$$

Com as médias dos percentuais de hemólise, realizou-se a análise estatística através do teste de Tukey ($p < 0,05$), comparando-se os resultados obtidos ao controle.

3.4 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

Este ensaio teve a finalidade de complementar os estudos iniciados por Cansian (2010), o qual avaliou o potencial antioxidante dos extratos brutos e frações de *Tynanthus micranthus* através dos métodos Fosfomolibdênio e DPPH. Como os resultados obtidos foram pouco representativos, procurou-se realizar novos ensaios que simularam condições naturais do organismo humano, através da avaliação de enzimas envolvidas na primeira defesa endógena, relacionadas aos ataques das espécies reativas de oxigênio, impedindo sua formação ou sequestrando-as de forma a impedir sua interação com alvos celulares, ou seja, bloqueando a etapa de iniciação da cadeia radicalar (ROVER *et al.*, 2001).

Além disso, avaliou-se a atividade antioxidante enzimática apenas de amostras que apresentaram atividade frente à enzima tirosinase, em ensaios também realizados por Cansian (2010), uma vez que a atividade da tirosinase está diretamente ligada à presença de substâncias antioxidantes, muito encontradas em extratos vegetais, como por exemplo, flavonoides e ácidos fenólicos (SUNG-JUM; VINAY; NITI, 2003).

Para estes ensaios, foram utilizadas suspensões de eritrócitos (2%) obtidos de sangue de carneiro desfibrinado (Newprov[®]), suspensas em tampão fosfato. Apenas para o ensaio da atividade da catalase foi utilizado como fonte enzimática o plasma de coelho liofilizado, obtido pela mesma empresa.

O sangue de carneiro primeiramente passou por um processo de centrifugação com a finalidade de remover o plasma, plaquetas e leucócitos. Os eritrócitos, presentes no sedimento, foram lavados 3 vezes com NaCl (123 mM) em 28 mM de tampão de fosfato (pH 7,4), seguida pela centrifugação a 3000 rpm por 5 minutos, e ressuspensos no tampão fosfato.

Em seguida foram divididas em alíquotas de 2 mL, centrifugadas a 3000 rpm por 5 minutos, com substituição dos sobrenadantes das frações pelo mesmo volume dos reagentes da solução (200 µg/mL dos extratos e frações). Incubaram-se as amostras, durante 30 minutos, a temperatura ambiente, homogeneizando-as em aparelho PHOENIX HS 22.

3.4.1 Atividade da catalase

A atividade da catalase foi realizada conforme Aebi (1984), com modificações como, o uso de plasma de coelho liofilizado a 2,0% e as amostras contendo os extratos e padrões em tampão fostato 10 mM, pH 7.0.

As amostras e padrões quercetina e catequina, na concentração de 200 µg/mL, receberam 100 µL de plasma de coelho liofilizado. Em seguida, foi adicionado 100 µL de H₂O₂ 10 mM, e imediatamente fez-se a leitura em 240 nm (A₀) e após 15 segundos (A₁₅), permitindo estabelecer a velocidade de redução do H₂O₂, proporcional à velocidade da reação enzimática da catalase: $2\text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow 2\text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$. As reações foram realizadas a 25°C, sendo monitorado o consumo de H₂O₂ (ϵ , 0,036 mM⁻¹cm⁻¹) (AEBI, 1984).

Como controle positivo foi utilizado o hidroperóxido de terc-butila (tBHP) 5 mM, o qual aumenta a atividade da catalase, e como controle negativo, a suspensão com ausência de extratos, padrões e H₂O₂.

As análises foram realizadas em triplicata e os resultados foram expressos em µmol H₂O₂ min⁻¹.

3.4.2 Atividade da peroxidase

A atividade da peroxidase foi avaliada conforme Putter (1974) e Beutler (1984), com algumas modificações. As amostras e os padrões quercetina e catequina foram preparados numa concentração de 200 µg/mL dissolvidos em tampão fosfato de potássio 25 mM (pH 6.8). Posteriormente foram adicionados 500 µL de solução de sangue a 2,0% a 100 µL de cada solução das amostras preparadas.

Após 10 minutos a mistura foi hemolisada com 100 µL de H₂O₂ 10 mM, e adicionado 100 µL de solução precipitante (ácido metafosfórico a 2,0%, NaCl 0,9% e EDTA 2,0%) conforme descrito por Beutler (1984), e centrifugada a 25000 rpm por 10 minutos. 500 µL do sobrenadante foram retirados e adicionados 250 µL de guaiacol 2,6 mM.

Sistemas incubados sem adição de peroxidase foram utilizados como branco, como controle positivo foi utilizado o H_2O_2 e como controle negativo a suspensão com ausência de extratos e H_2O_2 a fim de estabelecer a atividade peroxidásica dos eritrócitos utilizados. A formação de Tetraguaicol (ϵ , $25,5 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), produto da oxidação do guaiacol, foi monitorada a 470 nm (PUTTER, 1974).

3.4.3 Atividade da superóxido dismutase

O método descrito por Ilouno, Shu e Igbokwe (1996) foi utilizado com o objetivo de verificar a inibição da atividade da superóxido dismutase (SOD). Para isso, as soluções das amostras e padrões quercetina e catequina ($200 \mu\text{g/mL}$), receberam 1 mL de solução de sangue de carneiro a 2%, seguidos de $50 \mu\text{L}$ de tBHP (5 mM), e foram incubadas durante 30 minutos. Posteriormente as soluções foram hemolisadas com $250 \mu\text{L}$ de H_2O_2 destilada, e adicionada $250 \mu\text{L}$ de solução precipitante (ácido metafosfórico a 2,0%, NaCl 0,9% e EDTA 2,0%). As amostras foram centrifugadas e retirados $500 \mu\text{L}$ do sobrenadante, seguidos de $500 \mu\text{L}$ de solução SOD reagente (NBT $1,5 \text{ mM}$, riboflavina $2,5 \text{ mM}$, L-metionina 13 mM e tampão fosfato de potássio pH 7,8). Fez-se a leitura a 560 nm após 20 minutos de incubação.

Como controle foi utilizado a mesma concentração de sangue de carneiro a 2,0%, porém na ausência dos extratos e oxidante tBHP. Os resultados foram expressos em unidades de SOD/mg de proteína. Uma unidade de SOD é definida como a quantidade de enzima necessária para inibir em 50% a auto oxidação do NBT (WINTERBOURN, 1975; ILOUNO, SHU, IGBOKWE, 1996).

3.7.4 Atividade da glutathiona reduzida

Para avaliar a atividade da glutathiona reduzida (GSH), utilizou-se a metodologia descrita por Beutler, Duron e Kelly (1963), onde as suspensões de eritrócitos, incubadas ou não com os extratos, foram homogeneizadas durante 15

minutos com tBHP (5 mM). A concentração de GSH foi analisada pela determinação da glutatona do sangue, através da redução de 5.5'-ditiobis (ácido 2-nitrobenzóico - reagente de Ellman) por compostos sulfidrílicos presentes na molécula, medida em 412 nm (ϵ , $6,2 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) (FOYER; HALLIWELL, 1976).

Como controle positivo utilizou-se o tBHP e como controle negativo a suspensão de eritrócitos na ausência de extratos e tBHP para estabelecer a atividade da GSH dos eritrócitos utilizados.

3.4.5 Cálculo da atividade enzimática

A atividade das enzimas foi calculada segundo Bracht *et al.*, 2003. A absorbância dessas amostras, cujos ensaios foram realizados em triplicata, foi monitorada conforme metodologia descrita para cada enzima, e em seguida plotado um gráfico para cada dosagem enzimática, para obtenção da variação da tangente, medida pela fórmula $\alpha(\text{tg}) = \Delta A / \Delta t$, onde ΔA é a variação da absorbância e Δt é a variação do tempo (minutos).

Todas as enzimas possuem um coeficiente de extinção molar que é utilizado para calcular a atividade enzimática. As metodologias descrevem este coeficiente proveniente da cinética, sendo assim, após as leituras das absorbâncias, a atividade enzimática foi calculada em $\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1}$ através da seguinte fórmula:

$$\text{Atividade } (\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1}) = \text{vol. de incubação} \times \alpha (\text{tg}) (\text{min}^{-1}) = \text{unidades de enzima} / \text{Coeficiente de extinção molar da enzima } (\epsilon)$$

3.4.6 Atividade pró-oxidante

O mesmo procedimento foi utilizado para a atividade pró-oxidante da SOD e GSH, porém o oxidante tBHP não foi incubado com os extratos e padrões. Ambas as enzimas foram calculadas conforme procedimento já descrito acima e como controle

foi utilizada a mesma solução de sangue de carneiro, com ausência dos oxidantes e dos extratos.

Todos os testes foram realizados em triplicata, e os dados foram submetidos à análise de variância e quando os efeitos dos tratamentos foram significativos, ($p < 0,05$), em relação à testemunha, as médias foram comparadas pelo teste de Dunnet. Todos os resultados foram analisados considerando o nível de significância $\alpha = 5\%$.

3.5 AVALIAÇÃO DO COMPORTAMENTO SEXUAL

3.5.1 Animais e grupos experimentais

Realizou-se a avaliação do comportamento sexual de camundongos de acordo com Tajuddin; Latif; Qasmi (2003); Zamblé *et al.* (2008); Singh; Gupta (2011).

Para a experimentação foram utilizados camundongos Swiss (*Mus musculus*) machos e fêmeas com aproximadamente 60 dias, pesando em torno de 25g, adquiridos no biotério da Universidade do Vale do Itajaí (UNIVALI).

Os animais foram mantidos em sala com temperatura controlada (20 ± 2)°C, água e ração comercial *ad libitum*. Como os hábitos sexuais de camundongos são noturnos, durante três semanas os animais foram submetidos ao ciclo invertido, o qual estabelece iluminação artificial com um período de 12 horas claro e 12 horas escuro, considerando o período de luz das 22:00 às 10:00 horas da manhã.

Todos os procedimentos foram realizados de acordo com autorização concedida pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA), Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, processo número 23075.108893/2011-23 (ANEXO 4), respeitando os princípios éticos estabelecidos pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), e exigências definidas em “Guide for the Care and Use of Experimental Animals (Canadian Council on Animal Care)”.

As doses do extrato administradas foram determinadas de acordo com a utilização popular. Como as partes aéreas da planta (caule e folhas) são ingeridas popularmente em torno de 300mg/dia, pela média de peso de 60 kg de um ser humano normal adulto, calculou-se 5mg/kg/dia/animal como a dose usual e

10mg/kg/dia/animal o dobro da dose usual para realizar um comparativo. Foram pesadas partes iguais dos extratos brutos etanólicos do caule e das folhas.

Os machos foram divididos em quatro grupos de 7 - 9 animais cada. A variação ocorreu porque os animais com comportamento fora do padrão foram eliminados das estatísticas (TAJUDDIN; LATIF; QASMI, 2003):

- grupo CP300: tratados com 5mg/kg do extrato bruto das partes aéreas de *Tynanthus micranthus*;
- grupo CP600: tratados com 10mg/kg do extrato bruto das partes aéreas de *Tynanthus micranthus*;
- grupo controle sildenafil: tratados com 0,71 mg/kg (SINGH; GUPTA, 2011);
- grupo controle água destilada (veículo da diluição).

Os extratos e o controle sildenafil, nas concentrações acima citadas, foram dissolvidos em água e as doses foram administradas com catéter por via oral (gavagem). Durante o preparo das análises os animais foram mantidos em caixas com 4 ou 5 animais cada.

3.5.2 Preparação das fêmeas sexualmente receptivas

Para cada macho avaliado utilizou-se uma fêmea, porém, antes de serem colocados em contato, as fêmeas foram tratadas para se tornarem sexualmente receptivas, através da administração de hormônios sexuais femininos sintéticos. Aproximadamente 52 horas antes do acasalamento, as fêmeas receberam uma administração intraperitoneal de 10 UI de ECG (Gonadotrofina coriônica equina - Novormon® – Synthex, Buenos Aires, Argentina), seguido de 10 UI de HCG (gonadotrofina coriônica humana - Vetecor® - Calier, Barcelona, Espanha) 48 horas depois (NETO *et al.*, 2011).

3.5.3 Filmagem dos animais

O comportamento sexual foi filmado utilizando-se uma câmera de vídeo compacta durante a fase escura do ciclo no intervalo entre 13:00 às 20:00 horas, visto que os camundongos possuem hábitos sexuais noturnos e seu metabolismo está mais ativo.

Uma hora após a administração do tratamento, o macho foi introduzido em uma caixa de polipropileno transparente, permanecendo isolado por dez minutos para ambientação. Após este período a fêmea foi introduzida na caixa e o contato com o macho foi filmado durante 20 minutos, sendo separados após este período. A fêmea então foi retirada da caixa e passou por verificação quanto à presença de espermatozoides no esfregaço vaginal, confirmando-se ou não a ejaculação.

Foram consideradas sexualmente inativas as fêmeas que não apresentaram receptividade sexual (lordose, vibração das orelhas) num tempo de cinco minutos após serem colocadas com os machos, sendo então substituídas.

Após 3 horas de tratamento o macho foi colocado novamente em contato com a mesma fêmea, realizando-se a filmagem por mais 20 minutos.

Ao final das filmagens fez-se a análise através da observação de alguns parâmetros considerados importantes para a confirmação da influência dos extratos sobre o comportamento sexual destes animais, conforme detalhados no item 3.5.4.

3.5.4 Parâmetros analisados

A monta é operacionalmente definida como o macho assumindo a posição de cópula (TAJUDDIN; LATI; QASMI, 2003). A análise deste comportamento auxilia na determinação da atividade afrodisíaca de uma planta ou substância, sendo assim, após o término das filmagens foram analisados os seguintes parâmetros, principalmente relacionados ao comportamento de montagem:

- Latência de monta (seg): tempo decorrido entre a introdução da fêmea na caixa de filmagem e a primeira monta;
- Decisão ou não de monta;
- Número de montas ou tentativas de montas;
- Presença de espermatozóide (Sptz) no esfregaço vaginal.

Para os animais que não procuraram a fêmea durante o período analisado, considerou-se a latência de monta de 1200 segundos, que corresponde o tempo total das filmagens.

3.5.5 Análise estatística

A comparação estatística entre controle, padrão e grupos tratados foi obtida utilizando-se o teste de Kruskal-Wallis seguido pelo Teste de Dunns post-hoc para o parâmetro latência de monta e Teste-T para o parâmetro número de montas, com nível de confiança de 95% ($p < 0,05$).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

