

UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

**Frederico Pittella Silva**

**CARACTERIZAÇÃO FITOQUÍMICA E ATIVIDADES BIOLÓGICAS DE**  
***Centella asiatica* (L.) Urban**

Juiz de Fora - MG – Brasil  
2008

**FREDERICO PITTELLA SILVA**

**CARACTERIZAÇÃO FITOQUÍMICA E ATIVIDADES BIOLÓGICAS DE**  
***Centella asiatica* (L.) Urban**

Dissertação de Mestrado do Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, para obtenção do Título de Mestre em Ciências Biológicas na área de Genética e Biotecnologia

**Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Nádia Rezende Barbosa**

Juiz de Fora - MG – Brasil  
2008

Silva, Frederico Pittella

Caracterização fitoquímica e atividades biológicas de *Centella asiática* (L.) Urban / Frederico Pittella Silva ; orientadora: profa. Dra. Nádia Rezende Barbosa. -- 2008.

150 f.

Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas - Área: Genética e Biotecnologia) – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Juiz de Fora.

1. Plantas medicinais. 2. I. Barbosa, Nádia Rezende. II. Título.

CDU 615.32:633.88

*"O único homem que nunca comete erros é aquele que nunca faz coisa alguma. Não tenha medo de errar, pois você aprenderá a não cometer duas vezes o mesmo erro".*  
*Franklin D. Roosevelt (1882-1945).*

*"A mente que se abre a uma nova idéia jamais voltará ao seu tamanho original".*  
*Albert Einstein (1879-1955).*

*Dedico este trabalho aos meus avós, Nicolau e  
Silvéria, Martinho e Geralda,  
sempre olhando por mim.*

## AGRADECIMENTOS

A vida não é por acaso. Pela vida, oportunidade e todos os dons, agradeço a DEUS.

Aos meus pais, Narciso e Flora, pelo amor, pela criação, pela paciência, pelas oportunidades, por confiarem em mim e me incentivarem, obrigado por acreditarem neste sonho!

Às minhas irmãs, Fátima, Fabiana e Fernanda, pelos conselhos, confidências, apoio e incentivo nos momentos de fraqueza. Vocês abriram a porta do sucesso para nós!

Aos meus irmãos; Fábio, espelho-me em você para chegar longe e ter um futuro brilhante; e Felipe, pela amizade incompreendida por muitos, durante o dia-a-dia deste período difícil.

À Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup> Nádia Rezende Barbosa, sem você não conseguiria dar um passo sequer no mundo da pesquisa. Obrigado pela amizade, conversas, orientações, puxões de orelha, elogios, cobranças e incentivos. Levarei comigo seus sábios ensinamentos por toda a vida.

Ao Prof. Dr. Daniel Sales Pimenta, pelo idealismo, orientação e soluções. Sua amizade e sabedoria foram fundamentais para que eu pudesse acender a centelha de minha curiosidade científica.

À Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup> Míriam Aparecida Pinto Vilela, por me aceitar desde os primórdios da faculdade em seu laboratório. Seus conselhos sempre me ajudaram nos momentos de incerteza.

Ao Prof. Lúcio Guedes Barra, pela amizade e apoio, sempre facilitando nossos inúmeros problemas e viagens.

Ao Prof. Dr. Lyderson Facio Viccini, pelos ensinamentos, aulas, incentivos e amizade. Valeu pela ajuda e disponibilização de pessoal no laboratório de genética!

À Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup> Miriam Tereza P. Lopes do Laboratório de Substâncias Anti-Tumorais (LSAT) da UFMG, por ter aceito nossa parceria, abrindo seu laboratório e incentivado nossas buscas.

Aos Prof. Dr. Wagner Gattaz, Ana Paula Ferreira, Fátima Salimena, Rogério Estevam, Mauro Almeida, Elaine Coimbra, que estiveram sempre disponíveis para orientações quando foi preciso.

Ao grande amigo Rafael Cypriano Dutra (Limão), por toda a amizade, companhia, conselhos, conversas, apoio nos momentos difíceis, relatórios, provas, disciplinas, viagens, por saber escutar e mesmo nas críticas. Sua amizade foi fundamental nessa conquista.

À minha amada Camila, pelo seu apoio nesta caminhada, até mesmo se arriscando em alguns ensaios. Sei que muitas vezes fui ausente e fui errado, mas reconheço que seu amor e carinho me fizeram enxergar os problemas de outra maneira. Obrigado por ficar ao meu lado!

À amiga Pâmela, sempre disposta a ajudar! Por todas as horas trabalhando e ensinando na genética! À Fernanda pela ajuda na reta final!

Aos amigos do NIQUA e FFB: Fátima Frizeiro, Aline Ferreira, Vanessa Belo, Mariana Prates, Priscila Larcher, Alessandra Fedoce, Raphael Trevizani, Arquimedes Scheffer, Leandro de Sá, Erika, Vaneida, Humberto e Camila, no convívio, amizade, e contribuição.

Aos amigos do LSAT, Heveline, Dalton, Cris, Ana, Lu, Sandrinha, Fernanda.

Aos amigos do mestrado, por estarem juntos sempre!

Aos funcionários da FFB: Maura, Nádia, Pitanga e Roberto pelo suporte.

Aos amigos de São Paulo: Alaione, Fernanda, Patrícia, Fábio pela colaboração.

Sou grato também, àqueles que, sinceramente, torceram e contribuíram para a realização deste trabalho.

Muito Obrigado!

## RESUMO

SILVA, F.P. **Caracterização fitoquímica e atividades biológicas de *Centella asiatica* (L.) Urban.** 2008. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, 2008.

*Centella asiatica* (L.) Urban é membro da família Umbelliferae que apresenta distribuição pantropical, sendo freqüente nas bordas de florestas e como invasoras de outras plantas cultivadas. *C. asiatica* contém glicosídeos triterpênicos como o asiaticosídeo e madecassosídeo, e seus derivados ácidos (asiático e madecássico). Essas moléculas têm sido responsáveis pelas diversas atividades de seus extratos, usados para o tratamento de doenças neuropsiquiátricas, asma, lepra, úlceras, eczemas e no tratamento de feridas. Foram preparados os extratos aquoso (EA) e bruto metanólico (EBM); este último foi fracionado. A análise citogenética (mitose) revelou que o número cromossômico foi superior a 48. A triagem fitoquímica revelou a presença de flavonóides, heterosídeos, cumarinas, taninos e saponinas. O asiaticosídeo (ASA) foi quantificado nos extratos por HPLC; os EA, EBM e fração hexânica (FH), apresentaram 84,31%, 70,93% e 57,28% de ASA em suas composições. O doseamento dos constituintes fenólicos revelou 2,86g e 0,60g/100g de extrato para EA e EBM, respectivamente. Os teores de flavonóides para EA e EBM foram 0,361mg e 0,271 mg/ 100g de extrato, respectivamente. Ambos os EA e EBM demonstraram atividade antioxidante frente ao radical DPPH, com  $CI_{50} = 31,25 \mu\text{g/mL}$  e  $CI_{50} = 37,16 \mu\text{g/mL}$ , respectivamente. O EA inibiu de maneira dose-dependente a atividade da iPLA<sub>2</sub> e da cPLA<sub>2</sub> em amostras cerebelares de ratos. Os extratos não apresentaram potencial leishmanicida e nem antimicrobiano. Também não demonstraram potencial tóxico quando testados pelo modelo de *Artemia salina*. O EA apresentou atividade citotóxica seletiva para as linhagens MDA-MB 231 (carcinoma de mama humano) e B<sub>16</sub>F<sub>1</sub> (melanoma de camundongo) com  $CI_{50} = 648,0$  e  $698,0 \mu\text{g/mL}$ , respectivamente. Os cremes contendo EA e EBM apresentaram potencial cicatrizante em modelo de queimaduras. Esses resultados confirmam e ampliam o conhecimento sobre o uso popular de *Centella asiatica* (L.) Urban, e ratificam a planta como fonte natural de moléculas com potencial farmacológico.

## ABSTRACT

SILVA, F.P. **Phytochemical characterization and biological activities of *Centella asiatica* (L.) Urban.** 2008. Master Dissertation – Federal University of Juiz de Fora, Juiz de Fora, 2008.

*Centella asiatica* (L.) Urban is a member of Umbelliferae family that presents pantropical distribution, being frequent around forests and as invaders of grown plants. *C. asiatica* contains triterpenic glycosides such as asiaticoside and madecassoside, and its acids (asiatic and madecassic). These molecules have been responsible for several activities of its extracts, used to treat neuropsychiatric disorders, asthma, leprosy, ulcers, eczems and on wound healing. Water (EA) and crude methanolic (EBM) extracts were prepared, and the last was fractionated. The citogenetic assay (mitosis) revealed that the chromossomic number was higher than 48. The phytochemical screening showed the presence of flavonoid, heterosides, cumarins, tanins and saponis. The asiaticoside (ASA) was quantified in the extracts by HPLC; EA, EBM and hexanic fraction (FH) showed 84.31%, 70.93% and 57.28% of ASA in its composition. The determination of phenolic constituents revealed 2.86g and 0.60g/ 100g of extract for EA and EBM, respectively. The level of flavonoids for EA and EBM were 0.361mg and 0.271mg/ 100g of extract, respectively. Both EA and EBM showed antioxidant activity against DPPH radical, with  $IC_{50} = 31.25 \mu\text{g/mL}$  and  $IC_{50} = 37.16 \mu\text{g/mL}$ , respectively. The EA inhibited the activity of iPLA<sub>2</sub> and cPLA<sub>2</sub> in cerebelar samples in a dose-dependent manner. The extracts did not show neither leishmanicidal nor antimicrobial potencial. None toxicity was detected in the *Artemia salina* model. The EA presented selective antitumor activity against MDA-MB 231 (human breast cancer) and B<sub>16</sub>F<sub>1</sub> (mouse melanoma) cell lines, with  $IC_{50} = 648.0$  and  $698.0 \mu\text{g/mL}$ , respectively. Creams containing EA and EBM presented wound healing activity. These results confirm and extend the knowledge about popular usage of *Centella asiatica* (L.) Urban, and confirms the plant as a natural source of molecules with pharmacological potential.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –	Rotas do metabolismo vegetal e biossintéticas	5
Figura 2 –	Biossíntese de terpenos	7
Figura 3 –	Núcleos mais comuns das saponinas triterpênicas	10
Figura 4 –	Estruturas moleculares dos componentes de <i>C. asiatica</i>	11
Figura 5 –	Características morfológicas da <i>C. asiatica</i>	15
Figura 6 –	Esquema de fracionamento do extrato bruto metanólico (EBM) de <i>C. asiatica</i>	32
Figura 7 –	Representação dos quadrantes de aplicação dos cremes no modelo utilizado	49
Figura 8 –	Metáfase mitótica de <i>Centella asiatica</i>	54
Figura 9 –	Perfil cromatográfico do ASA e do PI nas condições padronizadas e validadas	57
Figura 10 –	Efeito inibitório do extrato aquoso de <i>C. asiatica</i> sobre a atividade de iPLA <sub>2</sub> em tecido cerebelar de ratos	60
Figura 11 –	Efeito inibitório do extrato aquoso de <i>C. asiatica</i> sobre a atividade de cPLA <sub>2</sub> em tecido cerebelar de ratos	60
Figura 12 –	Efeito citotóxico do EA de <i>C. asiatica</i> em células de carcinoma de mama humano (MDA – MB 231)	64
Figura 13 –	Efeito citotóxico do EA de <i>C. asiatica</i> em células de melanoma de camundongo (B <sub>16</sub> F <sub>1</sub> )	64
Figura 14 –	Efeito citotóxico do EA de <i>C. asiatica</i> em células de glioma de rato (C <sub>6</sub> )	65
Figura 15 –	Efeito citotóxico do EA de <i>C. asiatica</i> em células de carcinoma de pulmão humano (A <sub>549</sub> )	65
Figura 16 –	Efeito citotóxico do EA de <i>C. asiatica</i> em células normais de rim de hamster (BHK)	66

Figura 17 –	Evolução das lesões no coelho número 5 (ao qual foi aplicado o creme contendo EBM), nos dias 3, 6 e 10, do experimento	68
Figura 18 –	Evolução das lesões no coelho número 10 (ao qual foi aplicado o creme contendo EA), nos dias 3, 6 e 10, do experimento	68
Figura 19 –	Tecido conjuntivo de coelho tratado com creme contendo EA 10% exibindo fibras de colágeno (setas verdes) e grande quantidade de células inflamatórias (setas vermelhas)	69
Figura 20 –	Tecido conjuntivo de coelho tratado com creme contendo EBM 10% apresentando grande número de fibroblastos (setas amarelas) e poucas células inflamatórias (seta vermelha)	69
Figura 21 –	Tecido conjuntivo de coelho tratado com creme contendo EA 5% apresentando organização, pouca área correspondente a matriz extracelular (seta preta), grande quantidade de fibras de colágeno (setas verde) e fibroblastos (setas amarelas)	70
Figura 22 –	Tecido conjuntivo de coelho tratado com sulfadiazina apresentando grande número de vasos sanguíneos (setas marrons) e fibras de colágeno (setas verdes)	70
Figura 23 –	Número de células inflamatórias das amostras de tecido oriundo das feridas dos animais tratadas com creme contendo 5 e 10% de EA de <i>C.asiatica</i> , creme base e sulfadiazina de prata 1%	72
Figura 24 –	Número de fibroblastos das amostras de tecido oriundo das feridas tratadas com creme contendo 5 e 10% de EA de <i>C.asiatica</i> , creme base e sulfadiazina de prata 1%	72
Figura 25 –	Número de vasos sanguíneos das amostras de tecido	

	oriundas das feridas tratadas com creme contendo 5 e 10% de EA de <i>C.asiatica</i> , creme base e sulfadiazina de prata 1%	<b>73</b>
Figura 26 –	Porcentagem de campo microscópico ocupada pela área de matriz extracelular em amostras de tecido oriundo das feridas tratadas com creme contendo 5 e 10% de EA de <i>C.asiatica</i> , creme base e sulfadiazina de prata 1%	<b>73</b>
Figura 27 –	Porcentagem de campo microscópico ocupada pela área de células contendo fibras de colágeno em amostras de tecido oriundo das feridas tratadas com creme contendo 5 e 10% de EA de <i>C.asiatica</i> , creme base e sulfadiazina de prata 1%	<b>74</b>
Figura 28 –	Número de células inflamatórias das amostras de tecido oriundo das feridas tratadas com creme contendo 5 e 10% de EBM de <i>C.asiatica</i> , creme base e sulfadiazina de prata 1%	<b>75</b>
Figura 29 –	Número de fibroblastos das amostras de tecido oriundo das feridas tratadas com creme contendo 5 e 10% de EBM de <i>C.asiatica</i> , creme base e sulfadiazina de prata 1%	<b>76</b>
Figura 30 –	Número de vasos sanguíneos das amostras de tecido oriundo das feridas tratadas com creme contendo 5 e 10% de EBM de <i>C.asiatica</i> , creme base e sulfadiazina de prata 1%	<b>76</b>
Figura 31 –	Porcentagem de campo microscópico ocupada pela área de matriz extracelular em amostras de tecido oriundo das feridas tratadas com creme contendo 5 e 10% de EBM de <i>C.asiatica</i> , creme base e sulfadiazina de prata 1%	<b>77</b>
Figura 32 –	Porcentagem de campo microscópico ocupada pela área de células contendo fibras de colágeno em amostras de tecido oriundo das feridas tratadas com creme contendo 5 e 10% de EBM de <i>C.asiatica</i> , creme base e sulfadiazina de prata 1%.	<b>77</b>
Figura 33 –	Pesquisa de flavonóides através da reação com cloreto de alumínio	<b>121</b>
Figura 34 –	Pesquisa de flavonóides através da reação com ácido bórico	<b>121</b>

Figura 35 –	Pesquisa de cumarina	<b>122</b>
Figura 36 –	Pesquisa de heterosídeos através da reação de <i>Libermann-Buchard</i>	<b>122</b>
Figura 37 –	Pesquisa de heterosídeos através da reação de <i>Kedde</i>	<b>122</b>

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Reações de identificação de grupos de substâncias do metabolismo secundário de <i>Centella asiatica</i>	55
Tabela 2 –	Constituintes fenólicos presentes nos extratos aquoso e bruto metanólico de <i>Centella asiatica</i>	57
Tabela 3 –	Teor de flavonóides dos extratos aquoso e bruto metanólico de <i>Centella asiatica</i>	58
Tabela 4 –	Atividade leishmanicida dos extratos aquoso e bruto metanólico de <i>Centella asiatica</i> em <i>L. amazonensis</i> e <i>L. chagasi</i>	61
Tabela 5 –	Atividade antimicrobiana dos extratos de <i>Centella asiatica</i> pelo método turbidimétrico	61
Tabela 6 –	Toxicidade dos extratos de <i>Centella asiatica</i> sobre <i>Artemia salina</i>	62
Tabela 7 –	Citotoxicidade do EA de <i>Centella asiatica</i> em diferentes linhagens celulares ( $CI_{50} = \mu\text{g/ mL}$ )	66

## LISTA DE ABREVIATURAS

A<sub>549</sub> - linhagem celular de carcinoma de pulmão humano  
AA - ácido araquidônico  
acetil-coA - acetil-coenzima A  
AlCl<sub>3</sub> - cloreto de alumínio  
ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária  
ASA - asiaticosídeo  
ATCC - *American Type of Culture Collection*  
ATP - Adenosina tri-fosfato  
B<sub>16</sub>F<sub>1</sub> - linhagem celular de melanoma de camundongo  
bAS - β-amirina sintase  
BHK - linhagem celular (normal) de fibroblasto de rim de *hamster*  
BHT - butil-hidróxi-tolueno  
BSA - *bovine serum albumine* (albumina sérica bovina)  
C<sub>6</sub> - linhagem celular de glioma de rato  
<sup>14</sup>C - carbono 14  
CBR - Centro de Biologia de Reprodução  
CCD - cromatografia de camada delgada  
CEEA - Comissão de Ética na Experimentação Animal  
CLAE - cromatografia líquida de alta eficiência  
CI<sub>50</sub> - concentração de inibição em 50%  
CL<sub>50</sub> - concentração letal em 50%  
CO<sub>2</sub> - dióxido de carbono  
CoA - coenzima A  
COBEA - Colégio Brasileiro de Experimentação Animal  
cPLA<sub>2</sub> - fosfolipase A<sub>2</sub> citosólica  
CPM - contagem por minuto  
CYS - cicloartenol sintase

DL<sub>50</sub> - dose letal 50%

DMAPP - pirofosfato de dimetilalila éster alílico

DMSO - dimetilsulfóxido

DNA - ácido desoxirribonucléico

DPPH - 2,2-difenil-1,2-picrilhidrazil

EA - extrato aquoso

EBM - extrato bruto metanólico

EDTA - ácido etilenodiamino tetra-acético

EROs - espécies reativas de oxigênio

FA - fração acetônica

FC - fração clorofórmica

FH - fração hexânica

FHC - fração hexânica-clorofórmica

FPP - farnesil pirofosfato

g - grama

GPP - geranol pirofosfato

GSH-Px - glutathiona peroxidase

HE- hematoxilina e eosina

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> - peróxido de hidrogênio

H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> - ácido bórico

HCl - ácido clorídrico

HPLC - *high performance liquid chromatography*

HQ - 8-hidroxiquinoleína

HMG-CoA - 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA

ICB - Instituto de Ciências Biológicas

iPLA<sub>2</sub> - fosfolipase A<sub>2</sub> cálcio independente

IPP - isopentenil pirofosfato

kg - kilograma

KOH - hidróxido de potássio

LTA - leishmania tegumentar americana

LTD - *long-term depression*

LUV - luz ultra violeta  
LUS - lupeol sintase  
LV - leishmania visceral  
mCi - miliCurie  
MDA MB-231– linhagem celular de carcinoma de mama de humanos  
Mg - magnésio  
mg - miligrama  
MIC - *minimum inhibitory concentration* (concentração mínima inibitória)  
mL - mililitro  
MVA - ácido mevalônico  
MTT - 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5 difenil tetrazólico)  
ND - não determinado  
nm - nanômetro  
µL - microlitro  
µg - micrograma  
µM - micromolar  
µCi - microCurie  
N - normal  
NADPH - nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato  
NaOH - hidróxido de sódio  
NO - óxido nítrico  
O<sub>2</sub> - oxigênio  
p.a. - para análise  
PABA - Ácido p-aminobenzóico  
PBS - *Phosphate buffer saline* (tampão salina fosfato)  
PLC - fosfolipase C  
PLA<sub>2</sub> - fosfolipase A<sub>2</sub>  
RDC - Resolução de Decreto Constitucional  
ROS - *reactive oxygen species* (espécies reativas de oxigênio)  
RPMI - *Roswell Park Memorial Institute*  
SFB - soro fetal bovino

sPLA<sub>2</sub> - fosfolipase A<sub>2</sub> secretória

STD - *short-term depression* (depressão de curto tempo)

SNC - sistema nervoso central

SOD - superóxido desmutase

TGF- $\beta$  - *Transforming growth factor beta* (fator beta de crescimento transformante)

TNF - Fator de necrose tumoral

UFC - unidades formadoras de colônias

UFJF - Universidade Federal de Juiz de Fora

UFMG - Universidade Federal de Minas Gerais

UI - Unidade Internacional

$\lambda$  - comprimento de onda

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b>	<b>1</b>
1.1 Metabolismo vegetal	4
1.1.1 Produtos da via do mevalonato	5
1.1.2 Saponinas	8
1.2 Biodiversidade e identificação botânica	11
1.2.1 Taxonomia	12
1.3 Caracterização botânica, química e farmacológica de <i>Centella asiatica</i>	13
1.4 Potenciais biológicos	15
1.4.1 Espécies Reativas de Oxigênio (EROs)	15
1.4.2 Fosfolípidos e transdução de sinais	16
1.4.2.1 Síntese e metabolismo dos fosfolípidos	18
1.4.2.2 Fosfolipase A <sub>2</sub>	19
1.4.2.3 Subtipos de PLA <sub>2</sub>	19
1.4.3 Leishmanioses	21
1.4.4 Atividade antimicrobiana	22
1.4.5 Apoptose e Câncer	23
1.4.6 Cicatrização	24
<b>2 OBJETIVOS</b>	<b>28</b>
2.1 Geral	28
2.2 Específicos	28
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS</b>	<b>29</b>
3.1 Dados ambientais da colheita de <i>Centella asiatica</i>	29

3.2 Análise citogenética	29
3.3 Obtenção dos extratos	30
3.3.1 Preparação do extrato bruto metanólico (EBM) de <i>Centella asiatica</i>	31
3.3.1.1 Fracionamento do extrato bruto metanólico (EBM) de <i>Centella asiatica</i>	31
3.3.2 Preparação do extrato aquoso (EA) de <i>Centella asiatica</i>	32
3.4 Triagem fitoquímica	33
3.4.1 Flavonóides	33
3.4.2 Leucoantocianidinas	34
3.4.3 Taninos	34
3.4.4 Cumarinas	35
3.4.5 Heterosídeos	35
3.4.6 Saponinas	36
3.4.7 Alcalóides	37
3.4.8 Antraquinonas	37
3.5 Cinzas totais	38
3.6 Teor de umidade	38
3.7 Determinação de asiaticosídeo (ASA) por HPLC	39
3.8 Doseamento dos constituintes fenólicos totais	39
3.9 Determinação dos teores de flavonóides	40
3.10 Atividade antioxidante	41
3.11 Atividade da fosfolipase A <sub>2</sub> em tecido cerebelar de ratos	42
3.12 Atividade leishmanicida	43
3.13 Atividade antimicrobiana	44
3.13.1 Preparo e padronização da suspensão microbiana	45
3.13.2 Concentração Inibitória Mínima (MIC)	46
3.14 Toxicidade aguda	46
3.15 Atividade citotóxica	47
3.16 Atividade cicatrizante	48
3.16.1 Histopatologia e histomorfometria	50

3.17 Análise estatística	51
<b>4 RESULTADOS</b>	<b>53</b>
4.1 Análise citogenética	53
4.2 Triagem fitoquímica	53
4.3 Determinação de asiaticosídeo (ASA) por HPLC	56
4.4 Quantificação dos constituintes fenólicos totais	57
4.5 Determinação dos teores de flavonóides	58
4.6 Atividade antioxidante	58
4.7 Atividade da fosfolipase A <sub>2</sub> em tecido cerebelar de ratos	58
4.8 Atividade leishmanicida	59
4.9 Atividade antimicrobiana	61
4.10 Toxicidade aguda	62
4.11 Atividade citotóxica	62
4.12 Atividade cicatrizante	67
4.12.1 Análise macroscópica	67
4.12.2 Histopatologia e histomorfometria	67
<b>5 DISCUSSÃO</b>	<b>78</b>
5.1 Análise citogenética	78
5.2 Triagem fitoquímica	80
5.3 Determinação de asiaticosídeo (ASA) por HPLC	81
5.4 Quantificação dos constituintes fenólicos totais	82
5.5 Determinação dos teores de flavonóides	83
5.6 Atividade antioxidante	83
5.7 Atividade da fosfolipase A <sub>2</sub> em tecido cerebelar de ratos	85
5.8 Atividade leishmanicida	87
5.9 Atividade antimicrobiana	87

5.10 Toxicidade aguda	88
5.11 Atividade citotóxica	90
5.12 Atividade cicatrizante	92
<b>6 CONCLUSÕES</b>	<b>98</b>
<b>7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>99</b>
<b>ANEXO A</b>	<b>121</b>
<b>ANEXO B</b>	<b>123</b>
<b>ANEXO C</b>	<b>125</b>
<b>ANEXO D</b>	<b>136</b>
<b>ANEXO E</b>	<b>147</b>
<b>ANEXO F</b>	<b>149</b>

# 1 INTRODUÇÃO

A utilização das plantas, como medicamento para o tratamento das enfermidades que acometem a espécie humana, remonta à idade antiga (ZAKARIA, 1991; CALIXTO, 2001). Os primeiros medicamentos foram os de origem natural, cujos princípios ativos foram extraídos principalmente de plantas superiores e destinavam-se à terapia de doenças infecciosas. De fato, povos antigos, como os do mediterrâneo, chineses, hindus e maias (séculos antes da era atual) já conheciam o emprego terapêutico de certas plantas e de alguns minerais (KOROLKOVAS e BURCKHALTER, 1988).

Os benefícios obtidos com a utilização empírica levaram o homem a buscar sempre “novas” plantas, para o tratamento de diversas patologias, e a experiência acumulada foi transmitida por inúmeras gerações, levando ao descobrimento de alguns dos mais valiosos medicamentos utilizados na medicina moderna (SIMÕES et al., 1986). Além dos benefícios, observaram-se muitas reações tóxicas associadas a plantas, levando à necessidade de estudos criteriosos relativos à sua utilização. Diversos autores têm apontado à importância dos estudos químicos e farmacológicos, em várias espécies vegetais, pela intensa produção de metabólitos secundários, que podem ser medicinais ou tóxicos, principalmente nas espécies dos ecossistemas tropicais (BRITO e BRITO, 1993). Atualmente, estima-se que existam aproximadamente 500.000 espécies de plantas terrestres, das quais são conhecidos aproximadamente 50.000 metabólitos secundários (MONTANARI e BOLZANI, 2001).

Em nosso país, há uma grande diversidade de plantas com potencial terapêutico, o que estimula os pesquisadores no estudo de suas possíveis ações terapêuticas, bem como ações tóxicas, a fim de produzir medicamentos com garantia de eficácia e segurança (WALL e WANI, 1996). A riqueza da biodiversidade da flora brasileira, associada aos levantamentos etnobotânicos, etnofarmacológicos, farmacognósticos e fitoquímicos permite aos pesquisadores isolar compostos biologicamente ativos a partir de diferentes espécies vegetais, os quais podem se constituir em modelos tanto para a síntese de fármacos quanto de outros produtos para aplicação agrícola ou florestal

(GUERRA e NODARI, 2001). Uma investigação nessa área influenciaria diretamente a sociedade em vários níveis, possibilitando a descoberta de novos fármacos, a identificação de fontes de substâncias químicas locais capazes de substituir as importadas, assim como o desenvolvimento das indústrias de fitomedicamentos nacionais. No entanto, para alcançar qualquer dessas metas é indispensável a fundamentação científica, pois é o que possibilita a transformação segura e eficaz de uma planta em um medicamento fitoterápico de qualidade, diferente do uso baseado somente na prática popular (ELIZABETSKY, 2002).

Dentre os países da América Latina, somente o Brasil detém cerca de 20-22% das plantas e microorganismos do planeta (CALIXTO, 2005). Apesar disso, até meados da década de 90, cerca de 84% dos fármacos presentes no mercado brasileiro eram importados e 60% de todos os fármacos processados eram consumidos por somente 23% da população, fazendo com que os remédios caseiros à base de plantas medicinais se mantivessem como a principal fonte de medicamentos para a maioria da população (ELIZABETSKY e COSTA-CAMPOS, 1996; ELIZABETSKY, 1999). Segundo Calixto (2005), o aumento do emprego dos produtos naturais pela população, em todo o território nacional, traz consigo o uso indiscriminado de plantas sem qualquer conhecimento fitoquímico, farmacológico e toxicológico.

Estima-se que o comércio mundial de fitoterápicos movimentou cifras de 22 bilhões de dólares anuais (YUNES et al., 2001). Este quadro tem sido denominado “a revolução dos medicamentos fitoterápicos” (RATES, 2001). Entretanto, poucas informações estão disponíveis a respeito do risco potencial de certas plantas medicinais para a saúde humana, ainda que muitas contenham substâncias químicas conhecidas por serem mutagênicas e/ou carcinogênicas (BJELDANES e CHANG, 1977; WEISBURGER, 1979; GOGGELMANN e SCHIMMER, 1986). Como a maior parte da flora ainda é desconhecida do ponto de vista farmacobotânico, são imprescindíveis ações para a legalização das normas de uso e registro de fitoterápicos a fim de evitar o uso indiscriminado pela medicina popular (DI STASI, 1996).

A produção e a utilização de fitoterápicos padronizados, com seus benefícios comprovados e de alta qualidade, podem facilitar o acesso da população a medicamentos seguros e de menor custo (ELIZABETSKY e COSTA-CAMPOS, 1996;

LAPA et al., 1999) e para tal, a qualidade das plantas medicinais para este fim deve ser controlada. Alguns parâmetros de análise nos processos de inspeção da matéria-prima vegetal devem ser considerados, principalmente a correta identidade botânica e a análise fitoquímica qualitativa. Nesse contexto, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) criou, em 2004, uma normatização para a realização das análises de controle da qualidade de fitoterápicos no Brasil, a RDC nº 48, de 16/03/2004. Nela, constam os testes de identificação, pureza, características físicas e químicas, toxicidade e quantificação do princípio ativo ou biomarcador que devem ser efetivados tanto para a matéria-prima quanto para o produto acabado. Dessa forma, para garantir a qualidade das formulações, torna-se necessário identificar um marcador químico específico, assegurando a utilização da espécie na produção dos medicamentos.

*Centella asiatica* (L.) Urb. é um membro cosmopolita da família Umbelliferae que apresenta distribuição pantropical, sendo freqüente nas bordas de florestas e como invasoras de outras plantas cultivadas (SOUZA e LORENZI, 2005). É erva perene rizomatosa, apresentando plasticidade fenotípica quanto ao tamanho de folhas, as quais são maiores à sombra, aspecto ecológico importante, já que as folhas são comumente utilizadas em preparações farmacológicas (COELHO et al., 2005; COELHO, 2006).

*C. asiatica* também tem sido usada por séculos na medicina Ayuverdica (medicina tradicional Indiana) para o tratamento de doenças neuropsiquiátricas, asma, lepra, úlceras, eczemas e no tratamento de feridas (CHOPRA et al., 1956; HANDA et al., 1988). Na Tailândia é empregada para o tratamento de processos inflamatórios e infecções de origem variada (PUNTUREE et al., 2004). Recentemente, estudos têm mostrado a atividade dos extratos alcoólico e aquoso de *C. asiatica* como ansiolítico (BRADWEJN et al., 2000; WIJEWEERA et al., 2003).

A eficiência de *C. asiatica* no tratamento de doenças variadas, atestada por anos de uso na medicina tradicional, oferece vasto campo de estudo para a comprovação científica de seu potencial farmacológico. Dessa maneira, este estudo se justifica na validação das propriedades farmacológicas de *Centella asiatica* (L.) Urb., tendo em vista sua utilização em tratamentos comprovadamente eficazes.

## **1.1 Metabolismo vegetal**

Admite-se que os lípidos, as proteínas, os carboidratos e os ácidos nucléicos, comuns aos seres vivos e essenciais para a manutenção das células, são originados do metabolismo primário e, ainda, as substâncias originadas a partir de rotas biossintéticas diversas, e que estão restritas a determinados grupos de organismos, são produtos do metabolismo secundário (CASTRO et al., 2007). Todo o metabolismo vegetal está condicionado aos processos fotossintéticos. Destes, resultam as substâncias do metabolismo primário, as quais irão originar os metabólitos secundários. As reações fotossintéticas podem ser agrupadas em duas categorias: reações de claro ou fase luminosa (fotólise da água ou Reação de Hill – atualmente chamada de reações de tilacóide) na qual a energia solar será absorvida por moléculas de clorofila e transferida destas para moléculas armazenadoras de energia (adenosina trifosfato - ATP e nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato - NADPH); e reações de escuro ou fase bioquímica (Reação de Calvin – atualmente chamada de reações de estroma), nas quais as moléculas de ATP e NADPH servirão, respectivamente, como fonte de energia e força redutora no processo de fixação do dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>), o qual será convertido principalmente em glicose (VICKERY e VICKERY, 1981; SANTOS, 2004).

Através do metabolismo da glicose são formados praticamente todos os metabólitos primários e secundários. A glicose é convertida em moléculas de ácido pirúvico que podem seguir duas vias diferentes. Na primeira via, moléculas de piruvato entram na via do ácido chiquímico para formar os metabólitos secundários aromáticos (alcalóides indólicos, quinolínicos, isoquinolínicos, ligninas e lignanas, cumarinas e taninos hidrossolúveis). Na segunda via, o piruvato continua sendo oxidado até a formação de moléculas de acetil-coenzima A (acetil-coA). Estas podem seguir três vias diferentes: a do ácido cítrico, a do mevalonato e a da condensação do acetato. Entranto, na via do ciclo do ácido cítrico, serão formados os alcalóides pirrolidínicos, tropânicos, pirrolizidínicos, piperidínicos e quinolizidínicos. A via do mevalonato origina os terpenóides e os esteróis, enquanto as acetogeninas resultam da condensação do acetato. A combinação de uma unidade do ácido chiquímico e uma ou mais unidades do acetato ou derivados destes, poderá resultar na produção de antraquinonas, flavonóides

e dos taninos condensados (SANTOS, 2004). A Figura 1 resume as vias biossintéticas da glicose e seus produtos.

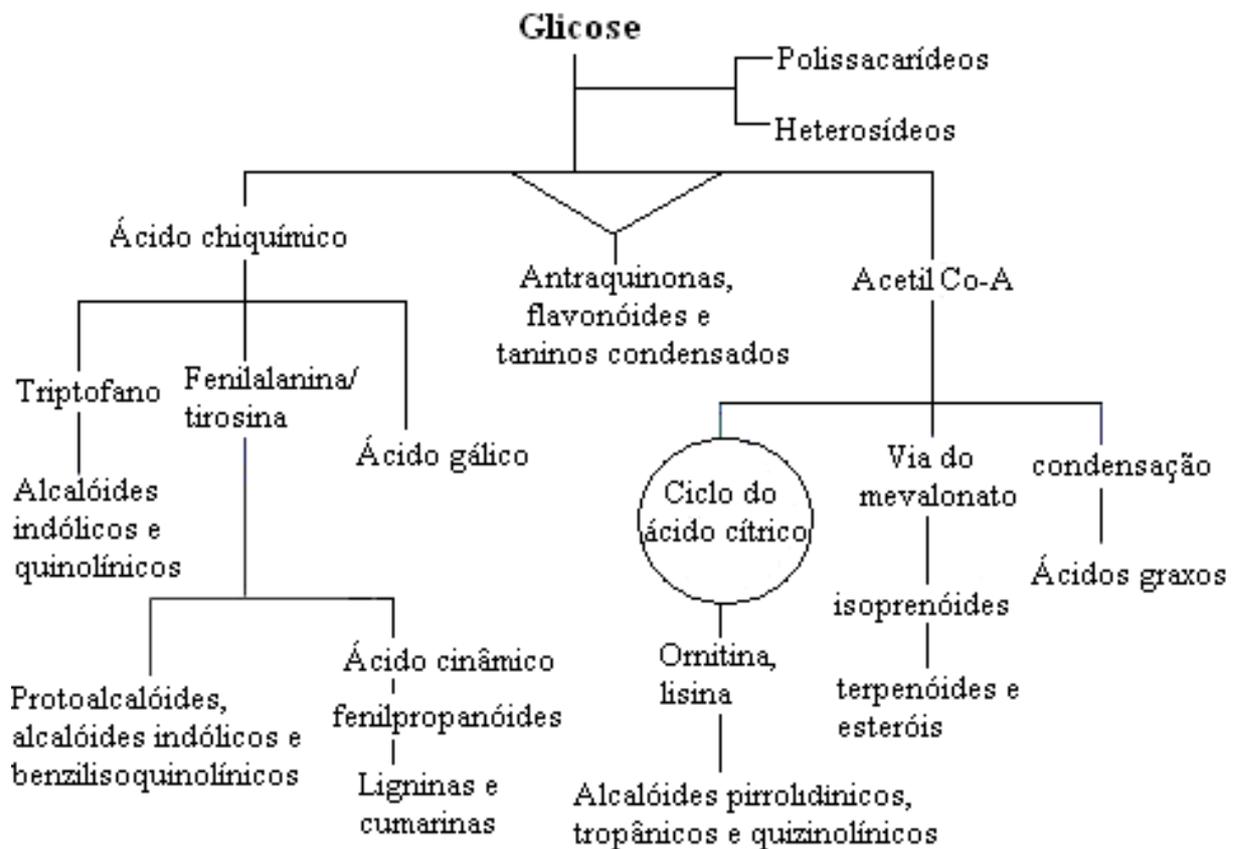


Figura 1 - Rotas do metabolismo vegetal e biossintéticas. Fonte: SIMÕES et al., 2004 (modificado).

### 1.1.1 Produtos da via do mevalonato

A via do mevalonato merece destaque neste estudo, devido aos seus produtos, os terpenóides e esteróis, que irão constituir as principais moléculas presentes na planta *Centella asiatica*. Os terpenos são originados da via do acetato-mevalonato a partir de uma unidade isopreno. A classificação dos terpenos é feita de acordo com a quantidade de unidades isopreno em hemiterpenóides, C5; monoterpenóides, C10; sesquiterpenóides, C15; diterpenóides, C20; triterpenóides, C30; e carotenóides, C40; dentre outros.

O mevalonato é resultante da condensação de uma unidade da acetoacetil-CoA com uma molécula da acetil-CoA. Após a condensação aldólica, ocorre uma hidrólise que origina a 3-hidróxi-3-metilglutaril-CoA, a qual é reduzida a mevalonato, numa reação irreversível. O mevalonato é então convertido a isopentenil-pirofosfato, ou *isopreno ativo*, uma unidade básica na formação dos terpenos e esteróides. A polimerização do mevalonato origina moléculas de cadeias carbonadas crescentes de cinco em cinco átomos de carbono. A molécula isopentenil-pirofosfato e seu isômero dimetilalil-pirofosfato formam *trans*-geranil-pirofosfato, a partir do qual são formados os demais terpenos (Figura 2) (SANTOS, 2004).

Os diversos terpenos apresentam funções variadas nos vegetais. Os monoterpenos e sesquiterpenos são constituintes dos óleos voláteis, sendo que os primeiros atuam na atração de polinizadores. Os sesquiterpenos, em geral, apresentam funções protetoras contra fungos e bactérias, enquanto muitos diterpenóides dão origem aos hormônios de crescimento vegetal. Os triterpenóides e seus derivados, os esteróides, apresentam função protetora contra herbívoros; alguns são antimitóticos e outros atuam na germinação das sementes e na inibição do crescimento da raiz (VICKERY e VICKERY, 1981; CASTRO et al., 2007).

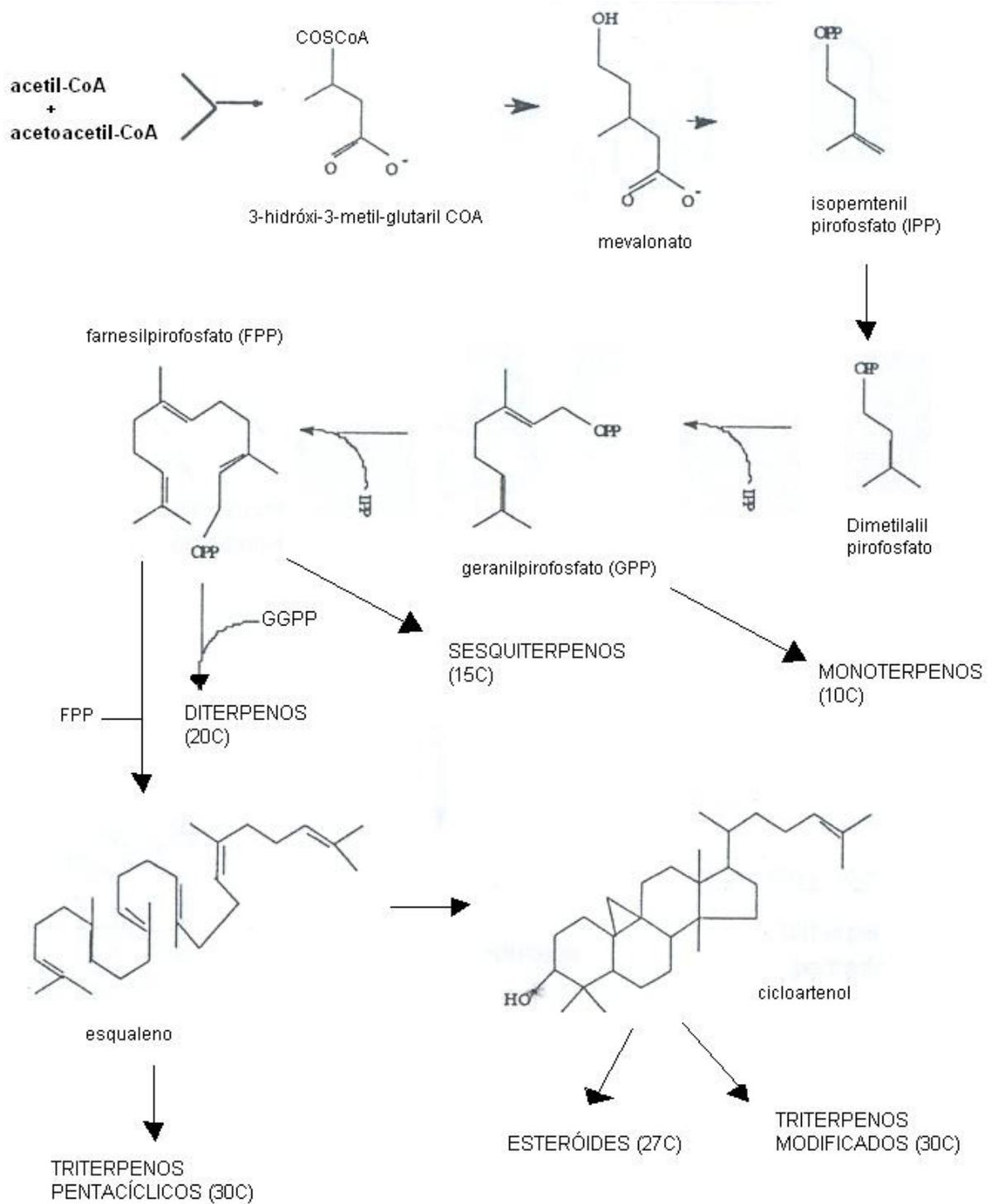


Figura 2 - Biosíntese de terpenos. Fonte: SANTOS, 2004 (modificado). IPP: isopentenil pirofosfato, FPP: farnesil pirofosfato, GPP: geranil pirofosfato.

### 1.1.2 Saponinas

Saponinas são glicosídeos de esteróides ou de terpenos policíclicos que possuem uma parte com característica lipofílica (triterpeno ou esteróide) e outra hidrofílica (açúcares). Esse tipo de estrutura determina a propriedade de redução da tensão superficial da água, sua ação detergente e emulsificante. Em solução aquosa, forma espuma persistente e abundante (SCHENKEL et al., 2004).

A detecção de saponinas em um vegetal é realizada de maneira bastante simples. Após agitação energética do extrato filtrado em tubo de ensaio, a formação de espuma, que não desaparece com a adição de um ácido mineral diluído, indica a presença de saponinas. O perfil cromatográfico das saponinas, estabelecido através de cromatografia de camada delgada (CCD) ou cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE ou *high performance liquid chromatography* - HPLC), também pode ser utilizado como um método de identificação de princípios ativos (biomarcadores) em extratos vegetais.

As saponinas (glicosídeos e, portanto, substâncias polares) são geralmente solúveis em água e pouco solúveis em solventes apolares. Os extratos aquosos, em geral, apresentam como vantagens: custo reduzido de obtenção e ausência de lípidos e de clorofila. No entanto, como desvantagens devem ser consideradas a possibilidade de hidrólise durante o processo extrativo ou de hidrotermólise, no caso de extração a quente, bem como a baixa estabilidade desses extratos. Por essas razões, geralmente são empregados álcoois (metanol ou etanol) ou misturas hidroalcoólicas para a extração, através de maceração, decocção, percolação ou extração exaustiva sob refluxo.

Freqüentemente, o extrato hidroalcoólico obtido é submetido à purificação, após eliminação do conteúdo alcoólico, através da partição com solvente pouco polar (diclorometano ou clorofórmio) para a retirada de compostos apolares, e em seguida da partição com *n*-butanol, para a eliminação de açúcares livres, aminoácidos e ácidos orgânicos, entre outras substâncias hidrofílicas que ficam na fase aquosa, obtendo-se uma fração purificada de saponinas na fase butanólica (SIMÕES et al., 2004). A

separação de substâncias através de polaridade, de acordo com o solvente, é utilizada para a obtenção de frações mais purificadas. Cada fração carrear­á um grupo de substâncias da planta com polaridade similar. Além destes, outros métodos de purificação incluem a complexação com colesterol, diálise, cromatografia de troca iônica ou extração seletiva, bem como outros métodos cromatográficos, utilizando resinas sintéticas, gel de sílica ou géis de exclusão molecular.

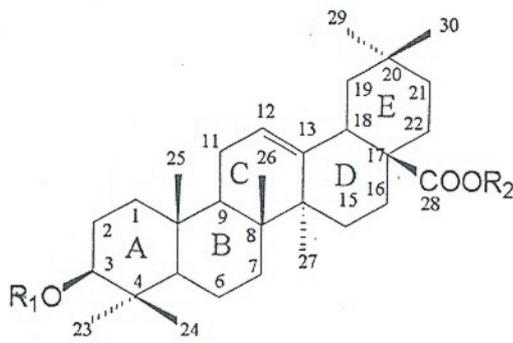
A classificação das saponinas é feita de acordo com o núcleo fundamental aglicona, sendo classificadas como saponinas esteroidais ou saponinas triterpênicas. As saponinas esteroidais são encontradas em maior quantidade nas monocotiledôneas e as triterpênicas, predominantemente, nas dicotiledôneas (SIMÕES et al., 2004).

As saponinas mais freqüentemente encontradas na natureza possuem 30 átomos de carbono e núcleo triterpênico. Este núcleo tem a mesma origem do esqueleto esteroidal até a formação do óxido de esqualeno. No entanto, este último ao se ciclizar e, de acordo com dois tipos diferentes de rearranjos, pode originar os triterpenos tetracíclicos e triterpenos pentacíclicos (ABE et al., 1993). Os principais núcleos de saponinas triterpênicas pentacíclicas estão ilustrados na Figura 3.

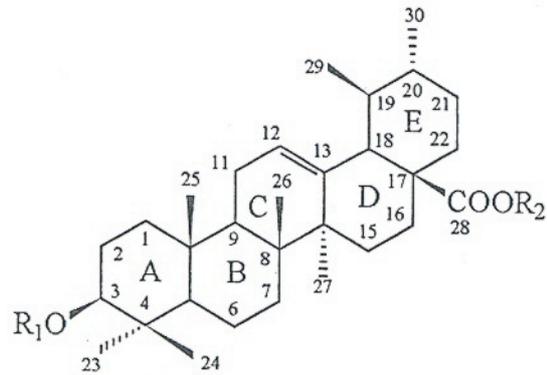
Dentre as saponinas utilizadas como substância isolada, destacam-se a glicirrizina e o seu derivado hemi-succinato sódico do ácido glicirrético, conhecido como carbenoxolona, além do asiaticosídeo, obtido de *Centella asiatica*. A Figura 4 mostra as estruturas moleculares de triterpenos presentes em *Centella asiatica*. Essas substâncias geralmente são isoladas pela utilização de colunas cromatográficas, podendo ser determinadas qualitativamente e quantitativamente por HPLC (GÜNTHER e WAGNER, 1996; BRINKHAUS et al., 2000).

O comportamento anfifílico das saponinas e a capacidade de formar complexos com esteróides, proteínas e fosfolípidos de membranas determinam um número variado de propriedades biológicas para essas substâncias, destacando-se a ação sobre as membranas celulares, que altera a sua permeabilidade ou causa a sua destruição (SIMÕES et al., 2004). Relacionadas com a ação sobre membranas, estão as atividades hemolítica, ictiotóxica e molusquicida freqüentemente observadas (JENTSCH et al., 1961). Para algumas saponinas também foi relatada ação espermicida, cujo mecanismo proposto é a ruptura da membrana plasmática do espermatozóide (SIMÕES et al., 2004).

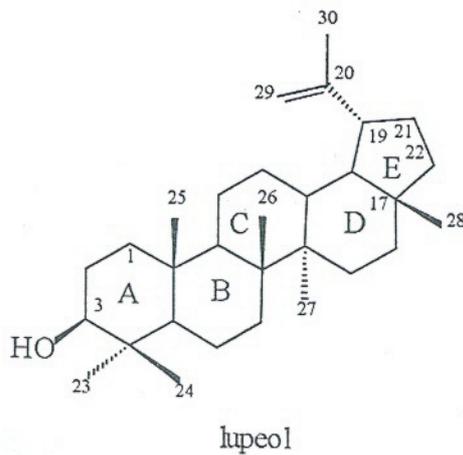
A atividade anti-helmíntica foi apontada para um número significativo de saponinas; no entanto, a irritação causada nas mucosas humanas tem impedido o desenvolvimento de aplicações práticas (JENTSCH et al., 1961).



Estrutura tipo  $\beta$ -amirina:  
ácido oleanólico  $R_1=R_2=H$



Estrutura tipo  $\alpha$ -amirina:  
ácido ursólico  $R_1=R_2=H$



lupeol

Figura 3 - Núcleos mais comuns das saponinas triterpênicas pentacíclicas. Fonte: SCHENKEL et al., 2004.

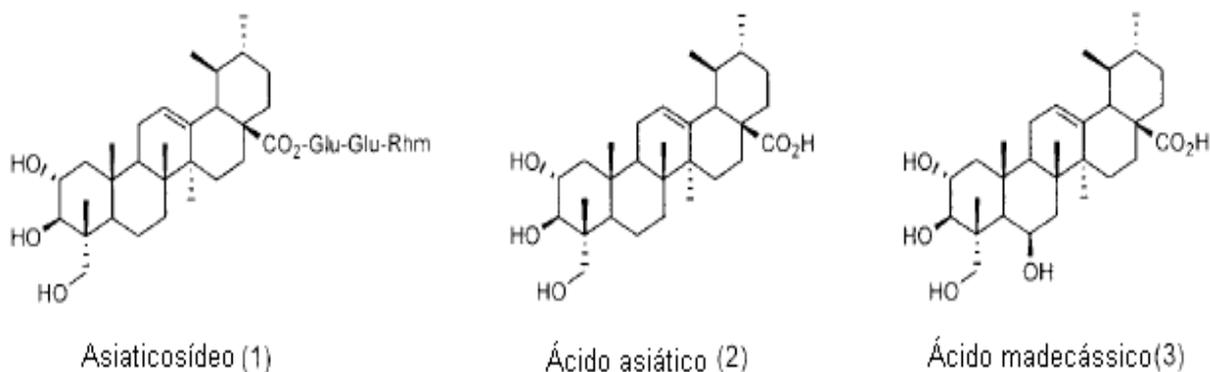


Figura 4 - Estruturas moleculares de componentes de *C. asiatica*. Glu = glicose; Rhm = ramnose. Fonte: JEW et al., 2000 (modificado).

Além das atividades supra-citadas, as saponinas têm demonstrado o potencial de reduzir os níveis séricos de colesterol através de reação de complexação; sendo o complexo colesterol-saponina excretado pelas fezes. A redução de triglicérides e colesterol foi observada no fígado de camundongos após dieta contendo saponinas de *Medicago sativa* L. (alfafa) (RESHEF et al., 1976). Extratos de *Panax ginseng* C.A. Mey. (ginseng) administrados a coelhos, reduziram os níveis séricos de colesterol e de triglicérides destes animais (MOON et al., 1984).

A atividade antiinflamatória dessa classe de substâncias é conhecida há longo tempo para as saponinas de diversas plantas, dentre elas *Glycyrrhiza glabra* L. (alcaçuz, cuja saponina principal é a glicirrizina), *Hydrocotyle vulgaris* L., *Panax ginseng* C.A. Mey. e *Tetrapanax papyrifera* (Hook.) K. Koch. Outras atividades biológicas das saponinas, como a antiviral, têm sido investigadas intensamente nas últimas décadas (SCHENKEL et al., 2004).

## 1.2 Biodiversidade e identificação botânica

O número de espécies de seres vivos no globo é estimado em cerca de 1,5 milhões (STACE, 1985). Estimativas atuais no reino Plantae (PRANCE et al., 2000)

sugerem que apenas as Magnoliophytas (angiospermas) estão representadas por um número entre 300 – 320 mil espécies. O Brasil é o país com maior diversidade genética do mundo, contando com mais de 55 mil espécies catalogadas (DIAS, 1996) de um total estimado entre 350 - 500 mil, sendo que mais da metade dessas espécies encontram-se nas florestas tropicais, cuja área corresponde a 7% da superfície da terra (SOEJARTO, 1996).

Quando se trabalha com plantas, a identificação da espécie e sua perpetuação como testemunho são os passos mais importantes para que qualquer investigação possa ser reproduzida. Estudos que envolvam plantas medicinais quer sejam nas áreas de etnobotânica, etnofarmacologia, farmacologia, farmacognosia, fitoquímica, agronomia ou biotecnologia, para que mereçam confiabilidade, devem partir da certeza de que as espécies envolvidas estejam corretamente identificadas e depositadas em herbários de instituições fidedignas. Para tanto, alguns procedimentos devem ser seguidos, tais como, coleta, herborização e registro (MENTZ e BORDIGNON, 2004).

### **1.2.1 Taxonomia**

O conceito de espécies difere grandemente entre os taxonomistas (RAVEN et al., 1996; JUDD et al., 1999). Denominam-se espécies os grupos de populações que têm semelhanças relativamente grandes entre si, diferindo de outros grupos de populações menos semelhantes. Aspectos genéticos e moleculares começam a ganhar importância e poderão, no futuro, ser decisivos na classificação de uma espécie (SANTOS, 2002).

Sinônimos, isto é, um ou mais nomes atribuídos à mesma espécie, são nomes que foram dados por pesquisadores para designar espécies consideradas por eles como novas. A origem do grande número de sinônimos encontrados na literatura decorre da dificuldade de comunicação entre os diferentes estudiosos desde a era Lineana até o início do século XX. Já no século XXI, especialistas em determinadas famílias conseguiram sinonimizar um número muito elevado de nomes (SIMÕES et al., 2004). Monografias de famílias, tribos, gêneros ou seções são, via de regra, a fonte mais

confiável para obtenção de uma listagem de sinônimos. Além das monografias, podem ser consultadas floras de regiões, estados ou países. Atualmente, meios eletrônicos para a obtenção de informações sobre a validade de nomes específicos estão disponíveis, como por exemplo, o *The International Plant Name Index*, mantido por três instituições: *The Royal Botanic Gardens (Kew)*, *The Harvard University Herbaria* e *Australian National Herbarium* ([www.ipni.org](http://www.ipni.org)), além do *w3Tropicos*, organizado pelo *Missouri Botanical Garden* ([www.mobot.org](http://www.mobot.org)), ambos atualizados periodicamente.

### **1.3 Caracterização botânica, química e farmacológica de *Centella asiatica***

A família Apiaceae, sinonímia de Umbelliferae, caracteriza-se por apresentar indivíduos como ervas, muito raramente arbustos ou árvores, geralmente aromáticas, com folhas alternas simples ou compostas; inflorescências do tipo umbela, mais freqüentemente composta; flores vistosas, bissexuadas ou raramente unissexuadas, actinomorfas, diclamídeas ou raramente monoclamídeas; cálice geralmente pouco desenvolvido e pentâmero, dialissépalo; corola em geral pentâmera, dialipétala de forma secundária, já que nos estágios embrionários é gamopétala; prefloração valvar; estames pentâmeros; ovário ínfero. Esta família possui distribuição cosmopolita, incluindo aproximadamente 400 gêneros e 4000 espécies, representando uma das maiores famílias de Angiospermas. No Brasil, ocorrem 8 gêneros e cerca de 100 espécies, sendo cultivadas como condimentares e alimentícias, como é o caso da cenoura (*Daucus carota* L.), o aipo (*Anethum graveolens* L.), o funcho (*Foeniculum vulgare* Mill.), a erva doce (*Pimpinella anisum* L.) e a salsa (*Petroselinum crispum* Mill. Nylman ex A. W. Hill) (SOUZA e LORENZI, 2005).

O gênero *Centella* pertencente a essa família, caracteriza-se por plantas de porte herbáceo com folhas reniformes (FARMACOPÉIA PORTUGUESA, 1997) que crescem em lugares úmidos e sombreados (TESKE e TRENTINI, 1995; MATSUDA et al., 2001), formando sobre o solo um tapete semelhante a um gramado (LORENZI e MATOS, 2002). *Centella* é, então, classificada como erva perene, rasteira, acaule, estolonífera,

rizomatoso, com estolões de até 30 cm de comprimento, possui folhas simples, longo-pecioladas, surgidas diretamente dos nós dos rizomas. As flores são pequenas, de cor esbranquiçada, reunidas em pequenas umbelas curto-pedunculadas que surgem na base da folha. Sua multiplicação se dá principalmente por rizomas e estolões (LORENZI e MATOS, 2002).

Embora originária da Ásia tropical, *Centella asiatica* (Figura 5) é um membro cosmopolita com predominância no hemisfério sul. No Brasil, ocorre como planta daninha bastante freqüente ao longo da costa leste da região sul e, em menor densidade, na região leste e parte centro-oeste. Infesta pastagens e jardins, sendo esporadicamente utilizada para fins de jardinagem (CONSOLARO, 1996). É conhecida popularmente como centela-asiática, cairuçu-asiático, centelha, codagem, pata-de-burro, pata-de-cavalo e pata-de-mula.

*C. asiatica* contém glicosídeos triterpênicos como a saponina-centella, asiaticosídeo, madecassosídeo, cefoleosídeo (KARTNIG e HOFFMANN-BOHM 1992; BRINKHAUS et al., 2000; MATSUDA et al., 2001). Alguns dos triterpenos e flavonóides de *C. asiatica* têm demonstrado potencial anti-tumoral (QIAN et al., 1982; BABU et al., 1995), enquanto outros derivados do asiaticosídeo (INHEE et al., 1999) e do ácido asiático (SANG-SUP et al., 2000) demonstraram efeito neuroprotetor contra a toxicidade induzida por beta-amilóide, um peptídeo associado com a doença de *Alzheimer*. O asiaticosídeo, glicosídeo triterpênico mais abundante nos extratos de *C. asiatica*, é convertido hidroliticamente *in vivo* em ácido asiático. As estruturas moleculares do asiaticosídeo e dos ácidos asiático e madecássico são mostradas na Figura 4.



Figura 5 - Características morfológicas da *C. asiatica*. Autor: Frederico Pittella Silva, 2008.

## **1.4 Potenciais biológicos**

### **1.4.1 Espécies reativas de oxigênio (EROs)**

O oxigênio ( $O_2$ ) é uma molécula altamente reativa e pode ser parcialmente reduzido para formar um número de agentes quimicamente reativos. O processo de transferência de elétrons ou a absorção de energia pode levar o oxigênio a gerar as espécies reativas de oxigênio (EROs), também conhecidas como radicais livres (OGA, 2003). As EROs são moléculas com um elétron desemparelhado no último orbital, ou seja, moléculas que têm um orbital atômico ou molecular ocupado por um único elétron, tornando-as muito instáveis, extraordinariamente reativas e com uma enorme capacidade para combinar-se com diversas moléculas integrantes da estrutura celular. ERO é um termo frequentemente usado para incluir também espécies que não são radicais livres,

mas algumas moléculas derivadas do  $O_2$ , capazes de gerar radical livre, como por exemplo, o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2000). O  $O_2$  envolvido no processo respiratório, sob certas condições, pode ser transformado no organismo em ânion superóxido, radical hidroxil, oxigênio *singlet* e peróxido de hidrogênio. Todas essas variações estão, muitas vezes, associadas a processos fisiológicos, como por exemplo a resposta imune, e principalmente a circunstâncias patológicas, incluindo reações inflamatórias.

Estas espécies reativas de oxigênio são altamente prejudiciais para os constituintes celulares, incluindo o DNA, os lípidos, ácidos graxos e as proteínas (STORZ et al., 1987). Diversas classes de moléculas são susceptíveis ao ataque de  $O_2$  e acabam formando hidroperóxidos. Tais hidroperóxidos contribuem para a disfunção de células e membranas celulares (LARSON, 1988).

As EROs podem aumentar a produção de outras espécies reativas, particularmente através de processos endógenos que acontecem em consequência do metabolismo normal. Também podem ser formadas pela exposição de células à radiação ionizante, pelas reações de oxi-redução ambientais ou pela exposição a metais pesados (BRENNAN e SCHIEST, 1996).

Dadas as características danosas das EROs, a maioria dos organismos têm desenvolvido meios para proteção dos seus constituintes celulares contra os oxidantes reativos (GASPARRI, 2005). Entretanto, existem condições onde há intensa produção e intensificação de ações das EROs, nas quais os mecanismos de proteção celular natural tornam-se ineficazes, o que possibilita o desenvolvimento de patologias. A busca por novas moléculas com capacidade antioxidante torna-se importante, então, para o combate a doenças onde as EROs passam a danificar e debilitar um organismo.

#### **1.4.2 Fosfolípidos e transdução de sinais**

Os fosfolípidos são os principais componentes da membrana celular. É na bicamada lipídica da membrana que se inserem proteínas como receptores e canais

iônicos, envolvidos na neurotransmissão, na transdução de sinais e na propagação dos potenciais de ação e condução do impulso nervoso (STRYER, 1988).

A bicamada de fosfolípidos que compõe a membrana neuronal determina as propriedades físico-químicas das membranas. Os fosfolípidos (fosfatidiletanolamina, fosfatidilcolina e fosfatidilserina, entre outros), além de serem os principais componentes da membrana neuronal, servem também como substratos para a síntese de mediadores intra e extracelulares, o que aumenta sua relevância para a neurotransmissão (SIEGEL et al., 1999). O crescimento de axônios e neuritos, a formação de novas conexões sinápticas e a eliminação das antigas conexões envolvem a síntese e a quebra de fosfolípidos.

Além dessas funções, vale lembrar que os neurotransmissores e o cálcio são contidos em vesículas fosfolipídicas e, ainda, que a liberação e recaptura dessas substâncias dependem da natureza das moléculas de fosfolípidos (HORROBIN et al., 1995).

Muitos dos sistemas de sinalização intracelular são regulados por produtos lipídicos, derivados de fosfolípidos de membranas neuronais. Por exemplo, o diacilglicerol é liberado pela clivagem do fosfatidilinositol pela fosfolipase C (PLC) e os ácidos graxos são liberados pela ação da fosfolipase A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>). A hidrólise de fosfolípidos que ocorre durante a transdução de sinais é necessária para a eficiente regulação das funções celulares. Em contrapartida, a clivagem anormal das membranas celulares, particularmente das membranas plasmáticas, rompe a homeostase celular e compromete a viabilidade celular. Exceto em casos de danos traumáticos e de danos induzidos por peroxidação lipídica, a quebra de fosfolípidos de membrana é usualmente iniciada por meio de hidrólises enzimáticas. A quebra maciça de fosfolípidos irá não só causar a formação de segundos mensageiros, mas também ocasionará mudanças da permeabilidade celular das membranas (O'REGAN et al., 1996).

Os fosfolípidos mais encontrados nos tecidos cerebrais são ricos em ácidos graxos polinsaturados contendo de três a seis ligações covalentes e duplas. Esses fosfolípidos permitem rápidas mudanças no formato da membrana e, assim, permitem a fusão de membranas, como ocorre durante a formação e degradação de conexões sinápticas e na liberação de neurotransmissores. É essa rica estrutura de ácidos graxos

polinsaturados que confere às membranas neuronais suas propriedades específicas em relação à sinalização celular e à modulação funcional de proteínas ligadas ou associadas à membrana.

#### **1.4.2.1 Síntese e metabolismo de fosfolípidos**

A síntese dos fosfolípidos ocorre em duas etapas fundamentais. Primeiro, os fosfolípidos são sintetizados por enzimas relativamente inespecíficas, no que se refere aos ácidos graxos que são ligados às posições *sn-1* e *sn-2*. Os ácidos graxos saturados e monoinsaturados são preferencialmente ligados à posição *sn-1*, enquanto os ácidos graxos essenciais, à posição *sn-2*. Concluída a síntese da estrutura básica dos fosfolípidos, a modelagem final da molécula, especialmente na posição *sn-2*, é feita por uma série de enzimas remodeladoras específicas, as quais controlam com precisão a composição final do fosfolípido (HORROBIN et al, 1995). Esses sistemas de remodelagem são particularmente importantes ao cérebro, onde alterações nas estruturas finais dos fosfolípidos podem determinar, em escala final, desordens neuropsiquiátricas. Um dos principais componentes desse sistema de remodelagem são as fosfolipases.

A estrutura final de cada molécula de fosfolípido depende não apenas de fatores genéticos, mas também de fatores ambientais. Embora as enzimas e as proteínas que regulam o metabolismo de fosfolípidos sejam geneticamente determinadas, elas dependem dos ácidos graxos essenciais providos pela alimentação. Portanto, uma vez que, os fosfolípidos sejam componentes estruturais de todas as membranas neuronais, e que desenvolvam papel-chave no processo de transdução de sinais, anormalidades no metabolismo destes podem contribuir para a fisiopatologia de transtornos psiquiátricos (HORROBIN et al, 1995).

### 1.4.2.2 Fosfolipase A<sub>2</sub>

Várias classes de receptores neuronais acoplados a proteínas G desencadeiam cascatas de sinalização intracelular por meio da ativação da PLA<sub>2</sub>. Os receptores envolvidos pertencem às famílias dos dopaminérgicos - D<sub>2</sub> (VIAL e PIONELLI, 1995), serotoninérgicos - 5-HT<sub>2</sub>, muscarínicos - M<sub>1</sub> (JONES et al, 1996) e glutamatérgicos (FAROOQUI e HORROCKS, 1994).

As PLA<sub>2</sub>s atuam removendo especificamente ácidos graxos essenciais da posição *sn-2* dos fosfolípidos, liberando resíduos sem o grupo acil ligado à posição *sn-2*, denominados lisofosfolípidos. Esse processo proporciona uma oportunidade para a célula alocar na posição *sn-2* vaga um ácido graxo mais apropriado para uma determinada função (BAZAN et al., 1993).

Ambos, ácidos graxos essenciais e lisofosfolípidos são moléculas altamente ativas na sinalização celular. Em condições normais, as enzimas da família da PLA<sub>2</sub> são envolvidas na manutenção da função celular normal, pelo fornecimento de ácido araquidônico (AA), o qual pode ser convertido em uma série de moléculas sinalizadoras, conhecidas por eicosanóides, incluindo as prostaglandinas, leucotrienos e hidroxiácidos, que atuam como segundos mensageiros.

### 1.4.2.3 Subtipos de PLA<sub>2</sub>

Existem vários subtipos de enzimas na família da PLA<sub>2</sub>, sendo estas subdivididas em cálcio-independente e cálcio-dependente. Seus genes estão distribuídos por todo o genoma, os quais variam de acordo com a função, localização, regulação, mecanismos de ação, estrutura primária e requerimento de íons cálcio. Acredita-se que vários subtipos de PLA<sub>2</sub> não funcionam alternadamente, mas que atuam preferencialmente em paralelo, na transdução de sinais. Contudo, a possível associação de um ou mais subtipos de

PLA<sub>2</sub> a vários receptores, por meio de diferentes mecanismos de ligação, torna difícil a total compreensão de suas funções (FAROOQUI et al., 1997).

As PLA<sub>2</sub> que são secretadas (sPLA<sub>2</sub>), como as encontradas em fluídos pancreáticos e inflamatórios, possuem pequena massa molecular (12-18 kDa) e requerem concentrações milimolares de íons cálcio. As sPLA<sub>2</sub> não demonstram preferência por ácido araquidônico frente a outros ácidos graxos localizados na posição *sn*-2 e contêm ligações dissulfídicas e um resíduo de histidina, que são essenciais para atividade enzimática (FAROOQUI et al., 2006).

As PLA<sub>2</sub> intracelulares possuem massa molecular mais elevada (39-110 kDa), são geralmente localizadas no citosol (cPLA<sub>2</sub>), e são resistentes à inativação por agentes redutores. As fosfolipases intracelulares cálcio-dependentes requerem a presença do íon em concentrações micromolares (0,1 a 10 $\mu$ M) e demonstram preferência por AA, ao contrário das PLA<sub>2</sub> cálcio-independentes (iPLA<sub>2</sub>) que não apresentam essa seletividade pelo AA. Fosfolipases cálcio-dependentes e cálcio-independentes estão envolvidas na transdução de sinais celulares que afetam as propriedades físico-químicas das membranas sinápticas (FAROOQUI et al., 1992); também estão envolvidas na modulação da síntese e liberação de dopamina, e na sensibilidade de receptores dopaminérgicos (OLIVEIRA et al., 1984).

A iPLA<sub>2</sub> não requer cálcio para a catálise propriamente dita embora concentrações submicromolares de cálcio sejam requeridas para ligações às membranas e às vesículas fosfolipídicas. Várias evidências sugerem que a enzima é completamente funcional para monômeros fosfolípidos na ausência de cálcio (NALEFSKI et al., 1994), enquanto o cálcio é necessário para hidrólise de fosfolípidos em vesículas ou em membranas (SHARP et al., 1991). Além disso, a iPLA<sub>2</sub> exibe atividade catalítica cálcio-independente para vesículas fosfolipídicas em concentrações molares de sais, que promovem as interações hidrofóbicas entre enzimas e fosfolípidos (REYNOLDS et al., 1993).

A iPLA<sub>2</sub> foi primeiramente isolada e caracterizada de macrófagos P388D1 (ACKERMANN et al., 1994), em virtude de os macrófagos possuírem elevada capacidade para incorporar AA dentro dos fosfolípidos de membrana. Durante o remodelamento da membrana, a incorporação de AA nos fosfolípidos, em condições normais, é

extremamente dependente da PLA<sub>2</sub>. Esse processo ocorre de modo cálcio independente (BALSINDE et al., 1994), sugerindo um envolvimento da iPLA<sub>2</sub>. Essa enzima parece regular também a principal via pela qual as células incorporam AA e outros ácidos graxos dentro dos fosfolípidos da membrana. A taxa de incorporação de AA dentro dos fosfolípidos também determina a quantidade de ácidos graxos disponíveis. Isso é relevante, visto que a disponibilidade de AA livre é um fator limitante para a biossíntese de eicosanóides.

### 1.4.3 Leishmanioses

As leishmanioses são doenças endêmicas causadas por protozoários do gênero *Leishmania* que ocorrem em várias partes do mundo sendo responsáveis por elevados índices de morbidade e mortalidade. Essa zoonose compreende formas clínicas variadas e pode, classicamente, ser dividida em dois grupos principais: Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) e Leishmaniose Visceral (LV). As manifestações clínicas são resultantes de complexas interações entre o parasito e a resposta imune do indivíduo infectado (GREVELINK e LERNER, 1996; HERWALDT, 1999).

O tratamento das leishmanioses é feito à base de antimoniais pentavalentes (Sb<sup>+5</sup>), anfotericina B e pentamidinas (isotionato e mesilato); quimioterápicos de elevado custo, usados por via parenteral e por prolongado período de tempo, causando efeitos adversos, tais como: alterações cardíacas, renais, pancreáticas e hepáticas (CROFT e YARDLEY, 2002). Embora, desde a descoberta dos Sb<sup>+5</sup>, pouco tem sido feito para a descoberta de novos tipos estruturais para o tratamento dessa patologia. Por esta razão, as dificuldades em relação à terapêutica atual têm conduzido a novos estudos com o objetivo de avaliar terapias alternativas, como a fitoterapia (PHILLIPSON e WRIGHT, 1991a,b).

O uso de plantas no tratamento da Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) é uma prática antiga entre as populações das áreas endêmicas (FOURNET et al., 1992; MOREIRA et al., 2002). Geralmente, as preparações vegetais são utilizadas por via oral

ou tópica sobre as lesões cutâneas (NETTO et al., 1985; IWU et al., 1994; AKENDENGUE et al., 1999). Porém, esses tratamentos são empíricos e pouco se sabe sobre sua real eficácia, uma vez que na LTA pode ocorrer a cura espontânea das lesões (MARSDEN et al., 1984; COSTA et al., 1990; ROSSEL et al., 1992; MARSDEN, 1994).

#### **1.4.4 Atividade antimicrobiana**

Os agentes infecciosos pertencem a sete grandes grupos: vírus, bactérias, fungos, protozoários, algas, helmintos, e agora, os príons. As infecções por vírus e helmintos são combatidas por fármacos chamados quimioterápicos. Os agentes sobre os quais atuam os antibióticos são as bactérias, as algas, os protozoários e os fungos (GAON et al., 1980).

Os antimicrobianos ou antibióticos são fármacos utilizados terapêuticamente com o intuito de provocar a morte ou inibir o crescimento de determinado agente microbiano. Eles podem ser originados de substâncias produzidas pelos próprios microorganismos, oriundas de vegetais ou mesmo sintéticas (ALTERTHUM e TRABULSI, 2003).

A classificação dos antibióticos pode ser realizada segundo diversos critérios: de acordo com sua estrutura química; segundo os tipos de germes sobre os quais atuam; e de acordo com o efeito provocado no microorganismo (TAVARES, 2006). O agrupamento dos antibióticos de acordo com a constituição química tem importância pelo fato de as substâncias do mesmo grupo apresentarem, em geral, mecanismos de ação semelhante e partilharem, total ou parcialmente, os microorganismos sobre os quais atuam (espectro de ação).

A ação dos antibióticos e dos quimioterápicos sobre os agentes microbianos provoca dois tipos de efeitos, se o microorganismo for sensível ao fármaco: a morte da bactéria (efeito bactericida – ou fungicida, no caso de fungos) ou a interrupção de seu crescimento e reprodução (efeito bacteriostático – ou fungistático, no caso de fungos). Estes efeitos são determinados por mecanismos de ação primários ou secundários dos fármacos sobre o agente microbiano e são variáveis com a concentração do antibiótico

no meio em que se encontra o microorganismo e a sensibilidade do mesmo (ALTERTHUM, 2004).

A tolerância é o fato de algumas bactérias mostrarem-se sensíveis às concentrações inibitórias mínimas de determinados antibióticos, isto é, sofrerem bacteriostase, mas não sofrerem a ação das concentrações mínimas habituais destes mesmos fármacos. Geralmente, a concentração necessária para a morte do microorganismo é igual ou duas vezes maior que a concentração inibitória mínima (ou MIC – *Minimum Inhibitory Concentration*) (CARVALHO, 1973). Diz-se que uma bactéria é resistente a um determinado antibiótico quando o microorganismo é capaz de crescer *in vitro* em presença da concentração inibitória mínima deste fármaco. A resistência pode ser natural, onde os genes da bactéria codificam enzimas que inativam o mecanismo de ação do fármaco; ou adquirida, quando a bactéria torna-se resistente a um fármaco sensível, através da aquisição de fatores genéticos ou mutação em seus genes de defesa (TAVARES, 2006).

Entretanto, a resistência aos fármacos que certos microorganismos têm adquirido, tem aumentado o esforço na busca por novas moléculas com atividade antimicrobiana. Muitas destas novas moléculas originárias de extratos vegetais têm sido purificadas, o que reforça a importância deste recurso natural (MITSCHER et al., 1987).

#### **1.4.5 Apoptose e câncer**

Apoptose é um processo de morte celular altamente organizado, caracterizado pela perda funcional da assimetria dos fosfolípidos da membrana plasmática, quebra enzimática do ácido desoxi-ribonucléico (DNA) e segmentação das células em corpos apoptóticos ligados à membrana (KIDD, 1998). Esse processo tem um importante papel na manutenção da homeostase tecidual pela eliminação seletiva do excesso de células (NAYFIELD et al., 1991).

A indução da apoptose pode ocorrer por uma variedade de estímulos, como inanição, DNA danificado, ocorrência de infecção viral, presença de linfócitos citotóxicos,

uso de fármacos anti-câncer, exposição excessiva a raios ultra-violeta, atuação intensa de algumas citocinas e ligações de indutores químicos a determinados receptores de morte presentes na superfície celular. Mudanças genéticas, que podem resultar na perda da apoptose ou no desarranjo das vias de sinalização da apoptose, são componentes críticos da carcinogênese (KASTAN et al., 1995). Além disso, a indução de apoptose em células cancerígenas é reconhecida como uma ferramenta valiosa para o tratamento do câncer (KORNBLAU, 1998).

Como o processo apoptótico possui um importante significado biológico, disfunções nos mecanismos de controle do sistema (apoptose deficiente ou excessiva) resultam numa variedade de condições patológicas, tais como imunodeficiência, doença auto-imune, doenças degenerativas (doença de *Alzheimer*, doença de *Parkinson*), câncer e infecções virais (FISHER et al., 2007; HAUSENLOY e SCORRANO, 2007).

O processo de execução de células por apoptose é mediado pela caspase-3, uma das famílias de proteases cisteínicas (POLVERINO e PATTERSON, 1998). Já a ativação da caspase-2 é fortemente regulada pela formação do apoptosoma (BRATTON et al., 2001), o qual é dependente da liberação do citocromo-c das mitocôndrias para o citosol, que acredita-se ser regulado pela Bax e Bcl-2. A enzima pró-apoptótica Bax, forma poros na membrana externa da mitocôndria, liberando o citocromo-c; enquanto a enzima anti-apoptótica Bcl-2 previne a abertura dos poros de transição da mitocôndria por se ligar à Bax (ANTONSSON et al., 1997). A presença excessiva de espécies reativas de oxigênio (EROs) tem sido sugerida como um sinal para a ativação da caspase-3 (JACOBSON e RAFF, 1995).

### 1.4.6 Cicatrização

A cicatrização de uma ferida é um processo complexo e dinâmico, desencadeado em resposta às lesões teciduais, na tentativa do organismo de restaurar a integridade anatômica e funcional do tecido lesionado. Para que um ferimento seja curado com êxito, os eventos devem se suceder numa seqüência apropriada, e o resultado final, geralmente uma cicatriz de tecido conjuntivo, representa o somatório deste processo.