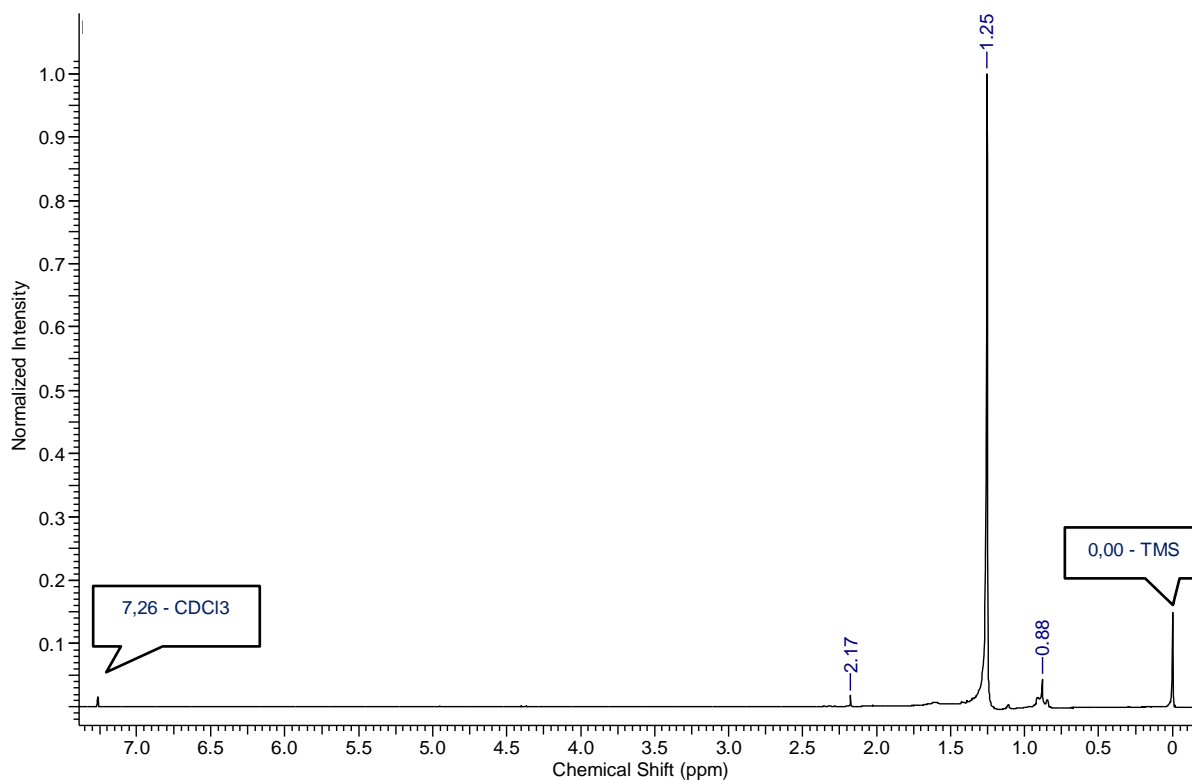
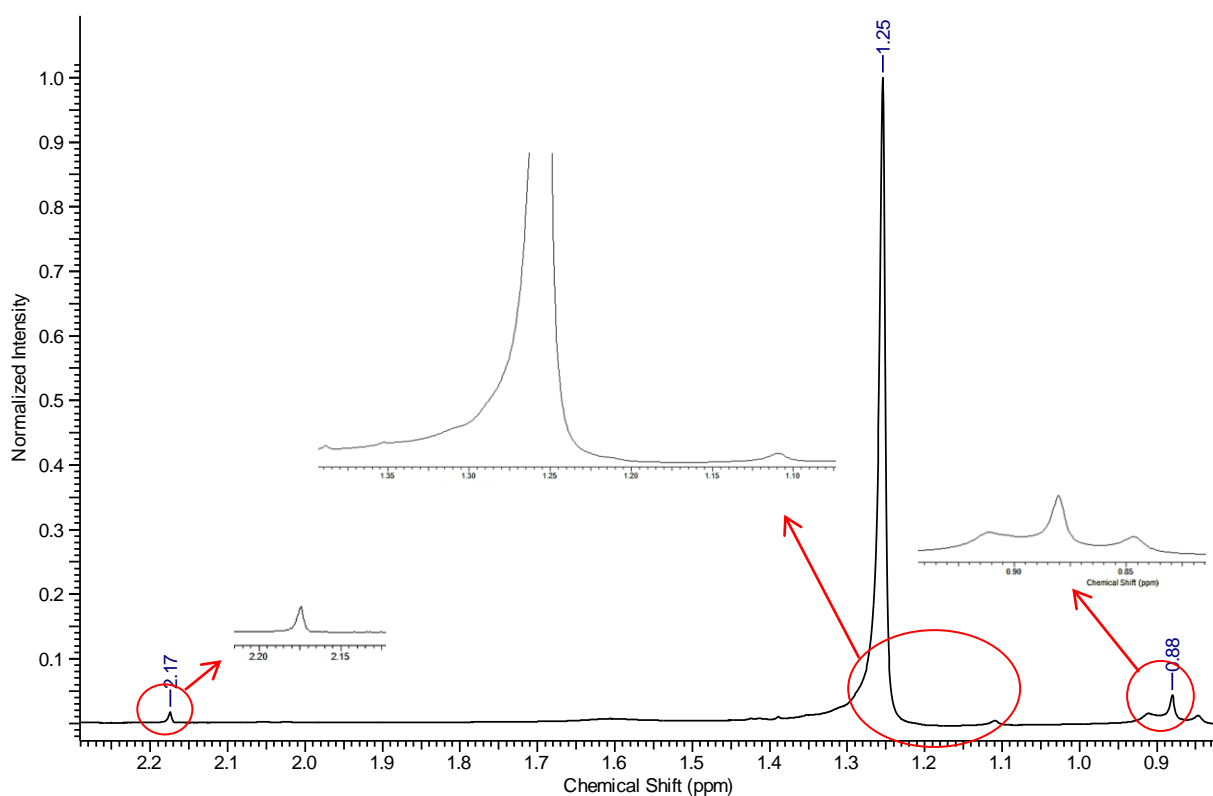
Todas as análises realizadas neste estudo utilizaram os extratos preparados anteriormente, por isso, os resultados dos testes físico-químicos e dos rendimentos obtidos no preparo dos extratos brutos e frações estão detalhados na dissertação de Cansian (2010). Este mesmo trabalho iniciou o isolamento e caracterização de compostos químicos presentes em *Tynanthus micranthus*, processo este que foi dado sequência no presente estudo, o qual trabalhou a fração hexânica das folhas. As demais frações estão reservadas para futuros estudos.

4.1 IDENTIFICAÇÃO DO DOTRIACONTANE

O hidrocarboneto dotriacontane foi isolado do resíduo do filtrado da fração hexânica das folhas e posteriormente foi analisado por RMN que possibilitou a elucidação de sua estrutura através da análise dos espectros de ^1H e ^{13}C obtidos no mesmo, conforme descrito no capítulo 3.1.

Os deslocamentos químicos (δ) obtidos no espectro de RMN ^1H (FIGURAS 15 e 16), mostram claramente um valor em δ 1,25 ppm característico de hidrogênios de $(-\text{CH}_2-)$, cuja integração (FIGURA 17) informa a presença de 60 hidrogênios nestas condições. O deslocamento químico em 0,88 ppm é característico de hidrogênios de metilas terminais $(-\text{CH}_3)$, cuja integração (FIGURA 17) sugere que estão em número de 6. O deslocamento em 2,17 ppm possivelmente representa um interferente que não faz parte da molécula, uma vez que a integração neste ponto apresentou um valor de 0,49.

Através das características observadas com os espectros de ^1H , que mostraram a presença de 66 hidrogênios, determinou-se o tamanho da cadeia carbônica.

FIGURA 15 - ESPECTRO DE RMN ¹H (CDCl₃, 200 MHz) DO DOTRIACONTANEFIGURA 16 - AMPLIAÇÃO DA REGIÃO ENTRE 0,85 – 2,2 ppm DO ESPECTRO DE RMN ¹H (CDCl₃, 200 MHz) DO DOTRIACONTANE COM DETALHE DE CADA DESLOCAMENTO QUÍMICO

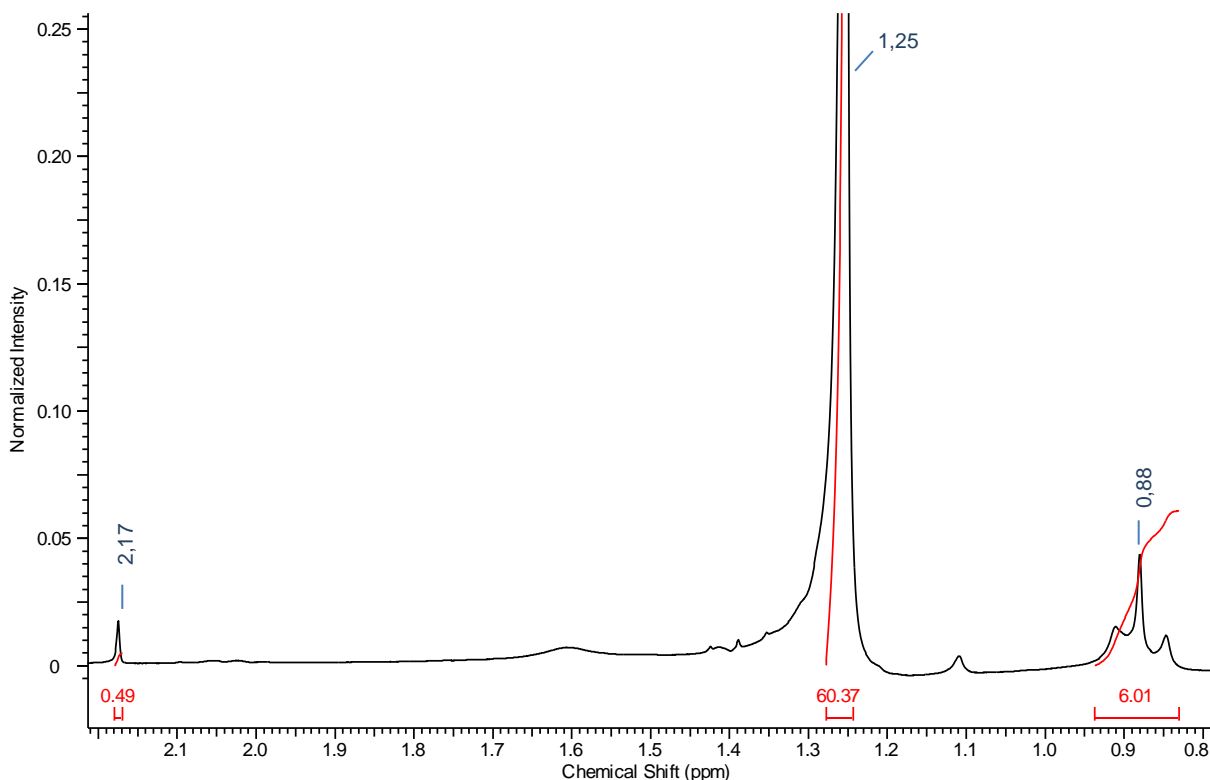


FIGURA 17 - INTEGRAÇÕES DOS HIDROGÊNIOS DO ESPECTRO DE RMN ^1H (CDCl_3 , 200 MHz) DO DOTRIACONTANE, AMPLIADO NA REGIÃO ENTRE 0,85 – 2,2 ppm

Os espectros de RMN ^{13}C (FIGURAS 18 e 19), mostram os deslocamentos químicos obtidos com a substância isolada, identificando-se os seguintes carbonos: δ 14,1 ppm indicativo de carbono de metila terminal; δ 22,7 ppm pertencente ao carbono ligado às metilas terminais; δ 29,7 ppm pico mais intenso correspondente aos carbonos da cadeia longa central; e δ 31,9 ppm correspondente aos carbonos 3 e 30 ligados aos grupamentos $-\text{CH}_2-\text{CH}_3$.

Ampliando a região entre δ 29,00 e δ 30,00 ppm (FIGURA 19 B), observa-se a presença de carbonos em δ 29,69 e δ 29,38 ppm. Estes também fazem parte da cadeia longa central, porém não foram posicionados porque seriam necessárias análises tridimensionais e carbono quantitativo, os quais não foram realizados. Sendo assim, foram incluídos no grupo dos carbonos em δ 29,7 ppm, posicionados entre C_4 e C_{29} (TABELA 10).

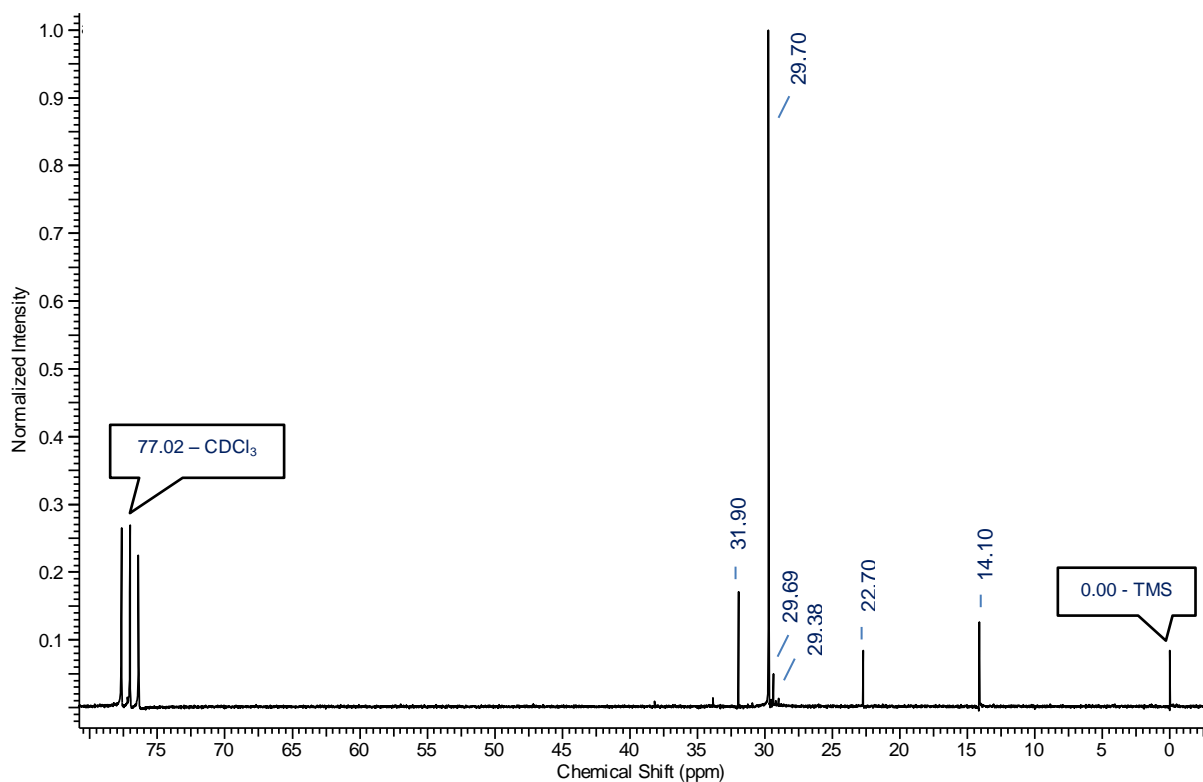


FIGURA 18 - ESPECTRO DE RMN ^{13}C (CDCl_3 , 50 MHz) DO DOTRIACONTANE

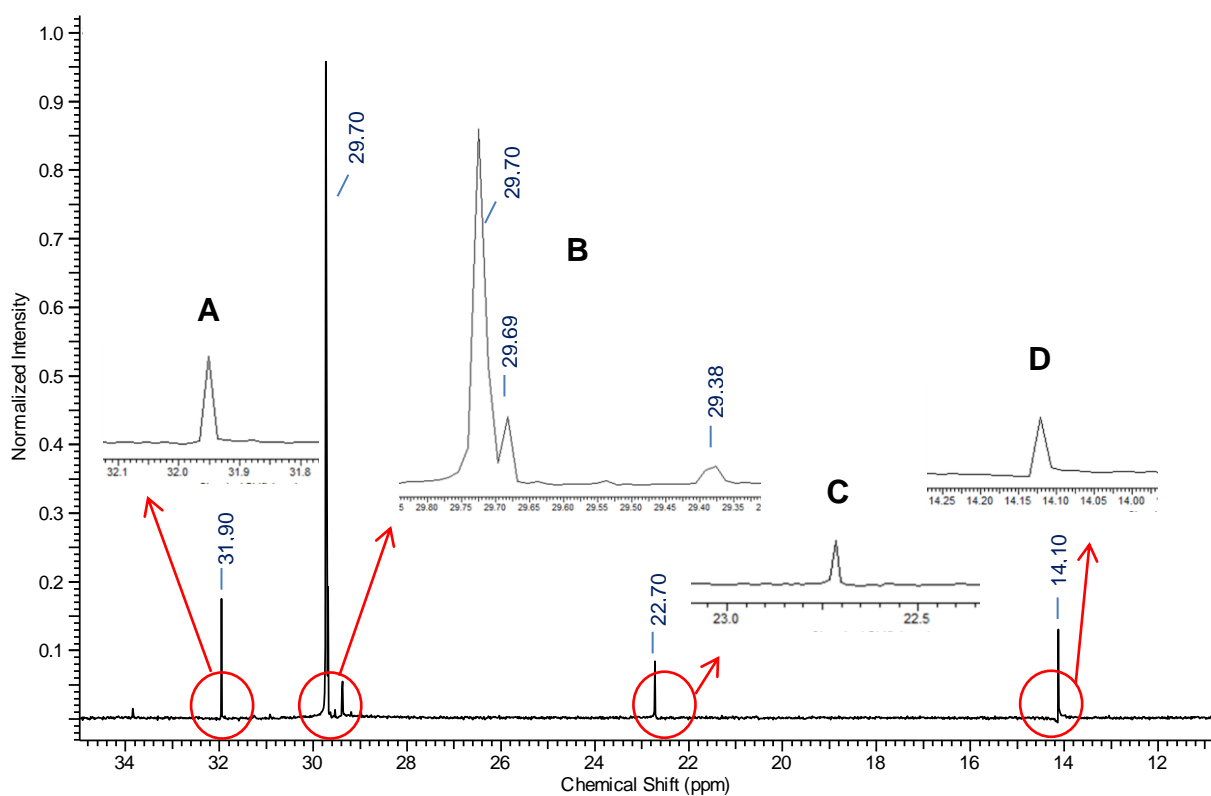


FIGURA 19 - AMPLIAÇÃO DA REGIÃO ENTRE 12 - 34 ppm DO ESPECTRO DE RMN ^{13}C (CDCl_3 , 50 MHz) DO DOTRIACONTANE COM DETALHE DE CADA DESLOCAMENTO QUÍMICO

Os deslocamentos obtidos com os espectros de ^{13}C e ^1H estão detalhados na TABELA 10, cuja análise demonstra tratar-se de um hidrocarboneto de cadeia longa, o alcano linear Dotriacontane (FIGURA 20), de fórmula molecular $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{30}\text{CH}_3$.

TABELA 10 - VALORES DE DESLOCAMENTOS QUÍMICOS (δ) DE RMN ^{13}C E ^1H PARA DOTRIACONTANE

Posição na molécula	δ Carbono (ppm)	δ Hidrogênio (ppm)
C_1 e C_{32}	14,1	0,88
C_2 e C_{31}	22,7	1,25
$\text{C}_4 - \text{C}_{29}$	29,7	1,25
C_3 e C_{30}	31,9	1,25

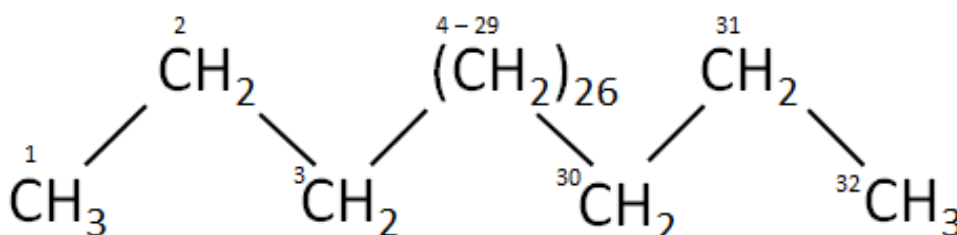


FIGURA 20 - FÓRMULA ESTRUTURAL DE DOTRIACONTANE

Complementando a elucidação do dotriacontane, a FIGURA 21 mostra espectros de RMN ^{13}C e ^1H sobrepostos, extraídos da ficha de especificações desta substância que pode ser adquirida pela Sigma Aldrich[®], onde pode-se comparar a similaridade com os espectros obtidos com o dotriacontane isolado de *Tynanthus micranthus*.

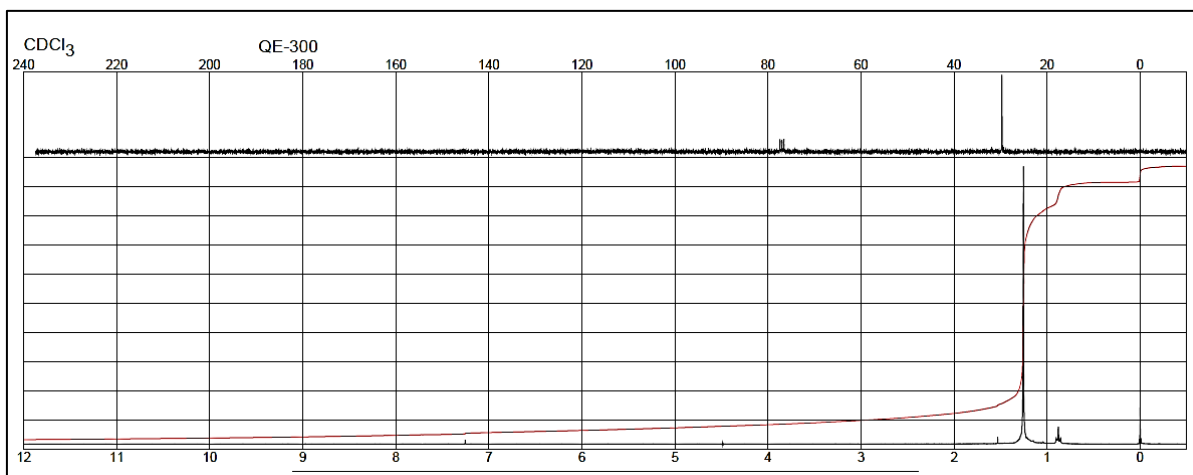


FIGURA 21 - FICHA DE ESPECIFICAÇÃO DO DOTRIACONTANE
 FONTE: SIGMA ALDRICH, 2013b

Os hidrocarbonetos naturais são compostos químicos constituídos apenas por átomos de carbono (C) e de hidrogênio (H), aos quais se podem juntar átomos de oxigênio (O), nitrogênio (N) e enxofre (S) dando origem a diferentes compostos de outros grupos funcionais. São conhecidos alguns milhares de hidrocarbonetos. As diferentes características físicas são uma conseqüência das diferentes composições moleculares. Contudo, todos os hidrocarbonetos apresentam uma propriedade comum, oxidam-se facilmente liberando calor (PERUZZO; CANTO, 1999).

Algumas plantas possuem na sua constituição química estruturas de hidrocarbonetos dos mais diversos pesos moleculares.

O *n*-tetracosano é um hidrocarboneto de cadeia longa de fórmula molecular $C_{24}H_{50}$ e foi isolado e identificado na espécie *Rourea induta* Planch., pertencente à família Connaraceae (KALEGARI *et al.*, 2011).

O trabalho de Tessmann e Dianese (2002) descreve o Hentriacontano, um hidrocarboneto obtido de folhas de *Syzygium jambos* (Myrtaceae), de fórmula molecular $C_{31}H_{64}$, o qual apresentou efeito estimulante sobre a germinação de urediniósporos de *Puccinia psidii*, fungo que provoca doença em algumas plantas como o próprio jambo (*Syzygium jambos* L. Alston) e em outras espécies da família Myrtaceae, entre elas a goiaba (*Psidium guajava* L.) e *Eucalyptus* spp.

Na família bignoniaceae, a espécie *Jacaranda cuspidifolia* Mart., conhecida como caroba, jacarandá e bolacheira, revelou a presença de uma mistura de hidrocarbonetos de 15 carbonos (pentadecano), 17 carbonos (heptadecano) e 20

carbonos (icosano) em sua análise fitoquímica, dentre outros compostos químicos elucidados (ARRUDA, 2009). A espécie *Mansoa difficilis*, também pertencente a esta família, mostrou a presença de hidrocarbonetos não identificados (SILVA *et al.*, 2009).

Existem estudos que mencionam o dotriacontane e derivados extraídos de espécies da família Piperaceae, como por exemplo em *Piper betle* Linn. (PARMAR *et al.*, 1998; NAGORI *et al.*, 2011), da família Malpighiaceae, como por exemplo em *Byrsonima fagifolia* (HIGUCHI *et al.*, 2011) e da família Asteraceae, como por exemplo em *Centaurea solstitialis* L. (LOGRADA *et al.*, 2013).

Dotriacontane já foi descrita na família Bignoniaceae (GORMANN; SCHREIBER; KOLODZIEJ, 2004; ROY *et al.*, 2011), no entanto, o presente estudo torna-se inédito por indicar pela primeira vez a substância no gênero *Tynanthus*.

4.2 ATIVIDADE IMUNOLÓGICA DO DOTRIACONTANE

Foi analisada a influência da substância isolada, identificada como dotriacontane, sobre a ativação de neutrófilos de forma qualitativa, apenas observando a presença ou não dos depósitos de formazan nas células. Os resultados (FIGURA 22) foram avaliados pelas imagens feitas durante as análises. As setas observadas na figura indicam os pontos que desenvolveram coloração pelo depósito de formazan, característico da ativação dos neutrófilos.

A FIGURA 22 A mostra os resultados do controle negativo (sem NBT e sem PMA) e confirmou a não ativação dos neutrófilos por algum componente que pudesse interferir na reação. A FIGURA 22B, que mostrou os resultados do controle negativo (com NBT e sem PMA), demonstrou que o ensaio não sofreu interferência deste componente e pode ser realizado com segurança na obtenção dos resultados com as amostras. Caso isto fosse observado todo o ensaio seria descartado.

A FIGURA 22 C mostra células ativadas com o PMA, que serviu de controle positivo para comparação com as amostras, onde pode-se observar o desenvolvimento da coloração, auxiliando na segurança do método de análise. O controle com PMA é ainda importante para verificar se os neutrófilos que estão em

teste são capazes de serem ativados, uma vez que esta substância serve como um modelo de ativação de neutrófilos.

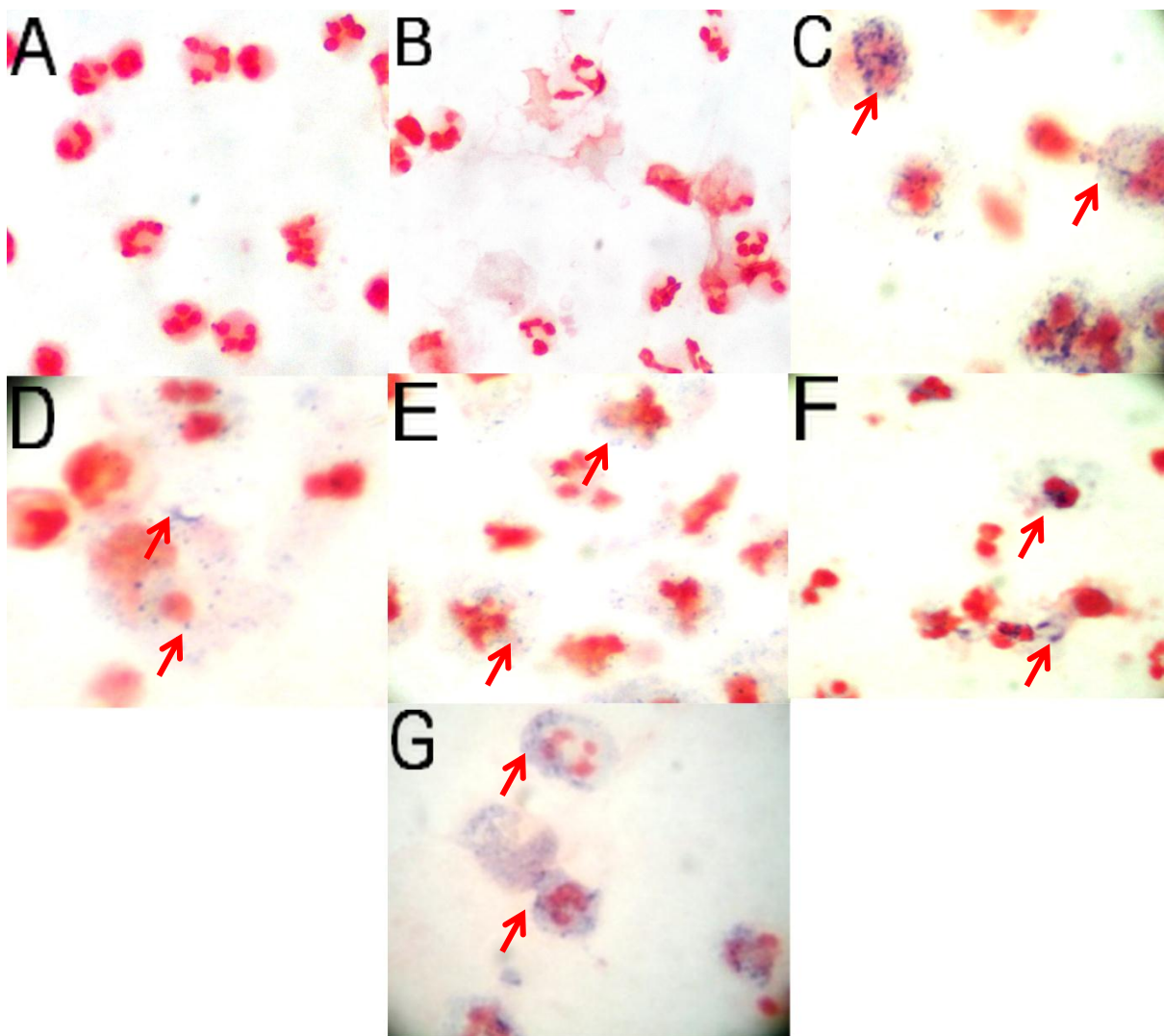


FIGURA 22 - IMAGENS DA ANÁLISE DE ATIVAÇÃO DE CÉLULAS DO SISTEMA IMUNOLÓGICO REALIZADO COM O DOTRIACONTANE ISOLADO DE *Tynanthus micranthus*
NOTA: **A**: controle sem NBT; **B**: controle com NBT; **C**: células ativadas com PMA; **D**: dotriacontane 2,5µg/mL; **E**: dotriacontane 5 µg/mL; **F**: dotriacontane 10 µg/mL; **G**: dotriacontane 15 µg/mL.
FONTE: a autora (2013)

As FIGURAS 22 D, 22 E, 22 F e 22 G mostram que as amostras em todas as concentrações ativaram os neutrófilos a liberarem ânions superóxido pela observação da coloração em todas as células. Ensaio quantitativo deve ser realizado para verificar a porcentagem de neutrófilos que apresentam depósitos intracitoplásmicos de formazan, mas os ensaios aqui apresentados já demonstram

que dotriacontane é um imunestimulante com boa atividade e sugerem sua utilização em doenças que envolvam a deficiência do sistema imunológico.

Para confirmar os efeitos de dotriacontane sobre neutrófilos, foi avaliado a atividade do dotriacontane comercial e os resultados novamente provam sua influencia sobre o sistema imunológico, como mostra a FIGURA 23, cujas setas indicam a formação de complexos de formazan em todas as concentrações analisadas.

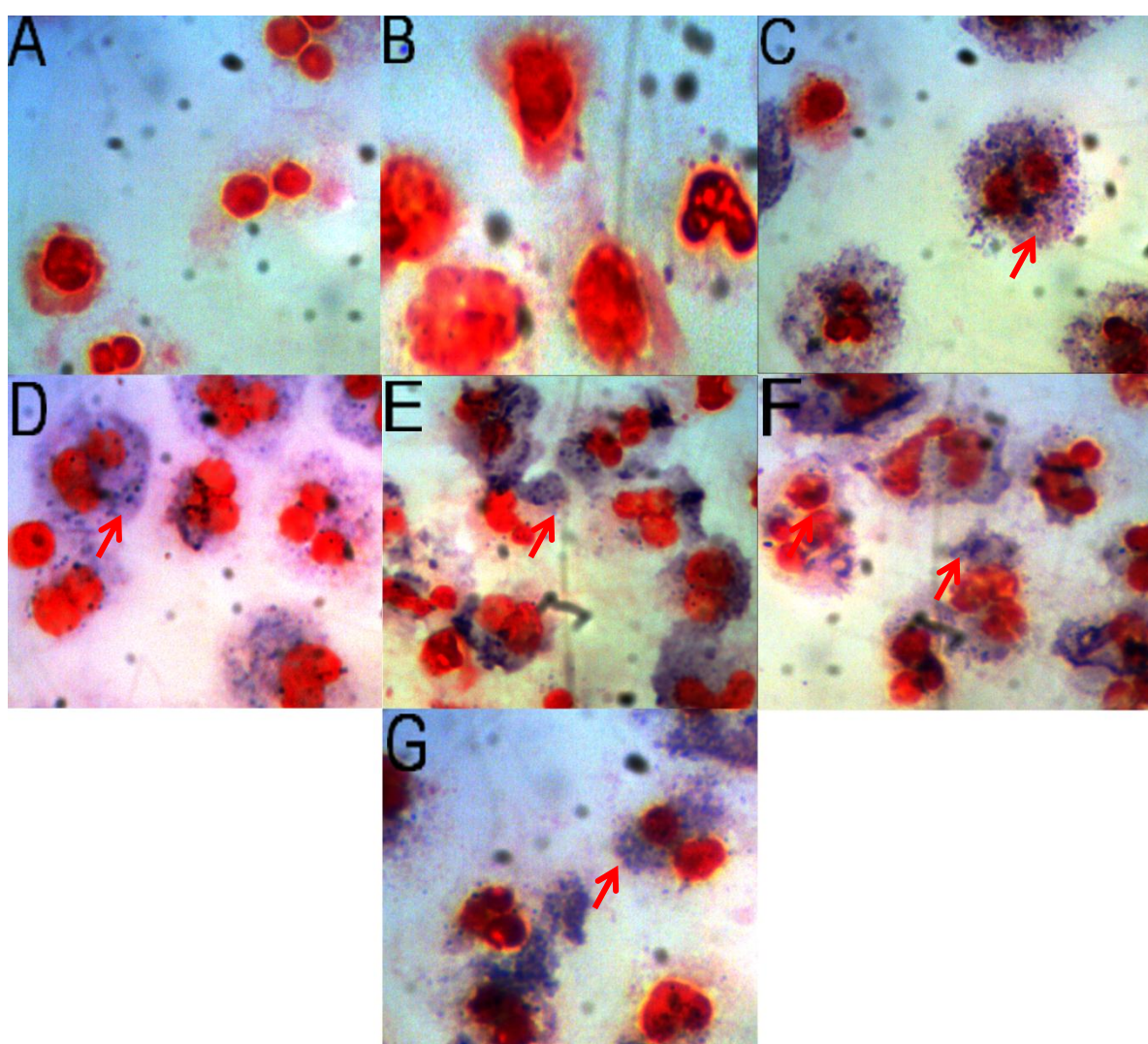


FIGURA 23 - IMAGENS DA ANÁLISE DE ATIVAÇÃO DE CÉLULAS DO SISTEMA IMUNOLÓGICO REALIZADO COM DOTRIACONTANE COMERCIAL

NOTA: **A**: controle sem NBT; **B**: controle com NBT; **C**: células ativadas com PMA; **D**: dotriacontane 2,5µg/mL; **E**: dotriacontane 5 µg/mL; **F**: dotriacontane 10 µg/mL; **G**: dotriacontane 15 µg/mL.

FONTE: a autora (2013)

Os leucócitos ou glóbulos brancos são células do sistema imunológico, e têm como função a defesa do organismo na forma de resposta celular. Eles são classificados em granulócitos (neutrófilos, eosinófilos e basófilos) e agranulócitos (linfócitos e monócitos). Os neutrófilos são móveis, realizam o fenômeno de fagocitose e apresentam-se em caso de processo inflamatório/infeccioso de longa duração e em alta porcentagem no sangue circulante, constituindo a primeira linha de defesa celular contra a invasão de microorganismos patogênicos (GUYTON; HALL, 2006).