O processo de reparação tecidual não é um simples processo linear, no qual fatores de crescimento disparam a proliferação celular, e sim uma integração de processos interativos dinâmicos, que envolve mediadores solúveis, elementos figurados do sangue, produção de matriz extracelular e células parenquimatosas (CARVALHO, 2002). A cicatrização, segundo Clark (1993), é um processo biológico complexo que inclui inflamação, migração celular, angiogênese, síntese de matriz extracelular, depósito de colágeno, e re-epitelização. As tentativas de restaurar a lesão induzida por uma agressão local começam muito cedo no processo da inflamação e, no final, resultam em reparo e substituição das células mortas ou danificadas, por células saudáveis.

Existem três componentes principais no processo inflamatório: proteínas plasmáticas, que extravasam para o espaço perivascular no local da inflamação, o que justifica a tumefação; células fixas, como os mastócitos, fibroblastos, leucócitos e plaquetas que chegam ao local da inflamação através da corrente sangüínea, e mediadores da reação inflamatória, que consistem de proteínas, lípidos, ácidos e aminas vasoativas (ROBBINS et al., 1996).

Aproximadamente quatro dias após a instalação da lesão, o tecido de granulação começa a ser formado e nesta etapa os novos fibroblastos acumulados misturam-se a neoformações de capilares, dando início ao tecido de granulação (GUIDUGLI-NETO, 1987). Fatores quimiotáticos, como fragmentos de colágenos, elastina e fibronectina, trombina enzimaticamente ativa e fator beta de crescimento transformante (TGF- $\beta$ ), continuam estimulando o acúmulo de monócitos, e a infiltração de outras células na ferida, como os neutrófilos. Estes são fagocitados por macrófagos que ainda removem o tecido lesionado e bactérias patogênicas. Os principais fatores de crescimento

responsáveis pela migração e coordenação dos fibroblastos e macrófagos para a cicatriz são os fatores de crescimento epidermal (EGF), o TGF- $\beta$  e o fator de crescimento derivado das plaquetas (PDGF) (HUYBRECHTS-GODIN et al., 1979).

Na fase fibroblástica, com a ativação de macrófagos na ferida e com a elaboração de fatores de crescimento específicos, a matriz extracelular começa a ser substituída por um tecido conjuntivo mais forte e mais elástico. O principal componente de uma cicatriz de tecido conjuntivo maduro é o colágeno. O colágeno é a proteína mais comumente encontrada em animais e sua produção envolve diversos eventos pós-translacionais. Cada molécula de colágeno compõe-se de três cadeias polipeptídicas enroladas umas as outras, em forma de hélice. Os muitos tipos de colágenos encontrados nos tecidos são explicados pela composição bioquímica das cadeias individuais e a combinação dessas cadeias entre si. Entretanto, cada molécula de colágeno é similar, visto que as cadeias peptídicas possuem o aminoácido glicina em cada terceira posição, com prolina e lisina freqüentemente nas outras posições (CARVALHO, 2002). Assim, em uma ferida em processo de cura, fibroblastos produtores de colágeno são recrutados das margens da ferida e induzidos a sintetizar o colágeno, num processo coletivo conhecido como fibroplasia. A fibroplasia tem início pela formação de tecido de granulação no espaço do ferimento. Esse tecido consiste de uma matriz frouxa de colágeno, fibronectina e ácido hialurônico, contendo macrófagos, fibroblastos e vasos recém-formados e exsudativos (RYAN e MAJNO, 1977). A contração da ferida faz com que suas margens se aproximem mais e, se o tecido original estava revestido por uma superfície epitelial, ocorrerá a re-epitelização.

A maturação e a remodelagem é a fase final da cura da ferida. É durante essa fase que a cicatriz da ferida adquire sua máxima resistência. A resistência de uma cicatriz fibrosa pode ser atribuída à deposição de colágeno e remodelagem das fibrilas de colágeno, de modo que sejam formados feixes maiores dessa proteína, com maior número de ligações covalentes transversais entre as fibrilas (RINGLER, 1997). Gradativamente, os feixes de fibras colágenas tornam-se mais espessos, resultando em uma configuração mais regular, que está diretamente relacionada às forças mecânicas, a qual o tecido está sujeito durante a atividade normal (CLARK, 1985). A cicatriz passa a apresentar a forma de uma massa fibrosa acrescida de fibras colágenas. Observa-se

apoptose dos fibroblastos e das células endoteliais, e os eosinófilos aparecem nas últimas fases de reparação. Com a restauração da circulação sanguínea e o aumento dos níveis de oxigênio na área afetada, ocorre a facilitação da síntese do colágeno e da proliferação celular, havendo a inibição da angiogênese e da migração celular (TODD et al., 1991).

O processo de cicatrização é caracterizado pelo preenchimento de determinado espaço e selado pela cicatriz. Entretanto, esse processo pode ser atrapalhado ou desmanchado por diversos distúrbios como diabetes, imunocomprometimento, isquemia, necrose tecidual e etc, que conseqüentemente resultam em ferida crônica ou outras complicações problemáticas (MARTIN, 1997). O quadro pode também ser alterado pela presença de bactérias, tipo de ferida (aberta/fechada), grau de suprimento sanguíneo, tipo de tecido lesado, dentre outros (MAJNO e JORIS, 1996).

As falhas de cicatrização mais importantes são as que ocorrem nos estágios iniciais do reparo, levando à acentuação do edema, reduzida proliferação vascular e diminuição dos elementos celulares, tais como leucócitos, macrófagos e fibroblastos. As alterações desses eventos são responsáveis por uma baixa síntese de colágeno, além de contribuírem para aumentar os riscos de infecções em pacientes já comprometidos.

Na tentativa de apresentar os processos de cura e reparo como fases específicas compostas de mecanismos precisos, ocorre uma superposição significativa entre as fases de reparo. Ocorre também uma variação significativa na natureza, composição e duração das fases em diferentes feridas, dependendo do local onde se encontra o tecido, o grau de contaminação e infecção bacteriana, irrigação sanguínea e extensão da lesão no tecido. Desta forma, a cura da ferida pode ser definida como uma complicada interação de células, fatores de crescimento, componentes da matriz extracelular e oxigênio, existindo entre esses componentes, relações dinâmicas e freqüentemente recíprocas (CARVALHO, 2002).

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Geral

Realizar a caracterização fitoquímica e verificar as propriedades farmacológicas dos extratos aquoso (EA) e bruto metanólico (EBM) de *Centella asiatica* (L.) Urban.

### 2.2 Específicos

- 1 - Identificar citogeneticamente a espécie.
- 2 - Realizar a triagem fitoquímica das principais classes do metabolismo secundário na planta *C. asiatica* e quantificar o asiaticosídeo (biomarcador) nos EA, EBM e FH, empregando a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC).
- 3 - Determinar a atividade antioxidante dos EA e EBM de *C. asiatica* e a sua relação com os teores de constituintes fenólicos.
- 4 - Investigar o efeito do EA de *C. asiatica* sobre a atividade da fosfolipase A<sub>2</sub> em tecido cerebelar de ratos.
- 5 - Avaliar a atividade leishmanicida do EA e EBM de *C. asiatica*.
- 6 - Avaliar o potencial antimicrobiano do EA e EBM de *C. asiatica*.
- 7 - Avaliar a toxicidade dos EA e EBM de *C. asiatica*, através do bioensaio em *Artemia salina*.
- 8 - Verificar a atividade citotóxica do EA de *C. asiatica*.
- 9 - Verificar a atividade cicatrizante dos EA e EBM de *C. asiatica*.

## **3 MATERIAL E MÉTODOS**

### **3.1 Dados ambientais da colheita de *Centella asiatica***

A planta *Centella asiatica* (L.) Urban foi cultivada em 2 canteiros na Estação de Cultivo e Manutenção de Plantas da UFJF. A amostra composta foi coletada unicamente, em abril de 2006 pela manhã, sendo constituída de plantas crescidas em diferentes valores de luminosidade (30, 75 e 100% de luminosidade). Uma exsicata de *C. asiatica* foi depositada no herbário CESJ da UFJF sob o número 24610, tendo sido identificada pela Dr<sup>a</sup> Fátima Regina Gonçalves Salimena, do Departamento de Botânica do Instituto de Ciências Biológicas da UFJF.

### **3.2 Análise citogenética**

Para a contagem do número de cromossomos da espécie *Centella asiatica* (L.) Urban, indivíduos foram coletados na Estação de Cultivo e Manutenção de Plantas da UFJF e colocados em hidroponia até que seus estolões gerassem pequenos meristemas radiculares, que foram utilizados de acordo com método modificado de Consolaro (1996). Este ensaio foi realizado no Laboratório de Genética do Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da UFJF. As raízes com aproximadamente 1 cm, foram submetidas a vários tratamentos de bloqueio celular com o uso de colchicina 0,05% e posteriormente com solução de 8-hidroxiquinoleína (HQ) 3mM. Foram testados diversos tempos de bloqueio: 30, 60 e 90 minutos, 2, 5, 6, 7, 8 e 9 horas, a 4°C em refrigerador (Electrolux, Brasil). Após o tratamento, as raízes foram lavadas com água destilada durante 15 minutos e fixadas em ácido acético p.a.: metanol p.a. (1:3, v/v) por um período mínimo de 24 horas e mantidas à temperatura de -20°C. Após esse período, as raízes foram lavadas com água destilada por 15 minutos, repetindo as lavagens em intervalos de 5 minutos, por três vezes. Posteriormente, foi realizada a digestão enzimática transferindo as raízes para

microtubos contendo 1,5 mL de solução enzimática Pectinex Ultra SP-L, que foram mantidos por 6 horas em banho-maria (Fanem, Brasil) a 37°C. Após a digestão, foram novamente lavadas com água destilada, fixadas e armazenadas em freezer (Brastemp, Brasil) a -20°C até o momento do preparo da lâmina.

Para a confecção das lâminas, as raízes foram hidrolisadas utilizando solução de ácido clorídrico 5N por 20 minutos à temperatura ambiente, seguida por dissociação celular. Com o auxílio de microscópio estereoscópico SZ40 (*Olympus*, Japão) e bisturi, a região meristemática foi dissociada sobre uma lâmina, onde foram gotejadas 3 a 4 gotas de fixador gelado. Após serem secas em chapa de aquecimento a temperatura de 50°C, as lâminas foram imersas por 11 segundos em solução de ácido acético 45% gelado e novamente seco em placa aquecida a 50°C. Em seguida, foram coradas em solução de *Giemsa* 5% por 6 minutos, lavadas com água destilada e seca em placa de aquecimento a 50°C. As lâminas foram analisadas sob microscópio óptico BX41 (*Olympus*, Japão) e, as células que apresentaram cromossomos bem espalhados e com nível de condensação desejável, foram capturadas por uma câmara de vídeo acoplada ao microscópio BX51 (*Olympus*, Japão), digitalizadas e analisadas por meio do *software* Image-Proplus (Media Cybernetics), o qual possui ferramentas para a determinação do número de cromossomos.

### **3.3 Obtenção dos extratos**

Os extratos foram preparados e fracionados no Laboratório de Fitoquímica do Departamento de Botânica da UFJF.

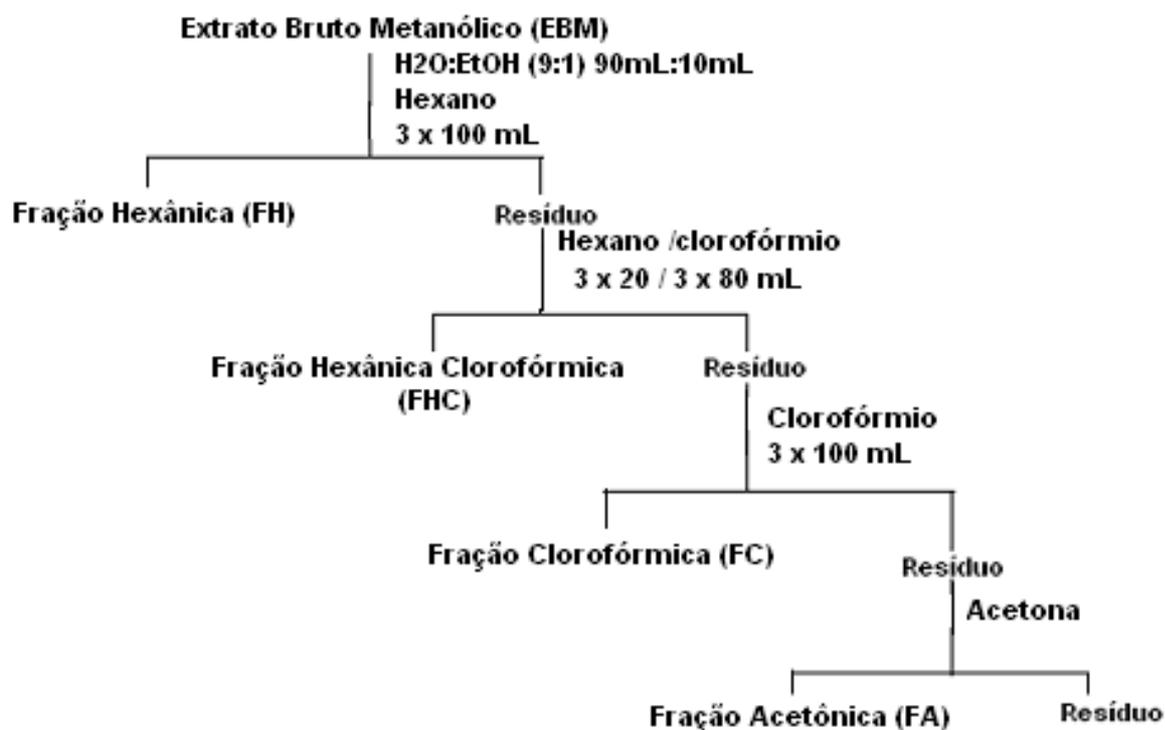
#### **3.3.1 Preparação do extrato bruto metanólico (EBM) de *Centella asiatica***

Foram pesados 102 g de planta seca para a extração à quente por refluxo com metanol (800 mL) por 2 horas, utilizando balão acoplado a 2 condensadores de bola. O extrato metanólico inicial foi retirado e armazenado em frasco âmbar e foi adicionada

nova alíquota de metanol (400 mL) ao balão, deixando em maceração à frio por mais 14 horas. Ambos os extratos foram, então, filtrados e armazenados em frasco âmbar. Posteriormente, outra extração foi realizada pelo mesmo procedimento com 110 g de planta seca e 800 mL de metanol. O volume total de extrato metanólico de *C. asiatica* (cerca de 1900 mL) foi rotavaporado (rotaevaporador R-114 - Buchi, Suíça) para retirada do solvente, até a obtenção de um resíduo de coloração verde escura.

### 3.3.1.1 Fracionamento do extrato bruto metanólico (EBM) de *Centella asiatica*

Cerca de 10,0 g do extrato bruto metanólico foi usado para a obtenção de frações que, de acordo com a polaridade do solvente, retira diferentes substâncias do extrato bruto. O esquema de fracionamento utilizado está representado na Figura 6. Foram obtidas as frações hexânica (FH), hexânica-clorofórmica (FHC), clorofórmica (FC) e acetônica (FA).



**Figura 6 - Esquema de fracionamento do extrato bruto metanólico (EBM) de *Centella asiatica*.**

### **3.3.2 Preparação do extrato aquoso (EA) de *Centella asiatica***

A planta fresca foi seca à sombra e em local ventilado, e usada para a preparação do extrato aquoso. O extrato aquoso foi preparado por infusão das folhas de *C. asiatica* (200 g) em água (4 L), seguido de maceração por 24 horas. A solução final foi filtrada em papel de filtro e depois liofilizada (liofilizador Thermo - Thermo Electron, Estados Unidos), na Embrapa Gado de Leite (Juiz de Fora – MG), até a obtenção de um resíduo, o qual foi armazenado protegido da luz, em freezer (ThermoForma, Estados Unidos) a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ , até o momento do uso.

### 3.4 Triagem fitoquímica

Algumas classes de produtos do metabolismo secundário foram pesquisadas nas folhas de *C. asiatica* através de reações de grupos funcionais da molécula, segundo Matos (1997): flavonóides, leucoantocianidinas, taninos, cumarinas, heterosídeos, saponinas, alcalóides e antraquinonas. Além disso, foi realizada a determinação de cinzas totais e teor de umidade das folhas. Os ensaios foram realizados no Laboratório de Farmacognosia da Faculdade de Farmácia da UFJF.

#### 3.4.1 Flavonóides

Foram pesados aproximadamente 1,5 g de folhas e este material foi transferido para um béquer e acrescentados 15 mL de etanol 70%. Este material sofreu aquecimento em chapa de aquecimento (Ceramag Midi, IKA – Estados Unidos da América) por 30 minutos. Posteriormente foi filtrado em papel de filtro e o filtrado submetido às reações para detecção de flavonóides:

- Reação com cloreto de alumínio 5% ( $\text{AlCl}_3$ ): diferentes áreas de um papel de filtro foram umedecidas, com 5 gotas do extrato obtido anteriormente e foi acrescentada uma gota de solução etanólica de  $\text{AlCl}_3$  a 5%. Fluorescência sob a luz ultravioleta (LUV) indica a presença de flavonóides ( $\lambda = 250 \text{ nm}$ ).
- Reação com ácido bórico ( $\text{H}_3\text{BO}_3$ ): a 5 mL do extrato obtido anteriormente foram adicionados 3 mL de solução de ácido bórico 3% e 1 mL de solução de ácido oxálico 10%, evaporando até a secura em chapa de aquecimento (Ceramag Midi, IKA – Estados Unidos da América). Em seguida, após esfriamento na superfície de trabalho, foram adicionados 10 mL de éter etílico para análise (p.a.) e observado sob a LUV ( $\lambda = 250 \text{ nm}$ ). O aparecimento de fluorescência amarelo-esverdeada indica a presença de flavonóides.

- Reação com hidróxido de sódio (NaOH) 1N: a 5 mL do extrato obtido anteriormente foram adicionados 0,5 mL de solução de NaOH 1N. A coloração amarelada indica a presença de flavonóides.
- Reação de *Shinoda*: a 2 mL do extrato obtido anteriormente, foram adicionados 2 a 3 fragmentos de magnésio (Mg) metálico e 1 mL de solução de ácido clorídrico concentrado. Coloração rósea avermelhada indica a presença de flavonóides.

### **3.4.2 Leucoantocianidinas**

Foi adicionado a 2mL do extrato alcoólico obtido anteriormente 1 mL de ácido sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) concentrado. Coloração avermelhada é indicativa da presença de leucoantocianidinas.

### **3.4.3 Taninos**

Foram pesados 2,0 g de folhas, transferidos para um béquer e adicionados 50 mL de etanol 70%. Este material foi submetido à fervura em chapa de aquecimento (Ceramag Midi, IKA – Estados Unidos da América) por 5 minutos. O extrato foi filtrado em papel de filtro (Whatman nº 1) e o filtrado submetido às reações para detecção de taninos:

- Reações com sais de ferro: ao extrato aquoso (2 mL) foram adicionados 5 mL de água destilada e algumas gotas de solução de cloreto férrico a 2%. Para reação positiva, foi observada a formação e a coloração do precipitado. Precipitado de coloração verde indica a presença de taninos condensados, enquanto de cor azul indica taninos hidrolisáveis.
- Reações com alcalóides: ao tubo de ensaio contendo o extrato (2 mL) obtido anteriormente foi adicionada uma gota de solução de ácido clorídrico 10% e

algumas gotas de solução de sal de alcalóides solúvel 0,1%. A formação de precipitado indica a presença de taninos totais.

- Reação com gelatina: ao tubo de ensaio contendo o extrato (2mL) obtido anteriormente foi adicionada uma gota de solução de ácido clorídrico a 10% e solução de gelatina 2,5%. A formação de precipitado indica a presença de taninos totais.

#### **3.4.4 Cumarinas**

Foram pesados aproximadamente 2,0 g de folhas e adicionado 1 mL de solução de ácido clorídrico 10% e 10 mL de solução de etanol 70%. Essa solução foi aquecida 10 minutos em chapa de aquecimento (Ceramag Midi, IKA – Estados Unidos da América). Após filtração em papel de filtro (Whatman nº 1), o volume foi reduzido a 5 mL através de aquecimento em chapa de aquecimento (Ceramag Midi, IKA – Estados Unidos da América) e extraído com 10 mL de acetato de etila p.a. (Dinâmica – Brasil) em funil de separação. O extrato em acetato de etila foi concentrado a 5 mL e transferido para um tubo de ensaio, ao qual foram adicionados 5 mL de solução de hidróxido de potássio (KOH) 5%. Fluorescência azul-esverdeada após exposição à LUV ( $\lambda = 250 \text{ nm}$ ) indica a presença de cumarinas.

#### **3.4.5 Heterosídeos**

Foram pesados aproximadamente 2,0 g de folhas. Estes foram transferidos para um béquer contendo 20 mL de solução de etanol 50%, e submetidos à fervura por 30 minutos, em chapa de aquecimento (Ceramag Midi, IKA – Estados Unidos da América). Em seguida, o extrato foi mantido em repouso na superfície de trabalho e filtrado em papel de filtro (Whatman nº 1). O procedimento de extração foi repetido por mais 2 vezes,

sendo adicionados 10 mL de solução de etanol 50%. Ao final, o extrato foi filtrado através de papel de filtro (Whatman nº 1) e reunido em um béquer. Ao béquer foram adicionados 10 mL de solução saturada de acetato básico de chumbo  $[\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot \text{Pb}(\text{OH})_2]$ . A solução foi filtrada em papel de filtro (Whatman nº 1) e o conteúdo foi transferido para um funil de separação. À solução hidroalcoólica presente no funil de separação foram adicionados 15 mL de clorofórmio p.a. (Vetec – Brasil), sendo o procedimento repetido por 2 vezes. Os extratos clorofórmicos obtidos foram reunidos e concentrados, em chapa de aquecimento (Ceramag Midi, IKA – Estados Unidos da América), até 10 mL para realização das reações de *Kedde* e *Lieberman-Buchard*.

- Reação de *Kedde*: para esta reação foram evaporados 3 mL do extrato clorofórmico obtido anteriormente, adicionadas 4 gotas de solução etanólica de ácido 3,5-dinitrobenzóico 1% e 2 gotas de solução de hidróxido de potássio 1N. Coloração vermelha violácea intensa indica a presença de heterosídeos principalmente, lactonas  $\alpha$  e  $\beta$ -insaturadas.
- Reação de *Lieberman-Buchard*: para esta reação foram utilizados 5 mL do extrato clorofórmico obtido anteriormente, levado este até resíduo, em chapa de aquecimento (Ceramag Midi, IKA – Estados Unidos da América). Foram adicionados 0,5 mL de solução de anidrido acético  $[(\text{CH}_3\text{CO})_2\text{O}]$  p.a. ao resíduo e transferidos vagarosamente para um tubo de ensaio que continha 1 mL do ácido sulfúrico concentrado. O aparecimento da coloração castanho-avermelhada na interface indica a presença de heterosídeos, principalmente, daqueles que possuem núcleo esteroidal.

### 3.4.6 Saponinas

Em um béquer foi pesado 1,0 g de folhas e adicionados 80 mL de água destilada. Esse extrato foi neutralizado com 10 mL de solução de carbonato de sódio 20% e aquecido até fervura em chapa de aquecimento (Ceramag Midi, IKA – Estados Unidos da América). Este foi resfriado na superfície de trabalho, filtrado em papel de filtro

(Whatman nº 1) e completado o volume em um balão de 100 mL. Dez tubos de ensaio foram numerados. No primeiro tubo foram adicionados 1 mL do extrato e 9 mL de água destilada, no segundo tubo foram adicionados 2 mL do extrato e 8 mL de água destilada, e assim sucessivamente, até o décimo tubo que continha apenas 10 mL do extrato. Cada tubo foi vedado com parafilme e agitado vigorosamente durante 15 segundos. A bateria de tubos permaneceu em repouso por 15 minutos, à temperatura ambiente. Espuma persistente acima de 1 cm por 15 minutos indica a presença de saponinas.

### 3.4.7 Alcalóides

Em um béquer foram pesados 2,0 g das folhas e agitados com 20 mL de solução de ácido clorídrico 1%. O material foi aquecido por 10 minutos em chapa de aquecimento (Ceramag Midi, IKA – Estados Unidos da América). Após esfriamento na superfície de trabalho, foi filtrado em papel de filtro (Whatman nº 1) para um funil de separação e alcalinizado com 10 mL de solução de hidróxido de amônia 10%. O filtrado alcalino foi extraído com 2 porções de 10 mL de clorofórmio p.a. e filtrado com papel de filtro para um béquer. O clorofórmio foi evaporado em banho-maria a temperatura 37°C e o resíduo ressuspendido em 5 mL de solução de ácido clorídrico 1%. Em tubo de ensaio foi colocado 1 mL do resíduo ressuspendido e adicionadas 2 gotas do reagente de *Dragendorff*. O aparecimento de precipitado indica a presença de alcalóides.

### 3.4.8 Antraquinonas

- Reação de *Borntraeger*: cerca de 0,2 g das folhas foram transferidos para um béquer. Foram adicionados 10 mL de solução de ácido sulfúrico 2N e mantidos em ebulição na chapa de aquecimento por 10 minutos. Este foi resfriado na superfície de trabalho e filtrado com papel de filtro para um funil de separação, onde foram

adicionados 10 mL de acetato de etila p.a.. Após agitação, a fase em acetato de etila foi recolhida e foram adicionados 2 mL de solução de hidróxido de sódio 2N com posterior agitação manual. A presença de coloração vermelha na camada aquosa indica a presença de antraquinonas.

### 3.5 Cinzas totais

Foram pesados 3,0186 g da planta total triturada em balança analítica (HR-200, AND - Japão). Este conteúdo foi transferido para um cadinho (de silício ou platina) previamente pesado após ser calcinado (mufla NT-380 - Brasil) a 600°C por 1 hora e resfriado em dessecador. Após distribuir a amostra uniformemente no cadinho, esta foi incinerada aumentando paulatinamente a temperatura da mufla, até 600°C por 4 horas. Em seguida, foi calculada a porcentagem de cinzas totais, conforme descrito abaixo:

$$\% \text{ cinzas totais} = \frac{[(\text{peso do cadinho} + \text{amostra após incineração}) - \text{peso do cadinho calcinado}](\text{g})}{\text{peso da amostra}} \times 100$$

### 3.6 Teor de umidade

Para avaliar o teor de umidade, foram pesados cerca de 1 a 2 g da planta total triturada, os quais foram transferidos para um cadinho de porcelana. A umidade foi determinada em um sistema de infravermelho (SI4040 BG200, GEHAKA – Brasil).

### 3.7 Determinação de asiaticosídeo (ASA) por HPLC

Foi validado um método analítico para o controle de qualidade das frações e extratos utilizando como biomarcador o asiaticosídeo, empregando a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) com detector diode array. A fração hexânica e os extratos foram submetidos à análise cromatográfica e avaliados quanto ao teor de asiaticosídeo presente nas mesmas. As análises cromatográficas foram realizadas no Núcleo de Identificação e Quantificação Analítica (NIQUA), na Faculdade de Farmácia e Bioquímica da UFJF.

As seguintes condições foram consideradas ideais para a metodologia de análise: fase móvel gradiente composta por acetonitrila 100% e solução de ácido fosfórico 0,5% (75:25, v/v), fluxo da fase móvel 2,0 mL/ minuto, coluna cromatográfica CN (250 x 4,6 mm, 5µm tamanho da partícula, Shimadzu), detector *diode array* (comprimento de onda de 204 nm), volume de injeção da amostra de 25 µL. Amostras dos extratos e fração foram ressuspensas em fase móvel e filtradas em membrana de 0.22 µm de diâmetro do poro (Millipore Corp., Bedford, Estados Unidos da América). Foi utilizado como padrão interno (PI) a boldina (*Pharmacopeia*, Brazil).

A curva de calibração foi construída a partir de injeções de asiaticosídeo (ChromaDex Inc. - Estados Unidos da América) em concentrações conhecidas (31,25 – 500 µg/ mL) na coluna cromatográfica. A concentração de asiaticosídeo presente nos extratos e fração foi calculada através da média das áreas dos picos do asiaticosídeo e do padrão interno, obtidas por injeções em triplicata das amostras dos extratos de *C. asiatica* contendo boldina (100 µg/mL).

### 3.8 Quantificação dos constituintes fenólicos totais

O doseamento dos constituintes fenólicos totais foi realizado segundo a metodologia descrita pela Association of Official Analytical Chemists (A.O.A.C. - 1960),

utilizando o reagente de Folin-Dennis, em meio alcalino (solução saturada de carbonato de sódio). Para o doseamento dos constituintes fenólicos foram utilizados os EA e EBM descritos anteriormente. Em tubos de ensaio foram adicionados 10 µL de EA ou EBM, 100 µL do reagente de Folin-Dennis, previamente preparado, 200 µL de uma solução saturada de carbonato de sódio e 1,69 mL de água deionizada, resultando em volume final de 2 mL, em cada tubo de ensaio. Foi preparado um branco o qual não continha os extratos vegetais. O ácido tânico foi utilizado como padrão para a construção da curva de calibração. O ensaio foi realizado em triplicata. A leitura de absorvância foi realizada em espectrofotômetro (UV mini 1240, Shimadzu - Japão) no comprimento de onda selecionado (760 nm). A quantificação foi realizada no Núcleo de Identificação e Quantificação Analítica (NIQUA), na Faculdade de Farmácia e Bioquímica da UFJF.

### **3.9 Determinação dos teores de flavonóides**

O doseamento dos flavonóides foi realizado segundo Vennat et al. (1992). A rotina foi utilizada como padrão para a construção da curva de calibração. Para a determinação dos teores de flavonóides foram utilizados os EA e EBM descritos anteriormente. Utilizando tubos cônicos de centrífuga foram adicionados, na ordem indicada, 10 mL de EA ou EBM, 4 mL de clorofórmio p.a. e 6 mL de água destilada. Após homogeneização, esta solução foi centrifugada por 3 minutos a 3500 rpm (206 BL, Fanem, Brasil). Em seguida, uma alíquota de 2 mL da camada superior foi retirada com auxílio de uma pipeta de *Pasteur* e transferida para um balão volumétrico de 25 mL. Foram adicionados ao balão 0,6 mL de ácido acético glacial, 10 mL de solução de piridina:metanol (2:8, v/v) e 2,5 mL de solução de 8% de cloreto de alumínio hexahidratado, em metanol. O volume do balão foi completado com água e após um intervalo de 15 minutos foi realizada a leitura da absorvância em espectrofotômetro (UV mini 1240, Shimadzu - Japão) no comprimento de onda de 420 nm. A determinação dos teores foi realizada no Núcleo de Identificação e Quantificação Analítica (NIQUA), na Faculdade de Farmácia e Bioquímica da UFJF.

### 3.10 Atividade antioxidante

A atividade antioxidante de radicais 2,2-difenil-1,2-picril-hidrazil (DPPH) foi determinada pela sua capacidade seqüestrante de acordo com o método de Sreejavan e Rao (1997), com pequenas modificações. Neste modelo, 1,5 mL da solução etanólica de DPPH 0,05 mM foram adicionados a 500 µL de uma solução etanólica de EA e EBM de *C. asiatica*, nas concentrações de 250; 125; 62,50; 31,25; 15,62; 7,81; 3,90; 1,95 e 0,97 µg/mL. Os testes foram realizados em triplicata. Essa reação transcorreu em temperatura ambiente, por 30 minutos, protegida da luz. Em seguida, a absorvância foi lida em espectrofotômetro (UV mini 1240, Shimadzu - Japão) no comprimento de onda ( $\lambda$ ) de 517 nm. Foi utilizado um branco para cada concentração, a fim de retirar a interferência da cor do extrato, o qual continha 500 µL de amostra e 1,5 mL de etanol. Como controle negativo, foi usada a mistura de 500 µL de etanol p.a. e 1,5 mL da solução etanólica de DPPH 0,05 mM. Ácido ascórbico e butil-hidróxi-tolueno (BHT) foram usados como padrões nas mesmas concentrações (250 – 0,97 µg/mL). A inibição do radical DPPH foi calculada usando a equação:

$$CI_{50} (\%) = 100 \times (A_0 - A_s)/A_0$$

onde:

$A_0$  = absorvância do controle negativo

$A_s$  = absorvância da amostra teste

O valor de  $CI_{50}$  representa a concentração do extrato aquoso e do extrato bruto metanólico de *C. asiatica* que causou 50% de inibição. O ensaio foi realizado no Núcleo de Identificação e Quantificação Analítica (NIQUA), na Faculdade de Farmácia e Bioquímica da UFJF.

### 3.11 Atividade da fosfolipase A<sub>2</sub> em tecido cerebelar de ratos

A atividade de subtipos de PLA<sub>2</sub> foi determinada pelo ensaio radioenzimático, de acordo com Gattaz et al. (1995) e modificado por Barbosa et al. (2004). De acordo com esse método, o ácido araquidônico marcado com carbono-14 (<sup>14</sup>C), é preferencialmente quebrado pela PLA<sub>2</sub> na posição *sn*-2 da molécula de fosfatidilcolina, e um contador de cintilação líquida é usado para medir o produto radioativo desta reação enzimática. Uma estimativa indireta da atividade de PLA<sub>2</sub> é então determinada pela contagem por minuto de radioatividade de <sup>14</sup>C (CPM). O ensaio foi realizado no Laboratório de Investigações Médicas 27 (LIM27) do Instituto de Psiquiatria do Hospital das Clínicas da USP.

Como substrato para a enzima, foi usado o L- $\alpha$ -1-palmitoil-2-araquidonil-fosfatidilcolina marcado com [<sup>14</sup>C] na cauda araquidonil na posição *sn*-2 (araquidonil-1-<sup>14</sup>C-PC) (PerkinElmer, Boston, MA). Antes da reação enzimática, uma mistura de araquidonil-1-<sup>14</sup>C-PC e antioxidante toluol-etanol-butilhidroxitoluol (1:10, v/v) foi evaporado sob nitrogênio líquido (0,075  $\mu$ Ci por amostra), ressuspendido em solução de 0,3 mg/mL de albumina sérica bovina (BSA - *bovine serum albumine*) em água ultrapura, e homogeneizada por sonicação. Os homogenatos de tecido foram diluídos a uma concentração protéica de 1,5 mg/mL em 50 mM de tampão Tris-HCl (pH 8,5 para cPLA<sub>2</sub> e sPLA<sub>2</sub>; pH 7,5 para iPLA<sub>2</sub>).

As amostras testes foram preparadas de acordo com atividade do subtipo de PLA<sub>2</sub> de interesse, sob gelo. Para a atividade total de iPLA<sub>2</sub>, amostras continham 100  $\mu$ L de homogenato protéico, 100  $\mu$ L de extrato aquoso de *C. asiatica* em concentrações de 25 – 500  $\mu$ g/mL, 100  $\mu$ L de Tris 1M (pH 7,5), 50  $\mu$ L de CaCl<sub>2</sub> 5  $\mu$ M e 150  $\mu$ L de radioativo ressuspendido <sup>14</sup>C-PC, que corresponde à 0,075 mCi. Para a atividade residual de iPLA<sub>2</sub>, foi adicionado ao nosso ensaio 50  $\mu$ L de bromoenol lactona (BEL) 1,0 mM e 50  $\mu$ L of Tris 1M pH 7,5.

Também foi determinada a atividade de PLA<sub>2</sub> cálcio-dependente (citossólica e secretória). Para o ensaio com cPLA<sub>2</sub>, foram adicionados 50  $\mu$ L de CaCl<sub>2</sub> 10  $\mu$ M, 50  $\mu$ L de BEL 1,0 mM, 50  $\mu$ L de Tris 1M pH 8,5, 100  $\mu$ L do homogenato diluído, 100  $\mu$ L de extrato aquoso de *C. asiatica* como descrito acima, e 150  $\mu$ L de radioativo ressuspendido <sup>14</sup>C-PC.

Após um período de incubação de 30 minutos a 37°C em banho maria, a reação enzimática nas amostras foi parada pela adição de 700 µL de uma mistura de ácido clorídrico e isopropanol (ambos Merck) (1:12, v/v). As amostras foram reservadas por 10 minutos em temperatura ambiente. O [1-<sup>14</sup>C] ácido araquidônico liberado foi extraído pela adição de 700 µL de *n*-heptano (Merck) seguida por uma centrifugação de 3.220 *g* por 10 minutos em temperatura ambiente em uma centrífuga de microtubos (5417 C; Eppendorf, Hamburg, Alemanha), após a qual 500 µL da fase superior das amostras foram transferidos para microtubos contendo sílica (Merck) e 300 µL de *n*-heptano. Uma segunda centrifugação de 3.220 *g* foi realizada por 10 minutos em temperatura ambiente, após a qual 500 µL da fase superior das amostras foram transferidos para tubos contendo 6 mL de líquido de cintilação (*Ultima Gold*; Packard). Finalmente, a radioatividade do [1-<sup>14</sup>C] ácido araquidônico liberado foi medida em um contador Tri-Carb 2100TR (Packard), expressa em contagens por minuto (CPM). Essa medida foi utilizada para calcular a atividade da PLA<sub>2</sub>, que é expressa em pmol/mg proteína/minuto. Todas as determinações da atividade da PLA<sub>2</sub> foram realizadas em triplicata.

### 3.12 Atividade leishmanicida

A atividade leishmanicida foi realizada de acordo com o método descrito por M'bongo et al. (1997). O ensaio foi realizado no Laboratório de Parasitologia do Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da UFJF. As formas promastigotas utilizadas para a realização do *screening* foram: *Leishmania amazonensis* (MHOM/Br/75/Josefa isoladas de paciente com leishmaniose cutânea difusa) e *Leishmania chagasi* (MHOM/Br/74/PP75 isoladas de pacientes com leishmaniose visceral). As formas, promastigotas de *L. amazonensis* foram cultivadas em meio *Warren* (Becton-Dickson, Estados Unidos da América) e as formas promastigotas de *L. chagasi* foram mantidas em meio 199 (GIBCO, Bahamas), ambos suplementados com 10% de soro fetal bovino. Estas células foram mantidas a temperatura de 24°C em incubadora de gás carbônico (ThermoForma, Estados Unidos da América). O *screening* foi realizado em placas de 96 poços, mantidas

a temperatura de 24°C por 24 horas. As formas promastigotas foram padronizadas de forma que a suspensão contivesse 2 milhões de células/mL (*L. amazonensis*) e 3 milhões de células/mL (*L. chagasi*), após contagem em câmara de *Newbauer*. Foram adicionados a cada poço da placa 100 µL da suspensão padronizada de parasitas e as placas foram incubadas a temperatura de 24°C por 1 hora, antes da incubação das substâncias-teste.

Os extratos testados (EA e EBM) foram dissolvidos com solução de dimetilsulfóxido p.a. (DMSO, Vetec - Brasil) e adicionados a cada poço da placa. Cada concentração foi testada em triplicata. A anfotericina B foi usada como fármaco de referência. A viabilidade celular de ambas as formas promastigotas foram determinadas através do método colorimétrico, utilizando difenil tetrazólio (MTT), que avalia a integridade mitocondrial baseada na redução enzimática do corante pelas desidrogenases mitocondriais (MOSMANN, 1983; DENIZOT e LANG, 1986). Os resultados foram expressos através da  $CI_{50}$  de cada substância-teste.

### 3.13 Atividade antimicrobiana

Os extratos bruto metanólico e aquoso de *C. asiatica* foram testados quanto a atividade antimicrobiana pelo método turbidimétrico. Os ensaios foram realizados no Núcleo de Identificação e Quantificação Analítica (NIQUA), na Faculdade de Farmácia e Bioquímica da UFJF. Para a determinação da concentração mínima inibitória (*minimum inhibitory concentration* - MIC) foram testadas as cepas *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 90271, *Candida albicans* ATCC 10231, *Staphylococcus aureus* ATCC 29737 e *Streptococcus mutans* ATCC 25175. Os meios utilizados para repique foram: *Tryptone Soy Agar* (TSA), *Saboraud Dextrose Agar* (SDA) e Anti-1. As concentrações testadas foram entre 2 - 125 µg/ mL.

Para ressuspender os extratos, foram utilizados os seguintes solventes:

- Extrato bruto metanólico: DMSO/ *Tween* + solução fisiológica (1:9, v/v).
- Extrato aquoso: solução fisiológica.