Park, Fikrig e Smithwick (1968) foram os primeiros a aplicar o teste de redução do NBT para auxiliar na diferenciação do diagnóstico dos estados febris induzidos por bactérias dos estados que não tinham origem bacteriana. Eram examinados os esfregaços microscopicamente para a determinação da porcentagem de neutrófilos que apresentavam depósitos intracitoplásmicos de formazan, sendo esta mais elevada em infecções bacterianas.

Algumas doenças, especialmente as que envolvem um defeito metabólico da função dos neutrófilos, apresentam valores baixos ou normais no teste de NBT mesmo nos casos em que existe uma infecção bacteriana ativa. É possível detectar estes estados através da modificação do teste de NBT, de modo a incluir uma estimulação *in vitro* do sistema fagocitário. A estimulação *in vitro* de sangue de indivíduos normais, sem disfunções celulares ou humorais e sem deficiência no metabolismo de granulócitos, irá demonstrar um aumento acentuado na porcentagem de neutrófilos contendo formazan. As células de doentes com disfunções, por exemplo, doença granulomatosa crônica, não apresentaram uma resposta positiva, mesmo quando estimuladas (SIGMA-ALDRICH, 2013a).

Muitos produtos a base de plantas utilizadas na medicina tradicional são relatados pelas propriedades imunomoduladoras. Alguns atuam na imunidade humoral mediada por células, outros ativam apenas os componentes celulares do sistema imunitário, ou seja, a função fagocítica, sem afetar a imunidade humoral. Os agentes que ativam os mecanismos de defesa do hospedeiro, na presença de uma resposta imunitária, podem proporcionar uma terapia de suporte à quimioterapia convencional, sendo assim, alternativas vindas a partir de extratos de plantas assim como seus componentes, podem servir de apoio para o tratamento de determinadas patologias que envolvem o sistema imunológico (GHULE; YEOLE, 2012).

Estudos realizados com a espécie *Piper betle* Linn., mostram a presença de dotriacontane e seus derivados nos seus extratos e descrevem algumas atividades biológicas desta planta, entre elas a atividade imunomoduladora, porém, sem relacionar tal atividade com esta substância e sim ao extrato metanólico contendo uma mistura de fenóis, flavonoides, taninos e polissacarídeos (KANJWANI *et al.*, 2008; NAGORI *et al.*, 2011).

Pesquisas realizadas por Higuchi *et al.* (2011), revelaram a atividade antituberculose de dotriacontane contra *Mycobacterium tuberculosis* em Concentração Inibitória Mínima de 62.5 µg/mL, porém, poucas pesquisas mencionam as atividades biológicas desta substância, o que torna interessante os resultados obtidos neste estudo.

4.3 ATIVIDADE HEMOLÍTICA

Para a avaliação da atividade hemolítica, as amostras, após dissolvidas nas concentrações a serem testadas, foram distribuídas em placa específica para leitura das absorbâncias no espectrofotômetro (FIGURA 24),

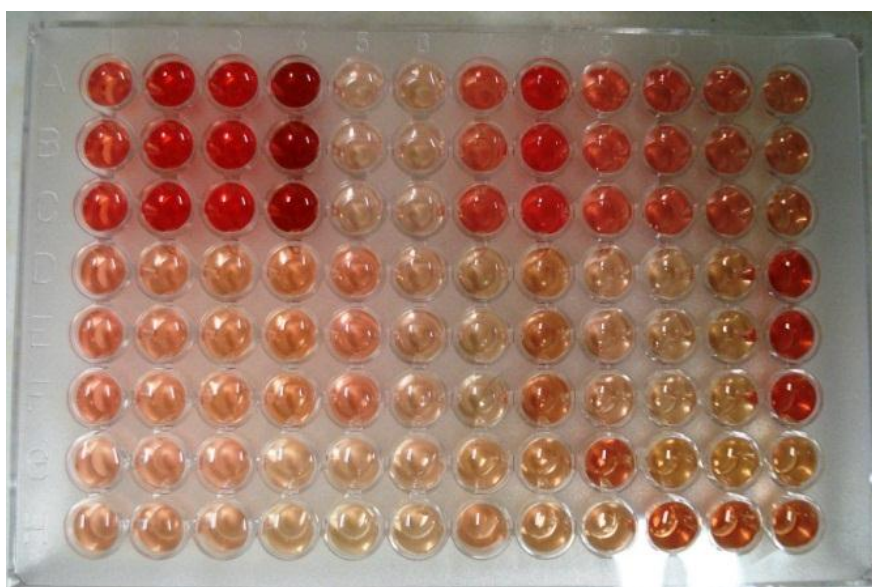


FIGURA 24 – PLACA UTILIZADA NA AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE HEMOLÍTICA DOS EXTRATOS DE *Tynanthus micranthus*

A observação visual da placa já permite sugerir que, além do controle de hemólise total, alguns orifícios contendo os extratos apresentaram coloração avermelhada caracterizando a hemólise, confirmado pela leitura das absorbâncias, cujos resultados estão detalhadamente descritos na TABELA 11. Diante de cada absorbância obtida, pode-se calcular o percentual de hemólise com relação ao controle positivo, cujos valores foram comparados estatisticamente (TABELA 12).

TABELA 11 - RESULTADO DAS ABSORBÂNCIAS OBTIDAS NA AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE HEMOLÍTICA DOS EXTRATOS BRUTOS E FRAÇÕES DE *Tynanthus micranthus*

Amostra	Concentração (µg/mL)	Abs (540 nm) Triplicata			Média	Desvio Padrão
HC	100	0,597	0,661	0,775	0,678	0,090
	200	1,282	1,204	1,286	1,257	0,046
	500	1,210	1,222	1,237	1,223	0,013
	1000	1,520	1,457	1,532	1,503	0,040
HF	100	0,153	0,164	0,160	0,159	0,006
	200	0,168	0,161	0,159	0,163	0,005
	500	0,522	0,476	0,568	0,522	0,046
	1000	1,043	0,969	0,891	0,968	0,076
HAC	100	0,431	0,443	0,474	0,449	0,022
	200	0,413	0,394	0,419	0,409	0,013
	500	0,356	0,321	0,361	0,346	0,022
	1000	0,272	0,267	0,272	0,270	0,003
HAF	100	0,404	0,422	0,412	0,413	0,009
	200	0,33	0,348	0,330	0,336	0,010
	500	0,296	0,304	0,323	0,308	0,014
	1000	0,349	0,357	0,329	0,345	0,014
CF	100	0,333	0,342	0,353	0,343	0,01
	200	0,201	0,207	0,201	0,203	0,003
	500	0,180	0,165	0,174	0,173	0,007
	1000	0,306	0,323	0,388	0,339	0,043
EBC	100	0,199	0,208	0,203	0,203	0,004
	200	0,172	0,176	0,179	0,176	0,003
	500	0,227	0,204	0,209	0,213	0,012
	1000	0,695	0,687	0,690	0,691	0,004
EBF	100	0,286	0,295	0,297	0,293	0,006
	200	0,208	0,203	0,213	0,208	0,005
	500	0,252	0,293	0,492	0,346	0,128
	1000	0,325	0,304	0,324	0,318	0,012
CC	100	0,277	0,281	0,241	0,266	0,022
	200	0,210	0,199	0,204	0,204	0,005
	500	0,334	0,279	0,275	0,296	0,033
	1000	0,569	0,522	0,460	0,517	0,055
Branco	-	0,253	0,182	0,360	0,265	0,090
Controle Positivo	-	1,324	1,336	1,322	1,327	0,008
Controle Solvente	-	0,447	0,443	0,452	0,447	0,004

NOTA: Hexano Caule (HC), Hexano Folha (HF), Hidroalcoólica Caule (HAC), Hidroalcoólica Folha (HAF), Clorofórmio Folha (CF), Extrato Bruto Caule (EBC), Extrato Bruto Folha (EBF), Clorofórmio Caule (CC).

TABELA 12 - RESULTADO DO PERCENTUAL DE HEMÓLISE NA AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE HEMOLÍTICA DOS EXTRATOS BRUTOS E FRAÇÕES DE *Tynanthus micranthus*

Amostra	Concentração (µg/mL)	Médias de % Hemólise	Resultados do teste de Tukey*				
EBF	100	0	a1				
	200	0	a1				
	500	1.40	a1				
	1000	0	a1				
HF	100	0	a1				
	200	0	a1				
	500	7.03	a1				
	1000	48.97			a3		
CF	100	0	a1				
	200	0	a1				
	500	0	a1				
	1000	0	a1				
HAF	100	0	a1				
	200	0	a1				
	500	0	a1				
	1000	0	a1				
EBC	100	0	a1				
	200	0	a1				
	500	0	a1				
	1000	22.90			a2		
HC	100	21.67			a2		
	200	76.24				a4	
	500	73.01				a4	
	1000	99.37					a5
CC	100	0	a1				
	200	0	a1				
	500	0	a1				
	1000	6.56	a1				
HAC	100	0.83	a1				
	200	0	a1				
	500	0	a1				
	1000	0	a1				
Controle		100.00					a5

NOTA: *Médias seguidas pela mesma letra e mesmo número não se diferem estatisticamente. Amostras: Hexano Caule (HC), Hexano Folha (HF), Hidroalcoólica Caule (HAC), Hidroalcoólica Folha (HAF), Clorofórmio Folha (CF), Extrato Bruto Caule (EBC), Extrato Bruto Folha (EBF), Clorofórmio Caule (CC).

Os dados obtidos podem ser melhor analisados através da FIGURA 25, que compara as amostras e o controle positivo e evidencia a atividade hemolítica dose dependente da amostra HC, que na concentração de 1000 µg/mL demonstrou atividade estatisticamente igual ao controle positivo. A amostra HF mostrou atividade hemolítica, na concentração máxima testada, próximo de 50% em relação ao controle positivo. EBC 1000 µg/mL também apresentou atividade hemolítica, porém em menor proporção (22,90%). As amostras que se encaixam no grupo estatístico a1 possuem atividade hemolítica nula.

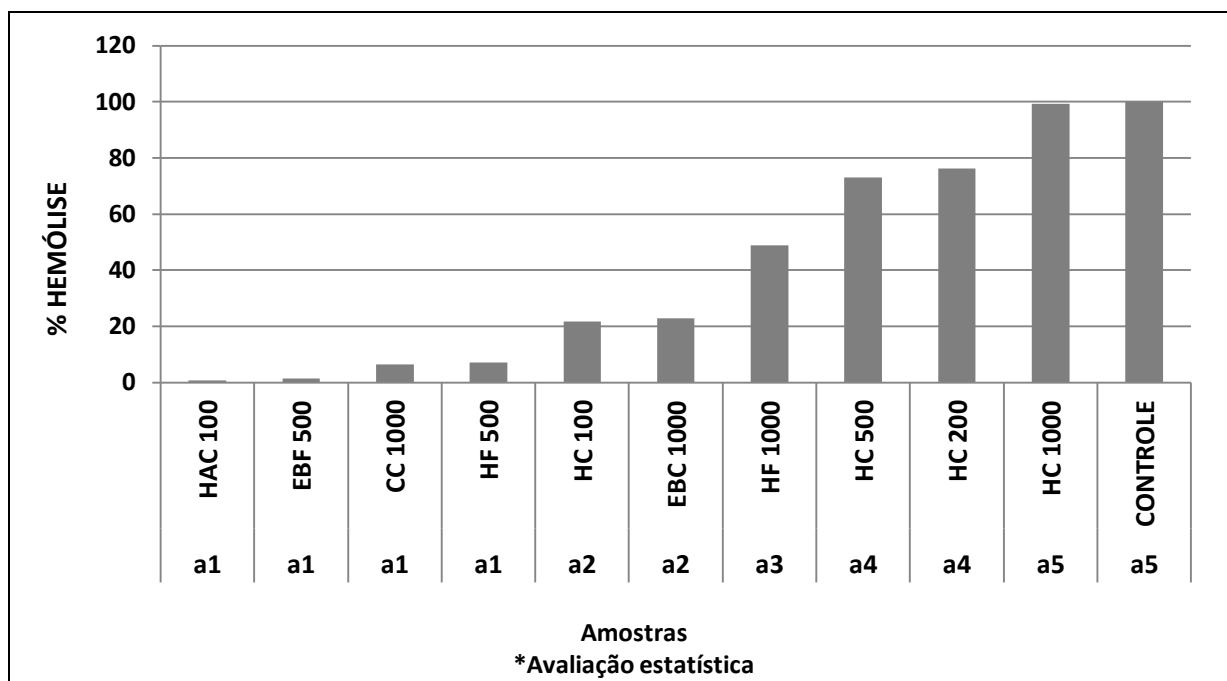


FIGURA 25 - COMPARAÇÃO ESTATÍSTICA DOS PERCENTUAIS DE HEMÓLISE NA AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE HEMOLÍTICA DOS EXTRATOS BRUTOS E FRAÇÕES DE *Tynanthus micranthus*

NOTA: (HC) hexano caule, (HF) hexano folha, (HAC) hidroalcoólica caule, (EBC) extrato bruto caule, (EBF) extrato bruto folha, (CC) clorofórmio caule. *Médias seguidas pela mesma letra e mesmo número não se diferem estatisticamente pelo teste de Tukey.

Muitas plantas e seus metabólitos secundários já possuem comprovação de sua toxicidade. Diversos alcaloides, grupo que inclui vários entorpecentes, são tóxicos e prejudiciais à saúde mesmo em pequenas concentrações (CARVALHO; OLIVEIRA; VALÉRIO, 2012).

Os taninos possuem grande habilidade em interagir com proteínas e outras macromoléculas, o que lhes conferem poder tóxico e aglutinante. Além disso, os taninos se complexam com facilidade a íons metálicos, sendo estes, componentes de importantes cofatores enzimáticos de diversos sistemas biológicos, incluindo microrganismos (MONTEIRO *et al.*, 2005; CARVALHO; OLIVEIRA; VALÉRIO, 2012).

As saponinas triterpênicas induzem a hemólise pela interação com os componentes da membrana celular dos eritrócitos, principalmente com o colesterol, provocando uma deformação na membrana e seu consequente rompimento (ARABSKI *et al.*, 2012; CARVALHO; OLIVEIRA; VALÉRIO, 2012).

Ainda analisando o mecanismo pelo qual alguns compostos químicos provocam a hemólise, pode-se citar aqueles que atuam na redução de compostos xenobióticos, tais como fenóis, capazes de promover a hemólise através da

oxidação da hemoglobina, formando metahemoglobina (OLIVEIRA *et al.*, 2009), e estes também estão presentes na planta.

Conforme análise fitoquímica, os alcaloides estão ausentes em *Tynanthus micranthus*, porém estão presentes saponinas, taninos e flavonoides. Como já se discutiu anteriormente, estes grupos químicos são os principais responsáveis pelos efeitos tóxicos das plantas, porém não se sabe qual é o responsável pela ação tóxica observada nesta espécie, ou ainda se é um sinergismo entre eles o causador deste efeito.

No ensaio com a *Artemia salina* realizado por Cansian (2010), as frações acetato de etila da raiz, caule e folha, além das frações clorofórmicas do caule e folhas, apresentaram um valor de DL₅₀ inferior a 1000µg/mL, concentração máxima para uma amostra ser considerada ativa segundo Meyer *et al.* (1982), caracterizando assim toxicidade destas amostras frente ao molusco.

Comparando-se os métodos, *Artemia salina* e hemólise, utilizados para rastrear a toxicidade de *Tynanthus micranthus*, não se pode estabelecer uma relação entre eles, uma vez que as amostras que deram atividade hemolítica não apresentaram toxicidade frente ao microcrustáceo e vice-versa.

Os métodos possuem fundamentos diferentes, mas ambos avaliam a bioatividade dos extratos. A junção dos resultados serve de alerta quanto à sua utilização e sugere que ensaios toxicológicos mais aprofundados, como testes *in vivo*, sejam realizados com o objetivo de garantir a segurança de usuários de preparados à base desta planta.

4.4 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

Conforme mostra a FIGURA 26, a fração HAF protegeu os eritrócitos contra o estresse oxidativo, mantendo o nível das enzimas oxidativas em condições normais e confirmando seu potencial antioxidante.

Com relação à atividade da catalase (FIGURA 26 A), foi observado que de maneira semelhante à catequina e quercetina, utilizadas como padrões de substância antioxidante, HAF manteve os níveis biológicos normais. Os demais

extratos (HAR e HAC) tiveram atividade semelhante ao oxidante tBHP, demonstrando não ter atividade antioxidante.

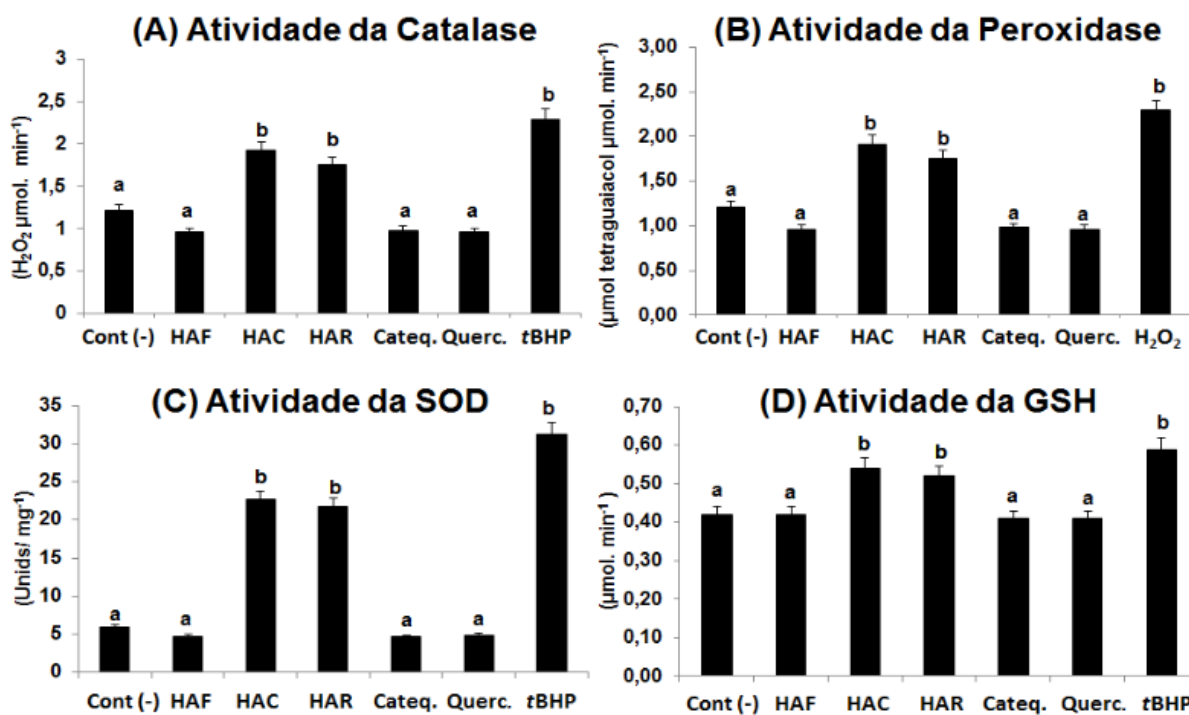


FIGURA 26: ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DOS EXTRATOS HIDROALCOÓLICOS DAS FOLHAS (HAF), CASCAS (HAC) E RAÍZES (HAR), E DOS PADRÕES CATEQUINA E QUERCETINA SOBRE AS ENZIMAS CATALASE, PEROXIDASE, SUPERÓXIDO DISMUTASE (SOD) E GLUTATIONA REDUZIDA (GSH) EM ERITRÓCITOS

NOTA: *Médias comparadas pelo teste de Dunnet com nível de significância $p < 0,05$. Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente.

Efeito similar foi observado na atividade da peroxidase (FIGURA 26 B). HAF inibiu a ação da peroxidase de maneira similar a catequina e quercetina, com inibição da oxidação do peróxido de hidrogênio em relação ao controle.

Efeito inibitório também foi observado para a atividade da SOD (FIGURA 26 C), onde HAF se comportou de maneira semelhante aos padrões antioxidantes catequina e quercetina, sendo evidente a inibição dos níveis da enzima em relação ao controle com tBHP.

HAF também manteve os níveis de GSH normais nas células sanguíneas (FIGURA 26 D), com proteção semelhante aos padrões utilizados.

Os extratos HAR e HAC não protegeram as células sanguíneas da oxidação celular de acordo com os resultados das metodologias utilizadas para a avaliação em comparação com o controle e padrões utilizados.

A fim de verificar o efeito oxidante dos extratos investigados, foi avaliada a atividade pró-oxidante frente a atividade da SOD e GSH, (FIGURAS 27 A e 27 B), respectivamente. Os resultados encontrados mostram que nas concentrações utilizadas, HAF não provoca oxidação, evitando danos celulares, uma vez que não houve aumento da atividade das enzimas oxidantes (SOD e GSH).

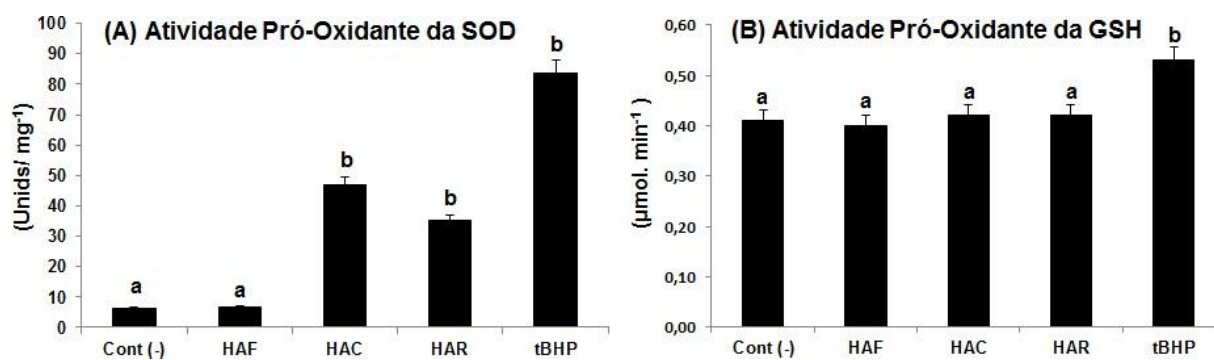


FIGURA 27 - ATIVIDADE PRÓ-OXIDANTE DOS EXTRATOS HIDROALCÓLICOS DAS FOLHAS (HAF), CASCAS (HAC) E RAÍZES (HAR), E DO OXIDANTE tBHP SOBRE A SOD E GSH EM ERITRÓCITOS

NOTA: *Médias comparadas pelo teste de Dunnet com nível de significância $p < 0,05$. Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente.

Os demais extratos causaram oxidação do sistema celular, aumentando a atividade da SOD, evidenciando a sua ação pró-oxidante. A atividade da GSH não se mostrou alterada, indicando que os extratos utilizados não possuem ação oxidante frente a esta enzima.

Alguns antioxidantes naturais de plantas, como por exemplo os polifenóis, em alguns casos podem exercer tanto a atividade pró-oxidante quanto anti-oxidante, provocando a oxidação acelerada e produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) ou prevenindo a oxidação e eliminação de EROs; respectivamente (SHIN; KIM; JANG, 2007). Este fenômeno indica que em certas condições e em certos tecidos, eles podem oferecer mais riscos oxidativos do que benefícios antioxidantes (BEHLING *et al.*, 2004).

Um estudo comprovou que em concentrações elevadas, a capacidade antioxidante de carotenóides foi diminuída e licopeno, luteína e beta-caroteno apresentaram efeitos pró-oxidantes. Em altas concentrações eles podem alterar as propriedades de membranas biológicas, influenciando a permeabilidade a toxinas, ao oxigênio ou metabólitos (EL-AGAMEY *et al.*, 2004). Este relato evidencia que nas concentrações utilizadas e em condições normais, os extratos podem ter alterado as propriedades das membranas celulares.

A HAF se torna interessante para estudos posteriores que abordem o potencial antioxidante *in vivo*, uma vez que em condições normais não atua como oxidante e mantém os níveis de SOD e GSH normais, como observado nos ensaios de atividade pró-oxidante. Embora HAC e HAR não tenham alterado os níveis de GSH neste mesmo ensaio, o aumento dos níveis de SOD demonstraram que estudos *in vivo* devem ser realizados, com a finalidade de confirmar se estes extratos possuem realmente ação oxidante.

4.5 AVALIAÇÃO DO COMPORTAMENTO SEXUAL

Conforme metodologia, os animais de cada grupo foram numerados de 1 a 10. As filmagens foram realizadas após 1 hora e 3 horas do tratamento, 20 minutos cada casal, mantendo o mesmo casal nos dois tempos de filmagem.

Os resultados obtidos na avaliação dos parâmetros juntamente com as médias e desvio padrão estão representados na TABELA 13, e a FIGURA 28, mostra um casal no momento das filmagens, observando-se uma tentativa de monta.

Durante as filmagens observou-se que alguns animais não procuraram a fêmea no tempo observado, sendo considerados 1200 segundos a latência de monta, que corresponde ao tempo total da filmagem, além disso, animais que demonstraram comportamento muito diferente do padrão foram excluídos do grupo, como por exemplo: animais que não procuraram as fêmeas nos dois tempos de filmagem e animais que tiveram excesso de tentativa de monta muito diferentes da média.

TABELA 13- EFEITO DE *Tynanthus micranthus* NO COMPORTAMENTO DE MONTA DE CAMUNDONGOS (SWISS) MACHOS ADULTOS

Grupo (n = 7 - 9)	Latência de monta (seg.)		Número de montas	
	1ª hora	3ª hora	1ª hora	3ª hora
Controle (água)	1070,78 ± 129,20	1071,56 ± 128,40	0,44 ± 0,44	0,89 ± 0,89
Sildenafil	765,11 ± 174,70	421,11 ± 113,70	4,67 ± 2,44	6,22 ± 1,99*
CP300	541,22 ± 168,10	347,22 ± 163,30*	5,22 ± 1,97*	6,22 ± 2,29*
CP600	448,43 ± 201,30	233,71 ± 162,90**	8,00 ± 3,37*	7,57 ± 2,49**

NOTA: Os valores foram expressos como a média ± desvio padrão; n = numero de animais em cada grupo. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$: diferença significativa em relação ao controle em estatística realizada pelo teste Kruskal-Wallis seguido do teste Dunns post-hoc para latência de monta e teste T para número de montas.

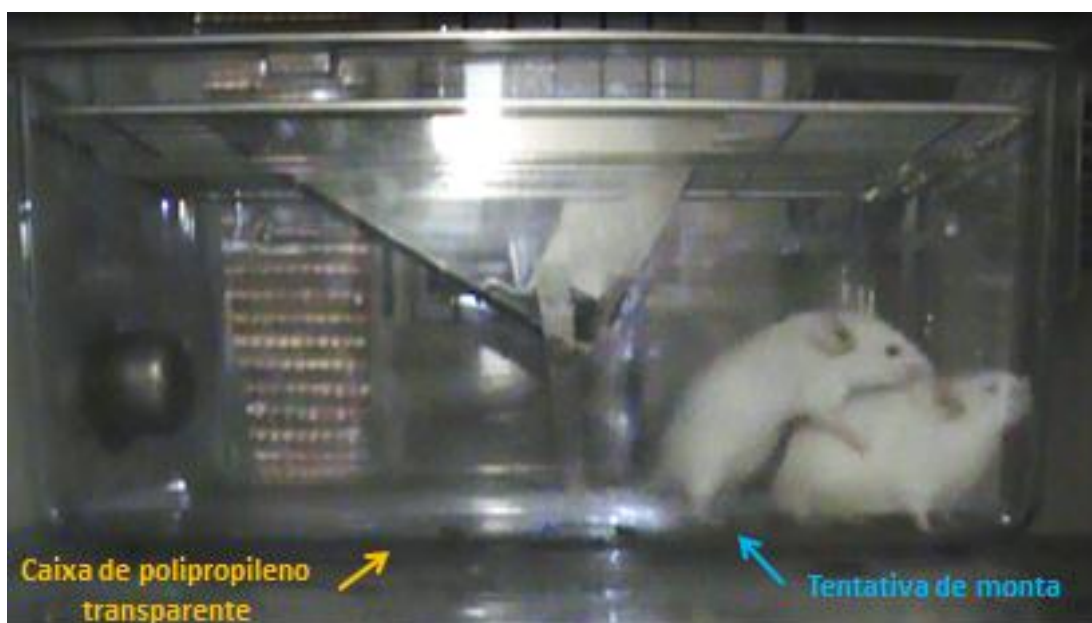


FIGURA 28 - AVALIAÇÃO DO COMPORTAMENTO SEXUAL
 FONTE: A AUTORA (2012)

Ao final da primeira hora de tratamento, os grupos CP300, CP600 e sildenafil, apresentaram uma redução da média dos valores observados no parâmetro latência de monta, em torno de 49%, 58% e 28%, respectivamente, porém não foram resultados estatisticamente diferentes quando comparados ao grupo controle água (FIGURA 29 A).

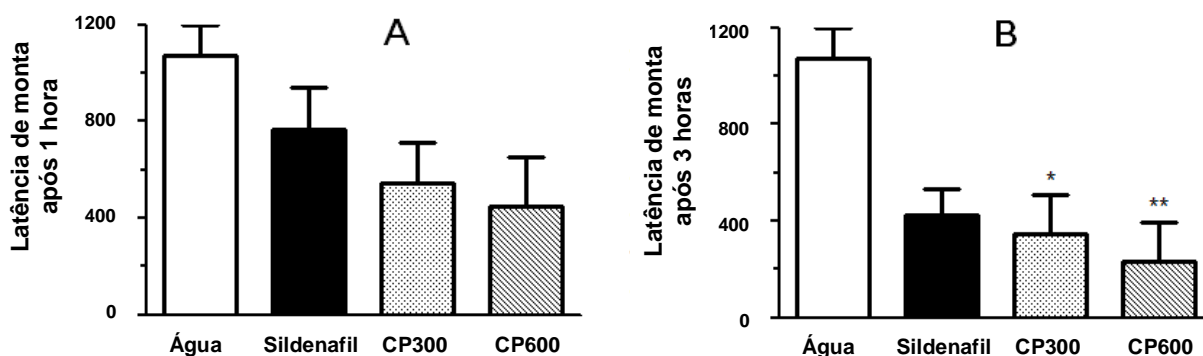


FIGURA 29 - EFEITOS DE *Tynanthus micranthus* SOBRE A LATÊNCIA DE MONTA DE CAMUNDONGOS MACHOS

NOTA: (A) uma hora após o tratamento; (B) três horas após o tratamento. Cada barra representa a média \pm desvio padrão das médias de 7-9 animais. Os níveis de significância são indicados por * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$ quando comparados com o grupo controle água.

Após três horas de tratamento, no entanto, resultados estatisticamente representativos foram observados no grupo CP300 e principalmente no grupo CP600, onde se observou uma redução das médias dos valores de latência de monta em 68% e 78%, respectivamente, quando comparados com o grupo controle. Já no grupo sildenafil observou-se uma redução um pouco menor do que o observado com os animais tratados com os extratos, sendo de 61% (FIGURA 29 B).

Durante as análises, foi observado que alguns machos não procuram a fêmea durante o período de filmagens, o que tornou possível verificar o parâmetro de decisão ou não de monta, que foi expresso pela soma de "sim" e "não" para cada grupo (FIGURA 30).

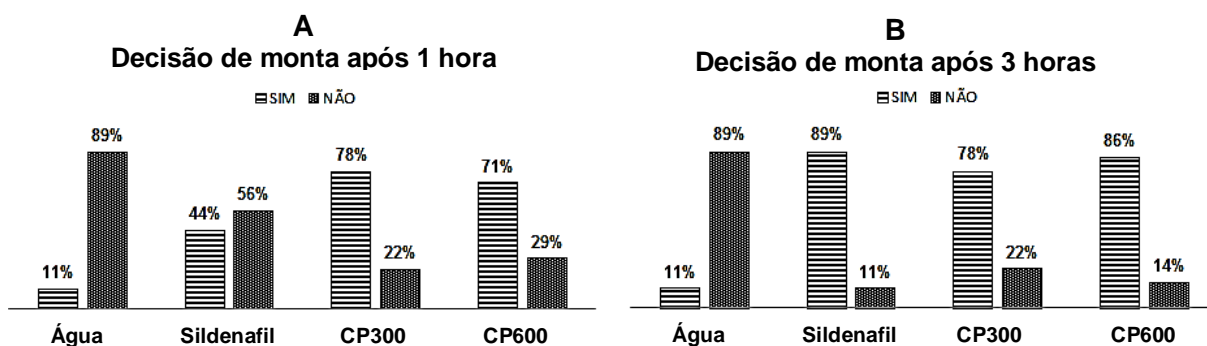


FIGURA 30 - EFEITOS DE *Tynanthus micranthus* SOBRE A DECISÃO DE MONTA DE CAMUNDONGOS MACHOS

NOTA: (A) uma hora após o tratamento; (B) três horas após o tratamento. Os resultados estão expressos em porcentagem de "SIM" E "NÃO" para a decisão ou não de monta durante os períodos analisados.

Em contraste com o grupo controle negativo água, em que apenas 11% dos animais mostraram o interesse pelo sexo feminino, no grupo CP300 78% dos animais apresentaram uma resposta positiva para a decisão de monta, com o mesmo padrão de comportamento observado nos dois tempos analisados e o grupo CP600 mostrou um total de 71% e 86% de respostas positivas na primeira e terceira hora, respectivamente. Os animais do grupo sildenafil apresentaram maior interesse pela fêmea na terceira hora de tratamento com 89% de respostas positivas, contrastando com o primeiro momento que foi de 44%.

Na avaliação do parâmetro número de montas ou tentativas de montas, os resultados presentes na (FIGURA 31) mostraram que ambas as concentrações de *T. micranthus* foram capazes de aumentar o número de montas nos dois tempos analisados, sendo mais significativo após três horas do tratamento com a dose mais elevada (Grupo CP600). O grupo sildenafil apresentou um aumento significativo no número de montas apenas na terceira hora após o tratamento.