As soluções foram preparadas de maneira a se obter volume necessário para o teste em triplicata, e para se fazer as outras soluções com concentrações determinadas e volumes necessários. A penicilina foi utilizada como fármaco de referência e foi

preparada de acordo com a farmacopéia americana (THE UNITED STATES PHARMACOPOEIA, 2000), nas concentrações finais de 4 - 0,25 UI/ mL.

### **3.13.1 Preparo e padronização da suspensão microbiana**

O tubo contendo o repique do microorganismo desejado foi incubado em uma estufa bacteriológica, durante 24 horas (bactérias) ou 48 horas (fungo). Após este período, foram adicionados 4 mL de solução fisiológica estéril, no tubo contendo as colônias repicadas, utilizando-se uma pipeta automática com ponteira estéril. Este tubo foi levado para agitação em vórtex, em baixa velocidade (para que as células bacterianas não fossem rompidas). Esta solução foi transferida para um balão estéril para padronização. A padronização da suspensão microbiana foi realizada utilizando-se espectrofotômetro (Shimadzu UV mini 1240 – Japão) ( $\lambda=580\text{nm}$ ) e cubetas de quartzo, onde dilui-se a suspensão citada acima com solução fisiológica estéril até obter-se uma leitura de 25% de transmitância. O ajuste do aparelho foi feito para 100% de transmitância, utilizando-se solução fisiológica estéril. Após a padronização, as cubetas foram deixadas em solução de hipoclorito de sódio 2%, aproximadamente 30 minutos, para descontaminação.

A partir dos valores obtidos na contagem foi possível calcular a concentração de UFC na suspensão padronizada. O meio foi inoculado a fim de se obter uma suspensão contendo entre 1000 e 10000 UFC em cada 4mL de meio.

### **3.13.2 Concentração Inibitória Mínima (MIC)**

A amostra a ser testada foi diluída através de 5 diluições sucessivas (10 - 0,625 mg/ mL) a partir da solução inicial. As diluições foram seriadas com fator de diluição 1:2. Para o controle negativo, acrescentou-se 4mL de caldo caseína estéril e 1mL de solução

fisiológica estéril a um tubo de ensaio estéril. Este procedimento foi realizado em triplicata.

No preparo dos tubos teste, acrescentou-se 4mL de caldo caseína inoculada e 1mL de cada concentração da droga preparada na segunda etapa em diferentes tubos. Incubou-se os tubos em estufa bacteriológica durante 24 horas (bactérias) ou 48 horas (fungos).

Observou-se, para cada cepa analisada, dentre os 5 tubos com concentrações diferentes da droga, qual apresentou crescimento bacteriano (turvação do meio). Assim, conclui-se que a concentração inibitória mínima da droga é a menor concentração onde não se verifica turvação do meio (CANDAN et al., 2003).

### **3.14 Toxicidade aguda**

O ensaio de toxicidade aguda em *Artemia salina* foi realizado conforme Meyer et al. (1982). O ensaio foi realizado no Núcleo de Identificação e Quantificação Analítica (NIQUA), na Faculdade de Farmácia e Bioquímica da UFJF. Foram transferidas 10 larvas de *Artemia salina* para tubos de ensaio, em quadruplicata, contendo diferentes concentrações (1 – 1000 µg/mL) de EA e EBM de *C. asiatica*. Os tubos foram mantidos sob iluminação direta e as larvas sobreviventes foram contadas, após 24 horas de exposição às substâncias-teste. O timol foi utilizado como referência. A concentração letal em 50% da população em estudo (CL<sub>50</sub>) foi determinada pela regressão linear entre o logaritmo da dose fornecida e as unidades probabilísticas de percentagem de mortos pelo teste dos probitos (LITCHFIELD e WILCOXON, 1949).

### 3.15 Atividade citotóxica

A determinação da atividade citotóxica em uma linhagem normal de células e sobre linhagens celulares tumorais foram avaliadas pela inibição da viabilidade celular através da metabolização do difenil tetrazólio (MTT), de acordo com método utilizado por Denizot e Lang (1986). O ensaio foi realizado no Laboratório de Substâncias Antitumorais (LSAT) do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG. Com o intuito de representar mais de uma origem embrionária celular, foram selecionadas as seguintes linhagens celulares: glioma de rato – C6, melanoma de camundongo – B<sub>16</sub>F<sub>1</sub>, carcinoma de pulmão humano – A<sub>549</sub> e carcinoma de mama humano – MDA-MB 231, e normal de rim de hamster – BHK.

As linhagens testadas foram cultivadas rotineiramente em *Roswell Park Memorial Institute* (RPMI) 1640 a 5% (v/v) de soro fetal bovino (SFB). As culturas foram incubadas em atmosfera úmida com 5% de CO<sub>2</sub>, à temperatura de 37°C, em ambiente escuro. As células proliferaram aderidas à superfície das garrafas plásticas estéreis de cultura e foram subcultivadas a cada três dias, de maneira que após a retirada do meio, a cultura fosse lavada com SFB-EDTA, e em seguida adicionada uma solução de tripsina 0,2% até que as células se desprendessem da garrafa de cultura. Então, as células foram suspensas em meio RPMI e soro e distribuídas para novas placas multipoços nas densidades desejadas.

As suspensões celulares foram semeadas em microplacas de 96 poços contendo 5x10<sup>3</sup> células/poço. As células foram incubadas em atmosfera úmida a 5% de CO<sub>2</sub> a temperatura de 37°C. Após 24 horas, foi adicionado o EA de *C. asiatica* nas concentrações desejadas (100 – 1000 µg/mL). A leitura de absorvância foi realizada em 96 ou 120 horas após a adição do extrato, em espectrofotômetro a 600 nm, tendo sido o MTT adicionado 4 horas antes das leituras (50µg/poço). Foi utilizado o taxol como controle positivo.

Com os valores de viabilidade das células expostas às frações e das células não expostas (células controle), obtidos através da leitura no espectrofotômetro, foram calculadas as porcentagens de inibição da viabilidade celular utilizando o *software* GraphPad Prisma 3.0 (GraphPad Software, Inc.). Os cálculos da concentração de inibição a 50% (CI<sub>50</sub>), de acordo com o modelo de análise de variância com uma variável

de classificação, foram realizados por meio de uma regressão linear simples. O modelo considerado foi  $y = a + bx$ , onde  $y$  é igual a porcentagem de inibição da viabilidade celular;  $x = (x_i + z)$ ,  $x_i$  = valor procurado, incógnita ( $CE_{50}$ ),  $z$  = média aritmética do log das concentrações,  $a$  = interseção do eixo  $y$  com a reta e  $b$  = inclinação da reta. Esses valores juntamente com os limites de confiança de 0,05 foram calculados com o auxílio do *software* SigmaPlot 10.0 (Systat Software, Inc.).

### 3.16 Atividade cicatrizante

Foram utilizados coelhos (*Oryctolagus cuniculus*) albinos da Nova Zelândia (com peso de 1,5 a 2,0 kg) machos, provenientes da Fazenda Experimental – Igarapé/MG. Os animais foram mantidos em gaiolas apropriadas para o modelo animal com ração e água *ad libitum*. A temperatura e a umidade do ambiente foram monitoradas com o auxílio de termohigrômetro e mantidas constantes pelo uso do ar condicionado (15000, Springer, Mundial – Brasil) e do desumidificador (Mechanic, Artel, Itália).

Todos os procedimentos estão de acordo com os princípios éticos na experimentação animal, adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), e aprovados sob o número 52/2006 pela Comissão de Ética na Experimentação Animal (CEEAA) da Pró-Reitoria de Pesquisa/UFJF.

Foram formulados cremes contendo extrato bruto metanólico (EBM) e extrato aquoso (EA) de *C. asiatica* nas concentrações de 5 e 10%. Foram testadas diversas bases de polaridades diferentes (creme Pollawax, gel carbopol, creme base Lanette). Desta maneira, pequena quantidade de extrato foi ressuspensa em água e incorporada nas bases para um teste prévio. Tanto para o creme contendo EBM, quanto para o creme contendo EA, foram produzidos 50 g de cada creme. O creme contendo EA teve coloração marrom. Já o creme contendo EBM teve coloração verde, apresentando aspecto aerado. A intensidade da cor diminuiu com a concentração. A viscosidade foi parecida entre os cremes. A avaliação foi realizada no Núcleo de Identificação e Quantificação Analítica (NIQUA), na Faculdade de Farmácia e Bioquímica da UFJF.

Neste ensaio, os animais foram numerados (de 1 a 10) e tiveram o pêlo do dorso tricotomizado, e esta área, dividida em 4 quadrantes. A seguir, foram administrados 0,2 mL de lidocaína 2 %, via subcutânea, a cada quadrante. Posteriormente, foram provocadas queimaduras com barra de ferro de 5 cm<sup>2</sup> aquecidas em banho de água fervente. O animal não apresentou resistência ao procedimento, indicando a eficiência da anestesia local. Cada quadrante recebeu um creme diferente. Nos coelhos numerados de 1 a 5, foi testado o creme contendo EBM (nas concentrações 5% e 10%), enquanto nos coelhos 6 a 10, foi testado o creme contendo EA (nas mesmas concentrações de 5% e 10%). Os cremes foram aplicados de acordo com o esquema representado na Figura 7.

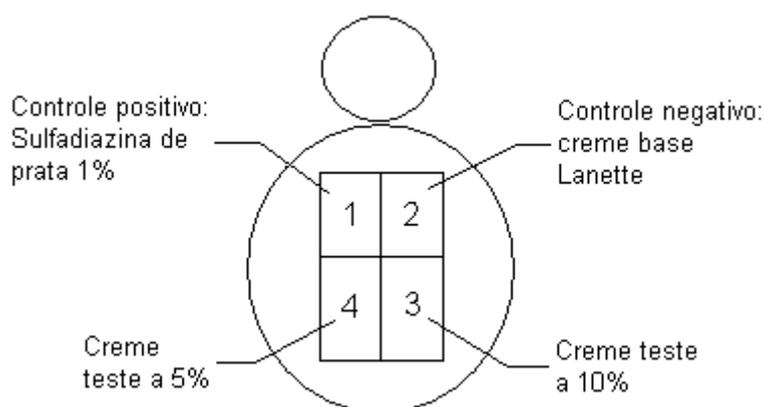


Figura 7 - Representação dos quadrantes de aplicação dos cremes no modelo utilizado.

Após este procedimento, os animais foram colocados nas gaiolas com ração e água *ad libitum*. Dipirona foi administrada via oral (incorporada na água) para o alívio da dor, após o efeito do anestésico.

No dia seguinte, o animal foi retirado da gaiola e colocado sob a bancada. Com o auxílio de uma espátula, foi retirada uma pequena quantidade da amostra, correspondente a aproximadamente 5 g, e delicadamente espalhado, de maneira uniforme, sobre toda a área da queimadura. Sobre cada área foi colocada gaze estéril cortada em quadrados, depois o animal foi envolvido por uma faixa de bandagem não oclusiva, a fim de evitar a remoção da substância e/ou ingestão da mesma. O animal foi recolocado na gaiola. Na segunda aplicação, foram retiradas a bandagem e a gaze com uma tesoura estéril, procedida a limpeza da lesão com água destilada e re-aplicadas as

amostras de creme; repetindo assim, o procedimento descrito anteriormente. Tais procedimentos foram repetidos até o final do experimento (10 dias).

Para cada um dos 10 coelhos, foi feita uma ficha (Anexo A), onde foram anotadas as seguintes informações: o horário de aplicação dos cremes, peso e comportamento do animal e características das lesões em cada quadrante específico (análises macroscópicas).

Ao final dos 10 dias, os coelhos foram sacrificados e tiveram parte das lesões cutâneas retiradas para a análise histopatológica e histomorfométrica, tendo em vista uma avaliação mais detalhada do efeito cicatrizante do creme.

### **3.16.1 Histopatologia e histomorfometria**

Todas as amostras das lesões cutâneas obtidas foram fixadas em formol tamponado a 10% (pH = 7,0) por um período mínimo de 24 horas. Após a fixação, as amostras foram desidratadas gradativamente em concentrações crescentes de álcool etílico (70% a 100%), diafanizadas em xilol, embebidas e incluídas em parafina, conforme métodos histopatológicos de rotina. Os fragmentos incluídos em parafina foram cortados, utilizando-se micrótomo (American Optical Co. "820", Spence, Estados Unidos), obtendo-se seções de 4 µm de espessura. As lâminas histopatológicas foram mantidas em estufa para secagem, e os cortes, posteriormente, submetidos à coloração por hematoxilina e eosina (HE), para análise histopatológica. As avaliações foram realizadas nos Laboratórios de Genética e Histologia do Instituto de Ciências Biológicas da UFJF.

A histomorfometria foi realizada através de imagens capturadas das amostras das lesões e avaliadas por sistema computadorizado de captura de imagens (*Olympus*, Japão). Imagens de cinco campos microscópios aleatórios foram capturadas de cada amostra de tecido na lâmina histológica com câmera digital (ampliação total 400x) acoplada ao microscópio BX51 (*Olympus*, Japão). As imagens foram arquivadas e submetidas à contagem de células inflamatórias, células fibroblásticas, número de vasos, avaliação das áreas de matriz extracelular e áreas de colágeno de todas as lesões ao

final do experimento com auxílio de marcação digital (ROCHA JÚNIOR et al., 2006) e *software* Image-Proplus (Media Cybernetics). Na identificação das células envolvidas, os fibroblastos foram identificados como células fibrilares alongadas com núcleos hipercromáticos roliços e achatados, formando feixes ou fascículos. Foram identificadas como células inflamatórias aquelas que possuíam núcleo arredondado e ovóide, rodeadas de matriz extracelular, as polimorfonucleares (PMN), eosinófilos, mastócitos, neutrófilos, plasmócitos, e macrófagos.

### 3.17 Análise estatística

Foram realizadas análises descritivas dos dados através de medidas de posição e de dispersão (média e erro padrão da média), para os ensaios de doseamento de constituintes fenólicos totais, determinação de teor de flavonóides, determinação de ASA nos extratos, e para as atividades das PLA<sub>2</sub>, atividade antioxidante, atividade leishmanicida e atividade antimicrobiana. Para avaliar a significância das diferenças entre as médias dos resultados dos grupos de estudo quando conveniente, foi aplicada a análise de variância (ANOVA) e teste *post Hoc* de *Bonferroni*, para os quais foi utilizado o *software Statistical Package for the Social Sciences 8.0 (SPSS)*. Foi estabelecido como limite de significância  $p < 0,05$ .

As CI<sub>50</sub>s (dose ou concentração das substâncias-teste ou compostos que reduziram a resposta em 50% em relação ao grupo controle) foram apresentadas como médias geométricas, acompanhadas de seus respectivos limites de confiança, em nível de 95%, assim como na toxicidade aguda. As CI<sub>50</sub>s foram estimadas a partir de experimentos individuais, utilizando o método de regressão linear através dos programas SigmaPlot 10.0 (Systat Software, Inc.) e GraphPad Prisma 3.0 (GraphPad Software, Inc.). No ensaio da atividade antitumoral, foi aplicada a ANOVA seguida do *post test* de *Dunnett* para comparação entre todos os grupos de tratamento e o controle, com limite de significância  $p < 0,05$ . A análise estatística do ensaio de histopatologia e histomorfometria foi realizada com o auxílio do *software* GraphPad Prisma 3.0 (GraphPad Software, Inc.),

onde foi aplicado a ANOVA seguida do *post test* de *Tukey* para comparação de todos os grupos de tratamento entre si, com limite de significância estabelecido em  $p < 0,05$ .

## **4 RESULTADOS**

### **4.1 Análise citogenética**

Foi realizado-se a caracterização citogenética da espécie em estudo, a fim de confirmar sua identidade botânica. Após várias tentativas com diversos tipos de tratamentos, o bloqueio com 8-HQ por 9 horas, digestão enzimática com Pectinex Ultra SP-L por 6 horas e hidrólise ácida por 20 minutos, foram consideradas as condições analíticas otimizadas para a visualização da metáfase. Foram observadas algumas metáfases mitóticas, com as quais foram utilizadas para estimar o número de cromossomos. Entretanto, não foi possível realizar a contagem exata do número de cromossomos, em virtude da sobreposição e pelo grande número destes. Apesar disso, o número de cromossomos foi estimado como sendo superior a 48, como pode ser visto na Figura 8.

### **4.2 Triagem fitoquímica**

Durante a realização da triagem fitoquímica das folhas de *Centella asiatica* foi possível detectar a presença de flavonóides, heterosídeos triterpênicos, cumarinas, taninos e saponinas. Os teores de cinzas totais e umidade para a amostra foram, respectivamente, de 11,17% e 12,93%. Os resultados encontram-se descritos na Tabela 1. No Anexo A, encontram-se as fotos de alguns dos ensaios realizados e os respectivos resultados encontrados.

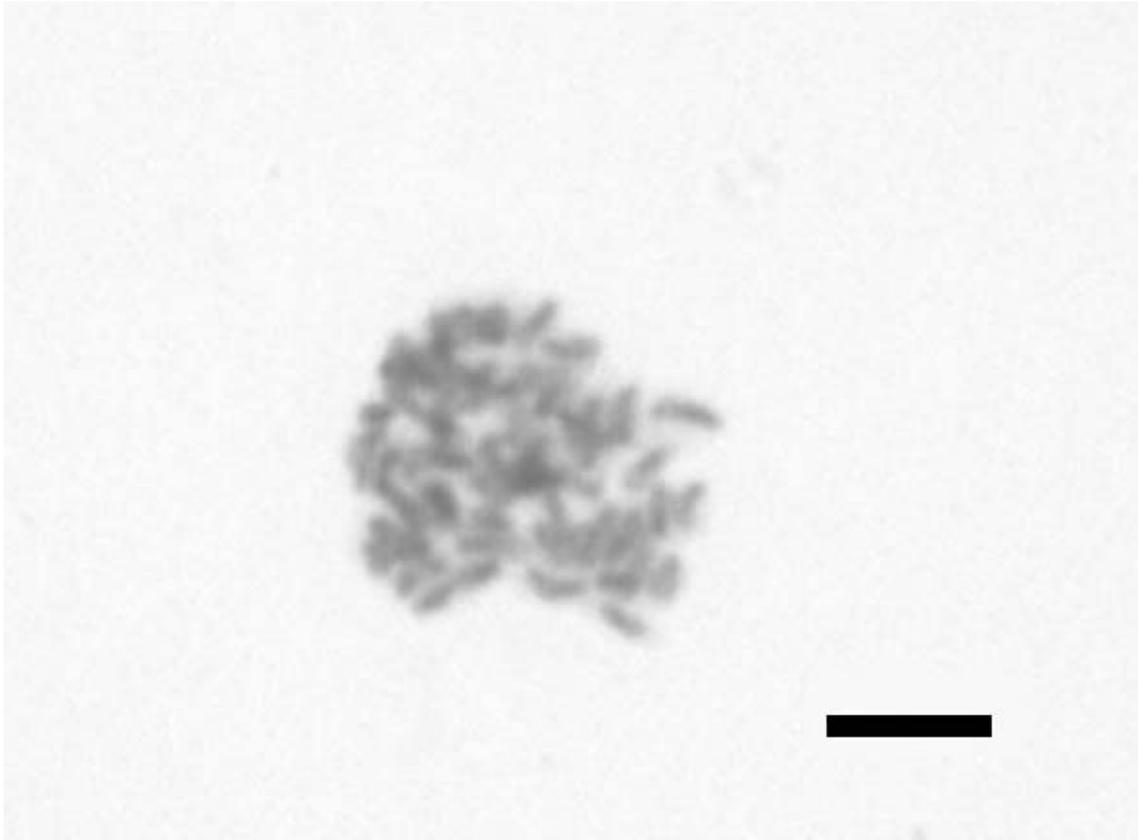


Figura 8 - Metáfase mitótica de *Centella asiatica*. Número de cromossomos estimado  $2n > 48$ . Barra correspondente a 5  $\mu\text{m}$ .

Tabela 1 - Reações de identificação de grupos de substâncias do metabolismo secundário de *Centella asiatica*.

Classes de substâncias	Reações químicas	Resultados
Flavonóides	AlCl <sub>3</sub>	+
	NaOH 1N	+
	<i>Shinoda</i>	-
	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	+
Leucoantocianidinas	HCl concentrado	-
Heterosídeos	<i>Kedde</i>	+
	<i>Lieberman-Buchard</i>	+
Taninos	Sais de ferro(FeCl <sub>3</sub> )	+
	Alcalóide	-
	Gelatina	-
Cumarinas	KOH 2N	+
Alcalóides	<i>Dragendorf</i>	-
Antraquinonas	<i>Borntraeger</i>	-
Saponinas	Índice de Espuma	+
Umidade	Teor	11,17%
Cinzas	Teor	12,93%

Legenda: - = não detectado ;  
+ = resultado positivo.

### 4.3 Determinação de asiaticosídeo (ASA) por HPLC

Foi desenvolvido e validado um método cromatográfico para a realização do controle da qualidade dos extratos de *Centella asiatica*, empregando o asiaticosídeo (ASA) como biomarcador. Dentre as substâncias químicas testadas como possível padrão interno (PI), foi escolhida a boldina, visto que a mesma apresentou melhor resolução do pico cromatográfico em relação aos demais padrões testados: escopolamina, atropina, nafazolina, cafeína e lamotrigina. O tempo total de análise foi de 9 min; sendo os tempos de retenção obtidos para o asiaticosídeo e para o PI (boldina) 0,821 min e 2,677 min, respectivamente. A resposta do detector mostrou-se linear entre 0,39 - 250 µg/ mL, apresentando equação da reta  $y = 0,021x + 0,1286$  e coeficiente de correlação  $R^2 = 1$ . O método apresentou coeficiente de variação inferior a 5% para exatidão e precisão (intra e interensaio). Após a validação do método cromatográfico, foi possível determinar o teor de asiaticosídeo presente nas amostras. A concentração de ASA foi calculada para as alíquotas dos extratos, através da relação entre as áreas dos picos referentes ao ASA (0,821 min) e ao PI (2,677) no cromatograma dos extratos, utilizando-se da equação da reta obtida a partir da curva de calibração.

A concentração de asiaticosídeo determinada nas condições padronizadas e validadas foram: a) extrato aquoso: 210,8 µg/ mL; b) extrato bruto metanólico: 177,3 µg/ mL e c) fração hexânica: 143,2 µg/ mL. Para o extrato aquoso (EA), o teor de asiaticosídeo presente na amostra representou 84,31% do total do extrato; para o extrato bruto metanólico (EBM) o teor foi de 70,93% e para a fração hexânica (FH) foi 57,28%. A Figura 9 ilustra o perfil cromatográfico do biomarcador ASA e do PI, nas condições analíticas empregadas.

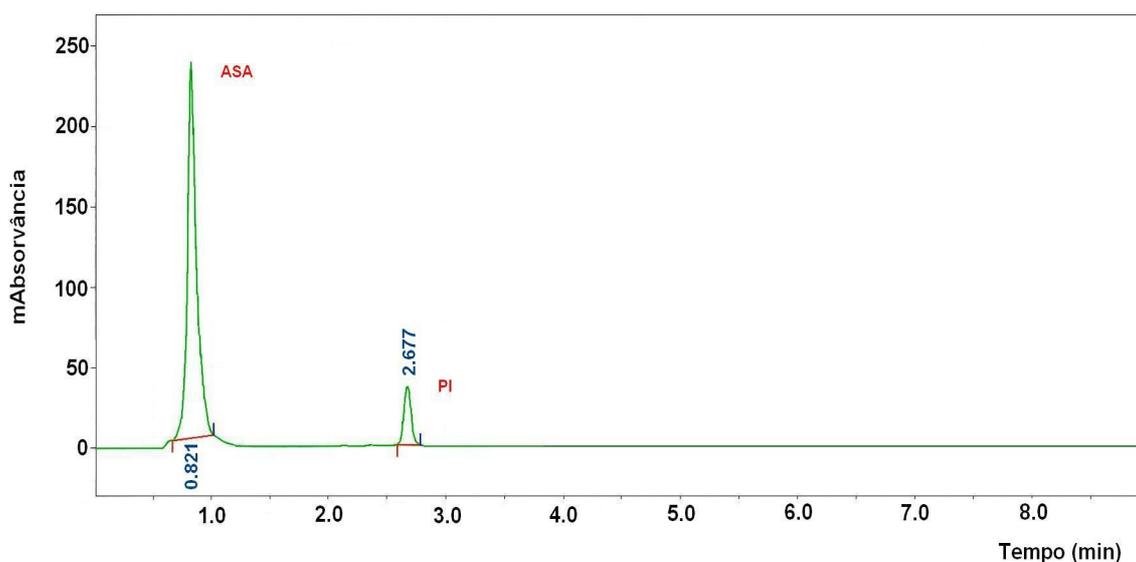


Figura 9 - Perfil cromatográfico do ASA e do PI nas condições padronizadas e validadas.

#### 4.4 Quantificação dos constituintes fenólicos totais

As concentrações dos constituintes fenólicos totais presentes nos extratos aquoso (EA) e bruto metanólico (EBM) de *C. asiatica* são mostradas na Tabela 2. Os valores são expressos em g de constituintes fenólicos/100 g de extrato seco.

Tabela 2 - Constituintes fenólicos totais presentes nos extratos aquoso e bruto metanólico de *Centella asiatica*.

Extratos	Constituintes fenólicos totais (g/100 g)
aquoso	2,86
bruto metanólico	0,60

#### 4.5 Determinação dos teores de flavonóides

O teor de flavonóides de ambos os extratos de *C. asiatica* é mostrado na Tabela 3. Os valores são apresentados em mg de flavonóides/100 g de extrato seco.

Tabela 3 - Teor de flavonóides dos extratos aquoso e bruto metanólico de *Centella asiatica*.

Extratos	Flavonóides (mg/100g)
aquoso	0,361
bruto metanólico	0,271

#### 4.6 Atividade antioxidante

Ambos os extratos aquoso e bruto metanólico de *C. asiatica* apresentaram capacidade seqüestrante frente ao radical DPPH, com valores de  $CI_{50}$  = a 31,25  $\mu$ g/mL e 37,16  $\mu$ g/mL, respectivamente. O ácido ascórbico e o butil-hidróxi-tolueno (BHT), utilizados como padrões de referência apresentaram valores de  $CI_{50}$  = 2,50  $\mu$ g/mL e 7,58  $\mu$ g/mL, respectivamente.

#### 4.7 Atividade da fosfolipase A<sub>2</sub> em tecido cerebelar de ratos

O extrato aquoso de *C. asiatica* inibiu de maneira dose-dependente, a atividade enzimática da fosfolipase A<sub>2</sub> cálcio independente (iPLA<sub>2</sub>) no tecido cerebelar de ratos, como mostrado na Figura 10. Houve diferença estatisticamente significativa na atividade da iPLA<sub>2</sub> entre os grupos de tratamento quando a concentração foi de 125  $\mu$ g/mL, 250  $\mu$ g/mL, e 500  $\mu$ g/mL, quando comparada entre as concentrações e contra o controle

(amostra de tecido sem a adição do extrato aquoso). Quando a amostra de cerebelo foi submetida ao tratamento com extrato aquoso de *C. asiatica* (500 µg/mL), o valor da inibição da atividade de iPLA<sub>2</sub> foi de 95,74%; para a dose de 250 µg/mL a inibição foi de 85,04% e com a dose de 125 µg/mL foi 38,65%, comparadas à atividade do controle.

A atividade da fosfolipases A<sub>2</sub> citosólica (cPLA<sub>2</sub>), quando tratada com extrato aquoso de *C. asiatica*, também mostrou um padrão de inibição dose dependente para a faixa de 12,5 a 50 µg/mL (25,54 a 63,16% de inibição) (Figura 11). Doses superiores a 50µg/mL parecem produzir uma saturação na inibição desta enzima. A porcentagem de inibição na maior dose testada (500 µg/mL) atingiu 76,83%. A atividade de sPLA<sub>2</sub>, por sua vez, não foi detectada, provavelmente porque ela tem baixa atividade no cerebelo, sendo esta menor que o limite de detecção do método (0,01 pMol/mg protein/min) (dados não mostrados).

#### **4.8 Atividade leishmanicida**

Neste ensaio avaliou-se a possível atividade leishmanicida dos EA e EBM de *C. asiatica* frente às formas promastigotas de *Leishmania amazonenses* e *Leishmania chagasi*, isoladas de pacientes apresentando manifestações clínicas de ambas as patologias. Os resultados obtidos não indicaram atividade leishmanicida dos extratos sobre as formas testadas, visto que estes tiveram valores de concentração de inibição em 50% (CI<sub>50</sub>) superiores a 100 µg/mL para ambos os extratos e em ambas as espécies testadas, enquanto a anfotericina B (fármaco de referência) apresentou valores inferiores a 2 µg/mL, como mostrado na Tabela 4.

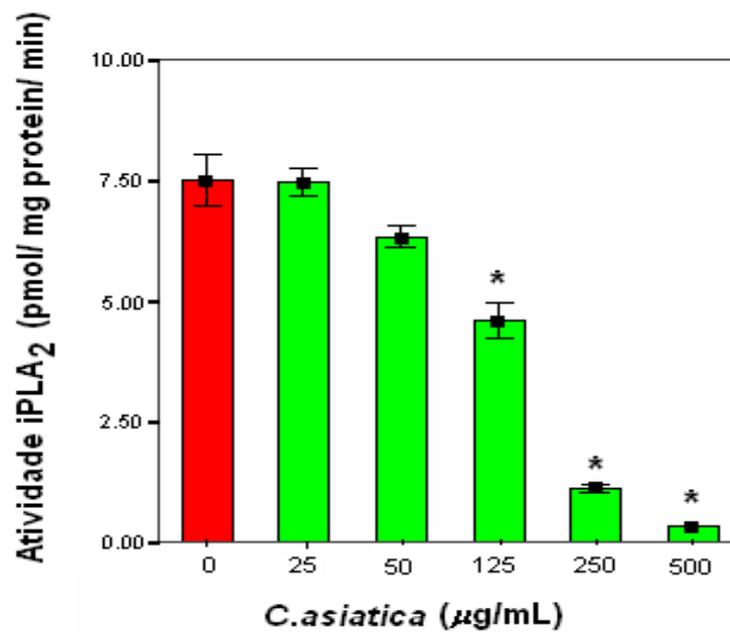


Figura 10 – Efeito inibitório do extrato aquoso de *C. asiatica* sobre a atividade de iPLA<sub>2</sub> em tecido cerebelar de ratos. Dados são expressos como média ± erro padrão da média (n=3). \* p < 0,05 quando comparado com amostra não tratada (controle) (ANOVA, seguida de *Bonferroni*).

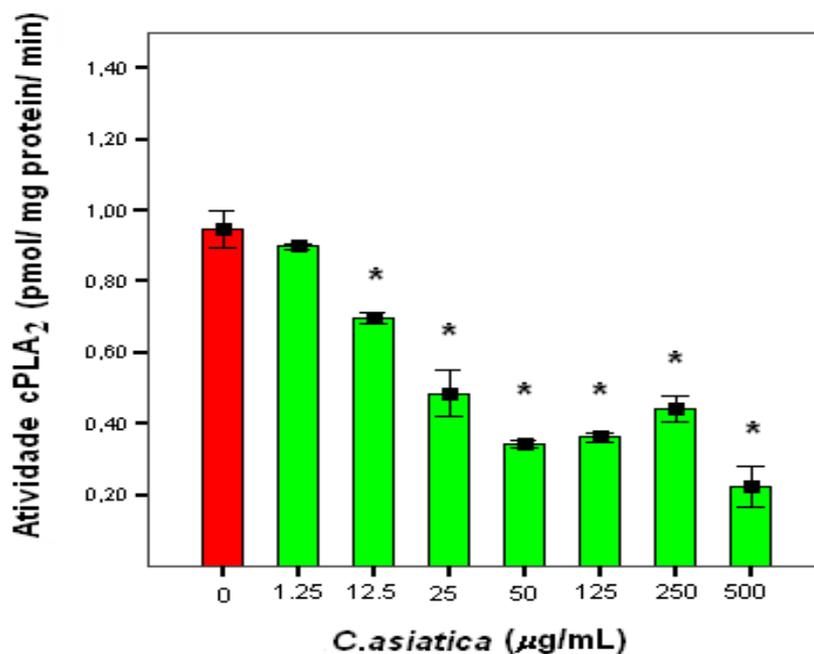


Figura 11 – Efeito inibitório do extrato aquoso de *C. asiatica* sobre a atividade de cPLA<sub>2</sub> em tecido cerebelar de ratos. Dados são expressos como média ± erro padrão da média (n=3). \* p < 0,05 comparado com amostra não tratada (controle) (ANOVA, seguida de *Bonferroni*).

Tabela 4 - Atividade leishmanicida dos extratos aquoso e bruto metanólico de *Centella asiatica* em *L. amazonensis* e *L. chagasi*.

Substância	CI <sub>50</sub> (µg/mL)	
	<i>L. amazonensis</i>	<i>L. chagasi</i>
extrato aquoso	> 100	> 100
extrato bruto metanólico	> 100	> 100
anfotericina B	0,90 ± 0,05	1,90 ± 0,12

#### 4.9 Atividade antimicrobiana

Os extratos aquoso e metanólico de *C. asiatica* foram avaliados quanto ao potencial antimicrobiano frente às cepas de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 90271; *Candida albicans* ATCC 10231; *Staphylococcus aureus* ATCC 29737; *Streptococcus mutans* ATCC 25175, nas concentrações de 125 µg/ mL - 2000 µg/mL. Os extratos não foram efetivos na concentração máxima testada (2000 µg/mL). Desta forma não foi possível estabelecer a concentração mínima inibitória (MIC) para os extratos de *C. asiatica* nas condições testadas, como mostra a Tabela 5.

Tabela 5 - Atividade antimicrobiana dos extratos de *Centella asiatica* pelo método turbidimétrico.

Substância	MIC (µg/mL)			
	<i>S.aureus</i>	<i>S. mutans</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>C. albicans</i>
extrato aquoso	ND	ND	ND	ND
extrato bruto metanólico	ND	ND	ND	ND
penicilina	12,5	-	50	-

Legenda: ND = não determinado.

#### 4.10 Toxicidade aguda

A CL<sub>50</sub> foi calculada para o EA e para o EBM, determinada pela regressão linear entre o logaritmo da dose fornecida e unidades probabilísticas de porcentagem de mortos pelo teste dos probitos. Os resultados obtidos foram superiores a 1000 µg/mL, como mostra a Tabela 6. Portanto, verificou-se que ambos os extratos não demonstraram ser tóxicos, através do modelo de *Artemia salina*. O timol foi utilizado como padrão de referência.

Tabela 6 - Toxicidade dos extratos de *Centella asiatica* sobre *Artemia salina*.

Substância	CL <sub>50</sub> <sup>*</sup> (µg/ml)	Intervalo de confiança (95%)
extrato aquoso	> 1000	1023,7 – 2542,5
extrato bruto metanólico	> 1000	6038,2 – 15168,0
timol	480,2	337,3 – 683,5

\*As amostras foram avaliadas em quadruplicata.

#### 4.11 Atividade citotóxica

Para avaliar a atividade citotóxica do EA de *C. asiatica*, 4 linhagens celulares tumorais e 1 normal foram utilizadas no ensaio, e os valores de CL<sub>50</sub> foram determinados a partir das curvas de dose-resposta. As Figuras 12, 13, 14 e 15 mostram o efeito citotóxico de EA nas linhagens tumorais MDA-MB 231, B<sub>16</sub>F<sub>1</sub>, C<sub>6</sub> e A<sub>549</sub>, respectivamente, através da densidade óptica das células que metabolizaram o 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2-5 difenil tetrazólico) (MTT), em função da concentração de EA testada. A Figura 16 mostra a citotoxicidade do EA na linhagem de células normais de rim de *hamster* (BHK).

O extrato de *C. asiatica* (100 – 1000 µg/mL) demonstrou potencial citotóxico em células das linhagens MDA-MB 231 e C6, pois apresentaram diferenças estatisticamente significativas quando comparados ao grupo controle (Figuras 12 e 14, respectivamente).

Para as células da linhagem B<sub>16</sub>F<sub>1</sub>, o extrato aquoso só demonstrou efetividade na concentração de 1000 µg/mL, para a qual foi verificada uma diferença estatisticamente significativa em relação ao controle (p = 0,0001) (Figura 13). No entanto, para células das linhagens A<sub>549</sub> e BHK, o extrato não foi efetivo nem mesmo na maior concentração testada (1000 µg/mL) (Figura 15 e 16, respectivamente).

Os valores de CI<sub>50</sub> e o percentual de células mortas estabelecidos para o tratamento com extrato aquoso de *C. asiatica* (1000 µg/mL) são mostrados na Tabela 7. O EA demonstrou uma atividade moderada e seletiva contra as linhagens celulares tumorais testadas. As linhagens mais sensíveis foram MDA-MB 231 (carcinoma de mama humano) e B<sub>16</sub>F<sub>1</sub> (melanoma de camundongo) com CI<sub>50</sub> = 648,0 e 698,0 µg/mL, respectivamente. A linhagem C<sub>6</sub> (glioma de rato), por sua vez, apresentou CI<sub>50</sub> = 1000,0 µg/mL. A linhagem B<sub>16</sub>F<sub>1</sub> mostrou uma alta porcentagem de células mortas (96,1%) na maior concentração testada (1000 µg/mL).

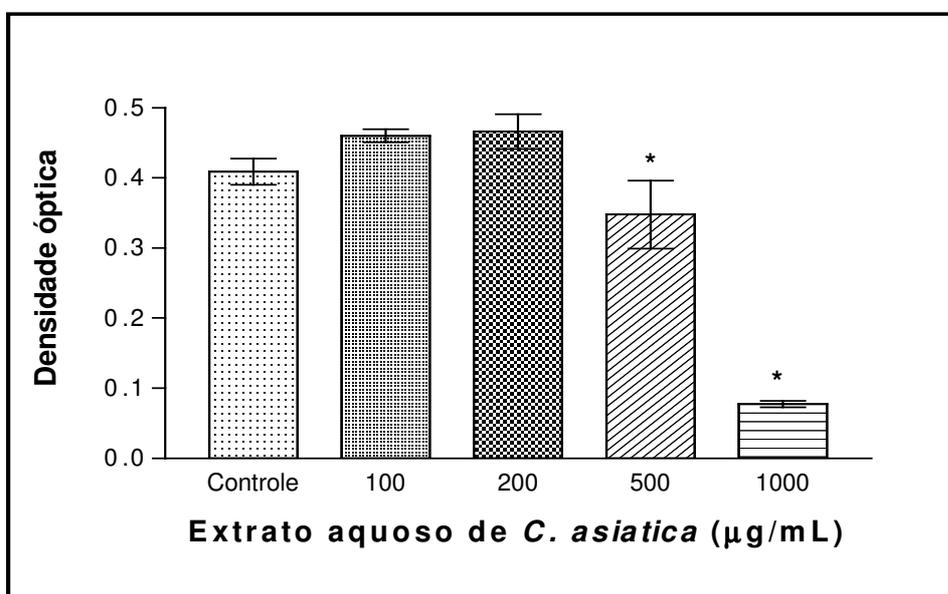


Figura 12 - Efeito citotóxico do EA de *C. asiatica* em células de carcinoma de mama humano (MDA- MB 231). O gráfico ilustra a densidade óptica de células que metabolizaram MTT ( $\lambda = 600$  nm) em cada concentração do extrato (n = 6). \* p < 0,05 comparado ao controle (ANOVA, seguida de *Dunnett*).