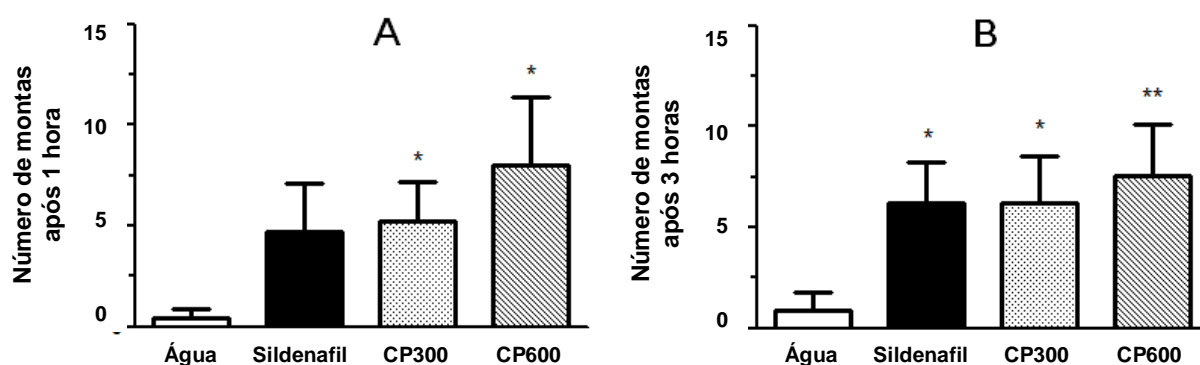


FIGURA 31 - EFEITOS DA *tynanthus micranthus* SOBRE O NÚMERO DE MONTAS DE CAMUNDONGOS MACHOS.

NOTA: (A) uma hora após o tratamento; (B) três horas após o tratamento. Cada barra representa a média \pm desvio padrão das médias de 7-9 animais. Os níveis de significância são indicados por * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$ quando comparados com o grupo controle água.

A presença de esperma no esfregaço vaginal foi observada apenas em uma fêmea do grupo CP300 em ambos os tempos analisados, e numa fêmea do grupo CP600 no tempo de três horas. A ausência de esperma na maioria das fêmeas pode ser explicada por um reduzido tempo de contato entre o casal, ou por falta de penetração, parâmetro este que não foi avaliado, pois o objetivo do trabalho foi

observar o aumento do interesse do macho pela fêmea, demonstrando assim a atividade afrodisíaca da planta.

O grande desafio após a avaliação dos resultados encontrados com os experimentos será definir ou sugerir um mecanismo de ação pelo qual a planta como um todo, ou as substâncias dela isoladas e conhecidas, atuam no organismo provocando as alterações sobre o comportamento sexual de machos. Esta melhora da performance sexual dos animais tratados com os extratos de *Tynanthus micranthus* pode ser determinada pela rica constituição química da planta, já detalhada por Cansian (2010), sugerindo sua ação em várias vias de estimulação para a atividade sexual.

Alguns trabalhos de revisão já surgiram com o objetivo de associar a atividade afrodisíaca a substâncias presentes em plantas utilizadas para esta finalidade, os quais descrevem resultados de testes obtidos a partir de ensaios *in vivo* ou *in vitro*. Alguns afrodisíacos conhecidos e muito citados são *Tribulus terrestres*, *Avena sativa*, *Ginkgo biloba*, *Panax ginseng*, *Syzygium aromaticum*, *Turnera afrodisiaca* e outras plantas (PATEL *et al*, 2011; MALVIYA *et al*, 2011; SINGH *et al*, 2012; SINGH; ALI; SINGH, 2013).

Fitoquímicos, como os flavonóides, têm sido relatados em trabalhos por afetarem diretamente as funções sexuais masculinas (MALVIYA *et al*, 2011), levando ao relaxamento da musculatura lisa (vasodilatação) do corpo cavernoso, pela via de ativação óxido nítrico /monofosfato de guanossina cíclico, ou pela interação com as vias centrais envolvidas na libido ou no desejo sexual (ESTRADA-REYES; CARRO-JUAREZ; MARTINEZ-MOTA, 2013).

Alguns estudos comprovam a atividade afrodisíaca de plantas estimulantes como no caso do cravo (*Syzygium aromaticum*) e Nutmeg (*Myristica fragrans*) (TAJUDDIN; LATIF; QASMI, 2003), que assim como *Tynanthus micranthus*, possuem óleo essencial rico em eugenol, o qual tem sido citado em pesquisas por suas propriedades vasodilatadora e relaxante do músculo liso (CRIDDLE; MADEIRA; SOARES, 2003; DAMIANI; ROSSONI; VASSOLLO, 2003; TAJUDDIN *et al.*, 2004).

Outro mecanismo de ação envolve os neurotransmissores responsáveis pelo relaxamento da musculatura lisa dos corpos cavernosos. As drogas que induzem alterações nos níveis de neurotransmissores ou sua atividade em células podem alterar o comportamento sexual, o que é muitas vezes reforçado por níveis elevados de testosterona. A teoria clássica do tratamento com testosterona é de que ela

estimula o desejo sexual e, ao fazê-lo, restaura o funcionamento erétil (SURESH-KUMAR; SUBRAMONIAM; PUSHANGADAN, 2000; TAJUDDIN; LATIF; QASMI, 2003; EL-TANTAWY; TEMRAZ; EL-GINDI, 2007).

5 CONCLUSÃO

Com base nos resultados dos experimentos propostos neste estudo, concluiu-se que a espécie *Tynanthus micranthus* Corr. Mello Ex Schum:

- Além dos compostos já evidenciados em estudos anteriores, como a apigenina e β -sitosterol, a espécie indicou a presença de um hidrocarboneto de cadeia longa, identificado através de RMN ^1H e ^{13}C , chamado dotriacontane, de fórmula molecular $\text{C}_{32}\text{H}_{66}$, primeira vez isolado neste gênero.
- Dotriacontane mostrou boa atividade imunoestimulante ativando neutrófilos em ensaio da avaliação imunológica e sugerindo sua utilização em doenças que envolvam a deficiência deste sistema, atividade esta nunca mencionada para esta substância.
- Evidenciou-se a atividade hemolítica dose dependente da amostra HC, que na concentração de 1000 $\mu\text{g/mL}$ demonstrou atividade estatisticamente igual ao controle positivo. A amostra HF mostrou atividade hemolítica na concentração máxima testada, próximo de 50% em relação ao controle positivo e EBC 1000 $\mu\text{g/mL}$ na proporção de 22,90%. Unindo-se estes resultados com os ensaios de toxicidade frente à *Artemia salina*, realizado em estudos anteriores, sugere-se que algumas frações da planta são tóxicas nestes sistemas biológicos analisados e necessitam de ensaios toxicológicos mais aprofundados, como testes *in vivo*, para garantir a segurança de sua utilização.
- Com relação à avaliação da atividade antioxidante dos extratos hidroalcoólicos, verificou-se que a fração HAF protegeu os eritrócitos contra o estresse oxidativo, mantendo o nível das enzimas oxidativas em condições normais, demonstrando seu potencial antioxidante.
- Na avaliação do efeito oxidante dos extratos os resultados encontrados mostram que nas concentrações utilizadas, HAF não provoca oxidação, evitando danos celulares, uma vez que não houve aumento da atividade das enzimas oxidantes (SOD e GSH). Os demais extratos causaram

oxidação do sistema celular, aumentando a atividade da SOD e evidenciando a sua ação pró-oxidante.

- Verificou-se que animais tratados com o extrato bruto do caule e folhas apresentaram maior atividade sexual após a terceira hora de tratamento, de forma dose dependente, demonstrando a atividade de *Tynanthus micranthus* sobre o comportamento sexual de camundongos, servindo de evidência para a comprovação dos efeitos afrodisíacos, conforme tradicionalmente utilizada.

Desta forma, este trabalho contribuiu para demonstrar o potencial de *Tynanthus micranthus*, de acordo com os resultados apresentados acima, e vem a colaborar para as evidências que indicam que a mesma pode fazer parte do grupo das plantas afrodisíacas, conforme sua utilização pela população, assim como outras espécies do gênero *Tynanthus*.

REFERÊNCIAS

- ABDO, C.H.N. *et al.* Disfunção erétil – Resultados do estudo da vida sexual do brasileiro. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 52, n. 6, p. 424-429, 2006.
- ABREU, J.S.; MARZOCCHI-MACHADO, C.M.; URBACZEK, A.C.; FONSECA, L.M.; URBINATI, E.C. Leukocytes respiratory burst and lysozyme level in pacu (*Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887). **Brazilian Journal of Biology**, v. 69, p. 1133-1139, 2009.
- ADIMOELJA, A. Phytochemicals and the breakthrough of traditional herbs in the management of sexual dysfunctions. **International Journal of Andrology**, v. 23, p. 82-84, 2000.
- AEBI, H. Catalase in vitro. **Methods in Enzymology**, v. 105, p.121-126, 1984.
- AL-ENEZI A.; AL-KHADHARI S.; AL-SHAJI T.F. Three-piece Inflatable Penile Prosthesis: Surgical Techniques and Pitfalls. **Journal of Surgical Technique and Case Report** , v. 3, n. 2, p. 76–83, 2011.
- ANDRADE, A.; PINTO, S.C.; OLIVEIRA, R.S. **Animais de Laboratório: criação e experimentação**. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz, 2002. 388 p.
- ANTUNES-RODRIGUEZ, J.; FAVARETTO, A.L.V. **Sistema reprodutor. Fisiologia**. 2 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999.
- APG - An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG II. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 141, p. 399-436, 2003.
- ARABSKI, M. *et al.* Effects of saponins against clinical *E. coli* strains and eukaryotic cell line. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, v. 2012, 6 p. Disponível em: <http://www.hindawi.com/journals/bmri/2012/286216>. Acesso em 17/09/2014.
- ARRUDA, A.L.A. **Contribuição ao estudo de atividade biológica de *Jacaranda cuspidifolia* Mart. (Bignoniaceae)**. 105 f. Tese (Doutorado em Ciências da Saúde) – Setor de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, Brasília, 2009.

ARRUDA, A.L.A. *et al.* Análise fitoquímica e atividade antimicobacteriana de extratos metanólicos de *Jacaranda cuspidifolia* Mart. (Bignoniaceae). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.14, n. 2, p. 276-281, 2012.

ASTHANA, N.; YADAV S. P.; GHOSH J. K. Dissection of antibacterial and toxic activity of melittin. **The journal of biological chemistry**, v. 279, n. 53, p. 55042–55050, 2004.

BARBOSA, W.L.R. *et al.* *Arrabidaea chica* (HBK) Verlot: phytochemical approach, antifungal and trypanocidal activities. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 18, n. 4, p. 544-548, 2008.

BARREIRO, E.; BOLZANI, V. S. Biodiversidade: fonte potencial para a descoberta de fármacos. **Química Nova**, v. 32, n. 3, p. 679-688, 2009.

BEHLING, E.B. *et al.* Flavonoide quercetina: aspectos gerais e ações biológicas. **Alimentação e Nutrição**, v. 15, n. 3, p. 285-292, 2004.

BEUTLER, E.; DURON, O.; KELLY, B. M. Improved method for the determination of blood glutathione. **Journal of Laboratory and Clinical Medicine**. v.61, p. 882-888, 1963.

BEUTLER, E. **Red Cell Metabolism. A Manual of Biochemical Methods**. 3. ed. New York: Grune and Stratton, 1984.

BIOTÉRIO CENTRAL UFC. Disponível em: http://www.bioteriocentral.ufc.br/fisiologia_roedor.html. Acesso em: 16/09/2014.

BRANDÃO, G.C. *et al.* Antiviral activities of plants occurring in the state of Minas Gerais, Brazil. Part 2. Screening Bignoniaceae species. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**. v. 20, n. 5, p. 742-750, 2010.

BRACK, E.A. **Diccionario Enciclopédico de Plantas Útiles del Perú**. Cusco: Centro de Estudios Regionales, Andinos Bartolomé de las Casas, 1999. p. 508-509.

BRACHT, A. *et al.* Enzimas. In: BRACHT, A.; ISHII-IWAMOTO, E.L. **Métodos de laboratório em Bioquímica**. Manole: Maringá, 2003. p. 103-137.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento de Assistência Farmacêutica. **Política nacional de plantas medicinais e fitoterápicos**. Brasília, DF: Ministério da Saúde, 2006.

BUCCI, L. R. Selected herbals and human exercise performance. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 72, p. 624S-636S, 2000.

BUREAU, M. E. Revisión des genres *Tynanthus* et *Lundia*. **Adansonia (Baillon). Recueil Périodique D'observations Botaniques**, v. 8, p. 270-294, 1868.

CALLOU, M.R.A.; RAMOS, P.R.M. Hipertensão arterial pulmonar. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 93, n. 6, p. 156-159, 2009.

CANSIAN, F.C. **Estudo fitoquímico e atividades biológicas da espécie *Tynanthus micranthus* Corr. Mélo (Bignoniaceae)**. 102 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2010.

CANSIAN, F.C. *et al.* Phytochemical, toxicity and microbiological activity study of *Tynanthus micranthus* Corr. Mello ex Schum. (Bignoniaceae). **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 31, p. 487-491, 2012.

CANSIAN, F.C. *et al.* Potencial alelopático de *Tynanthus micranthus* Corr. Mello ex. Schum. (Bignoniaceae) sobre diásporos de *Lactuca sativa* L. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica Aplicada**, v. 34, n. 1, p. 137-140, 2013.

CANSIAN, F.C. *et al.* *Tynanthus micranthus*: An efficient antioxidant and tyrosinase activity inductor. **African Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 8, n. 23, p. 651-657, 2014.

CARVALHO, C.A. *et al.* *Cipó-cravo* (*Tynanthus fasciculatus* Miers – Bignoniaceae): estudo fitoquímico e toxicológico envolvendo *Artemia salina*. **Revista Eletrônica de Farmácia**. v. 6, n. 1, p. 51-57, 2009 a.

CARVALHO, J.L.S. *et al.* Termoestabilidade de processos extrativos de *Nasturtium officinale* R. Br., Brassicaceae por sistema Soxhlet modificado. **Química Nova**, v. 32, n. 4, p. 1031-1035, 2009 b.

CARVALHO, M. S.; OLIVEIRA, D. A.; VALÉRIO, H. M. Estudo da atividade citotóxica de *Myracrodruon urundeuva* Fr. Allemão. **Revista de Biologia e Farmácia**, v. 8, n. 2, 2012.

CHASE, M.W.; REVEAL, J.L. A phylogenetic classification of the land plants to accompany APG III. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 161, p. 122–127, 2009.

CHEN J. *et al.* Effect of oral administration of high-dose nitric oxide donor L-arginine in men with organic erectile dysfunction: results of a double-blind, randomized, placebo-controlled study. **BJU International**, v. 83, n. 3, p. 269-273, 1999.

CHORILLI, M.; MICHELIN, D.C.; SALGADO, H.R.N. Animais de laboratório: o camundongo. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 28, n. 1, p. 11-23, 2007.

CIPRIANI, F.A. *et al.* Implicações químicas na sistemática e filogenia de Bignoniaceae. **Química Nova**, v. 35, n. 11, p. 2125-2131, 2012.

CLARO, J. A. *et al.* Impotência e auto-injeção de drogas vasoativas. **Jornal Brasileiro de Ginecologia**, v. 106, n. 6, p. 209-212, 1996.

CRIDDLE, D. N., MADEIRA, S. V., SOARES, M. R. Endothelium-dependent and -independent vasodilator effects of eugenol in the rat mesenteric vascular bed. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 55, n. 3, p. 359-365, 2003.

CRONQUIST, A.J. **An Integrated System of Classification of Flowering Plants**. New York: Columbia University, 1981. p.xvii.

CUNHA, A.P.; SILVA, A.P.; ROQUE, O.R. **Plantas e Produtos Vegetais em Fitoterapia**. Lisboa: Calouste Gulbenkian, 2003. p. 22.

CUSTÓDIO, D.L. *et al.* Antimicrobial Activity of Essential Oils from *Piment pseudocaryophyllus* and *Tynanthus micranthus*. **Brazilian archives of biology and technology**, v. 53, n. 6, p. 1363-1369, 2010.

DAMIANI, C.E.N.; ROSSONI, L.V.; VASSALLO, D.V. Vasorelaxant effects of eugenol on rat thoracic aorta. **Vascular Pharmacology**, v. 40, p. 59-66, 2003.

DI STASI, L.C.; HIRUMA-LIMA, C.A. **Plantas Medicinais na Amazônia e na Mata Atlântica**. 2 ed. rev. e ampl. São Paulo: UNESP, 2002. p. 449-450.

DONG, S.H. *et al.* Lipidated steroid saponins from *Dioscorea villosa* (wild yam). **Fitoterapia**, v. 91, p. 113-124, 2013.

DSM-IV- **Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders**. Porto Alegre: Editora Artemed, 2002.

EL-AGAMEY, A. *et al.* Carotenoid radical chemistry and antioxidant/ pro-oxidant properties. **Archives of Biochemistry and Biophysic**, v. 430, p. 37-48, 2004.

EL-TANTAWY, W. H.; TEMRAZ, A.; EL-GINDI, O. D. Free serum testosterone level in male rats treated with *Tribulus alatus* extracts. **International Brazilian Journal of Urology**, v. 33, n. 4, p. 554-559, 2007.

ESTRADA-REYES, R.; CARRO-JUAREZ, M.; MARTINEZ-MOTA, L. Pro-sexual effects of *Turnera diffusa* Wild (Turneraceae) in male rats involves the nitric oxide pathway. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 146, p. 164–172, 2013.

FELDMAN, H.A. *et al.* Impotence and its medical and psychosocial correlates: results of the Massachusetts male aging study. **Journal of Urology**, v. 151, p. 54-61, 1994.

FERREIRA, L.M.; HOCHMAN, B.; BARBOSA, M.V.J. Modelos experimentais em pesquisa. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 20, p. 28-34, 2005.

FERRIER, J. *et al.* *Tynanthus guatemalensis* Donn.Sm.: the taxonomic and archeological mystery behind a maya antidiabetic medicinal plant. **Conference Proceedings Natural Health Product Research Society of Canada**, Canadá, 2013.

FERRIER, J. **Ethnobotany, Pharmacology, and Metabolomics of Antidiabetic Plants used by the Eeyou Istchee Cree, Lukomir Highlanders, and Q'eqchi' Maya**. 193f. Dissertation – Faculty of Graduate and Postdoctoral Studies – University of Ottawa, Ottawa, Canadá, 2014.

FISCHER, E.; THEISEN, I.; LOHMANN, L.G. Bignoniaceae. *In* KADEREIT, J.W. **The families and genera of vascular plants**. Springer-Verlag: Berlin, 2004. p. 9-38.

FOYER, C.H.; HALLIWELL, B. The presence of glutathione and glutathione reductase in chloroplasts: a proposed role in ascorbic acid metabolism. **Planta**, v. 133, p. 21-25, 1976.

GEBARA, O.C.E. *et al.* Efeitos Cardiovasculares da Testosterona. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 79, n. 6, p. 644-649, 2002.

GENTRY, A. H. **Bignoniaceae**. Part I (Crescentieae and Tourrettieae). New York: The New York Botanical Garden, 1980 (Flora Neotropica, v.25).

GHULE, B.V.; YEOLE, P.G. In vitro and in vivo immunomodulatory activities of iridoids fraction from *Barleria prionitis* Linn. **Journal of Ethnopharmacology**, v.141, p. 424– 431, 2012.

GILLIS, C. N. *Panax ginseng* pharmacology: a nitric oxide link? **Biochemical Pharmacology**, v. 54, p. 1-8, 1997.

GOLDSTEIN, I. *et al.* Oral sildenafil in the treatment of erectile dysfunction. **The New England Journal of Medicine**, v. 338, n. 20, p. 1397-1404, 1998.

GOOGLE EARTH. Disponível em:
<https://www.google.com.br/maps/place/23%C2%B055'31.8%22S+52%C2%B006'39.0%22W/@-23.9254742,-52.1108333,166m/data=!3m1!1e3!4m2!3m1!1s0x0:0x0>.
Acesso em 08/07/2013.

GORMANN, R.; SCHREIBER, L.; KOLODZIEJ, H. Cuticular Wax profiles of leaves of some traditionally used African Bignoniaceae. **Zeitschrift für Naturforschung**, v. 59, p. 9-10, 2004.

GOWDAK, D.; GOWDAK, L.H. **Atlas de Anatomia Humana**. São Paulo: FTD, 1989.

GUYTON, A.C.; HALL, J.E. **Tratado de Fisiologia Médica**. 10 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002.

GUYTON, A.C.; HALL, J.E. **Tratado de Fisiologia Médica**. 11 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2006.

HATZIMOURATIDIS, K. *et al.* Guidelines on Male Sexual Dysfunction: Erectile Dysfunction and Premature Ejaculation. **European Urology**, v. 57, p. 804-814, 2010.

HIGASHI, T. *et al.* Redução do nitroblue tetrazolium (NBT) e resultados falso-positivos: esquistossomos mansônica e doença de chagas. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 18, n. 4, p. 266-282, 1976.

HIGUCHI, C.T. *et al.* *Byrsonima fagifolia* Niedenzu apolar compounds with antitubercular activity. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, 2011. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3135853/>. Acesso em: 19/09/2014.

HORA, R.C.; SOARES; J.J. Estrutura fitossociológica da comunidade de lianas em uma floresta estacional semidecidual na Fazenda Canchim, São Carlos, SP. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 25, n. 3, p. 323-329, 2002.

HOSTETTMANN, K.; QUEIROZ, E.F.; VIEIRA, P.C. **Princípios ativos de plantas superiores**. São Carlos: Edufscar, 2003. p. 47-56.

HU, C.C. *et al.* A spirostanol glycoside from Wild Yam (*Dioscorea villosa*) extract and its cytostatic activity on three cancer cells. **Journal of Food and Drug Analysis**, v. 15, n. 3, p. 310-315, 2007.

HULL, E.M.; DOMINGUEZ, J.M. Sexual behavior in male rodents. **Hormones and Behavior**, v. 52, n. 1, p. 45-55, 2007.

ILOUNO, L. E.; SHU, E. N.; IGBOKWE, G. E. An improved technique for the assay of red blood cell superoxide dismutase (SOD) activity. **Clinica Chimica Acta**, v. 247, p.1-6, 1996.

IPLANTS. Disponível em: <http://apps.kew.org/wcsp/qsearch.do>. Acesso em: 19/09/2014.

JOLY, A.B. **Botânica: Introdução à Taxonomia Vegetal**. 7.ed. São Paulo: Nacional. 1985. p. 595.

JOLY, A.B. **Botânica: Introdução à Taxonomia Vegetal**. 12.ed. São Paulo: Nacional, 1998.

JUDD, W.S. *et al.* **Plant Systematics: A Phylogenetic Approach**. Massachusetts: Sinauer Associates, 1999. p. 84.

KALEGARI, M. *et al.* Phytochemical constituents and preliminary toxicity evaluation of leaves from *Rourea induta* Planch. (Connaraceae). **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 47, n. 3, p. 635-642, 2011.

KANJWANI, D.G. *et al.* Evaluation of immunomodulatory activity of methanolic extract of *Piper betel*. **Journal of Immunology**, v. 67, p. 589-593, 2008.

KENNEDY, D.O. *et al.* Improved cognitive performance in human volunteers following administration of guarana (*Paullinia cupana*) extract: comparison and interaction with *Panax ginseng*. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 79, p. 401-411, 2004.

KENNEDY, D.O. *et al.* Improved cognitive performance and mental fatigue following a multi-vitamin and mineral supplement with added guaraná (*Paullinia cupana*). **Appetite**, v. 50, p. 506-513, 2008.

KIERSZENBAUM, A.L. Histologia e biologia celular: uma introdução à patologia. 3. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2012. 704p.

KLEMPNER, M.S. *et al.* Stimulation of neutrophil oxygen-dependent metabolism by human leukocytic pyrogen. **Journal of Clinical Investigation**, v. 64, p. 996-1002, 1979.

KO, W.C. *et al.* Inhibitory effects of flavonoids on phosphodiesterase isozymes from guinea pig and their structure-activity relationships. **Biochemical Pharmacology**, v.15, p. 2087-2094, 2004.

LECLERCQ, P. A. *et al.* Aromatic plant oils of the Peruvian Amazon. Part 2. *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf., *Renealmia* sp., *Hyptis recurvata* Point. and *Tynanthus panurensis* (Bur.). **Journal of Essential Oil Research**, v.12, p.14-18, 2000.

LEVIN, R.; RILEY, A. The physiology of human sexual function. **Psychiatry**, v. 6, n.3, 2007.

LEVINSKY, R.J.; HARVEY, B.A.; RODECK, C.H.; SOOTHILL, J.F. Phorbol myristate acetate stimulated NBT test: a simple method suitable for antenatal diagnosis of chronic granulomatous disease. **Clinical & Experimental Immunology**, v.54, p. 595-598, 1983.

LIMA, A.; PACE, M.; ANGYALOSSY, V. Seasonality and growth rings in lianas of Bignoniaceae. **Trees**, v. 24, n. 6, p.1045-1060, 2010.

LOGRADA, T. *et al.* Phyto-chemistry, antibacterial activity and chromosome number of *Centaurea solstitialis* L. grown in Algeria. **Global Journal of Research on Medicinal Plants & Indigenous Medicine**, v. 2, p. 675-684, 2013.

LOHMANN, L.G.; ULLOA, C.U. **Bignoniaceae**. In iPlants prototype checklist [online], 2007. Disponível em: <http://www.iplants.org>. Acesso em abril 2013.

LOPES, M.M.M. *et al.* Crescimento de Mudas de Cipó-Cravo (*Tynanthus fasciculatus* Miers), uma Liana com Potencial Medicinal. **Revista Árvore**, v. 32, n.2, p. 211-216, 2008.

MACKAY, D.N.D. Nutrients and Botanicals for Erectile Dysfunction: Examining the Evidence. **Alternative Medicine Review**, v. 9, n. 1, 2004.

MALVIYA, N. *et al.* Recent studies on aphrodisiac herbs for the management of male sexual dysfunction: a review. **Acta Poloniae Pharmaceutica**, v. 68, p. 3-8. 2011.

MARKERT, M.; ANDREWS, P.C.; BABIOR, B.M. Measurement of O₂⁻ production by human neutrophils. The preparation and assay of NADPH oxidase-containing particles from human neutrophils. **Methods in Enzymology**, v. 105, p. 358-365, 1984.

MELO, F.C.S.A. *et al.* The effects of *Tynnanthus fasciculatus* (Bignoniaceae) infusion on testicular parenchyma of adult Wistar rats. **Biological Research**. v.43, p. 445-450, 2010.

MENDES, F.R. Tonic, fortifier and aphrodisiac: adaptogens in the Brazilian folk medicine. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 21, n. 4, p. 754-763, 2011.

MEYER, B. N. *et al.* Brine Shrimp: A Convenient General Bioassays for Active Plant Constituents. **Planta Médica**, v. 45, n. 1, p. 31-34, 1982.

MIERS, J. Report on the plants collected by Mr. Weir, especially the Bignoniaceae. **Proceedings of the Royal Horticultural Society of London**, v. 3, p.193, 1863.

MIRANDA-CRUZ, E. *et al.* Antimicrobial activity of *Psidium friedrichsthalianum* L., *Pterocarpus hayesii* L., *Tynanthus guatemalensis* L. and *Spondias purpurea* L. extracts. **Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas**, v. 11, n. 4, p. 354 – 36, 2012.

MOBOT – **Missouri Botanical Garden**. Disponível em: http://mobot1.mobot.org/website/map_post.asp><<http://www.tropicos.org/NameSpecimens.aspx?nameid=50124665>><<http://www.tropicos.org/NameSpecimens.aspx?nameid=50006036>. Acesso em: 10/02/2012.

MONTEIRO, J.M. *et al.* Taninos: uma abordagem da química à ecologia. **Química Nova**, v. 28, n. 5, p. 892-896, 2005.

MONTRUCCHIO, D.P.; MIGUEL, O.G. Estudo fitoquímico e de atividade antimicrobiana de *Ptychopetalum olacoides* Benth. **Visão Acadêmica**, v.3, n. 2, p. 126, 2002.

MOORE, K.L.; PERSAUD, T.V.N. **Embriologia Clínica**. 8 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2008.

MORALES, L. *et al.* Bioactive properties of *Tynanthus panurensis* (Bureau) Sanwith bark extract, the Amazonian "clavo huasca". **Journal of Medicinal Food**, v. 14, n. 9, p. 939-943, 2011.

MUÑOZ, V. *et al.* The search for natural bioactive compounds through a multidisciplinary approach in Bolivia. Part II. Antimalarial activity of some plants used by Mosekene Indians. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 69, p. 139–155, 2000.

NAGORI, K. *et al.* *Piper betle* L.: A review on its ethnobotany, phytochemistry, pharmacological profile and profiling by new hyphenated technique DART-MS (Direct Analysis in Real Time Mass Spectrometry). **Journal of Pharmacy Research**, v. 4, n. 9, p. 2991-2997, 2011.

NOWATZKI, A. Disponível em: <http://professoralexeinowatzki.webnode.com.br/geografia-do-parana>. Acesso em: 08/07/2013.

NETO, J.A.L. *et al.* Embryo viability after revitrification with Vitri-ingá® method. **Jornal Brasileiro de Reprodução Assistida**, v.15, p. 15-18, 2011.

OLIVEIRA, A.B. *et al.* Estrutura química e atividade biológica de naftoquinonas de bignoniaceas brasileiras. **Química Nova**, v.3, n.4, p.302-307, 1990.

OLIVEIRA, E.C. *et al.* Uso de Sildenafil® para facilitar a retirada de óxido nítrico inalado em pós-operatório de hérnia diafragmática. **Revista Brasileira de Terapia Intensiva**, v. 17, n. 1, p. 60-62, 2005.

OLIVEIRA, E.C.; AMARAL, C.F.S. Sildenafil in the management of idiopathic pulmonary arterial hypertension in children and adolescents. **Jornal de Pediatria**, v. 81, n. 5, p. 390-394, 2005.

OLIVEIRA, V.M.A. *et al.* *In vitro* screening of Amazonian plants for hemolytic activity and inhibition of platelet aggregation in human blood. **Acta Amazonica**, v. 39, n. 4, p. 973-980, 2009.

OLMSTEAD, R.G. *et al.* A molecular phylogeny and classification of Bignoniaceae. **American Journal of Botany**, v. 96, n. 9, p. 1731-1743, 2009.

PANDE, L.; PATHAK A. Investigation of aphrodisiac potential of *Blepharis edulis* Linn. (Utangan) claimed by tribals of Malwa region of Madhya Pradesh. **International Journal of ChemTech Research**, v. 1, n. 3, p. 769-776, 2009.

PANOSSIAN, A.; WIKMAN, G. Effect of adaptogens on the central nervous System. **Arquivos Brasileiros de Fitomedicina Científica**, v. 3, n. 1, p. 29-51, 2005.

PARK, B.H.; FIKRIG, S.M.; SMITHWICK, E.M. Infection and nitroblue-tetrazolium reductions by neutrophils: a diagnostic aid. **The Lancet**, v. 2, p. 532, 1968.

PARK, H.H.; GOOD, R.A. N.B.T. test stimulated. **The Lancet**. v.19, p. 616, 1970.

PARK, S.W. *et al.* Effect of SA1, a Herbal Formulation, on Sexual Behavior and Penile Erection. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v. 29, n. 7, p.1383-1386, 2006.

PARMAR, V.S. *et al.* Polyphenols and alkaloids from *Piper* species. **Phytochemistry**, v. 49, n. 4, p. 1069-1078, 1998.

PATEL, D. K. *et al.* Pharmacologically screened aphrodisiac plant - A review of current scientific literature. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, p. S131-S138, 2011.

PAULETTI, P. M.; BOLZANI, V. S. Constituintes químicos de *Arrabidaea samydoides* (Bignoniaceae). **Química Nova**, v. 26, n. 5, p. 641-643, 2003.

PERUZZO, T.M.; CANTO, E.L. **Química**. 1.ed. São Paulo: Editora Moderna, 1999.

PETKOV, V. D.; BELCHEVA, S.; PETKOV, V. V. Behavioral effects of *Ginkgo biloba* L., *Panax ginseng* C.A. Mey. and Gincosan®. **The American Journal of Chinese Medicine**, v. 3, p. 841-855, 2003.

PLAZA, A. *et al.* Phenylpropanoid glycosides from *Tynanthus panurensis*: characterization and LC-MS quantitative analysis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, p. 2853-2858, 2005.

PUTTER, J. Peroxidase. In: BERGMAYER, H.U. **Methods of Enzymatic Analysis**. Verlag Chemie: Weinhan, 1974. p. 685-690.

QUEIROZ, S. L. Funções biológicas do óxido nítrico. **Química Nova**, v. 22, n. 4, 1999.

REICHERT, C. L. **Avaliação da aplicação de modelos comportamentais na busca de planta promissora para produção de novos produtos para ansiedade e depressão na indústria farmacêutica nacional**. 162 f. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) - Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2011.

REITZ, P. R. Bignoniaceae. *In*: **Flora Catarinense**. Itajaí: Herbário Barbosa Rodrigues, 1974.

ROVER, L. *et al.* Sistema antioxidante envolvendo o ciclo metabólico da glutatona associado a métodos eletroanalíticos na avaliação do estresse oxidativo. **Química Nova**, v. 24, p. 112-119, 2001.

ROWLAND, D. L.; TAI, W. A Review of plant-derived and herbal approaches to the treatment of sexual dysfunctions. **Journal of Sex & Marital Therapy**, v. 29, n. 3, p.185-205, 2003.

ROY, P. *et al.* Preliminary study of the antioxidant properties of flowers and roots of *Pyrostegia venusta* (Ker Gawl) Miers. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 11, p. 69, 2011.

SAMARAS, N. *et al.* A Review of age-related dehydroepiandrosterone decline and its association with well-known geriatric syndromes: is treatment beneficial? **Rejuvenation Research**, v. 16, p. 285-294, 2013.