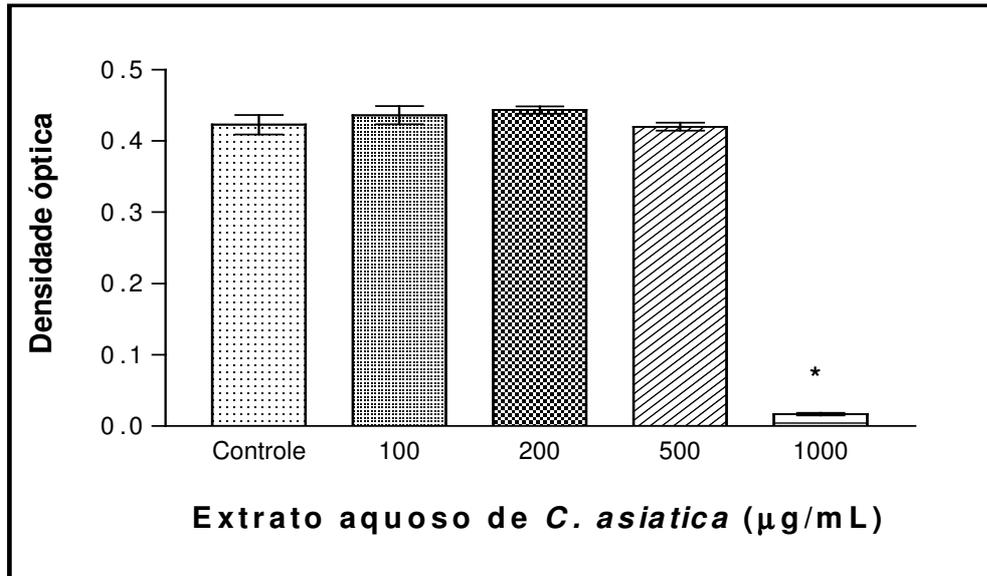


Figura 13 - Efeito citotóxico do EA de *C.asiatica* em células de melanoma de camundongo ( $B_{16}F_1$ ). O gráfico ilustra a densidade óptica de células que metabolizaram MTT ( $\lambda = 600 \text{ nm}$ ) em cada concentração do extrato ( $n = 6$ ). \*  $p < 0,05$  quando comparado ao controle (ANOVA, seguida de *Dunnett*).

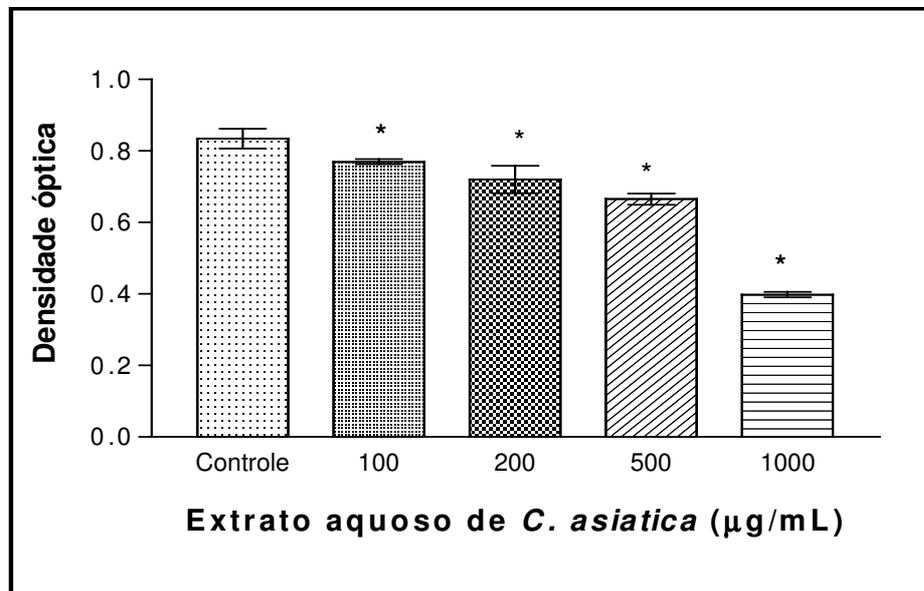


Figura 14 - Efeito citotóxico do EA de *C.asiatica* em células de glioma de rato ( $C_6$ ). O gráfico ilustra a densidade óptica de células que metabolizaram MTT ( $\lambda = 600 \text{ nm}$ ) em cada concentração do extrato ( $n = 6$ ). \*  $p < 0,05$  quando comparado ao controle (ANOVA, seguida de *Dunnett*).

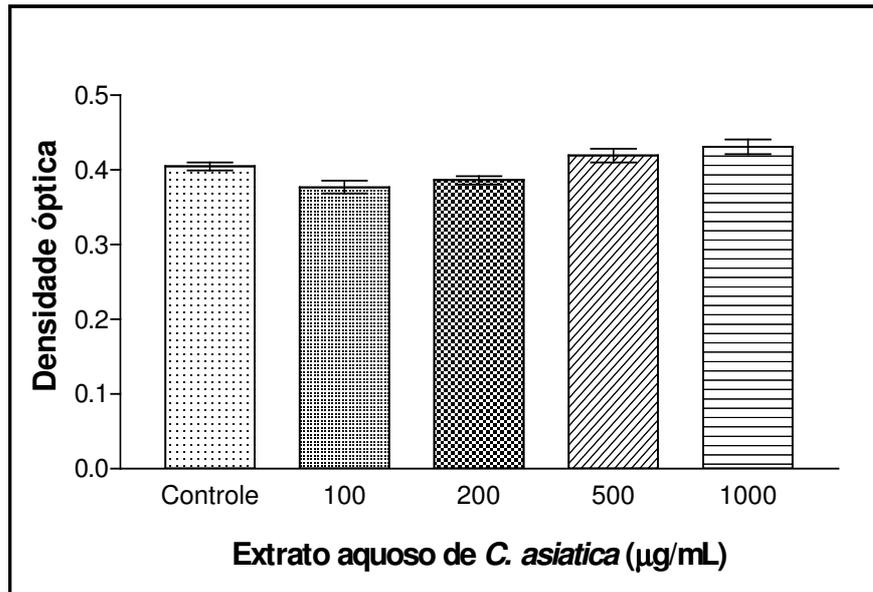


Figura 15 - Efeito citotóxico do EA de *C.asiatica* em células de carcinoma de pulmão humano ( $A_{549}$ ). O gráfico ilustra a densidade óptica de células que metabolizaram MTT ( $\lambda = 600$  nm) em cada concentração do extrato ( $n = 6$ ).

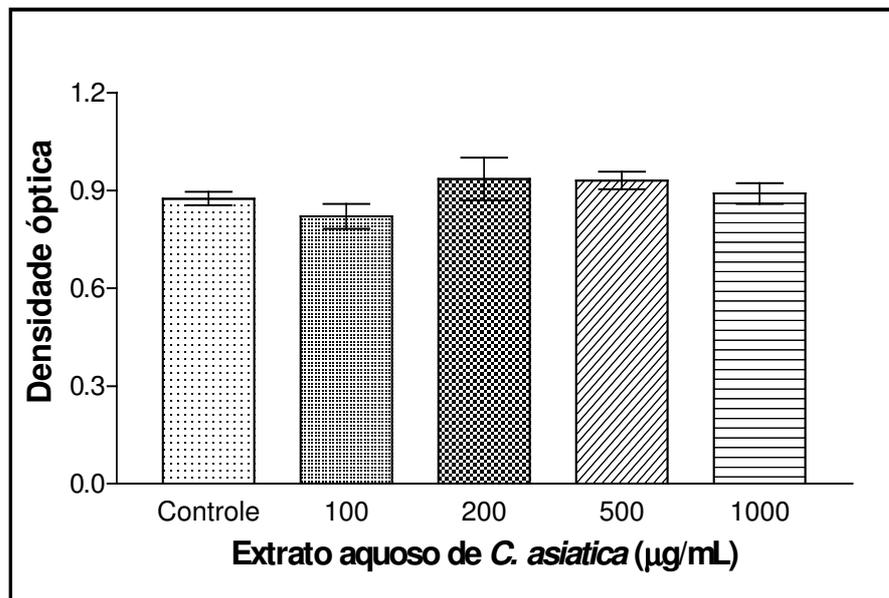


Figura 16 - Efeito citotóxico do EA de *C.asiatica* em células normais de rim de hamster (BHK). O gráfico ilustra a densidade óptica de células que metabolizaram MTT ( $\lambda = 600$  nm) em cada concentração do extrato ( $n = 6$ ).

Tabela 7 - Citotoxicidade do EA de *Centella asiatica* em diferentes linhagens celulares.

	Linhagens celulares	CI <sub>50</sub> (µg/mL)	Porcentagem de células mortas (%)*
Tumorais	B <sub>16</sub> F <sub>1</sub>	698,0	96,1
	MDA– MB 231	648,0	81,1
	C <sub>6</sub>	1000	52,3
	A <sub>549</sub>	>1000	5,3
Normal	BHK	>1000	10,5

n = 6; B<sub>16</sub>F<sub>1</sub> (melanoma de camundongo), MDA MB-231 (carcinoma de mama humano), C6 (glioma de rato), A<sub>549</sub> (carcinoma de pulmão humano), BHK (linhagem normal de rim de *hamster*). \* Percentual de células mortas quando tratadas com EA de *C. asiatica* (1000 µg/mL).

## 4.12 Atividade cicatrizante

### 4.12.1 Análise macroscópica

Durante 10 dias de tratamento foram observadas as características macroscópicas das feridas. O detalhamento da evolução das lesões pôde ser acompanhado anotando-se essas características em fichas (Anexo B) e por fotografias (Figuras 17 e 18).

Através da análise macroscópica, foi observado durante os primeiros 6 dias, um processo de cicatrização eficiente promovido por ambos os cremes supra-citados, quando comparado ao controle negativo (creme base *Lanette*). Porém, nos últimos 4 dias, a presença de secreção foi observada em alguns coelhos, indicando processo infeccioso, o que prejudicou a completa cicatrização da ferida.

#### 4.12.2 Análises histopatológicas e histomorfométricas

As análises histopatológicas e histomorfométricas foram realizadas a fim de comparar quantitativamente a atividade cicatrizante dos cremes-teste e controles. Foram analisadas características como número de células inflamatórias e restos celulares, número de fibroblastos, número de vasos sanguíneos (marcador de irrigação na ferida), área de matriz extracelular (falha na recomposição tecidual), e ainda, área de colágeno. Tais parâmetros foram avaliados e comparados entre os grupos controles e tratados. As Figuras 19 a 22 representam campos microscópicos de amostra do tecido tratado com os cremes contendo os extratos de *C. asiatica*, os quais demonstram o tecido conjuntivo contendo células inflamatórias e restos celulares; área com elevado número de fibroblastos; área com grande quantidade de colágeno, bem como área com grande número de vasos sanguíneos.

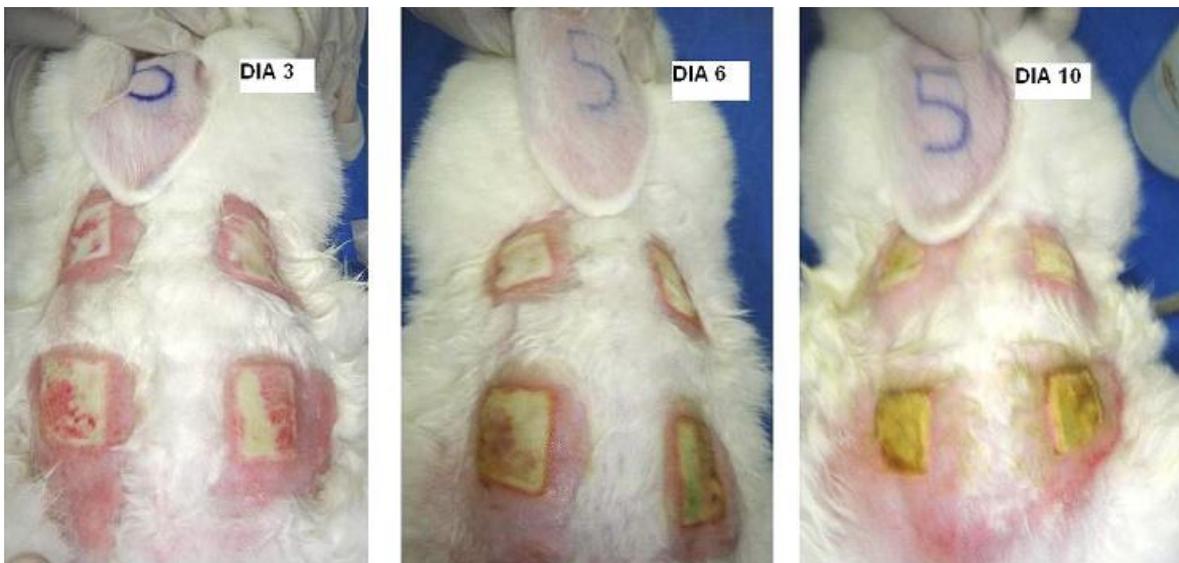


Figura 17 - Evolução das lesões no coelho número 5 (ao qual foi aplicado o creme contendo EBM), nos dias 3, 6 e 10 do experimento.



Figura 18 - Evolução das lesões no coelho número 10 (ao qual foi aplicado o creme contendo EA), nos dias 3, 6 e 10 do experimento.

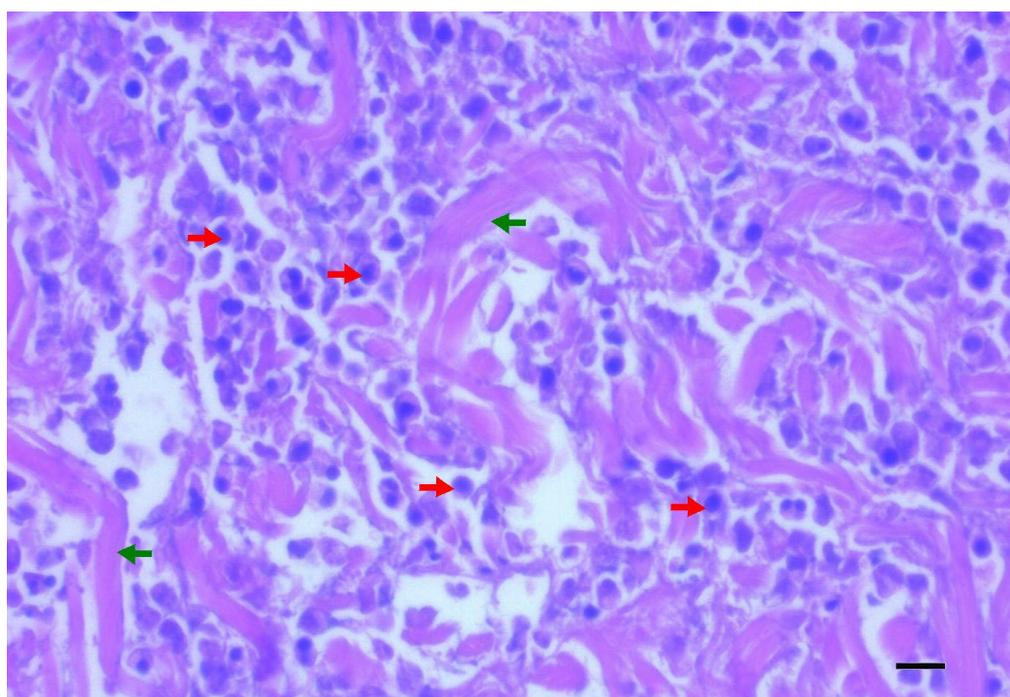


Figura 19 - Tecido conjuntivo de coelho tratado com creme contendo EA 10% exibindo fibras de colágeno (setas verdes) e grande quantidade de células inflamatórias (setas vermelhas). Coloração por hematoxilina-eosina (HE), análise em microscópio óptico (400x). Barra correspondente a  $10\mu m$ .

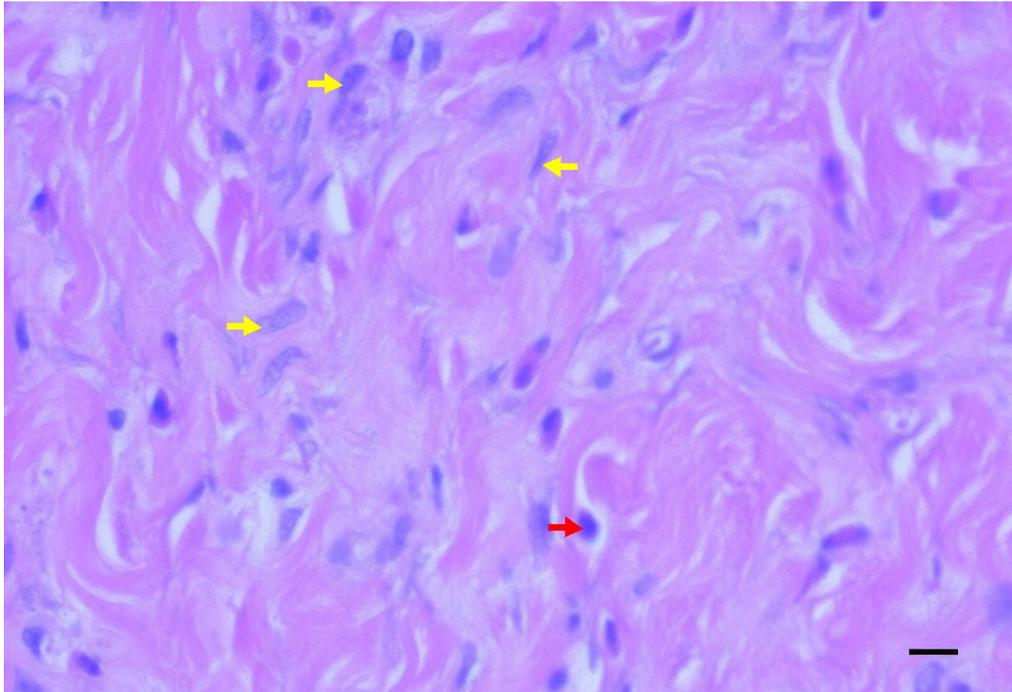


Figura 20 - Tecido conjuntivo de coelho tratado com creme contendo EBM 10% apresentando grande número de fibroblastos (setas amarelas) e poucas células inflamatórias (seta vermelha). Coloração por hematoxilina-eosina (HE), análise em microscópio óptico (400x). Barra correspondente a  $10\mu m$ .

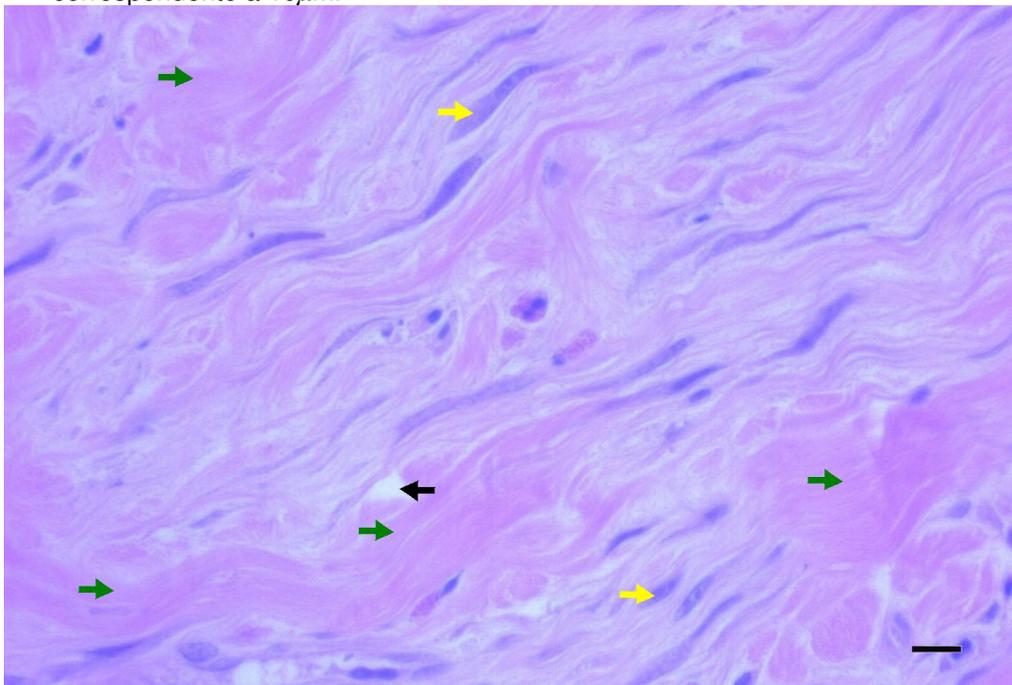


Figura 21 - Tecido conjuntivo de coelho tratado com creme contendo EA 5% apresentando organização, pouca área correspondente a matriz extracelular (seta preta), grande quantidade de fibras de colágeno (setas verde) e fibroblastos (setas amarelas). Coloração por hematoxilina-eosina (HE), análise em microscópio óptico (400x). Barra correspondente a  $10\mu m$ .

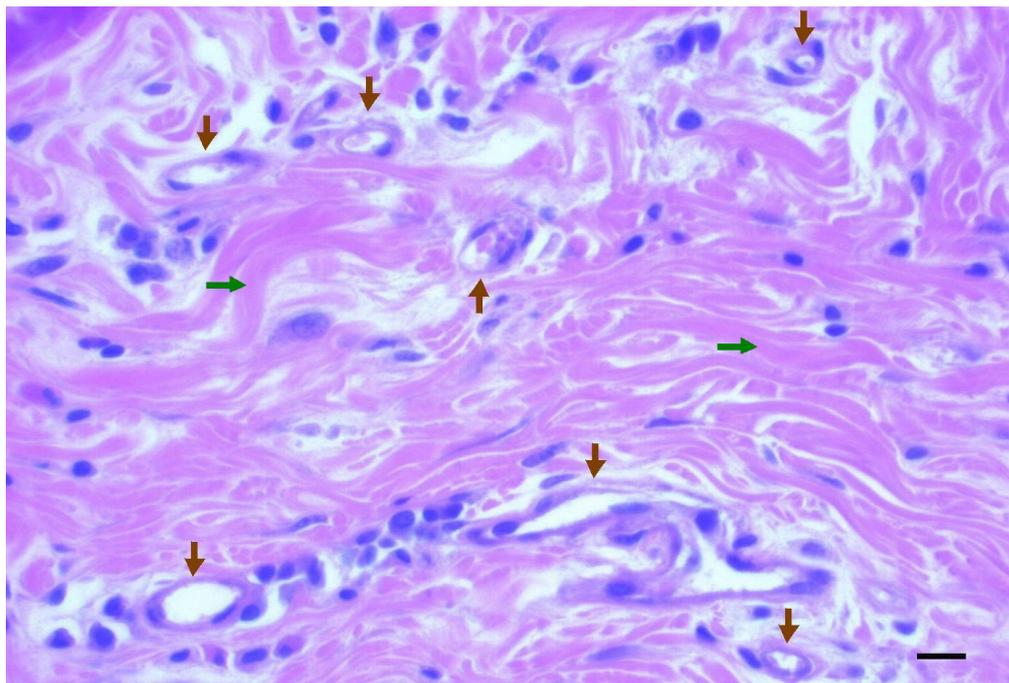


Figura 22 - Tecido conjuntivo de coelho tratado com sulfadiazina apresentando grande número de vasos sanguíneos (setas marrons) e fibras de colágeno (setas verdes). Coloração por hematoxilina-eosina (HE), análise em microscópio óptico (400x). Barra correspondente a  $10\mu m$ .

As análises histopatológica e histomorfométrica mostraram que o tratamento da ferida com o creme contendo 5 e 10% de EA de *C.asiatica* foi eficiente no processo de cicatrização. Destacam-se algumas características: o maior número de fibroblastos para o creme EA 5%, menor número de células inflamatórias de ambas as concentrações comparadas ao controle positivo e, principalmente, a maior área de colágeno de ambas as concentrações comparadas aos controles negativo (creme base) e positivo (sulfadiazina).

Na Figura 23 é possível observar que o tratamento com o extrato aquoso (5 e 10%) reduziu o número de células inflamatórias das amostras de tecido oriundo das feridas dos animais em relação àqueles tratados com a sulfadiazina de prata a 1%. No entanto, somente o creme contendo 10% de EA de *C.asiatica* demonstrou diferença estatisticamente significativa quando comparado ao tratamento com o creme base ( $p = 0,0001$ ).

A Figura 24 mostra que o tratamento com o extrato aquoso (5 e 10%) produziu maior número de fibroblastos das amostras de tecido oriundo das feridas dos animais em relação àqueles tratados apenas com o creme-base. Entretanto, somente a concentração

5% apresentou diferença estatisticamente significativa em relação ao tratamento com a sulfadiazina de prata a 1%.

A Figura 25 mostra que o tratamento com o extrato aquoso (5 e 10%) promoveu vascularização das amostras de tecido oriundo das feridas dos animais similar ao controle negativo (creme-base), mas este efeito foi estatisticamente diferente daquele provocado pelo controle positivo (sulfadiazina) ( $p = 0,0001$ ).

Foi observada diferença estatisticamente significativa na área de matriz extracelular, a qual foi menor nos cremes contendo EA, como mostra a Figura 26. Contrariamente, foi verificado um aumento estatisticamente significativo quanto à presença de fibras colágenas produzido pelo tratamento com o extrato aquoso (ambas concentrações) em relação aos controles: creme-base e sulfadiazina, como mostra a Figura 27.

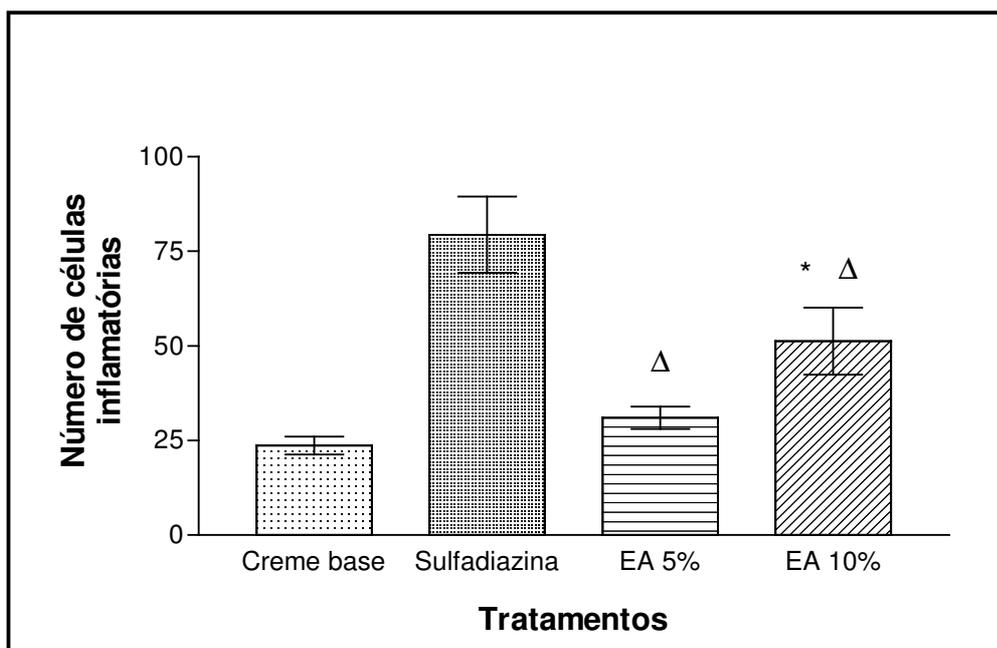


Figura 23 - Número de células inflamatórias das amostras de tecido oriundo das feridas dos animais tratadas com creme contendo 5 e 10% de EA de *C.asiatica*, creme base e sulfadiazina de prata 1%. Dados são expressos como média  $\pm$  erro padrão da média ( $n = 5$ /grupo). \*  $p < 0,05$  comparado ao controle negativo (creme base).  $\Delta$   $p < 0,05$  comparado ao controle positivo (sulfadiazina) (ANOVA, seguida de *Tukey*).

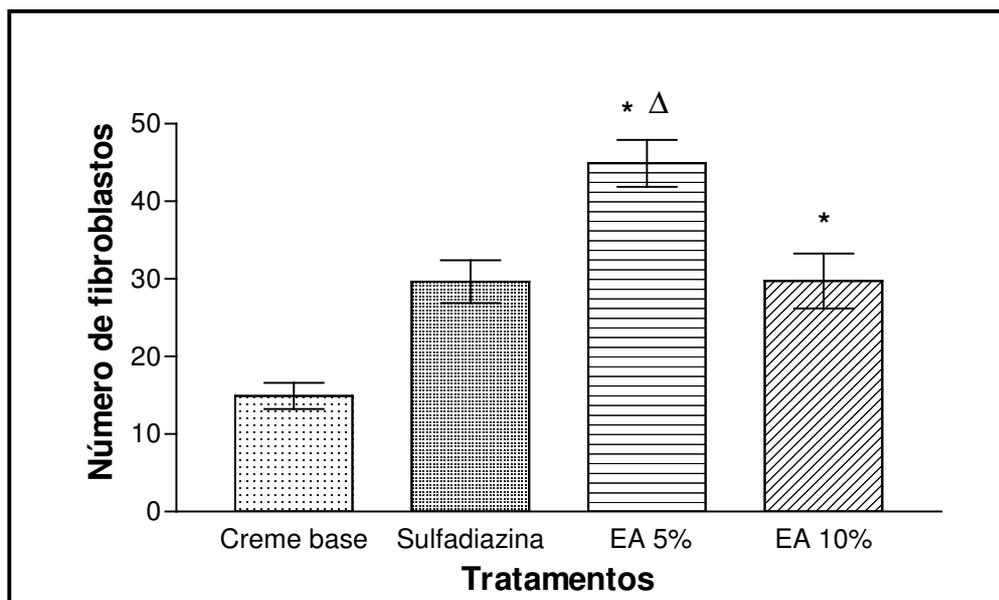


Figura 24 - Número de fibroblastos das amostras de tecido oriundo das feridas tratadas com creme contendo 5 e 10% de EA de *C.asiatica*, creme base e sulfadiazina de prata 1%. Dados são expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (n=5/grupo). \*  $p < 0,05$  comparado ao controle negativo (creme base).  $\Delta p < 0,05$  comparado ao controle positivo (sulfadiazina) (ANOVA, seguida de *Tukey*).

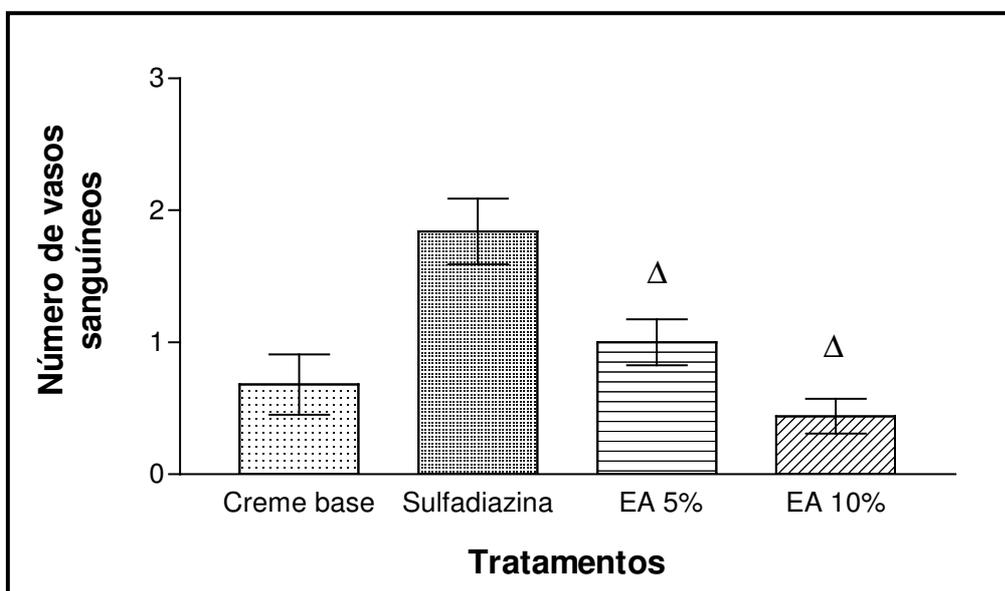


Figura 25 - Número de vasos sanguíneos das amostras de tecido oriundas das feridas tratadas com creme contendo 5 e 10% de EA de *C.asiatica*, creme base e sulfadiazina de prata 1%. Dados são expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (n=5/grupo).  $\Delta p < 0,05$  comparado ao controle positivo (sulfadiazina) (ANOVA, seguida de *Tukey*).

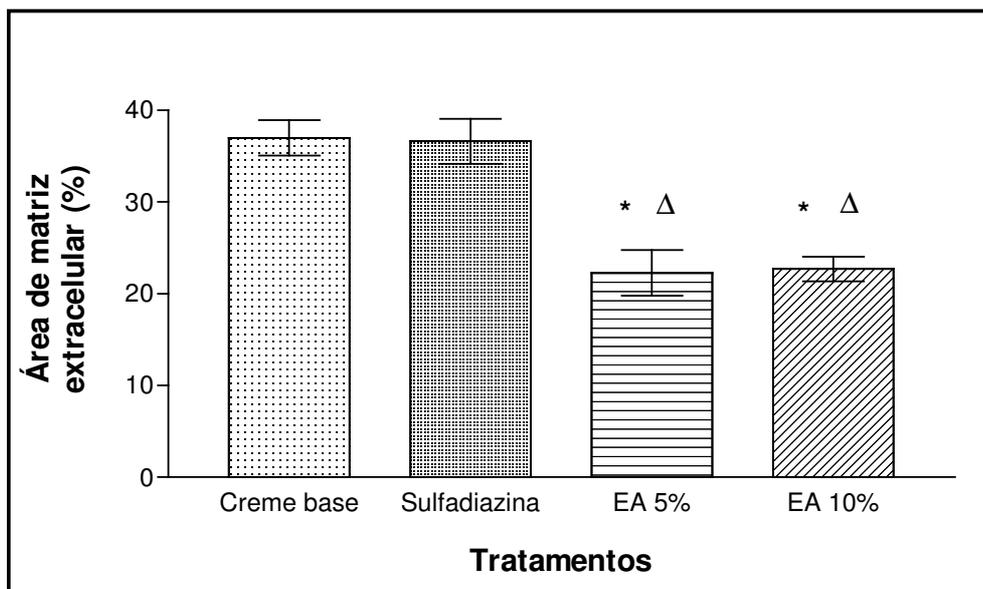


Figura 26 - Porcentagem de campo microscópico ocupada pela área de matriz extracelular em amostras de tecido oriundo das feridas tratadas com creme contendo 5 e 10% de EA de *C.asiatica*, creme base e sulfadiazina de prata 1%. Dados são expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (n=5/grupo)  $p < 0,05$  comparado ao controle negativo (creme base).  $\Delta p < 0,05$  comparado ao controle positivo (sulfadiazina) (ANOVA, seguida de *Tukey*).

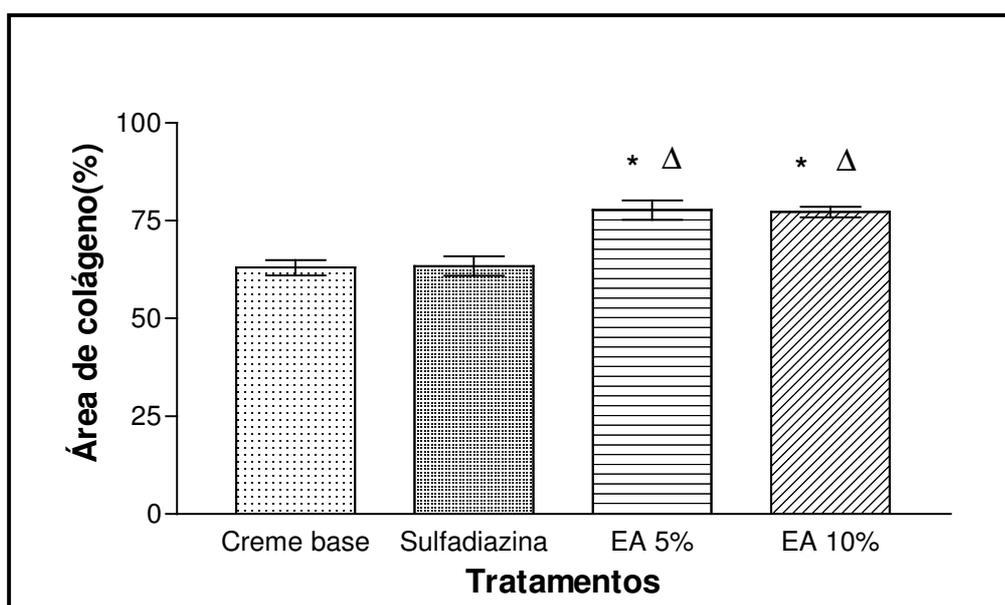


Figura 27 - Porcentagem de campo microscópico ocupada pela área de células contendo fibras de colágeno em amostras de tecido oriundo das feridas tratadas com creme contendo 5 e 10% de EA de *C.asiatica*, creme base e sulfadiazina de prata 1%. Dados são expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (n=5/grupo). \*  $p < 0,05$  comparado ao controle negativo (creme base).  $\Delta p < 0,05$  comparado ao controle positivo (sulfadiazina) (ANOVA, seguida de *Tukey*).

As análises histopatológica e histomorfométrica mostraram que o tratamento da ferida com o creme contendo 5 e 10% de EBM de *C.asiatica* também foi eficiente no processo de cicatrização. Destacam-se algumas características: o maior número de fibroblastos, menor número de células inflamatórias comparadas ao controle positivo e, principalmente, a maior área de colágeno do creme contendo EBM a 10% comparado à ambos os controles.

Na Figura 28 é possível observar que o tratamento com o extrato aquoso (5 e 10%) reduziu o número de células inflamatórias das amostras de tecido oriundo das feridas dos animais em relação àqueles tratados com a sulfadiazina de prata a 1%. No entanto, não houve diferença estatisticamente significativa quando ambas as concentrações foram comparadas ao creme base.

A Figura 29 mostra que o tratamento com o extrato bruto metanólico (5 e 10%) produziu maior número de fibroblastos nas amostras de tecido oriundo das feridas dos animais em relação àqueles tratados apenas com o creme base. Ambas as concentrações testadas apresentaram diferença estatisticamente significativa em relação ao tratamento com a sulfadiazina de prata a 1%.

A Figura 30 mostra que o tratamento com o extrato bruto metanólico (5 e 10%) promoveu vascularização das amostras de tecido oriundo das feridas dos animais similar ao controle negativo (creme base). No entanto, a concentração 5% apresentou diferença estatisticamente significativa em relação ao tratamento com a sulfadiazina de prata a 1%. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os tratamentos com o creme EBM 10% e a sulfadiazina.

Foi observada diferença estatisticamente significativa na área de matriz extracelular, a qual foi menor na concentração de 10% no creme contendo EBM, como mostra a Figura 31. Contrariamente, foi verificado um aumento estatisticamente significativo quanto à presença de fibras colágenas produzido pelo tratamento com o extrato bruto metanólico (concentração de 10%) em relação aos controles: creme-base e sulfadiazina, como mostra a Figura 32.

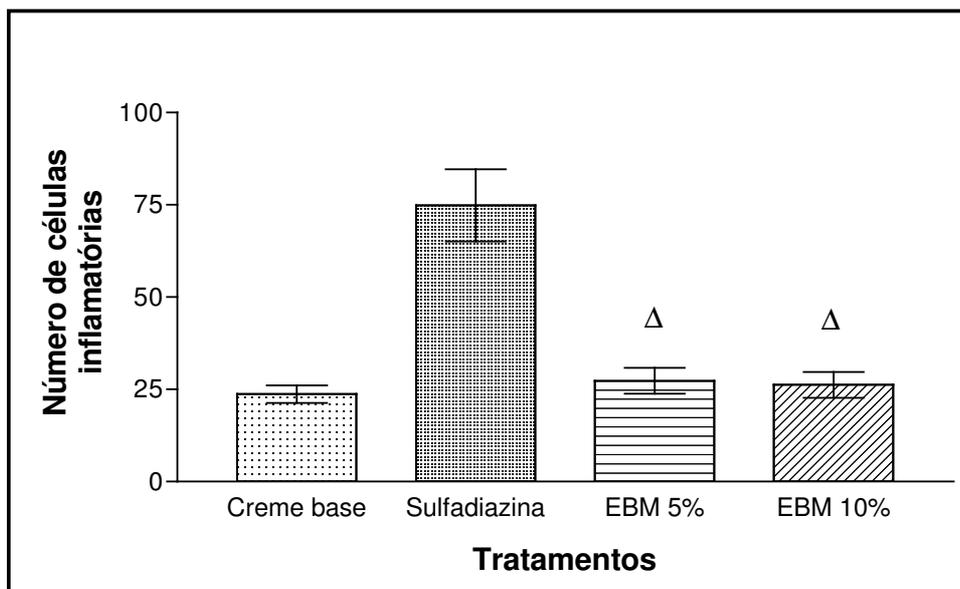


Figura 28 - Número de células inflamatórias das amostras de tecido oriundo das feridas tratadas com creme contendo 5 e 10% de EBM de *C.asiatica*, creme base e sulfadiazina de prata 1%. Dados são expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (n=5/grupo).  $\Delta$   $p < 0,05$  comparado ao controle positivo (sulfadiazina) (ANOVA, seguida de *Tukey*).

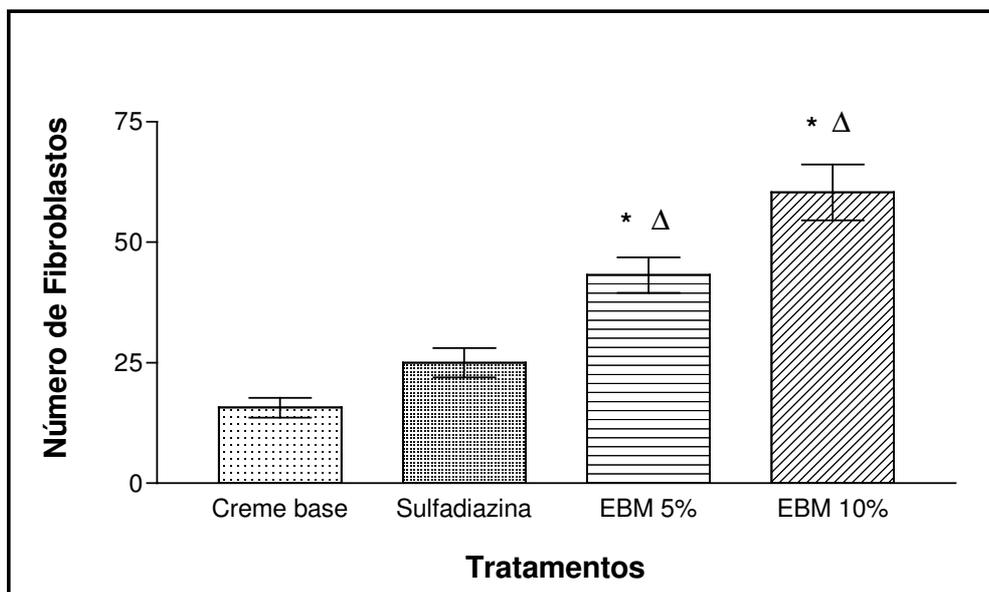


Figura 29 - Número de fibroblastos das amostras de tecido oriundo das feridas tratadas com creme contendo 5 e 10% de EBM de *C.asiatica*, creme base e sulfadiazina de prata 1%. Dados são expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (n=5/grupo). \*  $p < 0,05$  comparado ao controle negativo (creme base).  $\Delta$   $p < 0,05$  comparado ao controle positivo (sulfadiazina) (ANOVA, seguida de *Tukey*).

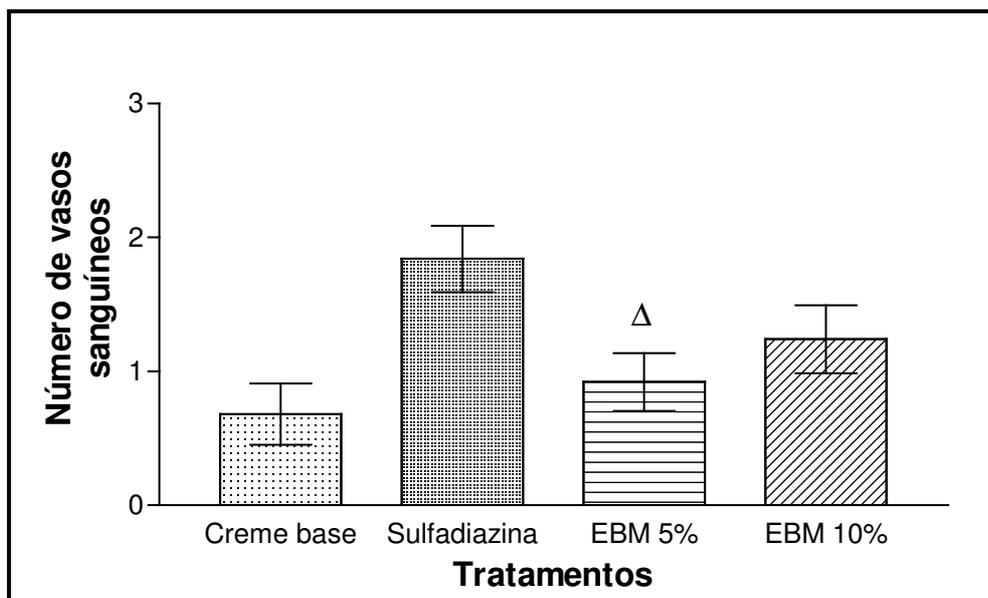


Figura 30 - Número de vasos sanguíneos das amostras de tecido oriundo das feridas tratadas com creme contendo 5 e 10% de EBM de *C.asiatica*, creme base e sulfadiazina de prata 1%. Dados são expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (n=5/grupo).  $\Delta$  p < 0,05 comparado ao controle positivo (sulfadiazina) (ANOVA, seguida de *Tukey*).

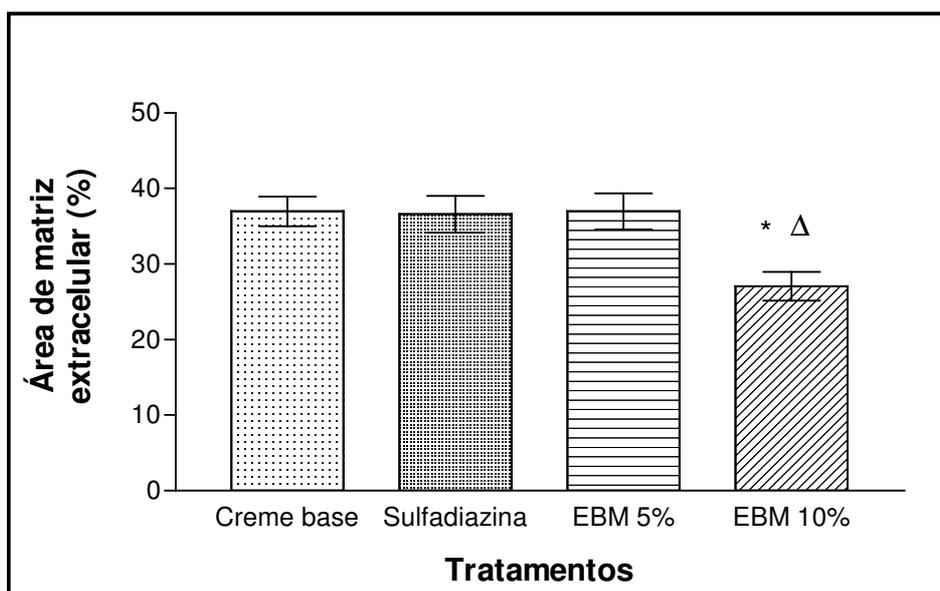


Figura 31 - Porcentagem de campo microscópico ocupada pela área de matriz extracelular em amostras de tecido oriundo das feridas tratadas com creme contendo 5 e 10% de EBM de *C.asiatica*, creme base e sulfadiazina de prata 1%. Dados são expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (n=5/grupo). \* p < 0,05 comparado ao controle negativo (creme base).  $\Delta$  p < 0,05 comparado ao controle positivo (sulfadiazina) (ANOVA, seguida de *Tukey*).

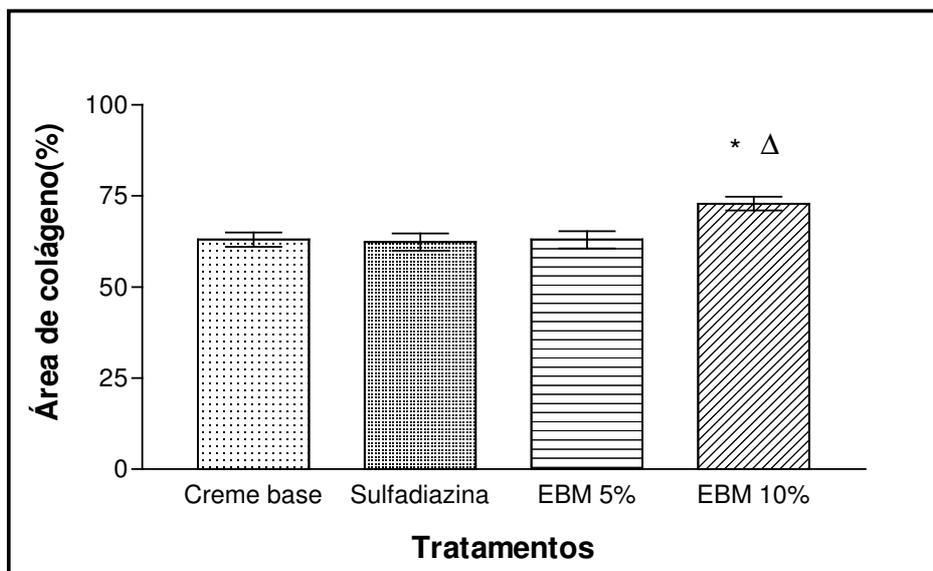


Figura 32 - Porcentagem de campo microscópico ocupada pela área de células contendo fibras de colágeno em amostras de tecido oriundo das feridas tratadas com creme contendo 5 e 10% de EBM de *C. asiatica*, creme base e sulfadiazina de prata 1%. Dados são expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (n=5/grupo). \*  $p < 0,05$  comparado ao controle negativo (creme base).  $\Delta p < 0,05$  comparado ao controle positivo (sulfadiazina) (ANOVA, seguida de *Tukey*).

## 5 DISCUSSÃO

As plantas são fontes importantes de produtos naturais biologicamente ativos, muitos dos quais constituem modelos para a síntese de um grande número de fármacos. Os produtos encontrados na natureza revelam uma grande diversidade em termos de estruturas e propriedades físico-químicas e biológicas (WALL e WANI, 1996).

Atualmente, o desenvolvimento de fitoterápicos tem recebido maior atenção tanto por parte da comunidade científica, quanto pelas indústrias farmacêuticas, visto que apenas 8% das espécies vegetais da flora brasileira foi estudada em busca de compostos bioativos (PERECIN et al., 2002). Apesar da grande aceitação e seu extenso uso terapêutico pela população em geral, principalmente a de baixa renda, as plantas medicinais têm sido relativamente pouco avaliadas cientificamente, sendo, dessa forma, necessário estudos mais detalhados no sentido de verificar e assegurar sua qualidade, segurança e eficácia.

### 5.1 Análise citogenética

A correta identificação da espécie é necessária aos estudos científicos de uma planta e importante para seu uso seguro e eficaz. A espécie deste trabalho foi identificada como *Centella asiatica* (L.) Urban e uma exsicata foi depositada no herbário local (CESJ-UFJF). Por a planta apresentar diversas sinonímias, ainda existem dificuldades para uma identificação padronizada desta planta.

No *campus* da Universidade Federal de Juiz de Fora é encontrada a espécie *Centella erecta* (L.f) Fernald. Esta espécie pode ser considerada como sinonímia de *Centella asiatica* (L.) Urb., segundo Lorenzi e Matos (2002). No *site* w3Tropicos ([www.mobot.org](http://www.mobot.org)) (2006), mantido atualizado pelo *Missouri Botanical Garden*, a descrição de *Centella asiatica* (L.) Urb. (inicialmente descrita em 1879) possui *Centella erecta* como

sinonímia. Porém, quando observamos a descrição de *Centella erecta* (L.f) Fernald (descrita em 1940), esta espécie se mantém separada de *C. asiatica*.

Embora tenha as mesmas características morfológicas e contenha as mesmas substâncias ativas, suspeita-se que as populações sul-americanas de *C. asiatica* (ou *C. erecta*) tenham número cromossômico diferente da espécie oriunda da região asiática, o que poderia indicar que são espécies diferentes. Segundo Consolaro (1996) - que trabalhou com espécies coletadas no Paraná e Santa Catarina - *Centella erecta* tem características hexaplóides ( $6n=54$ ), enquanto Constance (1991) afirma que *C. asiatica* é diplóide ( $2n=26$ ) e restrita ao continente asiático, sendo o número de cromossomos diferentes para ambas as sinonímias.

No intuito de esclarecer a taxonomia e contribuir para estudos futuros, foi realizada a avaliação citogenética. Houveram dificuldades, no entanto, na obtenção de uma metáfase na qual os cromossomos estivessem devidamente espalhados, o que facilitaria a contagem. Apesar disso, depois de determinadas as condições otimizadas, foi possível visualizar algumas metáfases mitóticas, que, embora não apresentassem todos os cromossomos perfeitamente espalhados, foi possível realizar uma estimativa do número cromossômico. O número estimado foi superior a 48; o que corrobora os achados de Consolaro (1996), que foi de 54 cromossomos.

Para sanar as dúvidas quanto a identificação das espécies, sugere-se um estudo comparativo entre indivíduos provenientes da Ásia e aqueles do Brasil, com ensaios de citogenética para contagem de cromossomos, bandeamento e quantificação de DNA por citometria de fluxo. Muitos estudos realizados fora da Ásia com a planta (DARNIS et al., 1979; GRIMALDI et al., 1990; CESARONE et al., 2001; JORGE e JORGE, 2005) utilizaram a nomenclatura de *C. asiatica* como a espécie de estudo. Desta maneira, sendo confirmada a segregação entre as espécies *Centella asiatica* e *Centella erecta*, através de provas genéticas como diferente número cromossômico, estudos anteriores deverão ser reavaliados.

Apesar de acreditar que *Centella asiatica* e *Centella erecta* sejam espécies distintas (baseado em características genéticas), este trabalho segue a classificação taxonômica usada internacionalmente e sugerida por Souza e Lorenzi (2005), onde estas espécies são consideradas sinonímias.

## 5.2 Triagem fitoquímica

A química dos produtos naturais representa, dentro da área de pesquisa com plantas medicinais, um ponto de grande importância e valor, na medida em que, por meio dos métodos utilizados nessa área pode-se realizar tanto o isolamento e a purificação de novos compostos quanto a correta determinação estrutural e posterior síntese total ou parcial. Os avanços nessa área são enormes, especialmente nas últimas décadas. Nesse contexto, a triagem fitoquímica representa o primeiro passo e é um importante instrumento na detecção de possíveis constituintes com atividade biológica.

A pesquisa fitoquímica tem por objetivo conhecer os constituintes químicos presentes em espécies vegetais. Quando não se dispõe de estudos químicos sobre a espécie de interesse, a análise fitoquímica preliminar pode indicar os grupos de metabólitos secundários relevantes na mesma. Caso o interesse esteja restrito a uma classe específica de constituintes ou às substâncias responsáveis por uma determinada atividade biológica, a investigação deverá ser direcionada para o isolamento e a elucidação estrutural das mesmas (FALKENBERG et al., 2004). As reações químicas realizadas para a triagem fitoquímica permitem verificar a presença de classes de substâncias, oriundas do metabolismo secundário das plantas. Porém, essas reações são, geralmente, inespecíficas e ocorrem em grupos funcionais ou estruturas comuns a várias substâncias.

A triagem fitoquímica de *Centella asiatica* demonstrou a presença de flavonóides, heterosídeos triterpênicos, cumarinas, taninos e saponinas. Tais resultados estão de acordo com Leung e Foster (1998) e com a bibliografia disponível para a planta (SIMÕES et al., 2004; *Centella asiatica* - Monograph, 2007). Entretanto, esses trabalhos avaliaram também a presença de aminoácidos e óleos voláteis. Neste estudo, essas substâncias não foram avaliadas, devido ao volume de material necessário para a realização do ensaio e às diferenças entre os protocolos utilizados.

### 5.3 Determinação de asiaticosídeo (ASA) por HPLC

A determinação da composição de extratos naturais é bastante trabalhosa, pois um extrato vegetal bruto é uma mistura muito complexa contendo, algumas vezes, centenas ou milhares de metabólitos diferentes. Desta forma, é necessário elencar dentre os componentes biologicamente ativos, pelo menos um para ser utilizado como biomarcador, o qual deverá ser quantificado. Assim sendo, uma rápida detecção dos biomacadores exerce um papel estratégico nas investigações fitoquímicas de extratos bruto. Portanto, poderá ser realizada uma triagem eficiente desses extratos (a detecção do constituinte ativo) através do emprego de vários métodos de detecção, dentre eles a cromatografia líquida de alta eficiência.

A técnica cromatográfica permitiu identificar o asiaticosídeo, uma saponina triterpênica, como principal constituinte nos EA, EBM e FH de *C.asiatica*. Após a padronização e validação das condições analíticas, as concentrações de asiaticosídeo determinadas foram: a) extrato aquoso: 210,8 µg/ mL; b) extrato bruto metanólico: 177,3 µg/ mL e c) fração hexânica: 143,2 µg/ mL. Para o extrato aquoso (EA), o teor de asiaticosídeo presente na amostra representou 84,31% do total da alíquota de extrato; para o extrato bruto metanólico (EBM) o teor foi de 70,93% e para a fração hexânica (FH) foi 57,28%. Os extratos com os maiores teores de ASA (EA e EBM) foram selecionados para a realização dos ensaios biológicos.

Em uma extração utilizando-se solventes polares (como a água), o ASA (molécula também polar) é extraído com maior eficiência. Desta forma, os resultados de quantificação de ASA nos extratos corresponderam à expectativa prévia de que o EA possuísse maior quantidade deste biomarcador. Trabalhos realizados por outros grupos de pesquisadores (INAMDAR et al., 1996; KIM et al., 2004) empregaram a HPLC para quantificar o ASA presente em seus extratos e em padrões comerciais. O tempo de corrida nestes trabalhos foi de 35 minutos, com o ASA sendo detectado aos 13 minutos. Pela metodologia do presente estudo, o tempo de corrida foi de 9 minutos e o ASA foi detectado aos 0,821 minutos, o que confere a este método uma vantagem importante: análise rápida de várias amostras ao longo do dia. Apesar do biomarcador quantificado ser o ASA, substâncias com o mesmo núcleo principal que esta substância, tais como o

madecassosídeo e o ácido asiático, podem estar incluídos na quantificação. Entretanto, o perfil cromatográfico dos extratos mostrou boa resolução no pico com tempo de 0,821 minutos, sendo desta maneira considerado a quantificação apenas do asiaticosídeo. Cheng et al. (2004) também verificaram a concentração de ASA em seus extratos por HPLC e identificaram uma concentração de apenas 4% deste biomarcador no extrato aquoso. Este valor pode ser, em parte, justificado pelo tempo de extração utilizado pelos pesquisadores, na qual o princípio ativo da planta foi extraído em apenas 1 hora. A alíquota de EA deste estudo apresentou 84,31% de ASA, entretanto a extração durou 24 horas e o extrato foi concentrado através da liofilização. Vale ressaltar que existem fatores externos (época de colheita, tamanho das folhas, luminosidade, dentre outros) e internos (tempo e técnica de extração) que podem influenciar no teor de princípios ativos presentes nas plantas e seus extratos.

#### **5.4 Quantificação dos constituintes fenólicos totais**

O resultado do doseamento de constituintes polifenólicos, através da metodologia preconizada pela *Association of Official Analytical Chemists* (A.O.A.C. - 1960), foi de 2,86 g/100g e 0,6g/100g para os extratos aquoso e bruto metanólico de *C. asiatica*, respectivamente. De acordo com Singleton (1981), este método quantifica principalmente taninos de alto peso molecular, como por exemplo taninos hidrolisáveis e outros polifenóis que tenham a molécula do ácido gálico em sua estrutura, absorvendo energia no comprimento de onda de 760 nm, faixa de absorção de taninos de alto peso molecular. De fato, os valores encontrados neste estudo estão de acordo com os resultados encontrados por Zainol et al. (2003), que obtiveram valores de 3,23 a 11,7 g/100g para diferentes partes de *C. asiatica*.

## 5.5 Determinação dos teores de flavonóides

O teor de flavonóides foi quantificado para ambos os extratos (EA e EBM). Os resultados demonstraram 0,361g/100g e 0,271g/100g de extrato aquoso e bruto metanólico, respectivamente. Flavonóides são moléculas altamente polares, de baixo peso molecular e que absorvem energia na faixa de 420 nm. A água é um solvente polar, e, portanto, capaz de extrair moléculas polares de plantas, como os heterosídeos. Como os resultados indicam, o solvente mais polar (água), extraiu melhor os flavonóides de *C. asiatica*. Os resultados sugerem que os constituintes flavônicos desta planta estejam na forma de heterosídeos, visto que estudos anteriores mostraram que estas moléculas podem ser encontradas na natureza no estado livre ou na forma de glicosídeos (BRUNETON, 1991; ROBBERS et al., 1996; ZUANAZZI, 2000).

## 5.6 Atividade antioxidante

O envelhecimento é um processo natural, que representa diversas mudanças morfológicas e bioquímicas que ocorrem da maturidade para a senescência, deixando o organismo mais vulnerável às doenças e à toxicidade, eventualmente levando a morte. De acordo com a hipótese do estresse oxidativo de envelhecimento, a perda da capacidade funcional associada à senescência é devido à acumulação de danos oxidativos moleculares (SOHAL et al., 2002) pelos radicais livres tóxicos produzidos durante a respiração normal. Radicais livres foram anteriormente reportados como sendo capazes de danificar muitos componentes celulares como proteínas, lípidos e DNA (DEAN et al., 1997; HAMILTON et al., 2001).

Para proteger as células dos danos oxidativos por oxidantes, produzidos durante o metabolismo do oxigênio, um sistema antioxidante é usado por organismos aeróbicos. Os principais antioxidantes como superóxido desmutase (SOD), catalase, glutathione peroxidase (GSH-Px), glutathione, ácido ascórbico e tocoferol são importantes para a

proteção celular devido a sua habilidade em eliminar radicais livres, como as espécies reativas de oxigênio (ERO ou ROS – *Reactive Oxygen Species*) (YOUNG e WOODSIDE, 2001). Atualmente, existe um interesse crescente nas funções bioquímicas de antioxidantes naturais contidos em vegetais, frutas e plantas medicinais, que podem ser candidatos à prevenção do dano oxidativo, melhorando, por exemplo, a memória.

A oxidação está presente no metabolismo normal de organismos aeróbicos e, desta maneira, os radicais livres são produzidos naturalmente, ou mesmo por alguma disfunção biológica. O excesso de radicais livres, no entanto, provoca efeitos prejudiciais, tais como a peroxidação dos lípides de membrana, agressão às proteínas dos tecidos e das membranas, às enzimas, carboidratos e DNA (HUSAIN et al., 1987), sendo relacionado com diversas patologias. Componentes com propriedades redutoras presentes em plantas, como os polifenóis e os flavonóides, têm despertado o interesse da comunidade científica principalmente por agir eliminando radicais livres em organismos, e desta forma, prevenindo doenças e promovendo a saúde.

Ambos os extratos aquoso e bruto metanólico de *C. asiatica* apresentaram capacidade seqüestrante frente ao radical DPPH, produzindo  $CI_{50} = 31,25 \mu\text{g/mL}$  e  $CI_{50} = 37,16 \mu\text{g/mL}$ , respectivamente. Ácido ascórbico e o BHT, utilizados como padrões, produziram  $CI_{50} = 2,50 \mu\text{g/mL}$  e  $CI_{50} = 7,58 \mu\text{g/mL}$ , respectivamente. Tais resultados estão de acordo com Subathra et al. (2005), que demonstraram que *C. asiatica* previne o dano oxidativo, presente em diversas neuropatogênias incluindo derrame, doença de *Parkinson* e doença de *Alzheimer*, melhorando o estado antioxidante neurológico.

Tanto os constituintes fenólicos quanto os flavonóides têm capacidade redutora frente a radicais livres. Desta forma, os resultados de constituintes fenólicos totais, teores de flavonóides e atividade antioxidante sugerem a ocorrência de sinergismo destas substâncias quanto ao potencial seqüestrante avaliado, em ambos os extratos, visto que a atividade antioxidante apresentou valores promissores comparados aos padrões (substâncias puras). Os resultados sugerem que a atividade antioxidante de ambos os extratos é justificada pela elevada concentração de constituintes fenólicos (dentre eles o asiaticosídeo presente em alta concentração) somada ao teor de flavonóides presentes nestes extratos.

## 5.7 Atividade da fosfolipase A<sub>2</sub> em tecido cerebelar de ratos

Produtos naturais têm sido usados para melhorar a memória e o aprendizado e para tratar doenças neurodegenerativas em países da Ásia por muitos anos. Entretanto, existe uma carência de informações científicas que comprovem a efetividade destes. Estudos que avaliam o uso de plantas medicinais e seus metabólitos no tratamento de doenças neurodegenerativas estão crescendo, especialmente para *Centella asiatica*. Rao et al. (2005) mostraram que o tratamento com *C. asiatica* durante o período pós-natal aumenta o aprendizado e a memória em ratos, enquanto Kim et al. (2004) testaram o ácido asiático *in vitro* e *in vivo* e descobriram que este constituinte aumenta a síntese de acetilcolina. Adicionalmente, derivados de asiaticosídeo (INHEE et al., 1999) e ácido asiático (SANG-SUP et al., 2000) mostraram efeitos protetores contra a neurotoxicidade induzida pelo peptídeo  $\beta$ -amilóide.

Entender a função de diferentes enzimas em neurônios é importante para se propor um papel para essas enzimas em diversas doenças neuropsiquiátricas. O extrato aquoso de *C. asiatica* melhorou de maneira dose-dependente a capacidade e, ainda, regularizou os níveis cerebrais de malondialdeído, catalase e glutathione em um modelo experimental da doença de *Alzheimer* em ratos (KUMAR e GUPTA 2003). Investigações clínicas revelaram também que em algumas doenças neuropsiquiátricas, a atividade da PLA<sub>2</sub> está aumentada (GATTAZ et al., 1987, 1990, 1995; HUDSON et al., 1999; LASCH et al., 2003; NOPONEN et al., 1993; ROSS et al., 1997); sendo esta crucial para a manutenção e para a determinação da composição da membrana celular.

Células de *Purkinje* são neurônios localizados no córtex cerebelar, que se pensa ser a base do aprendizado motor (ITO, 2001). De acordo com Linden (1995), a PLA<sub>2</sub> tem papel importante na indução de depressão de longo prazo (LTD – *long-term depression*) nas células de *Purkinje*. Em 2004, Shirai e Ito identificaram expressões diferenciais de subtipos de PLA<sub>2</sub> em cerebelo de ratos e descobriram que a iPLA<sub>2</sub> está localizada no núcleo das células de *Purkinje* ou na membrana nuclear, sugerindo que enzimas tenham potencial para estar envolvida na indução de LTD no cerebelo.

Existe uma forte relação entre o aumento da atividade da iPLA<sub>2</sub> e as

modificações na membrana de células cerebrais, o que é crucial para a instalação de diversas psicoses (SMESNY et al., 2005). O aumento de mudanças nas membranas está estritamente relacionado com a atividade específica da iPLA<sub>2</sub>. A quebra de fosfolípidos pela iPLA<sub>2</sub> é realizada para que ocorra a remodelação da membrana celular, modificando a fluidez de membrana (BALSINDE et al., 1997a; LAW et al., 2006). A modificação na fluidez de membrana ocorre devido à redução significativa na quantidade de AA incorporado na membrana celular, o que é causado pela redução da atividade de iPLA<sub>2</sub> (BALSINDE et al., 1997b).

Desde que a inibição da atividade de isoformas de PLA<sub>2</sub> também parece ser uma ferramenta útil para o tratamento de doenças neurodegenerativas, estudos que visam descobrir e testar inibidores de isoformas de PLA<sub>2</sub> poderão representar estratégias importantes para a descoberta de alvos terapêuticos. Neste estudo, foi verificado o efeito inibitório do extrato aquoso de *C. asiatica* sobre a modulação da atividade de PLA<sub>2</sub> em amostras de cerebelo de ratos, tendo sido demonstrada uma redução significativa na atividade de cPLA<sub>2</sub> e iPLA<sub>2</sub>. O extrato aquoso inibiu 76,83% e 95,74% da atividade de cPLA<sub>2</sub> e iPLA<sub>2</sub>, respectivamente, na maior concentração testada. Esta última é particularmente interessante, visto que a iPLA<sub>2</sub> é responsável por cerca de 80% da atividade total da PLA<sub>2</sub> no cérebro (dados não publicados).

Recentemente, Soumyanath et al. (2005) mostraram que *C. asiatica* e seus compostos estimularam a regeneração de nervos e aumentaram o alongamento de neuritos *in vitro*. Por outro lado, Forlenza et al. (2007) demonstraram que a integridade funcional de subtipos de PLA<sub>2</sub> é necessária para o desenvolvimento *in vitro* de neurônios, e que sua inibição deve reduzir o crescimento de neuritos e a viabilidade neuronal. Desde que os resultados obtidos neste trabalho demonstraram que o extrato aquoso de *C. asiatica* inibe a atividade da iPLA<sub>2</sub>, foi estabelecido um contraste entre esses estudos que poderá ser resolvido com análises mais aprofundadas no campo de desenvolvimento neuronal *in vivo*, atividade de PLA<sub>2</sub> e o uso de substâncias extraídas de *C. asiatica*.

Kumar e Gupta (2002) demonstraram que o extrato aquoso de *C. asiatica* foi efetivo na prevenção de déficits cognitivos, tendo sido estes efeitos relacionados com a diminuição nos parâmetros de estresse oxidativo. Este trabalho, juntamente com os achados de inibição de iPLA<sub>2</sub> e de potencial antioxidativo do presente estudo, sugerem

que o extrato aquoso de *C. asiatica* pode agir não apenas na redução da atividade de iPLA<sub>2</sub>, mas também prevenir o dano oxidativo, tornando-o um candidato alternativo para o tratamento de enfermidades neuropsiquiátricas, nas quais a atividade aumentada de PLA<sub>2</sub> e o estresse oxidativo coexistam.

### **5.8 Atividade leishmanicida**

A leishmaniose é uma doença infecciosa, não contagiosa, causada por protozoários do gênero *Leishmania*, endêmica ao redor do mundo, que afeta mais de 12 milhões de pessoas mundialmente e apresentam alta endemicidade, morbidade e mortalidade em populações da África, Ásia e América Latina (DUJARDIN, 2006; BEZERRA et al., 2006; WHO, 2007).

Não há relatos na literatura científica de uma possível atividade leishmanicida de *C. asiatica*, portanto, o ensaio foi realizado em caráter exploratório. Formas promastigotas de *Leishmania amazonenses* e *Leishmania chagasi* foram isoladas de pacientes para a realização do ensaio. Como o resultado demonstrou, ambos os extratos aquoso e bruto metanólico não apresentaram valores inibitórios considerados satisfatórios, sendo este acima de 100 µg/mL para ambos os extratos e para ambas as formas promastigotas. A anfotericina B (fármaco de referência) apresentou valores de Cl<sub>50</sub> inferiores a 2 µg/mL. Assim sendo, não foi demonstrado este potencial para os extratos de *C. asiatica*.

### **5.9 Atividade antimicrobiana**

O controle de infecção bacteriana tem sido efetivo desde o descobrimento de medicamentos antibacterianos. Entretanto, alguns dos patógenos se tornaram rapidamente resistentes aos vários fármacos de primeira geração. O desenvolvimento de resistência aos fármacos por parte dos microorganismos bem como o aparecimento de indesejáveis efeitos colaterais de certos antibióticos, tem levado à pesquisa de novos

agentes antimicrobianos. Segundo Mitscher et al. (1987), plantas medicinais, com destaque para os vegetais superiores, têm demonstrado ser fontes potenciais de moléculas com atividade antimicrobiana.

Não foi possível determinar uma concentração mínima inibitória (MIC) para os extratos em estudo na faixa de concentração testada (125 µg/mL a 2000 µg/mL). Como o fármaco de referência (penicilina) apresentou uma concentração mínima inibitória de 12,5 µg/mL, tornou-se desnecessária a continuação do ensaio, visto que seria necessário aumentar muito as concentrações dos extratos para a possível observação de algum efeito inibitório; e a maior concentração testada já correspondia a 40 vezes o valor de MIC para a penicilina (12,5 – 50 µg/mL).

Zaidan et al. (2005), utilizando o método de difusão em disco, observaram em suas análises que *C. asiatica* demonstrou atividade inibitória apenas para *S. aureus*, em concentração de 1000 µg/disco, com halo de 5 mm de inibição. A diferença entre os resultados encontrados por Zaidan e colaboradores pode ser explicada pelo método utilizado ou pela sensibilidade da cepa empregada. O grupo utilizou metodologia que difere da utilizada neste estudo. O método turbidimétrico, utilizado no presente estudo, é preconizado pela farmacopéia americana (THE UNITED STATES PHARMACOPOEIA, 2000), sendo possível determinar inclusive se a substância tem ação bactericida ou bacteriostática.

### **5.10 Toxicidade aguda**

O ensaio em *Artemia salina* é considerado uma boa ferramenta para o início de investigações de atividades biológicas de plantas. O ensaio foi proposto inicialmente por Michael, Thompson e Abramovitz (1956), posteriormente desenvolvido por Venhaecke et al. (1981) e modificado por Sleet e Brendel (1983), baseando-se na possibilidade de imobilizar náuplios de *Artemia salina* em culturas laboratoriais (CARBALLO et al., 2002). Este ensaio *in vivo* é uma triagem confiável para atividade biológica de metabólitos secundários de plantas e tem sido usado para identificar compostos com potencial

antitumoral.

Leboeuf et al. (1980) propuseram que os extratos brutos com  $CL_{50} < 250 \mu\text{g/mL}$  e substâncias puras com  $CL_{50} < 40 \mu\text{g/mL}$  poderiam ser considerados tóxicos. Por outro lado, Meyer et al. (1982) estabeleceram que os extratos com valores de  $CL_{50} < 1000 \mu\text{g/mL}$  em modelo experimental de *Artemia salina* eram tóxicos. Dollabela (1997) estabeleceu que os extratos vegetais com  $CL_{50} < 145 \mu\text{g/mL}$ , empregando o modelo *Artemia salina*, eram capazes de inibir, de maneira dose dependente, a formação de calos em discos de batata, relacionando-a com a atividade citotóxica. Após a correlação realizada por Meyer (1982), vários estudiosos de produtos naturais passaram a utilizar esta referência para a avaliação prévia de extratos de plantas que apresentam atividade biológica (JIMÉNEZ et al., 2001), e especificamente atividade antimicrobiana e citotóxica (ALALI et al., 1998; BATTINELLI et al., 2001; COLOMBO et al., 2001; CUNHA, 2002).

Apesar do resultado do EA de *Centella asiatica* não ter sido considerado tóxico no bioensaio de *Artemia salina* (ambos os extratos apresentaram  $CL_{50}$  maior que  $1000 \mu\text{g/mL}$ ), existem vários estudos que sugerem que um dos componentes da planta, o ácido asiático, possui atividade citotóxica. Coldren et al. (2003) demonstraram que o ácido asiático tem atividade citotóxica em fibroblastos. Diversos grupos mostraram que esta mesma molécula induz a apoptose e a paralização do ciclo celular em diferentes tipos de câncer (QIAN et al., 1982; BABU et al., 1995; LEE et al., 2002; BUNPO et al., 2005; PARK et al., 2005; CHO et al., 2006; HSU et al., 2006; PARK et al., 2007). Tais resultados, motivaram a realização de testes com o extrato aquoso quanto à atividade citotóxica, embora a triagem inicial não demonstrasse essa potencialidade.

### **5.11 Atividade citotóxica**

Tem havido um esforço mundial para a descoberta de novos agentes antitumorais provenientes de plantas (KAMUHABWA et al., 2000). Esse esforço decorre do fato de que os tratamentos quimioterápicos disponíveis atualmente atacam não somente as células tumorais, mas também todo o tecido saudável do organismo. Desta

forma, novas moléculas têm sido testadas quanto a sua especificidade em vários tipos de câncer. Nesse sentido, extratos de plantas usadas na medicina popular, como *Centella asiatica* (L.) Urb., tem sido avaliados quanto ao seu potencial antitumoral.

O asiaticosídeo, principal constituinte presente no extrato aquoso avaliado, transforma-se em ácido asiático por hidrólise *in vivo*, ou seja, quando ingerido o asiaticosídeo perde a cadeia de açúcares (no estômago) e ganha um íon H<sup>+</sup>, transformando-se em ácido asiático. Está vastamente descrito que o ácido asiático é capaz de induzir a apoptose através da liberação de íons Ca<sup>2+</sup> do retículo endoplasmático, o que ativará vias de apoptose através de caspases (BUNPO et al., 2005; PARK et al., 2005; CHO et al., 2006; HSU et al., 2006; PARK et al., 2007). Por outro lado, há apenas um relato na literatura de que o asiaticosídeo também possa paralisar o ciclo celular (HUANG et al., 2004). Entretanto, estes resultados são discordantes daqueles obtidos por Lu et al. (2004), no qual os autores afirmaram que o asiaticosídeo induz a progressão do ciclo celular em fibroblastos humanos.

Há um grande interesse científico na busca de novos compostos com atividade antitumoral, visto que os tratamentos quimioterápicos atuais exibem pequena seletividade para indução da apoptose apenas de células cancerígenas, atuando também em células saudáveis. Apesar dos valores de citotoxicidade do EA de *C. asiatica* serem considerados moderados quando comparados ao padrão de referência, não houve citotoxicidade para algumas linhagens testadas, o que demonstra seletividade para alguns tipos de câncer. O EA não demonstrou padrão citotóxico frente as linhagens A<sub>549</sub> (carcinoma de pulmão) e BHK (normal de rim). Na maior dose testada (1000 µg/mL), o EA provocou a morte de apenas 5,3% e 10,5% das células destas linhagens (A<sub>549</sub> e BHK, respectivamente) no ensaio, confirmando os achados no bioensaio de *Artemia salina*. A inibição da viabilidade celular chegou a 52,3% na linhagem C<sub>6</sub> (glioma), na concentração teste de 1000 µg/mL. Por outro lado, as linhagens B<sub>16</sub>F<sub>1</sub> (melanoma) e MDA-MB 231 (câncer de mama) tiveram valores inferiores de CI<sub>50</sub> (698,0 e 648,0 µg/mL, respectivamente) sendo que na dose máxima testada, o EA diminuiu em 81,1% (B<sub>16</sub>F<sub>1</sub>) e 96,1% (MDA-MB 231) a viabilidade celular destas linhagens. Desta forma, os resultados sugerem uma possível seletividade do extrato para atuação em células cancerígenas, visto que não houve toxicidade em células normais.

A atividade citotóxica do extrato aquoso mostrada neste trabalho tem a mesma faixa de citotoxicidade (10 - 1000 µg/mL) demonstrada em estudos com extratos de plantas com potencial citotóxico na Tanzânia (KAMUHABWA et al., 2000), na Coréia do Sul (YOO et al., 2007), na Itália e na Jordânia (FIORE et al., 2006). Estes estudos sugerem também uma atividade citotóxica moderada de extratos brutos comparada a uma substância pura. O EA de *C. asiatica* deste estudo demonstrou atividade citotóxica frente à linhagem de câncer de mama (MDA-MB 231), sendo que no trabalho de Hsu et al. (2005), o ácido asiático puro também diminuiu a viabilidade das células da mesma linhagem, de maneira dose-dependente. De fato, os valores de inibição obtidos por Hsu et al. (2005) foram consideravelmente menores (0,978 – 9,78 µg/mL) por se tratar de substância pura, comparados aos valores do EA deste estudo (100 - 1000 µg/mL).

Suspeita-se que o ácido asiático, que é o principal responsável pela citotoxicidade do extrato de *C. asiatica*, não esteja em concentração suficiente para determinar algumas atividades biológicas do extrato em ensaios realizados previamente, como atividade antimicrobiana, atividade leishmanicida e toxicidade em *Artemia salina*. Desta forma, sugere-se também a inserção do ácido asiático como biomarcador, o qual poderá ser avaliado cromatograficamente (HPLC) para monitoramento e quantificação deste nos extratos, juntamente com o asiaticosídeo.