SANDWITH; N.Y; HUNT, D.R. **Bignoniaceas**. Itajaí: Herbario Barbosa Rodrigues, 1974. v.18. p.77.

SANTAMARÍA, F.C. Psychosocial features of the management of erectile dysfunction. **Archivos Españoles de Urología**, v. 63, n. 8, p. 693-702, 2010.

SANTOS, P.M.L. *et al.* **Avaliação do potencial antibacteriano dos extratos de *Jacaranda puberula* Cham.** – um estudo baseado na indicação etnofarmacológica. Trabalho apresentado na 25ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2006.

SANTOS, P.M.L. *et al.* Antioxidant activity from the leaf extracts of *Jacaranda puberula* Cham., Bignoniaceae, a brazilian medicinal plant used for blood depuration. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 20, n. 2, p. 147-153, 2010.

SERAFINI, P. *et al.* Phosphodiesterase-5 inhibition augments endogenous antitumor immunity by reducing myeloid-derived suppressor cell function. **Journal of Experimental Medicine**, v. 203, p. 2691-2702, 2006.

SHIN, J. K.; KIM, G. N.; JANG, H. D. Antioxidant and pro-oxidant effects of green tea extracts in oxygen radical absorbance capacity assay. **Journal of Medicinal Food**, v. 10, p. 32-40, 2007.

SIGMA-ALDRICH. **Redução de Nitroazul de Tetrazólio (NBT). (Procedimento N.º 840).** Alemanha. Bula de reagente. Disponível em: http://www.sigmaaldrich.com/etc/medialib/docs/Sigma/General_Information/1/insert_pt_840.Par.0001.File.tmp/insert_pt_840.pdf. Acesso em: 28/10/2013a.

SIGMA ALDRICH. **Dotriacontane**. Alemanha. Bula de reagente. Disponível em: <http://www.sigmaaldrich.com/spectra/fnmr/FNMR010156.PDF>. Acesso em 28/10/2013b.

SILVA, M.N.; FERREIRA, V.F.; SOUZA, M.C.B.V. Um panorama atual da química e da farmacologia de naftoquinonas, com ênfase na β -lapachona e derivados. **Química Nova**, v. 26, n. 3, p. 407-416, 2003.

SILVA, E.S. *et al.* **Estudo químico do óleo essencial e extrato hexânico das folhas de *Mansoa difficilis* (Bignoniaceae)**. Trabalho apresentado na 32ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2009.

SILVA, P. B. *et al.* Avaliação do potencial alelopático, atividade antimicrobiana e antioxidante dos extratos orgânicos das folhas de *Pyrostegia venusta* (Ker Gawl.) Miers (Bignoniaceae). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.13, n. 4, p. 447-455, 2011.

SILVA, C.V.; BORGES, F.M.; VELOZO, E.S. Phytochemistry of some Brazilian Plants with Aphrodisiac Activity. **Phytochemicals - A global perspective of their role in nutrition and health**. 2012. Disponível em: <http://www.intechopen.com/books/phytochemicals-a-global-perspective-of-their-role-in-nutrition-andhealth/phytochemistry-of-some-brazilian-plants-with-aphrodisiac-activity>. Acesso em: 23/10/2013.

SIMÕES, C.M.O. *et al.* **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6. ed. Porto Alegre: UFRGS, Florianópolis: UFSC, 2007.

SINGH, S.; GUPTA, Y.K. Aphrodisiac activity of *Tribulus terrestris* Linn. in experimental models in rats. **Journal of Mens and Health**, v.8, p. S75–S77, 2011.

SINGH, R. *et al.* An Overview on traditional medicinal plants as aphrodisiac agent. **Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry**, v. 1, p. 43-56, 2012.

SINGH, R.; ALI, A.; SINGH, S. Current status of Indian medicinal plants with aphrodisiac potencial. **Pharmacology**, v. 4, p. 276-284, 2013.

SIQUEIRA, I.R. *et al.* *Ptychopetalum olacoides*, a traditional Amazon “nerve tonic”, possesses anticholinesterase activity. **Pharmacology and Biochemistry Behavior**, v. 75, p. 645-650, 2003.

SNYDER, P.J. Androgênios. **As Bases Farmacológicas da Terapêutica**. 11. ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill, p.1421, 2006.

SOUZA, V. C.; LORENZI, H. **Botânica Sistemática: Guia Ilustrado para identificação das famílias de Angiospermas da Flora Brasileira, baseado em APG II.** Nova Odessa: Plantarum, 2005. p. 508.

SOUZA, L.A.; SANTOS, G.O.; MOSCHETA, I.S. Morfoanatomia floral de espécies lianescentes de Bignoniaceae. **Iheringia, Série Botânica**, v. 65, n. 1, p. 5-15, 2010.

SPANGLER, R. E; OLMSTEAD, R. G. Phylogenetic analysis of Bignoniaceae based on the cpDNA gene sequences *rbcl* and *ndhF*. **Annals of the Missouri Botanical Garden**, v. 86, p. 33-46, 1999.

SUNG-YUM S.; VINAY K.S.; NITI S. Mushroom tyrosinase: recent prospect. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, p. 2837-2853, 2003.

SURESH-KUMAR, P. K.; SUBRAMONIAM, A.; PUSHPANGADAN, P. Aphrodisiac activity of *Vanda tessellata* (Roxb.) Hook. ex Don extract in male mice. **Indian Journal of Pharmacology**, v. 32, p. 300-304, 2000.

TAJUDDIN, S.A.; LATIF, A.; QASMI, I.A. Aphrodisiac activity of 50% ethanolic extracts of *Myristica fragrans* Houtt. (nutmeg) and *Syzygium aromaticum* (L) Merr. & Perry. (clove) in male mice: a comparative study. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 3, n. 6, p. 1-5, 2003.

TAJUDDIN, S.A.; LATIF, A.; QASMI, I.A. Effect of 50% ethanolic extract of *Syzygium aromaticum* (L.) Merr. & Perry. (clove) on sexual behaviour of normal male rats. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 4, n. 17, p.1-7, 2004.

TESSMANN, D.; DIANESE, J.C. Hentriacontane: a leaf hydrocarbon from *Syzygium jambos* with stimulatory effects on the germination of urediniospores of *Puccinia psidii*. **Fitopatologia Brasileira**, v. 27, n. 5, 2002.

VIAGRA: Citrato de sildenafil. Responsavel técnico José C. Bumerad. Guarulhos: Laboratórios Pfizer LTDA, 2009. Bula de remédio. Disponível em: <https://www.pfizer.com.br/arquivoPdf/Viagra.pdf>. Acesso em 28/10/2013.

VILEGAS, J.H.Y. *et al.* Constituents of brazilian medicinal plants. Constituents of *Tynanthus fasciculatus*. **Fitoterapia**, v. 64, n. 5, p. 476, 1993.

VILEGAS, W. *et al.* The chemistry of "cipócravo"- *Tynanthus fasciculatus*. **Revista Latinoamericana de Química**, v. 23, n. 2, p. 47-49, 1994.

VOLP, A.C.P. *et al.* Flavonoides antocianinas: características e propriedades na nutrição e saúde. **Revista Brasileira de Nutrição Clínica**, v. 23, n. 2, p. 141-149, 2008.

WAYNBERG, J. Yohimbine vs. muirapuama in the treatment of sexual dysfunction. **American Journal of Natural Medicine**, v. 1, p. 8-9, 1994.

WAYNBERG, J.; BREWER, S. Effects of Herbal on libido and sexual activity in premenopausal and postmenopausal women. **Advances in Therapy**, v. 17, p. 255-262, 2000.

WEINERT, P.L.; PEZZA, L.; PEZZA, H.R. Determinação espectrofotométrica de citrato de sildenafil em formulações farmacêuticas. **Química Nova**, v. 31, n. 5, p. 1112-1116, 2008.

WINTERBOURN, C.C. *et al.* The estimation of red blood cell superoxide activity. **Journal of Laboratory and Clinical Medicine**, v. 85, p. 337-341, 1975.

ZAMBLÉ, A., *et al.* Vasoactivity, antioxidant and aphrodisiac properties of *Caesalpinia benthiana* roots. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 116, p. 112-119, 2008.

ZHELEVA-DIMITROVA, D.; OBRESHKOVA, D.; NEDIALKOV, P. Antioxidant activity of *Tribulus terrestris* - a natural product in infertility therapy. **International Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences**, v. 4, n. 4, p. 508-511, 2012.

ZHENG, B.L. *et al.* Effect of a lipidic extract from *Lepidium meyenii* on sexual behavior in mice and rats. **Urology**, v. 55, p. 598-602, 2000.

ANEXOS

ANEXO 1

REGISTRO NO CNPq PARA ACESSO E REMESSA DE AMOSTRA DE COMPONENTE DO PATRIMÔNIO GENÉTICO



Ministério da
Ciência, Tecnologia
e Inovação



**Solicitações de Acesso e Remessa de Amostra de Componente do Patrimônio Genético
Autorizadas pelo CNPq em 2013**

Autorização nº 010393/2013-7

- Instituição: Universidade Federal do Paraná
- Coordenadora: Marilis Dallarmi Miguel
- Projeto: Abordagem fitoquímica, avaliação farmacológica e atividades biológicas de *Tynanthus micranthus* Corr. Mello Ex Schum (Bignoniaceae).
- Validade: 07/06/2013 a 24/05/2015

ANEXO 2

COMPROVANTE DE REGISTRO PARA COLETA DE MATERIAL BOTÂNICO, FÚNGICO E MICROBIOLÓGICO NO IBAMA



Ministério do Meio Ambiente - MMA
 Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis - IBAMA
 Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Comprovante de registro para coleta de material botânico, fúngico e microbiológico

Número: 28497-1		Data da Emissão: 15/04/2011 10:04
Dados do titular		
Registro no Ibama: 5235145	Nome: Fernanda Colombi Cansian	CPF: 019.335.539-60

Ressalvas

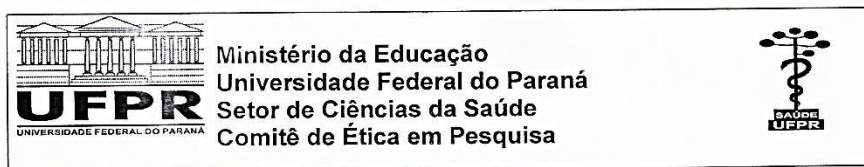
1	As atividades de campo exercidas por pessoa natural ou jurídica estrangeira, em todo o território nacional, que impliquem o deslocamento de recursos humanos e materiais, tendo por objeto coletar dados, materiais, espécimes biológicos e minerais, peças integrantes da cultura nativa e cultura popular, presente e passa da, obtidos por meio de recursos e técnicas que se destinem ao estudo, à difusão ou à pesquisa, estão sujeitas a autorização do Ministério de Ciência e Tecnologia.
2	A autorização não eximirá o pesquisador da necessidade de obter outras anuências, como: I) do proprietário, arrendatário, posseiro ou morador quando as atividades forem realizadas em área de domínio privado ou dentro dos limites de unidade de conservação federal cujo processo de regularização fundiária encontra-se em curso; II) da comunidade indígena envolvida, ouvido o órgão indigenista oficial, quando as atividades de pesquisa forem executadas em terra indígena; III) do Conselho de Defesa Nacional, quando as atividades de pesquisa forem executadas em área indispensável à segurança nacional; IV) da autoridade marítima, quando as atividades de pesquisa forem executadas em águas jurisdicionais brasileiras; V) do Departamento Nacional da Produção Mineral, quando a pesquisa visar a exploração de depósitos fossilíferos ou a extração de espécimes fósseis; VI) do órgão gestor da unidade de conservação estadual, distrital ou municipal, dentre outras.
3	O material biológico coletado deverá ser utilizado para atividades científicas ou didáticas no âmbito do ensino superior.
4	É necessário a obtenção de anuências previstas em outros instrumentos legais, bem como de consentimento do responsável pela área, pública ou privada, onde será realizada a atividade.
5	Este documento não abrange a coleta de vegetais hidróbios, tendo em vista que o Decreto-Lei nº 221/1967 e o Art. 36 da Lei nº 9.605/1998 estabelecem a necessidade de obtenção de autorização para coleta de vegetais hidróbios para fins científicos.
6	A autorização para envio ao exterior de material biológico não consignado deverá ser requerida por meio do endereço eletrônico www.ibama.gov.br (Serviços on-line - Licença para importação ou exportação de flora e fauna - CITES e não CITES). Em caso de material consignado, consulte www.icmbio.gov.br/sisbio - menu Exportação.
7	Este documento não é válido para: a) coleta ou transporte de espécies que constem nas listas oficiais de espécies ameaçadas de extinção; b) recebimento ou envio de material biológico ao exterior; e c) realização de pesquisa em unidade de conservação federal ou em caverna.
8	Este documento não dispensa o cumprimento da legislação que dispõe sobre acesso a componente do patrimônio genético existente no território nacional, na plataforma continental e na zona econômica exclusiva, ou ao conhecimento tradicional associado ao patrimônio genético, para fins de pesquisa científica, bioprospecção e desenvolvimento tecnológico. Veja maiores informações em www.mma.gov.br/icgen .
9	As atividades contempladas nesta autorização NÃO abrangem espécies brasileiras constante de listas oficiais (de abrangência nacional, estadual ou municipal) de espécies ameaçadas de extinção, sobreexploradas ou ameaçadas de sobreexploração.

Táxons registrados

Nível taxonômico	Táxon(s)
GENERO	Tynanthus

ANEXO 3

APROVAÇÃO DO PROJETO DE PESQUISA CEP/SD 1033.158.10.11



Curitiba, 01 de fevereiro de 2011

Ilmo (a) Sr. (a)
Obdulio Gomes Miguel
Josiane de Fátima Gaspari Dias

Nesta

Prezado(a) Pesquisador(a),

Comunicamos que o Projeto de Pesquisa intitulado "**Estudo de produtos naturais sobre a função dos neutrófilos humanos**" está de acordo com as normas éticas estabelecidas pela Resolução CNS 196/96, foi analisado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Setor de Ciências da Saúde da UFPR, em reunião realizada no dia 01 de dezembro de 2010 e apresentou pendência(s). Pendência(s) apresentada(s), documento(s) analisado(s) e projeto aprovado em 01 de fevereiro de 2011.


Registro CEP/SD: 1033.158.10.11

CAAE: 0090.0.091.000-10

Conforme a Resolução CNS 196/96, solicitamos que sejam apresentados a este CEP, relatórios sobre o andamento da pesquisa, bem como informações relativas às modificações do protocolo, cancelamento, encerramento e destino dos conhecimentos obtidos.



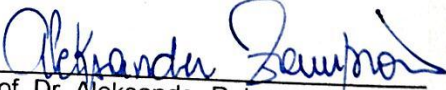
Data para entrega do relatório final ou parcial: 01/08/2011.

Atenciosamente


Prof.ª Dr.ª Ida Cristina Gubert
Vice-Coordenadora do Comitê de Ética em
Pesquisa do Setor de Ciências da Saúde

ANEXO 4

APROVAÇÃO DO PROJETO DE PESQUISA CEUA 23075.108893/2011-23

 <p>UFPR UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ</p>	<p>Ministério da Educação UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ Setor de Ciências Biológicas Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA)</p>	
		<div style="border: 1px solid black; padding: 5px; display: inline-block;">Nº 594</div>
CERTIFICADO		
<p>O Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, instituído pela PORTARIA Nº 787/03-BL, de 11 de junho de 2003, com base nas normas para a constituição e funcionamento do CEUA, estabelecidas pela RESOLUÇÃO Nº 01/03-BL, de 09 de maio de 2003 e considerando o contido no Regimento Interno do CEUA, CERTIFICA que os procedimentos utilizando animais no projeto de pesquisa abaixo especificado, estão de acordo com os princípios éticos estabelecidos pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e exigências estabelecidas em "Guide for the Care and Use of Experimental Animals (Canadian Council on Animal Care)".</p>		
CERTIFICATION		
<p>The Ethics Animal Experiment Committee of the Setor de Ciências Biológicas of the Federal University of Paraná, established by the DECREE Nº 787/03-BL on June 11th 2003, based upon the RESOLUTION Nº 01/03-BL from May 9th 2003, and upon the CEUA internal regiment, CERTIFIES that the procedures using animals in the research project specified below are in agreement with the ethical principals established by the Experimental Animal Brazilian Council (COBEA), and with the requirements of the "Guide for the Care and Use of Experimental Animals (Canadian Council on Animal Care)".</p>		
PROCESSO: 23075.108893/2011-23	APROVADO: 28/02/2012 – R.O. 01/2012	
TÍTULO: Abordagem fitoquímica, avaliação farmacológica e atividades biológicas de <i>Tynanthus micranthus</i> Corr. Mello ex Schum (Bignoniaceae)		
AUTORES: Marilis Dallarmi Miguel, Fernanda Colombi Cansian, Obdulio Gomes Miguel, Vera Lucia Lângaro Amaral		
DEPARTAMENTO: Ciências Farmacêuticas		
		 Prof. Dr. Aleksander Roberto Zamprônio Coordenador do CEUA