Não foi encontrada na literatura científica relatos a respeito do potencial citotóxico do asiaticosídeo. No entanto, acredita-se que a citotoxicidade moderada do EA demonstrada neste estudo possa estar relacionada a presença do asiaticosídeo no extrato, ou mesmo sua atuação em sinergismo com componentes minoritários. Desta maneira, os resultados reforçam a evidência de que a *C. asiatica* pode ser considerada uma fonte natural para a obtenção de agentes antitumorais.

### **5.12 Atividade cicatrizante**

O reparo tecidual é um estado dinâmico que compreende diferentes processos, entre eles, inflamação, proliferação celular e síntese de elementos que constituem a

matriz extracelular, como o colágeno, elastina e fibras reticulares (THOMAS et al., 1995). Os processos de cicatrização e reparo tecidual ocorrem após trauma ou doença. O reparo das feridas e sua reestruturação constituem mecanismo complexo, em que vários fatores contribuem para a criação de diversos tipos de cicatrização como hipertrofia, atrofia ou normotrofia, da área lesionada (CLARK, 1985).

Há consenso na literatura quanto à utilização da sulfadiazina de prata 1% para o tratamento de queimaduras, com a finalidade de desbridar tecidos necrosados e combater a infecção local (WARD e SAFLE, 1995). A sulfadiazina de prata 1% contém uma mistura de nitrato de prata e sulfadiazina de sódio, efetivos contra uma ampla microbiota de Gram-negativas, como por exemplo: *Escherichia coli*, *Enterobacter*, *Klebsiella* sp e *Pseudomonas aeruginosa*, além de bactérias Gram-positivas como *Staphylococcus aureus* e também fungos (*Candida albicans*) (FERREIRA et al., 2003). É análogo estrutural do ácido p-aminobenzóico (PABA), inibindo competitivamente a diidropteroato sintase, enzima bacteriana que catalisa a incorporação do PABA no ácido diidrofólico. Isso impede a biossíntese do ácido diidrofólico e diminui a quantidade de ácido tetraidrofólico metabolicamente ativo, co-fator para a biossíntese de purinas, timidina e DNA. A consequência é a parada de crescimento das bactérias. É também antagonizada pelo PABA e seus derivados (como procaína e tetracaína) e pela presença de secreção purulenta ou produtos de degradação dos tecidos, que fornecem as substâncias necessárias para o crescimento bacteriano (KOROLKOVAS, 1997).

A aplicação de sulfadiazina de prata 1%, segue a prescrição médica, que recomenda a sua utilização nos primeiros dias de tratamento da queimadura, enquanto há presença de tecido necrótico ou infecção. Esse agente tópico deve ser aplicado duas vezes ao dia, em razão da oxidação da prata (FERREIRA et al., 2003). Têm sido relatados episódios de leucopenia poucos dias após o uso e de reações alérgicas em menos de 5% dos pacientes (WARD e SAFLE, 1995). Há também evidências de que ela seja tóxica para o crescimento de queratinócitos e fibroblastos (SMOOT et al., 1991).

O creme base (Lanette) é composto por uma cera auto-emulsionante aniônica, de álcool de polioxietileno com alquil sulfato de sódio, miscível em água. É uma dispersão coloidal composta por 90 partes de álcool graxo e 10 partes de tensoativo, utilizada para a fabricação de cremes aniônicos. Quando fundido e acrescido de água, forma emulsão

óleo/água estável, na qual podem ser incorporados emolientes, umectantes, hidratantes e outros ativos cosméticos para enriquecer o tratamento dermatológico. O creme base por si só é umectante, conferindo emoliência e suavidade à pele (PRISTA et al., 2002). Neste ensaio, o mesmo foi utilizado como controle negativo e veicular.

Neste procedimento experimental, o detalhamento da evolução das lesões pôde ser acompanhado através de fichas, nas quais foram anotadas as principais características macroscópicas: presença de secreção, escara, edema, pus, sangramento, ferida aberta, dentre outras e por meio de fotografias digitais. Através da análise macroscópica, foram observados durante os primeiros 6 dias, processos de cicatrização eficientes para ambos os cremes (contendo EA e EBM), nas duas concentrações testadas (5% e 10%), quando comparados ao controle negativo. Quando comparados com o controle positivo (sulfadiazina de prata), o ferimento teve melhora similar macroscopicamente, com bordas cicatrizadas (secas) e poucos pontos de ferida aberta. Entretanto, nos 4 últimos dias, houve o aparecimento de secreção nas áreas tratadas com creme contendo extratos, o que pode ser indicativo de infecção/inflamação. Este fato sugere que os cremes-teste tenham apenas propriedades cicatrizantes, não apresentando propriedades antimicrobianas/antiinflamatórias, o que pode ser ratificado pelas análises histopatológica e histomorfométrica. Estas observações confirmam os achados do ensaio de atividade antimicrobiana, nos quais os extratos de *C. asiatica* não apresentaram propriedades antimicrobianas.

Na avaliação histopatológica e histomorfométrica dos tecidos tratados com extratos de *C. asiatica*, diversas características que influenciam no processo de cicatrização foram analisadas e dentre as quais destacam-se: o número de células inflamatórias, de fibroblastos e de vasos sanguíneos, além das áreas de matriz extracelular e de colágeno.

No processo de cicatrização, as células inflamatórias são necessárias em um primeiro momento para a remoção do tecido lesionado e de bactérias do local da ferida. No entanto, aproximadamente 4 dias após a ocorrência da lesão, a presença destas células pode comprometer as etapas posteriores da cicatrização (GUIDUGLI-NETO, 1987). Ao verificar essa característica após os 10 dias de tratamento, o creme contendo EA 5% apresentou menor número de células inflamatórias comparado ao controle

positivo ( $p = 0,0001$ ), enquanto o creme contendo EA 10% foi similar ao controle positivo (Figura 23). O creme contendo EA 5% teve número de células inflamatórias e restos celulares (proveniente da degradação de outras células) similar ao controle negativo. O baixo número de células inflamatórias apresentado pelo creme-base após 10 dias de aplicação, pode ser justificado pela ação hidratante que este possui. Acredita-se que o sistema umectante do creme-base proporciona um mecanismo mais ativo para hidratar o estrato córneo, aliviando a irritação da pele e, conseqüentemente, reduzindo a inflamação.

Em um segundo momento, um creme cicatrizante deve acelerar a migração e proliferação da principal célula cicatricial, o fibroblasto. O creme contendo EA a 5% apresentou diferença estatisticamente significativa no número de fibroblastos, comparado aos controles e ao creme EA 10% (Figura 24). A concentração de 10% apresentou número maior de fibroblastos que o controle negativo, porém esse número foi similar ao controle positivo.

Ao analisar a vascularização dos campos digitalizados, observa-se que o controle positivo apresentou maior número de vasos sangüíneos por campo microscópico, sendo que os cremes teste tiveram número médio similar ao controle negativo. No entanto, a presença de vasos sangüíneos na área lesionada é uma marca de neovascularização do tecido lesionado. Através dos novos vasos, componentes sangüíneos e nutrientes podem chegar e acelerar o processo de cicatrização.

A Figura 26 mostra que ambos os cremes contendo EA apresentaram menor quantidade de matriz extracelular que os controles. Segundo Carvalho (2002), a fase fibroblástica de cicatrização é aquela na qual a matriz extracelular é substituída por fibras de colágeno. Desta forma, a menor área de matriz extracelular apresentada pelos cremes contendo EA sugere que o tratamento com os cremes-teste levaram o tecido à fase fibroblástica de cicatrização. Acredita-se que o mesmo não tenha ocorrido com ambos os controles, pois estes apresentaram grande área de matriz extracelular ao final do tratamento.

A análise das áreas de colágeno mostrou que ambos os cremes contendo EA promoveram aumento estatisticamente significativo na produção de colágeno quando comparados aos controles (Figura 27). De fato, uma das substâncias presentes no

extrato aquoso de *C. asiatica*, o asiaticosídeo, foi estudada pela técnica de *DNA microarray*, com a qual foi observada que esta molécula aumenta a expressão de 19 genes ligados à fisiologia da cicatrização (LU et al., 2004). Estes genes estudados codificam proteínas que formarão pró-colagenos, e posteriormente a própria molécula de colágeno. Desta maneira, os resultados histomorfométricos corroboram os trabalhos de Lu et al. (2004).

O creme contendo EBM também demonstrou potencial cicatrizante. O número de células inflamatórias para o creme contendo EBM foi bastante menor que o controle positivo, demonstrando causar menor grau de inflamação que a sulfadiazina no tratamento de uma ferida. Esse número de células foi similar para ambas as concentrações de EBM, e comparável ao controle negativo. Novamente, a baixa irritação apresentada pelo creme base é justificada pela sua ação hidratante.

A Figura 29 mostra que o creme contendo EBM apresentou um aumento estatisticamente significativo no número de fibroblastos quando comparado com os controles positivo ( $p = 0,0001$ ) e negativo ( $p = 0,005$ ); e essa diferença foi dose-dependente. Nesta fase da cicatrização, os fibroblastos produzem o colágeno, processo conhecido como fibroplasia (RYAN e MAJNO, 1977).

O número de vasos sanguíneos foi maior para a sulfadiazina comparada aos cremes teste e ao controle negativo. Os resultados sugerem que a sulfadiazina possa estimular a angiogênese de maneira mais intensa que os cremes contendo extratos de *C. asiatica*.

A área de matriz extracelular foi reduzida, quando analisado o creme contendo EBM 10% em comparação aos controles e ao creme teste 5% (Figura 31). Esse resultado indica que o creme EBM a 10% possa ter começado a substituir a matriz extracelular pelas fibras de colágeno. Quando foi analisada a área de colágeno induzida pelo uso dos cremes contendo EBM em detrimento à área induzida pelo controle positivo, nota-se uma diferença estatisticamente significativa, na qual o creme a 10% foi bem mais eficiente que os controles (Figura 32). Esse fato está ligado também à presença do asiaticosídeo no creme, visto que esta molécula induz à produção de colágeno pelos fibroblastos na fase de fibroplasia.

*Centella asiatica* tem sido usada por séculos na medicina tradicional asiática no tratamento de feridas. Estudos têm mostrado que o tratamento com *C. asiatica* melhora o processo de cicatrização por promover a proliferação celular e aumentar a síntese de colágeno *in vivo* (MAQUART et al., 1999; LU et al., 2004), o que pôde ser confirmado pelos ensaios deste trabalho. Foi também demonstrado que houve aumento da força de tensão no tecido injuriado quando tratado com extratos de *C. asiatica*, o que facilitou o processo de reparo da ferida (SUGUNA et al., 1996). Cheng e Koo (2000) demonstraram que o extrato aquoso de *C. asiatica* inibiu as lesões gástricas induzidas por ácido acético. Posteriormente, o mesmo grupo de pesquisadores demonstrou que a proliferação de células epiteliais e a angiogênese foram estimuladas quando foram administrados isoladamente o extrato aquoso de *C. asiatica* e o asiaticosídeo em úlceras gástricas em ratos Wistar (CHENG et al., 2004).

Como os cremes formulados contendo os extratos de *C. asiatica* com elevado teor de asiaticosídeo apresentaram bons resultados no tratamento da queimadura, supõe-se que tal propriedade esteja relacionada com o asiaticosídeo. Os cremes contendo EA e EBM mostraram-se eficazes na aceleração dos processos de cicatrização de uma ferida, no modelo de queimadura. Estes induziram maior proliferação fibroblástica, com menor número de células inflamatórias e com maior produção de colágeno em substituição à área de matriz extracelular, comparado ao fármaco de referência usado em queimaduras, a sulfadiazina de prata 1%. Apesar de apresentarem menor angiogênese que a sulfadiazina, os cremes-teste apresentaram maiores vantagens no tratamento, quando todas as características foram analisadas conjuntamente.

Desta maneira, o presente ensaio ratifica as descobertas de Lu et al. (2004), que em seu trabalho afirma que o asiaticosídeo é um indutor da progressão do ciclo celular, proliferação e síntese de colágeno em fibroblastos humanos e, ainda, corrobora os achados de Shukla et al. (1999), os quais demonstraram a eficiência do processo de cicatrização promovida pelo asiaticosídeo empregando modelos *in vitro* e *in vivo*.

## 6 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos demonstram o perfil fitoquímico e a potencialidade farmacológica dos extratos de *Centella asiatica* (L.) Urban em alguns ensaios biológicos.

Testes de classe de substâncias do metabolismo secundário revelaram a presença de flavonóides, heterosídeos triterpênicos, cumarinas, taninos e saponinas nas folhas de *C. asiatica*. A quantificação de ASA por HPLC mostrou grande porcentagem deste constituinte nos EA, EBM e FH.

Os EA e EBM apresentaram atividade antioxidante frente ao radical DPPH.

O EA inibiu a atividade da iPLA<sub>2</sub> e da cPLA<sub>2</sub> no cerebelo de ratos.

O EA demonstrou atividade citotóxica seletiva contra as linhagens B<sub>16</sub>F<sub>1</sub> (melanoma) e MDA-MB 231 (câncer de mama).

Cremes contendo EA ou EBM apresentaram eficiência superior ao controle (sulfadiazina de prata 1%) no processo de cicatrização de feridas por queimadura.

Os extratos de *C. asiatica* não foram efetivos nas atividades leishmanicida, antimicrobiana e toxicidade aguda.

A análise dos dados deste estudo fornece base científica para o uso de *Centella asiatica* na medicina popular. Apesar de ainda haver questões importantes que aguardam análises mais profundas, este estudo estende o conhecimento científico e ratifica a *C. asiatica* como fonte natural para obtenção de protótipos e moléculas com atividade biológica.

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABE, I.; ROHMER, M.; PRESTWICH, G.D. 1993. Enzymatic cyclization of squalene and oxidosqualene to sterols and triterpenes. **Chemical Reviews**, **93**: 2189-2206.

ACKERMANN, E.J.; KEMPNER, E.S.; DENNIS, E.A. 1994. Ca(2+)-independent cytosolic phospholipase A2 from macrophage-like P388D1 cells. Isolation and characterization. **The Journal of Biological Chemistry**, **269** (12): 9227-9233.

AKENDENGUE, B.; NGOU-MILAMA, E.; LAURENS, A.; HOCQUEMILLER, R. 1999. Recent advances in the fight against leishmaniasis with natural products. **Parasite**, **6**: 3-8.

ALALI, F.Q.; ZHANG, Y.; ROGERS, L.; MCLAUGHLIN, J.L. 1998. Mono-tetrahydrofuran acetogenins from *Goniothalamus giganteus*. **Phytochemistry**, **49** (3): 761-768.

ALTERTHUM, F.; TRABULSI, L. R. 2003. **Microbiologia**. São Paulo: Ed. Atheneu. 720p.

ALTERTHUM, F. 2004. Mecanismo de ação dos antibacterianos e mecanismos de resistência. In: TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F. **Microbiologia**. 4 ed. São Paulo: Ed. Atheneu, p.79.

ANTONSSON, B.; CONTI, F.; CIAVATTA, A.; MONTESSUIT, S.; LEWIS, S.; MARTINOU, I. 1997. Inhibition of Bax channel-forming activity by Bcl-2. **Science**, **277**: 370-372.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. 1960. **Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists**. 9. ed. Board, Washington.

BABU, T.D.; KUTTAN, G.; PADIKKALA, J. 1995. Cytotoxic and antitumour properties of certain taxa of Umbelliferae with special reference to *Centella asiatica* (L.) Urban. **Journal of Ethnopharmacology**, **48**: 53-57.

BALSINDE, J.; BARBOUR, S.E.; BIANCO, I.D.; DENNIS, E.A. 1994. Arachidonic acid mobilization in P388D1 macrophages is controlled by two distinct Ca(2+)-dependent phospholipase A2 enzymes. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, **91** (23): 11060-11064.

BALSINDE, J.; DENNIS, E.A. 1997a. Function of calcium-independent phospholipase A2 in arachidonic acid metabolism in P388D1 macrophages. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, **407**: 99–103.

BALSINDE, J.; BALBOA, M.A.; DENNIS, E.A. 1997b. Antisense inhibition of group VI Ca<sup>2+</sup>-independent phospholipase A2 blocks phospholipid fatty acid remodeling in murine P388D1 macrophages. **The Journal of Biological Chemistry**, **272**: 29317–29321.

BARBOSA, N.R.; FISCHMAN, L.; TALIB, L.L.; GATTAZ, W.F. 2004. Inhibition of platelet phospholipase A2 activity by CATUABA extract suggests anti-inflammatory properties. **Phytotherapy Research**, **18 (11)**: 942-944.

BATTINELLI, L.; TITA, B.; EVANDRI, M.G.; MAZZANTI, G. 2001. Antimicrobial activity of *Epilobium spp.* Extracts. **Farmaco**, **56 (5-7)**: 345-348.

BAZAN, N.G.; ZORUMSKI, C.F.; CLARK, G.D. 1993. The activation of phospholipase A2 and release of arachidonic acid and other lipid mediators at the synapse: the role of platelet-activating factor. **Journal of Lipid Mediators**, **6 (1-3)**: 421-427.

BEZERRA, J.L.; COSTA, G.C.; LOPES, T.C.; CARVALHO, I.C.D.S.; PATRÍCIO, F. J.; SOUSA, S.M.; AMARAL, F.M.M.; REBELO, J.M.M.; GUERRA, R.N.M.; RIBEIRO, M.N.S.; NASCIMENTO, F.R.F. 2006. Avaliação da atividade leishmanicida *in vitro* de plantas medicinais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, **16**: 631-637.

BJELDANES, L.F.; CHANG, G.W. 1977. Mutagenic activity of quercetin and related compounds. **Science**, **197**: 577-578.

BRADWEJN, J.; ZHOU, Y.; KOSZYCKI, D.; SHLIK, J. 2000. A double blind, placebo-controlled study on the effects of Gotu Kola-(*Centella asiatica*) on acoustic startle response in healthy subjects. **Journal of Clinical Psychopharmacology**, **20 (6)**: 680-684.

BRATTON, S.B.; WALKER, G.; SRINIVASULA, S.M.; SUN, X.M.; BUTTERWORTH, M.; ALNEMRI, E.S.; COHEN, G.M. 2001. Recruitment, activation and retention of caspases-9 and -3 by Apaf-1 apoptosome and associated XIAP complexes. **The EMBO Journal**, **20**: 998–1009.

BRENNAN, R.J., SCHIEST, R.H. 1996. Cadmium is an inducer of oxidative stress in yeast. **Mutation Research**, **356**: 171-178.

BRINKHAUS, B.; LINDNER, M.; SCHUPPAN, D.; HAHN, E.G. 2000. Chemical, pharmacological and clinical profile of the East Asian medical plant *Centella asiatica*. **Phytomedicine** **7** (5): 427-448.

BRITO, A.R.M.S.; BRITO, A.A.S. 1993. Forty years of brazilian medicinal plant research. **Journal of Ethnopharmacology**, **49** (2): 53-67.

BRUNETON, J. 1991. **Elementos de Fitoquímica e de Farmacognosia**. 1 ed. Editorial Acribia S.A, Zaragoza.

BUNPO, P.; KATAOKA, K.; ARIMOCHI, H. 2005. Inhibitory effects of asiatic acid and CPT-11 on growth of HT-29 cells. **The Journal of Medical Investigation**, **52**: 65–73.

CALIXTO, J. B. 2001. **Medicamentos Fitoterápicos**. In: YUNES, R. A; CALIXTO, J. B. Plantas medicinais sob a ótica da química moderna. Chapecó: Editora Argos. p. 297-315.

CALIXTO, J.B. 2005. Twenty-five years of research on medicinal plants in Latin America. A personal view. **Journal of Ethnopharmacology**, **100**: 131-134.

CANDAN F.; UNLU M.; TEPE, B.; DAFERERA,D.; POLISSIOU, M.; SÖKMEN, A.; AKPULAT, A. 2003. Antioxidant and antimicrobial activity of essential oil and methanol extracts of *Achillea millefolium* subsp. *millefolium* Afan. (Asteraceae). **Journal of Ethnopharmacology**, **87**: 215-220.

CARBALLO, J. L.; HERNÁNDEZ-INDA, Z. L.; PÉREZ, P.; GARCÍA-GRÁVALOS, M. D. 2002. A comparison between two brine shrimp assays to detect *in vitro* cytotoxicity in marine natural products. **BMC Biotechnology**, **2**: 1-5.

CARVALHO, P.T.C. 2002. **Análise da cicatrização de lesões cutâneas através da espectrofotometria: Estudo experimental em ratos diabéticos**. Dissertação de mestrado, Universidade de São Paulo, v. 1, 72 p.

CARVALHO, G. 1973. **A resistência bacteriana**. Rassegna Med e Cultural, p. 15-61.

CASTRO, H.G.; BARBOSA, L.C.A.; LEAL, T.C.A.B.; SOUZA, C.M.; NAZARENO, A.C. 2007. Crescimento, teor e composição do óleo essencial de *Cymbopogon nardus* (L.). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, **9 (4)**: 55-61.

*Centella asiatica* - Monograph. 2007. **Alternative Medicine Review: a Journal of Clinical Therapeutic**, **12 (1)**: 69-72.

CESARONE, M.R.; INCANDELA, L.; DE SANCTIS, M.T. 2001. Flight microangiopathy in medium- to long-distance flights: prevention of edema and microcirculation alterations with total triterpenic fraction of *Centella asiatica*. **Angiology**, **52**: 33-37.

CHENG, C.L.; KOO, M.W.L. 2000. Effects of *Centella asiatica* on ethanol induced gastric mucosal lesions in rats. **Life Sciences**, **67 (21)**: 2647-2653.

CHENG, C.L.; GUO, J.S.; LUK, J.; KOO, M.W.L. 2004. The healing effects of *Centella* extract and asiaticoside on acetic acid induced gastric ulcers in rats. **Life Sciences**, **74**: 2237-2249.

CHO, C.W.; CHOI, D.S.; CARDONE, M.H.; KIM, C.W.; SINSKEY, A.J.; RHA, C. 2006. Glioblastoma cell death induced by asiatic acid. **Cell Biology and Toxicology**, **22**: 393-408.

CHOPRA, R.N.; NAYAR, S.L.; CHOPRA, I.C. 1956. **Glossary of Indian Medicinal Plants**. New Delhi: CSIR.

CLARK, R.A. 1985. Cutaneous tissue repair: basic biologic consideration. **Journal of the American Academy of Dermatology**, **13**: 701-725.

CLARK, R.A. 1993. Basics of cutaneous wound repair. **The Journal of Dermatologic Surgery and Oncology**, **19**: 693-706.

COELHO, M.G; CHEDDIER, L.M.; SCIO, E.; PIMENTA, D.S. 2005. **Alterações morfoanatômicas e químicas em *Centella erecta* (LINN. F.)FERNAND., relacionadas à luminosidade e sazonalidade**. In: Livro de resumos XI Seminário Mineiro de Plantas Mediciniais e IIª Jornada de Farmácia de Diamantina, Diamantina/MG, p. 81-82.

COELHO, M.G. 2006. **Interface agrônomo-química em *Centella erecta* (L.f.) Fernald**. Trabalho de conclusão de curso – Ciências Biológicas – Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora.

COLDREN, C.D.; HASHIM, P.; ALI, J.M.; OH, S.K.; SINSKEY, A.J.; RHA, C. 2003. Gene expression changes in the human fibroblast induced by *Centella asiatica* triterpenoids. **Planta Medica**, 69: 725–732.

COLOMBO, M.L.; BUGATTI, C.; MOSSA, A.; PESCALLI, N.; PIAZZONI, L.; PEZZONI, G.; MENTA, E.; SPINELLI, S.; JOHNSON, F.; GUPTA, R.C.; DASARADHI, L. 2001. Citotoxicity evaluation of natural coptisine and sintesis of coptisine from berberine. **Farmaco**, 56 (5-7): 403-409.

CONSOLARO, M.E.L. 1996. **Caracterização citogenética de algumas populações sul-brasileiras de *Centella asiatica* (L.) Urban (Umbelliferae)**. Dissertação de mestrado, Universidade Estadual de Maringá, v. 1, 29 p.

CONSTANCE, L. 1991. University Herbarium Berkeley, Califórnia (**comunicação pessoal** em 12/06/1991 para Herbário CESJ-UFJF).

COSTA, J.M.L.; VALE, K.C.; FRANÇA, F.; SALDANHA, A.C.R.; SILVA, J.O.; LAGO, E.L.; MARSDEN, P.D.; MAGALHÃES, A.V.; SILVA, C.M.P.; NETTO, A.S.; GALVÃO, C.E.S. 1990. Cura espontânea da leishmaniose causada por *Leishmania (Viannia) braziliensis* em lesões cutâneas. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, 23: 205-208.

CROFT, S.L.; YARDLEY, V. 2002. Chemotherapy of leishmaniasis. **Current Pharmaceutical Design**, 8: 319-342.

CUNHA, M. M. 2002. **Avaliação da atividade citotóxica de frações contendo acetogeninas derivadas de extratos de plantas da família das Annonaceae**. Dissertação de mestrado, Univerisdade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte: ICB-UFMG, v.1, 113 p.

DARNIS, F.; ORCEL, L.; DE SAINT-MAUR, P.P.; MAMOU, P. 1979. Use of a titrated extract of *Centella asiatica* in chronic hepatic disorders. **La Semaine des Hôpitaux**, 55: 1749-1750.

DEAN, R.T.; FU, S.; STOCKER, R.; DAVIES, M.J. 1997. Biochemistry and pathology of radical mediated protein oxidation. **The Biochemical Journal**, **324**: 1-18.

DENIZOT, F.; LANG, R. 1986. Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. **Journal of Immunological Methods**, **89**: 271-277.

DIAS, B.F.S. 1996. **A implementação da convenção sobre biodiversidade biológica no Brasil: desafios e oportunidades**. Campinas: André Tosello, 10 p.

DI STASI, L.C. 1996. **Plantas medicinais: arte e ciência. Um guia de estudos terapêuticos**. São Paulo: Editora UNESP, 230 p.

DOLLABELA, M.F. 1997. **Triagem *in vitro* para atividade antitumoral e anti-*Trypanossoma cruzi* de extratos vegetais, produtos naturais e substâncias sintéticas**. Dissertação de mestrado, Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte: ICB-UFMG, v.1, 130 p.

DUJARDIN, J.C. 2006. Risk factors in the spread of leishmaniasis: towards integrated monitoring? **Trends in Parasitology**, **22**: 4-6.

ELIZABETISKY, E.; COSTA-CAMPOS, L. 1996. Medicinal plant genetic resources and international cooperation: the Brazilian perspective. **Journal of Ethnopharmacology**, **51**: 111-120.

ELISABETISKY, E. 1999. **Etnofarmacologia como ferramenta na busca de substâncias ativas**. In: Farmacognosia: da planta ao medicamento/Organizado por SIMÕES, C.M.O. et al. Porto Alegre/Florianópolis: 1ed. Universidade/UFRGS/ed. da UFSC, p. 87-99.

ELISABETISKY, E. 2002. **Revista Ciência Hoje**, **31(182)**.

FALKENBERG, M.B.; SANTOS, R.I.; SIMÕES, C.M.O. 2004. **Introdução à análise fitoquímica**. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. Porto Alegre: Editora UFRGS, Florianópolis: Editora UFSC.

FARMACOPÉIA PORTUGUESA, 1997. 7 ed., Imprensa Nacional, Casa da Moeda, Portugal.

FAROOQUI, A.A.; HIRASHIMA, Y.; HORROCKS, L.A. 1992. **Brain phospholipases and their role in signal transduction.** *Plenum Press New York*, p. 11-25.

FAROOQUI, A.A.; HORROCKS, L.A. 1994. Involvement of glutamate receptors, lipases, and phospholipases in long-term potentiation and neurodegeneration. **Journal of Neuroscience Research**, **36**: 267-323.

FAROOQUI, A.A.; YANG, H.C.; ROSENBERGER, T.A.; HORROCKS, L.A. 1997. Phospholipase A<sub>2</sub> and its role in brain tissue. **Journal of Neurochemistry**, **69**: 889–901.

FAROOQUI, A.A.; ONG, W.Y.; HORROCKS, L.A., 2006. Inhibitors of Brain Phospholipase A<sub>2</sub> Activity: Their Neuropharmacological Effects and Therapeutic Importance for the Treatment of Neurologic Disorders. **Pharmacological Reviews**, **58**: 591–620.

FERREIRA, E.; LUCAS, R.; ROSSI, L. A.; ANDRADE, D. 2003. Curativo do paciente queimado: uma revisão de literatura. **Revista da Escola de Enfermagem da USP**, **37(1)**: 44-51.

FIORE, G.; NENCINI, C.; CAVALLO, F.; CAPASSO, A.; BADER, A.; GIORGI, G.; MICHELI, L. 2006. *In vitro* Antiproliferative Effect of Six *Salvia* species on Human Tumor Cell Lines. **Phytotherapy Research**, **20**: 701–703.

FISCHER, R.; BAUMERT, T.; BLUM, H.E. 2007. Hepatitis C virus infection and apoptosis. **World Journal of Gastroenterology**, **13 (36)**: 4865-4872.

FORLENZA, O.V.; MENDES, C.T.; MARIE, S.K.N.; GATTAZ, W.F. 2007. Inhibition of phospholipase A<sub>2</sub> reduces neurite outgrowth and neuronal viability. **Prostaglandins, Leukotrienes, and Essential Fatty Acids**, **76**: 47–55.

FOURNET, A.; BARRIOS, A.A.; MUNÓZ, V.; HOCQUEMILLER, C.A. 1992. Effects of natural naphthoquinones in Balb/c mice infected with *Leishmania amazonensis* and *L. venezuelensis*. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, **43**: 219-222.

GAON, D, et al. 1980. Classificação e mecanismo de ação dos antibióticos. **Ars Curandi em Odontologia** **13**: 8-58.

GASPARRI, S. 2005. **Estudo das atividades antioxidante e mutagênica/antimutagênica induzidas pelo extrato vegetal da *Costus spicatus*.** Dissertação de Mestrado, Universidade Luterana do Brasil, v.1, 79 p.

GATTAZ, W.F.; KOLLISCH, M.; THUREN, T.; VIRTANEN, J.A.; KINNUNEN, P.K. 1987. Increased plasma phospholipase-A2 activity in schizophrenic patients: reduction after neuroleptic therapy. **Biological Psychiatry**, **22**: 421– 426.

GATTAZ, W.F.; HUBNER, C.V.; NEVALAINEN, T.J.; THUREN, T.; KINNUNEN, P.K. 1990. Increased serum phospholipase A2 activity in schizophrenia: a replication study. **Biological Psychiatry**, **28**: 495–501.

GATTAZ, W.F.; SCHMITT, A.; MARAS, A. 1995. Increased platelet phospholipase A2 activity in schizophrenia. **Schizophrenia Research**, **16**: 1– 6.

GOGGELMANN, W.; SCHIMMER, O. 1986. Mutagenic activity of phytotherapeutical drugs. **Progress in Clinical Biological Research**, **206**: 63-72.

GREVELINK, S.A.; LERNER, E.A. 1996. Leishmaniasis. **Journal of the American Academy Dermatology**, **34**: 257-272.

GRIMALDI, R.; DE PONTI, F.; D'ANGELO, L.; CARAVAGGI, M.; GUIDI, G.; LECCHINI, S.; FRIGO, G.M.; CREMA, A. 1990. Pharmacokinetics of the total triterpenic fraction of *Centella asiatica* after single and multiple administrations to healthy volunteers. A new assay for asiatic acid. **Journal of Ethnopharmacology**, **28**: 235-241.

GUERRA, M. P.; NODARI, R.O. 2001. **Biodiversidade**: aspectos biológicos, geográficos, legais e éticos. In: SIMÕES, C.M.O. *et al.* Farmacognosia: da planta ao medicamento. 2. Ed. Florianópolis/Porto alegre: UFSC/UFRS, p.13-26,

GUIDUGLI-NETO, J. 1987. The effect of roentgen radiation on the capillary sprontsonal superficial loops of granulation tissue I: quantitative study of the vascular volume. **Revista de Odontologia da Universidade de São Paulo**, **6**: 6-8.

GÜNTHER, B.; WAGNER, H. 1996. Quantitative determination of triterpenes in extracts and phytopreparations of *Centella asiatica* (L.) Urban. **Phytomedicine**, **3**: 59-65.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.C. 2000. **Free Radicals in Biology and Medicine**. New York: Oxford.

HAMILTON, M.L.; REMMEN, H.V.; DRAKE, J.A.; YANG, H.; GUO, Z.M.; KEWITT, K.; WALTER, C.A., RICHARDSON, A. 2001. Does oxidative damage to DNA increase with age? **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, **98**: 10469–10474.

HANDA, S.S.; DEEPAK, M.; MANGAL, A.K. 1988. **Centella asiatica**. In: Indian Herbal Pharmacopoeia, Indian Drug Manufacture. Jammu-Tawi: Mumbai and Regional Research Laboratory, p. 47–55.

HAUSENLOY, D.J.; SCORRANO, L. 2007. Targeting cell death. **Clinical Pharmacology and Therapeutics**, **82** (4): 370-373.

HERWALDT, B.L. 1999. Leishmaniasis. **Lancet**, **354**: 1191-1199.

HORROBIN, D.F.; GLEN, A.I.; HUDSON, C.J. 1995. Possible relevance of phospholipid abnormalities and genetic interactions in psychiatric disorders: the relationship between dyslexia and schizophrenia. **Medical Hypotheses**, **45** (6): 605-13.

HUANG, Y.H.; ZHANG, S.H.; ZHEN, R.X.; XU, X.D.; ZHEN, Y.S. 2004. Asiaticoside inducing apoptosis of tumor cells and enhancing anti-tumor activity of vincristine. **Ai Zheng**, **23** (12):1599-604.

HUDSON, C.; GOTOWIEC, A.; SEEMAN, M.; WARSH, J.; ROSS, B.M. 1999. Clinical subtyping reveals significant differences in calcium-dependent phospholipase A2 activity in schizophrenia. **Biological Psychiatry**, **46**: 401– 405.

HUSAIN, S. R.; CILLARD, J.; CILLARD, P. 1987. Hydroxyl radical scavenger activity of flavonoids. **Phytochemistry**, **26**: 2489-2497.

HSU, Y. L.; KUO, P. L.; LIN, L. T.; LIN, C. C. 2005. Asiatic Acid, a Triterpene, Induces Apoptosis and Cell Cycle Arrest through Activation of Extracellular Signal-Regulated

Kinase and p38 Mitogen-Activated Protein Kinase Pathways in Human Breast Cancer Cells. **The Journal of Pharmacological and Experimental Therapeutics**, **313**: 333–344.

HUYBRECHTS-GODIN, G.; PEETERS-JORIS, C.; VAES, G. 1979. Macrophage-fibroblast interaction in collagenase production and cartilage degradation. **The Biochemical Journal**, **184**: 643-650.

INAMDAR, P. K.; YEOLE, R. D.; GHOGARE, A. B.; DE SOUZA, N. J. 1996. Determination of biologically active constituents in *Centella asiatica*. **Journal of Chromatography**, **742**: 127-130.

INHEE, M.J.; EUN, S.J.; HWAN, Y.S.; KYOON, H.; YOUNG, K.J.; KEUN, P.H.; SANG-SUP, J.; WHAN, J.M. 1999. Protective effects of asiaticoside derivatives against beta-amyloid neurotoxicity. **Journal of Neuroscience Research**, **58 (3)**: 417–425.

ITO, M. 2001. Cerebellar long-term depression: Characterization, signal transduction, and functional roles. **Physiological Reviews**, **81**: 1143–1195.

IWU, M.M.; JACKSON, J.E.; SCHUSTER, B.G. 1994. Medicinal plants in the fight against leishmaniasis. **Parasitology Today**, **10**: 65-68.

JACOBSON, M.D.; RAFF, M.C. 1995. Programmed cell death and Bcl-2 protection in very low oxygen. **Nature**, **374**: 814–816.

JENTSCH, K.; SPIEGL, P.; FUCHS, L. 1961. Vergleichende Untersuchung der anthelminthischen Wirksamkeit von Saponinen *in vitro*. **Arzneimittel-Forschung**, **11**: 413-414.

JEW, S.; YOO, C.; LIM, D.; KIM, H.; MOOK-JUNG, I.; JUNG, M.W.; CHOI, H. JUNG; KIM, H.; PARK, H. 2000. Structure-Activity Relationship Study of Asiatic Acid Derivatives Against Beta Amyloid (A $\beta$ )-induced Neurotoxicity. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, **10**: 119-121.

JIMÉNEZ, G.; *et al.* 2001. Biological screening of plants of the venezuelan amazons. **Journal of Ethnopharmacology**, **77**: 77-83.

JONES, C.R.; ARAI, T.; BELL, J.M.; RAPOPORT, S.I. 1996. Preferential in vivo incorporation of [3H]arachidonic acid from blood in rat brain synaptosomal fractions before and after cholinergic stimulation. **Journal of Neurochemistry**, **67 (2)**: 822-829.

JORGE, O. A.; JORGE A.D. 2005. Hepatotoxicity associated with the ingestion of *Centella asiatica*. **Revista Española de Enfermedades Digestivas**, **97**: 115-124.

JUDD, W.S.; CAMPBELL, C.S.; KELLOGG, E.A.; STEVENS, P.F. 1999. **Plant systematics: a phylogenetic approach**. Sunderland, Massachusetts: Sinauer Associates, 464 p.

KAMUHABWA, A.; NSHIMO, C.; DE WITTE, P. 2000. Cytotoxicity of some medicinal plant extracts used in Tanzanian traditional medicine. **Journal of Ethnopharmacology**, **70**: 143–149.

KARTNIG, T.; HOFFMANN-BOHM, K.; Centella. In: H"ANSEL, R., KELLER, K., RIMPLER, H., SCHNEIDER, G. 1992. **Hager's Handbuch der Pharmazeutischen Praxis**. Berlin Heidelberg New York: Springer.

KASTAN, M.B.; CANMAN, C.E.; LEONARD, C.J. 1995. P53, cell cycle control and apoptosis: implications for cancer. **Cancer Metastasis Reviews**, **14**: 3–15.

KIDD, V.J. 1998. Proteolytic activities that mediate apoptosis. **Annual Review of Physiology**, **60**: 533–573.

KIM, S.R.; KOO, K.A.; LEE, M.K.; PARK, H.G.; SANG-SUP, J.; CHA, K.; KIM, Y.C. 2004. Asiatic acid derivatives enhance cognitive performance partly by improving acetylcholine synthesis. **The Journal of Pharmacy and Pharmacology**, **56**: 1275–1282.

KIM, O.T.; KIM, M.Y.; HUH, S.M.; BAI, D.G.; AHN, J.C.; HWANG, B. 2005. Cloning of a cDNA probably encoding oxidosqualene cyclase associated with asiaticoside biosynthesis from *Centella asiatica* (L.) Urban. **Plant Cell Reports**, **24**: 304–311.

KORNBLAU, S.M. 1998. The role of apoptosis in the pathogenesis, prognosis, and therapy of hematologic malignancies. **Leukemia**, **12**: S41–S46.

KOROLKOVAS, A.; BURCKHALTER, J. H. 1988. **Química farmacêutica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. p. 4-5.

KOROLKOVAS, A. 1997. **Dicionário Terapêutico Guanabara**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. p. 18.20.

KUMAR, M.H.V.; GUPTA, Y.K. 2002. Effect of different extracts of *Centella asiatica* on cognition and markers of oxidative stress in rats. **Journal of Ethnopharmacology**, **79**: 253–260.

KUMAR, M. H. V.; GUPTA, Y. K. 2003. Effect of *Centella asiatica* on cognition and oxidative stress in an intracerebroventricular streptozotocin model of Alzheimer's disease in rats. **Clinical and Experimental Pharmacology & Physiology**, **30**: 336–342.

LAPA, A. J.; SOUCCAR, C.; LIMA-LANDAMAN, M. T. R.; GODINHO, R. O.; DE LIMA, T. C. M. 1999. **Farmacologia e toxicologia de produtos naturais**. In: Farmacognosia: da planta ao medicamento/Organizado por Simões, C.M.O. et al. Porto Alegre/Florianópolis: ed. Universidade/UFRGS/ed. da UFSC, p. 181-196.

LARSON, R.A. 1988. The antioxidants of higher plants. **Phytochemistry**, **27**: 969-978.

LASCH, J.; WILLHARDT, I.; KINDER, D.; SAUER, H.; SMESNY, S. 2003. Fluorometric assays of phospholipase A<sub>2</sub> activity with three different substrates in biological samples of patients with schizophrenia. **Clinical Chemistry and Laboratory Medicine**, **41**: 908 – 914.

LAW, M.H.; COTTON, R.G.H.; BERGER, G.E. 2006. The role of phospholipases A<sub>2</sub> in schizophrenia. **Molecular Psychiatry**, **11**: 547–556.

LEBOEUF, M.; CAVÉ, A.; BHAUMIK, P.K.; MUKHERJEE, B.; MUKHERJEE, 1980. The phytochemistry of the annonaceae. **Phytochemistry**, **21 (12)**: 2783-2813.

LEE, Y.S.; JIN, D.Q.; KWON, E.J.; PARK, S.H.; LEE, E.S.; JEONG, E.C.; NAM, D.H.; HUH, K.; KIM, J.A. 2002. Asiatic acid, a triterpene, induces apoptosis through intracellular Ca<sup>+2</sup> release and enhanced expression of p53 in HepG2 human hepatoma cells. **Cancer Letters**, **186**: 83–91.

LEUNG, A.Y.; FOSTER, S. 1998. **Encyclopedia of Common Natural Ingredients Used in Food, Drugs, and Cosmetics**. New York, NY: John Wiley & Son; 2nd ed., 284 p.

LINDEN, D. J. 1995. Phospholipase A<sub>2</sub> controls the induction of short-term versus long-term depression in the cerebellar Purkinje neuron in culture. **Neuron**, **15**: 1393–1401.

LITCHFIELD, J.T.; WILCOXON, F. 1949. A simplified method of evaluating dose-effect experiments. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, **1**: 99-113.

LORENZI, H.; MATOS, F.J.A. 2002. **Plantas Medicinais no Brasil, nativas e exóticas**. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 512 p.

LU, L.; YING, K.; WEI, S.; FANG, Y.; LIU, Y.; LIN H.; MA, L.; MAO, Y. 2004. Asiaticoside induction for cell-cycle progression, proliferation and collagen synthesis in human dermal fibroblasts. **International Journal of Dermatology**, **43**: 801-807.

MAJNO, G.; JORIS, I. 1996. **Cells, tissue and disease: principles of general pathology**. EUA: Blackwell Science.

MATSUDA, H.; MORIKAWA, T.; UEDA, H.; YOSHIKAWA, M. 2001. Medicinal foodstuffs. XXVII. Saponin constituents Gotu Kola (2): Structures of new ursane- and oleanane-type triterpene oligoglycosides, centellasaponin B, C, and D, from *Centella asiatica* cultivated in Sri Lanka. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, **49**: 1368–1371.

MAQUART, F.X.; CHASTANG, F.; SIMEON, A.; WEGROWSKI, Y. 1999. Triterpenes from *Centella asiatica* stimulate extracellular matrix accumulation in rat experimental wounds. **European Journal of Dermatology**, **9** (4): 289-296.

MARSDEN, P.D.; TADA, M.S.; BARRETO, A.C.; CUBA, C.C. 1984. Spontaneous healing of *Leishmania braziliensis braziliensis* skin ulcers. **Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, **78**: 561-562.

MARSDEN, P.D. 1994. Personal experience with diagnostic and therapeutic aspects of human *Leishmania (Viannia) braziliensis* in Três Braços. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, **89**: 485-487.

MARTIN, P. 1997. Wound healing-aiming for perfect skin regeneration. **Science**, **276**: 75-81.

MATOS, F.J. 1997. **Introdução à fitoquímica experimental**. Edições UFC, Fortaleza.

M'BONGO, N.; LOISEAU, P.M.; LAWRENCE, F.; BORIES, C.; CRACIUNESCU, D.G.; ROBERT-GERO, M. 1997. *In vitro* sensitivity of *Leishmania donovani* to organometallic derivatives of pentamidine. **Parasitology Research**, **83**: 515-517.

MENTZ, L.A.; BORDIGNON, S.A.L. 2004. **Nomeclatura botânica, classificação e identificação de plantas medicinais**. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. Porto Alegre: Editora UFRGS, Florianópolis: Editora UFSC.

MEYER, B.N.; FERRIGNI, N.R.; PUTNAM, J.E.; JACOBSEN, L.B.; NICHOLS, D.E.; MCLAUGHLIN, J.L. 1982. Brine shrimp: a convenient general bioassay for active constituents. **Planta Medica**, **45**: 31-34.

MICHAEL, A. S.; THOMPSON, C. G.; ABRAMOVITZ, M. 1956. *Artemia salina* as a test organism for a bioassay. **Science**, **123**: 464-468.

MITSCHER, L.A.; DRAKE, S.; GOLLOPUDI, S.R.; OKWUTE, S.K. 1987. A modern look at folkloric use of anti-infective agents. **Journal of Natural Products**, **50**: 1025-1040.

MONTANARI, C.A.; BOLZANI, V.S. 2001. Planejamento racional de fármacos baseado em produtos naturais. **Química Nova**, **24 (1)**: 105-111.

MOON, C.K.; KANG, N.Y.; YUN, Y.P.; LEE, S.H.; LEE, H.A.; KANG, T.L. 1984. Effect of red ginseng crude saponin on plasma lipid levels in rats fed on a diet high in cholesterol and triglycide. **Archives of Pharmacal Research**, **7**: 41-45.

MOREIRA, R.C.R.; REBÊLO, J.M.M.; GAMA, M.E.A.; COSTA, J.M.L. 2002. Nível de conhecimento sobre Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) e uso de terapias alternativas por populações de uma área endêmica da Amazônia do Maranhão, Brasil. **Caderno de Saúde Pública** **18**: 187-195

MOSMANN, T. 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, **65**: 55-63,

NALEFSKI, E.A.; SULTZMAN, L.A.; MARTIN, D.M.; KRIZ, R.W.; TOWLER, P.S.; KNOPF, J.L.; CLARK, J.D. 1994. Delineation of two functionally distinct domains of cytosolic phospholipase A2, a regulatory Ca(2+)-dependent lipid-binding domain and a Ca(2+)-

independent catalytic domain. **The Journal of Biological Chemistry**, **269 (27)**: 18239-18249.

NAYFIELD, S.G.; KARP, J.E.; FORD, L.G.; DORR, F.A.; KRAMER, B.S. 1991. Potential role of tamoxifen in prevention of breast cancer, **Journal of the National Cancer Institute**, **83**: 1450–1459.

NETTO, E.M.; TADA, M.S.; GOLIGHT, K.D.C.; LAGO, E.; BARRETO, A.C.; MARSDEN, P. 1985. Conceitos de uma população local a respeito da leishmaniose mucocutânea em uma área endêmica. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, **18**: 33-37.

NOPONEN, M.; SANFILIPO, M.; SAMANICH, K.; RYDER, H.; KO, G.; ANGRIST, B. 1993. Elevated PLA2 activity in schizophrenics and other psychiatric patients. **Biological Psychiatry**, **34**: 641–649.

OGA, Z. 2003. **Fundamentos de toxicologia**. São Paulo: Editora Atheneu, p. 39-44.

OLIVEIRA, C.R.; DUARTE, E.P.; CARVALHO, A.P. 1984. Effect of phospholipase digestion and lysophosphatidylcholine on dopamine receptor binding. **Journal of Neurochemistry**, **43 (2)**: 455-65.

O'REGAN, M.H.; ALIX, S.; WOODBURY, D.J. 1996. Phospholipase A2-evoked destabilization of planar lipid membranes. **Neuroscience Letters**, **202 (3)**: 201-203.

PARK, B.C.; BOSIRE, K.O.; LEE, E.S.; LEE, Y.S.; KIM, J.A. 2005. Asiatic acid induces apoptosis in SK-MEL-2 human melanoma cells. **Cancer Letters**, **218**: 81–90.

PARK, B.C.; PAEK, S.H.; LEE, Y.S.; KIM, S.J.; LEE, E.S.; CHOI, H.G.; YONG, C.S.; KIM, J.A. 2007. Inhibitory Effects of Asiatic Acid on 7,12-Dimethylbenz[ $\alpha$ ]anthracene and 12-O-Tetradecanoylphorbol 13-Acetate-Induced Tumor Promotion in Mice. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, **30 (1)**: 176-179.

PERECIN, M.B.; BOVI, O.A.; MAIA, N.B. 2002. Pesquisas com plantas aromáticas, medicinais e corantes: o papel do Instituto Agrônômico. **Agrônômico**, **54 (2)**: 21-24.

PHILLIPSON, J.D.; WRIGHT, C.W. 1991a. Medicinal plants in tropical medicine: Medicinal plants against protozoal diseases. **Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, **85**: 18-21.

PHILLIPSON, J.D.; WRIGHT, C.W. 1991b. Antiprotozoal agents from plant sources. **Planta Medica**, **57**: 53-59.

POLVERINO, A.J.; PATTERSON, S.D. 1997. Selective activation of caspases during apoptotic induction in HL-60 cells. Effects of a tetrapeptide inhibitor. **The Journal of Biological Chemistry**, **272**: 7013–7021.

PRANCE, G.T.; BEENTJE, H.; DRANSFIELD, J.; JOHNS, R. 2000. The tropical flora remains undercollected. **Annals of the Missouri Botanical Garden**, **87**: 67-71.

PRISTA L.N., ALVES A. C., MORGADO R., LOBO J.S. 2002. **Tecnologia Farmacêutica**. Volume I, 6ª Edição, Fundação Calouste Gulbenkian, Lisboa, p. 597-605.

PUNTUREE, K.; WILD, C.P.; VINITKETKUMNEUN, U. 2004. Thai medicinal plants modulate nitric oxide and tumor necrosis factor-alpha in J774.2 mouse macrophages. **Journal of Ethnopharmacology**, **95 (2-3)**: 183-189.

QIAN, S.; CHEN, K.; TOSHITO, R.; YOSHIKI, K. 1992. Antitumour agents 135. Structure and stereochemistry of polacandrin, a new cytotoxic triterpene from *Polanisia dodecandra*. **Journal of Natural Products**, **55**: 1488–1497.

RAO, S.B.; CHETANA, M.; DEVI, P.U. 2005. *Centella asiatica* treatment during postnatal period enhances learning and memory in mice. **Physiology and Behavior**, **86**: 449-457.

RATES, S.M.K. 2001. Promoção do uso racional de fitoterápicos: uma abordagem no ensino de Farmacognosia. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, **11**: 57-69.

RAVEN, P.H.; EVERT, R.F.; EICHHORN, S.E. 1996. **Biologia vegetal**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 728 p.

RESHEF, G.; GESTETNER, B.; BIRK, Y.; BONDI, A. 1976. Effect of alfafa saponinas on the growth and some aspects of lipid metabolism of mice and quails. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, **27**: 63-72.

REYNOLDS, L.J.; HUGHES, L.L.; LOUIS, A.I.; KRAMER, R.M.; DENNIS, E.A. 1993. Metal ion and salt effects on the phospholipase A2, lysophospholipase, and transacylase

activities of human cytosolic phospholipase A2. **Biochimica et Biophysica Acta**, **1167** (3): 272-280.

RINGLER, D.J. 1997. In: CARROLL, C. **Veterinary Pathology**. 6th ed., MD, Williams and Wilkins. USA, p. 113-158.

ROBBINS, S.L. et al. 1996. **Patologia estrutural e funcional**. 5 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan.

ROBBERS, J.E.; SPEEDIE, M.K.; TYLER, V.E. 1996. **Pharmacognosy and Pharmabiotecnology**. Editora International Williams & Wilkins, Baltimore.

ROCHA JÚNIOR, A.M.; OLIVEIRA, R.G.; FARIAS, R.E.; ANDRADE, L.C.R.; AARESTRUP, F.M. 2006. Modulação da proliferação fibroblástica e da resposta inflamatória pela terapia a laser de baixa intensidade no processo de reparo tecidual. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, **81** (2): 150-156.

ROSS, B.M.; HUDSON, C.; ERLICH, J.; WARSH, J.J.; KISH, S.J. 1997. Increased phospholipid breakdown in schizophrenia. Evidence for the involvement of a calciumindependent phospholipase A2. **Archives of General Psychiatry**, **54**: 487–494.

ROSSEL, R.A.; DURAN, R.J.; ROSSEL, O.; RODRIGUES, A.M. 1992. Is leishmaniasis ever cured? **Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, **86**: 251-253.

RYAN, G.B.; MAJNO, G. 1977. Acute inflammation: a review. **The American Journal of Pathology**, **86**: 185-276,

SANG-SUP, J.; CHI-HYOUNG, Y.; DOO-YEON, L.; HEEMAN, K.; INHEE, M.J.; MIN, W.J.; HEESUNG, C.; YOUNG-HOON, J.; HEEDOO, K.; HYEUNG-GEUN, P. 2000. Structure–activity relationship study of asiatic acid derivatives against beta amyloid (A-β)-induced neurotoxicity. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, **10**: 119–121.

SANTOS, S. S. 2002. **Caracterização genética, taxonomia molecular e biogeografia da pescada-gó (*Macrodon ancylodon* - *Sciaenidae*) da Costa Atlântica da América do Sul**. Dissertação de Mestrado - Curso de Pós-Graduação em Biologia Ambiental, Universidade Federal do Pará, v. 1, 103 p.

SANTOS, R. I. 2004. **Metabolismo básico e origem dos metabólitos secundários**. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. Porto Alegre: Editora UFRGS, Florianópolis: Editora UFSC.

SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; ATHAYDE, M.L. 2004. **Saponinas**. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. Porto Alegre: Editora UFRGS, Florianópolis: Editora UFSC.

SHARP, J.D.; WHITE, D.L.; CHIOU, X.G.; GOODSON, T.; GAMBOA, G.C.; MCCLURE, D.; BURGETT, S.; HOSKINS, J.; SKATRUD, P.L.; SPORTSMAN, J.R. 1991. Molecular cloning and expression of human Ca(2+)-sensitive cytosolic phospholipase A<sub>2</sub>. **Journal of Biological Chemistry**, **266 (23)**: 14850-14853.

SHIRAI, Y.; ITO, M. 2004. Specific differential expression of phospholipase A<sub>2</sub> subtypes in rat cerebellum. **Journal of Neurocytology**, **33**: 297–307.

SHUKLA, A.; RASIK, A.M.; JAIN, G.K.; SHANKAR, R.; KULSHRESTHA, D.K.; DHAWAN, B.N. 1999. *In vitro* and *in vivo* wound healing activity of asiaticoside isolated from *Centella asiatica*. **Journal of Ethnopharmacology**, **65**: 1-11.

SIEGEL, D.P. 1999. The Modified Stalk Mechanism of Lamellar/Inverted Phase Transitions and Its Implications for Membrane. **Biophysical Journal**, **76**: 291– 313.

SINGLETON, V. L. 1981. Naturally occurring food toxicants: phenolic substances of plant origin common in foods. **Advances in Food Research**, **27**: 149-242.

SIMÕES, C.M.O.; MENTZ, L.A.; SCHENKEL, E.O.; IRGANG, B.E.; STEHMAN, J.R. 1986. **Plantas da medicina popular do Rio Grande do Sul**. Porto Alegre: Editora da UFRS, p.176.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. 2004. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Porto Alegre: Editora Universidade/UFRGS; Florianópolis: Editora UFSC, 1102 p.

SLEET, R. B.; BRENDEL, K. 1983. Improved methods for harvesting and counting synchronous populations of *Artemia nauplii* for use in developmental toxicology. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, **7**: 435-446.

SMESNY, S.; KINDER, D.; WILLHARDT, I.; ROSBURG, T.; LASCH, J.; BERGER, G.; SAUER, H. 2005. Increased Calcium-Independent Phospholipase A2 Activity in First but Not in Multiepisode Chronic Schizophrenia. **Biological Psychiatry**, **57**: 399–405.

SMOOT, E.C.; KUCAN, J.O.; ROTH, A.; MODY, N.; DEBS, N. 1991. *In vitro* toxicity testing for antibacterials against human keratinocytes. **Plastic and Reconstructive Surgery**, **87(5)**: 917-24.

SOHAL, R.S.; MOCKETT, R.J.; ORR, W.C. 2002. Mechanisms of aging: an appraisal of the oxidative stress hypothesis. **Free Radical Biology and Medicine**, **33**: 575–586.

SOEJARTO, D.D. 1996. Biodiversity prospecting and benefits sharing: perspectives from the field. **Journal of Ethnopharmacology**, **51**: 1-15.

SOUMYANATH, A.; ZHONG, Y.P.; GOLD, S.A.; YU, X.; KOOP, D.R.; BOURDETTE, D.; GOLD, B.G. 2005. *Centella asiatica* accelerates nerve regeneration upon oral administration and contains multiple active fractions increasing neurite elongation in-vitro. **The Journal of Pharmacy and Pharmacology**, **57**: 1221–1229.

SOUZA, V.C.; LORENZI, H. 2005. **Botânica Sistemática: Guia ilustrado para identificação das famílias de Angiospermas da flora brasileira, baseado em APGII**. Nova Odessa: Instituto Plantarum de Estudos da Flora, 640 p.

SREEJAVAN, N.; RAO, M. N. A. 1997. Free radical scavenging activity of curcuminoids. **Drug Research**, **46**: 169-171.

STACE, C.A. 1985. **Plant taxonomy and biosystematics**. London: Edward Arnold, 279 p.

STORZ, G., CHRISTMAN, M.F., SIES, H., AMES, B.N. 1987. Spontaneous mutagenesis and oxidative damage to DNA in *Salmonella typhimurium*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, **84**: 8917-8921.

STRYER, L. 1988. **Biochemistry**. New York: Freeman, 625 p.

SUBATHRA, M.; SHILA, S.; DEVI, M.A.; PANNEERSELVAM, C. 2005. Emerging role of *Centella asiatica* in improving age-related neurological antioxidant status. **Experimental Gerontology**, **40**: 707-715.

SUGUNA, L.; SIVAKUMAR, P.; CHANDRAKASAN, H.G. 1996. Effects of *Centella asiatica* extract on dermal wound healing in rats. **Indian Journal of Experimental Biology**, **34 (12)**: 1208-1211.

TAVARES, W. 2006. **Antibióticos e quimioterápicos para o clínico**. São Paulo: Ed. Atheneu, 615p.

**THE UNITED STATES PHARMACOPOEIA**. 2000. Rockville: The United States Pharmacopoeial Convention, 24 ed.

THOMAS, D.W.; ONEILL, I.D.; HARDING, K.G. 1995. Cutaneous wound healing: a current perspective. **Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, **53**: 442-447.

TESKE, M.; TRENTINI, A.M.M. 1995. **Compêndio de Fitoterapia**. Curitiba: Ed. Herbarium Laboratório Botânico, 2ª edição, 317 p.

TODD, R.; DONOFF, B. R.; CHIANG, T. CHOU, M.Y.; ELOVIC, A.; GALLAGHER, G.T.; WONG, D.T. 1991. The eosinophil as a cellular source of transforming growth factor alpha in healing cutaneous wounds. **The American journal of pathology**, **138**: 1307-1313.

VENHAECKE, P.; PERSOONE, G.; CLAUS, C.; SORGELOOS, P. 1981. Proposal for a short-term toxicity test with *Artemia nauplii*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, **5**: 382-387.

VENNAT, B.; GROSS, D.; POURRAT, H. 1992. *Hamamelis virginiana*: identification and assay of proanthocyanidins, phenolic acids and flavonoids in leaf extracts. **Pharmaceutica Acta Helvetiae**, **67**: 11-14.

VICKERY, M.L.; VICKERY, B. 1981. **Secondary Plant Metabolism**. Hong Kong: The Macmillan Press Ltd.

VIAL, D.; PIONELLI, D. 1995. Dopamine D2 receptors potentiate arachidonate release via activation of cytosolic, arachidonate-specific phospholipase A2. **Journal of Neurochemistry**, **64 (6)**: 2765-2772.

WALL, M.E.; WANI, M.C. 1996. Camptothecin and taxol: from discovery to clinic. **Journal of Ethnopharmacology**, **51**: 239-254.

WARD, R.S., SAFLE, J.R. 1995. Topical agents in burn and wound care. **Physical Therapy**, **75 (6)**: 526-38.

WEISBURGER, E.K. 1979. Natural carcinogenic products. **Environmental Science and Technology**, **13**: 278-281.

WIJEWEERA, P.P.; ARNASON, J.T.; KOSZYCKI, D.; MERALI, Z. 2003. Evaluation of anxiolytic properties of Gotukola – (*Centella asiatica*) extracts and asiaticoside in rat behavioral models. **Phytomedicine**, **13 (9-10)**: 668-676.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. The leishmaniasis and Leishmania/HIV coinfections. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs116/en/>. Consultado em 10/04/07, 2007.

YOO, H. H.; PARK J. H.; KWON, S. W. 2007. *In vitro* cytotoxic activity of some Korean medicinal plants on human cancer cell lines: enhancement in cytotoxicity by heat processing. **Phytotherapy Research**, **21 (9)**: 900-903.

YOUNG, I.S.; WOODSIDE, J.V. 2001. Antioxidants in health and disease. **Journal of Clinical Pathology**, **54**: 176–186.

YUNES, R.; PEDROSA, R C; FILHO, V.C. 2001. Fármacos e fitoterápicos: a necessidade do desenvolvimento da indústria de fitoterápicos e fitofármacos do Brasil. **Química Nova**, **24**: 147-152.

ZAIDAN, M.R.S.; NOOR, R.A.; BADRUL, A.R.; ADLIN, A.; NORAZAH, A.; ZAKIAH, I. 2005. *In vitro* screening of five local medicinal plants for antibacterial activity using disc diffusion method. **Tropical Biomedicine**, **22 (2)**: 165–170.

ZAINOL, M. K.; ABD-HAMID, A.; YUSOF, S.; MUSE, R. 2003. Antioxidative activity and total phenolic compounds of leaf, root, and petiole of four accessions of *Centella asiatica* (L.) Urban. **Food Chemistry**, **81**: 575–581.

ZAKARIA, M. 1991. Isolation and characterization of active compounds from medicinal plants. **Asia Pacific Journal of Pharmacology**, **6**: 15-20.

ZUANAZZI, J.A.S. 2000. **Flavonóides**. In: SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. (Ed.). *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. Editora UFRGS, Porto Alegre, Editora UFSC, Florianópolis.

**ANEXO A – Fotografias do resultado de ensaios para pesquisa de metabólitos secundários através da triagem fitoquímica**

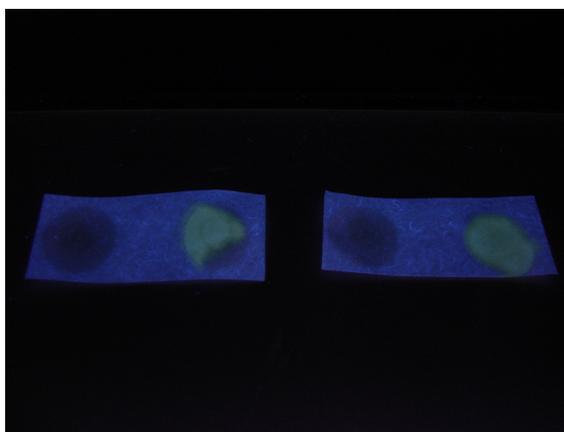


Figura 33 – Pesquisa de flavonóides através da reação com cloreto de alumínio. Mancha fluorescente à direita é amostra contendo cloreto de alumínio. À esquerda, amostra sem cloreto de alumínio. Ensaio realizado em duplicata.

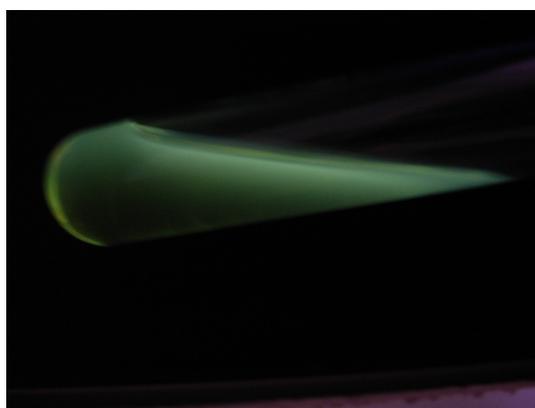


Figura 34 – Pesquisa de flavonóides através da reação com ácido bórico. Presença de coloração fluorescente esverdeada indica resultado positivo.

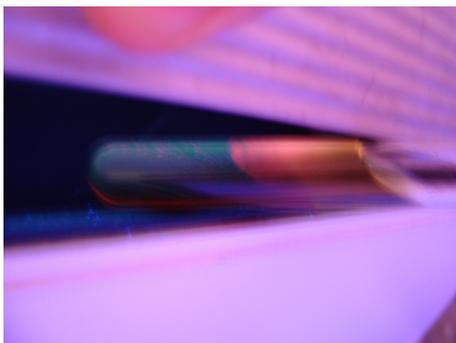


Figura 35 – Pesquisa de cumarina: fluorescência azul-esverdeada na porção inferior, sob LUV, indica resultado positivo.



Figura 36 – Pesquisa de heterosídeos através da reação de *Libermann-Buchard*. Resultado positivo: coloração avermelhada na porção superior.



Figura 37 – Pesquisa de heterosídeos através da reação de *Kedde*. Resultado positivo: coloração marrom-avermelhada.

## **ANEXO B - Ficha utilizada para avaliação da atividade terapêutica de creme contendo extratos de plantas empregando modelo experimental de queimadura em coelhos**

**Modelo:** Coelhos albinos da Nova Zelândia, adultos, machos mantidos por 10 dias com ração apropriada e controle de luz, temperatura e umidade.

Peso:

### **Coelho 1 – 10**

Sexo: Fem Masc

Peso inicial:

Data de início do ensaio: Horário:

Anestésico local: Lidocaína 2 % + Felipressina

Volume aplicado: 0,2 mL. Via: subcutânea. Analgésico: Dipirona.

*1º dia*

### **Queimadura**

Com barra de ferro (5 cm<sup>2</sup>) colocado em banho de água fervente por 1 minuto. Tempo de contato da pele com a barra: 10 segundos.

Horário:

### **2º dia**

Horário:

Procedimento de aplicação das amostras na área da queimadura.

Aplicar as amostras de manhã e à tarde.

Retirar o animal da gaiola. Colocar na bancada. Com a espátula estéril, retirar uma pequena quantidade da amostra e delicadamente espalhar uniformemente sobre toda a área da queimadura. Sobre cada área colocar gaze cortada em quadrados, depois com uma faixa de bandagem não oclusiva enrolar todo o animal para prender a gaze no local. Colocar duas faixas de bandagem, suficiente para cobrir as áreas de queimadura.

**3º dia – 10º dia**

Horário:

Irritação e agitação:    Ausente            Presente

Observação das queimaduras:

Área avermelhada	Área 1	Área 2	Área 3	Área 4
Área esbranquiçada	Área 1	Área 2	Área 3	Área 4
Presença de secreção	Área 1	Área 2	Área 3	Área 4
Presença de escara:	Área 1	Área 2	Área 3	Área 4
Presença de edema	Área 1	Área 2	Área 3	Área 4
Presença de pus	Área 1	Área 2	Área 3	Área 4

Tamanho da ferida:

Área 1	Menor que o dia anterior	Maior que o dia anterior		
Área 2	Menor que o dia anterior	Maior que o dia anterior		
Área 3	Menor que o dia anterior	Maior que o dia anterior		
Área 4	Menor que o dia anterior	Maior que o dia anterior		
Secagem das feridas	Área 1	Área 2	Área 3	Área 4

Outras observações:

## ANEXO C - Artigo publicado

1. Letters in Drug Design & Discovery, Volume 4, Number 2, March 2007 , pp. 149-153(5)

Publisher: Bentham Science Publishers

DOI: 10.2174/157018007779422514

### **Synthesis and antimicrobial activity of pyridine derivatives substituted at C-2 and C-6 positions**

Mauro Vieira De Almeida<sup>1\*</sup>, Marcus Vinícius de Nora Souza<sup>1</sup>, Nadia Rezende Barbosa<sup>2</sup>, Frederico Pittella Silva<sup>2</sup>, Giovanni Wilson Amarante<sup>1</sup>, Sílvia Helena Cardoso<sup>1</sup>.

1- Departamento de Química, ICE, Universidade Federal de Juiz de Fora, 36036-330 – Juiz de Fora, MG, Brazil. Tel +55 (32) 3229-3310.

2- Faculdade de Farmácia e Bioquímica, Universidade Federal de Juiz de Fora, MG, Brazil. Tel +55 (32) 3229-3809

\* Author to whom correspondence should be addressed - e-mail: mauro.almeida@uff.edu.br

#### **Abstract**

A series of substituted pyridines at C-2 and C-6 positions was synthesized and evaluated *in vitro* against *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus mutans* and *Candida albicans*. Most of compounds exhibited a wide range of modest *in vitro* activity against the tested microorganism.

**Key-words:** substituted pyridines, amide, antimicrobial activity

#### **Introduction**

In the last years there has been a worldwide increase in infections caused by microorganisms resistant to multiple antimicrobial agents. Various factors have been associated to this increase, in special the use and misuse of antimicrobial agents, which led to an increasing morbidity and mortality and to an overall increase in healthcare costs. Another important problem is the dramatic reduction in development of new antibiotics active against these multidrug-resistant pathogens. Due to these problems, we urgently need new drugs in antimicrobial field. Pyridinic derivatives (Figure 1) are an important class of compound with a wide range of activities [1-4]. The pyridine nucleus is present in many products such as drugs, vitamins, food, flavorings, plants, dyes, rubber products, adhesives, insecticides and herbicides [5-6]. Due to the importance of this class and the

incidence of multiple drug resistance (MDR) in the antimicrobial field, the aim of this work is the synthesis and biological activity of pyridine derivatives against *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus mutans* and *Candida albicans* [7-10].

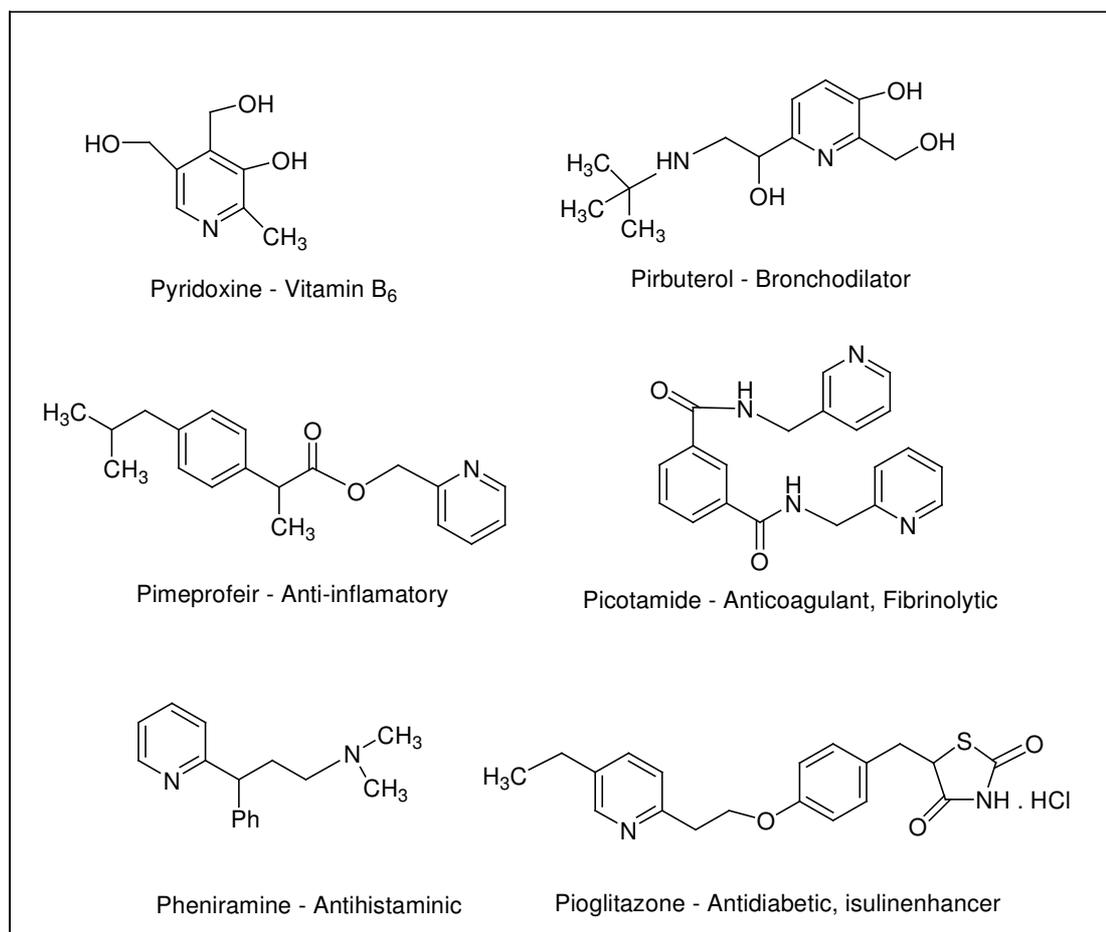
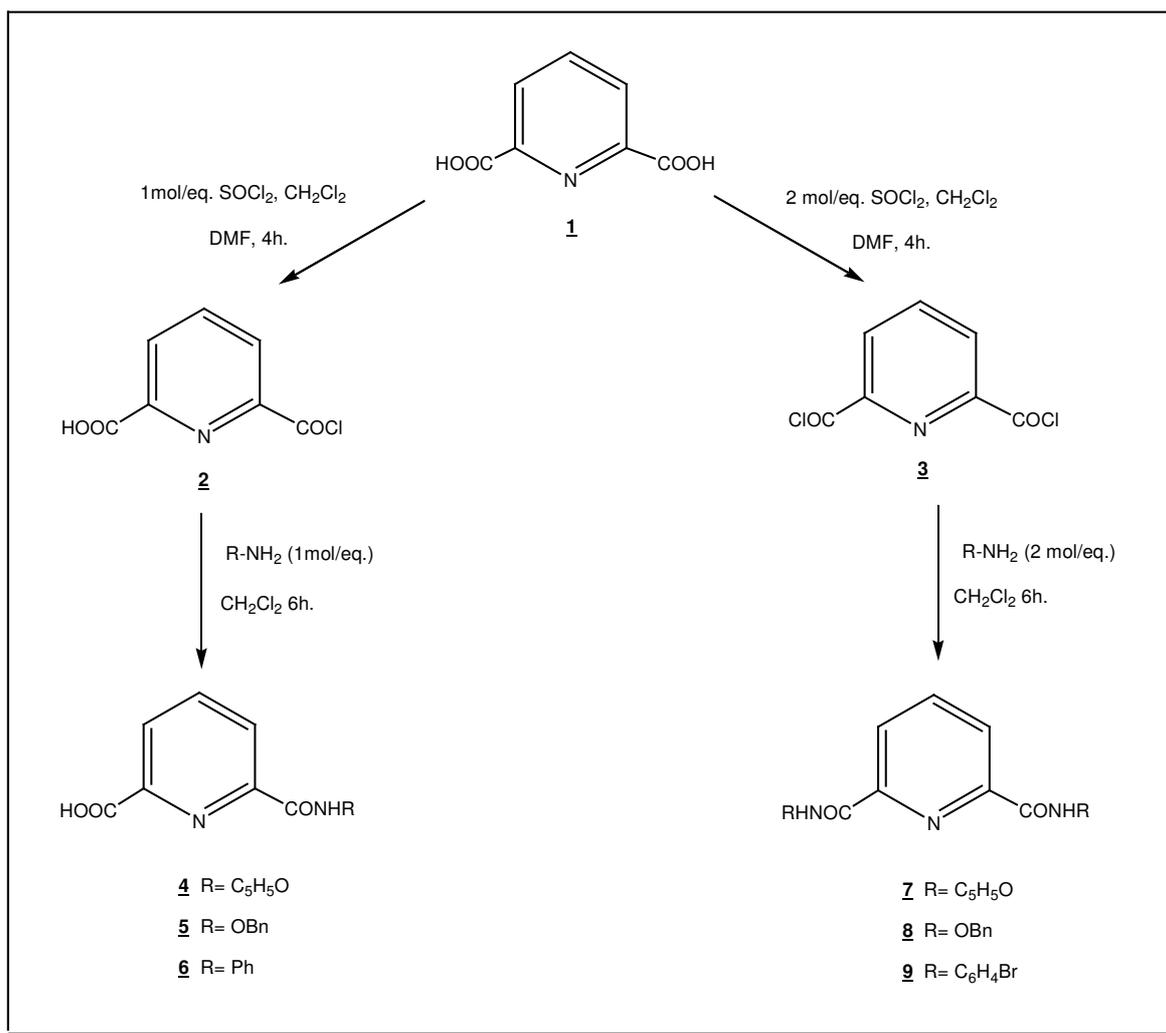


Figure 1. Pyridine derivatives and these activities [11-17]

## Chemistry

The synthesis of pyridines derivatives **4-9** described in this study is shown in scheme 1. The newer derivatives were synthesized by reaction of acid chlorides **2** and **3** in dichloromethane and *N,N*-dimethylformamide (DMF) catalytic with 1 or 2 mol/equivalent of appropriate amine [18].



Scheme 1. Synthesis of pyridines derivatives.

Table 1. Yields and physicochemical properties of the synthesized compounds.

Compound	Formula M.W.	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	Yield (%)	Mp (°C)
4	$\text{C}_{12}\text{H}_{10}\text{N}_2\text{O}_4$	$\text{CO}_2\text{H}$	$\text{CONHCH}_2\text{-furfuryl}$	48	143-145
5	$\text{C}_{14}\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}_4$	$\text{CO}_2\text{H}$	$\text{CONHOBn}$	37	158-159
6	$\text{C}_{12}\text{H}_{10}\text{N}_2\text{O}$	$\text{CO}_2\text{H}$	$\text{CONHPh}$	57	165-167

<b>7</b>	C <sub>17</sub> H <sub>15</sub> N <sub>3</sub> O <sub>2</sub>	CONHCH <sub>2</sub> -furfuryl	CONHCH <sub>2</sub> furfuryl	82	141-142
<b>8</b>	C <sub>21</sub> H <sub>19</sub> N <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	CONHOBn	CONHOBn	77	169-170
<b>9</b>	C <sub>19</sub> H <sub>13</sub> N <sub>3</sub> O <sub>2</sub> Br <sub>2</sub>	CONH- <i>p</i> -C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> Br	CONH- <i>p</i> -C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> Br	86	257-258

The treatment of acid chloride **2** with 1 mol/equiv. of furfurylamine, *O*-benzyl-hydroxylamine or aniline afforded the compounds **4**, **5** and **6** in 48%, 37% and 52% yield, respectively. The reaction of **3** with 2 mol/equiv. of furfurylamine, *O*-benzyl-hydroxylamine or 4-bromo-aniline furnished the derivatives **7**, **8** and **9** with 82%, 77% and 86% yield, respectively (Table 1). The structure were confirmed by the analysis of IR, <sup>1</sup>H NMR and <sup>13</sup>C NMR spectral data.

The N-H absorption bands between 3500-3200 cm<sup>-1</sup> were particularly characteristic for both monoamide and diamide compounds. The monoamines **4-6** displayed the C=O group of carboxylic acid and amide in 1736 and 1666 cm<sup>-1</sup>, respectively. The diamines **7-9** showed one absorption due to carbonyl group as 1650 cm<sup>-1</sup>. The spectra of compounds **4**, **5**, **7** and **8** showed absorption corresponding to C-H groups between 3000-2800 cm<sup>-1</sup>.

<sup>1</sup>H NMR spectra of pyridines derivatives were in agreement with the proposed structures and displayed the presence of multiplets in the aromatic region corresponding to the hydrogen of pyridine, phenyl or furoic rings. The N-H resonance was apparent as a broad singlet or triplet between 9-12 ppm. In the spectra of derivatives **4**, **5**, **7** and **8** was observed in δ 4-5 ppm the presence of absorptions corresponding to hydrogens of CH<sub>2</sub> groups.

### Biology

The antimycobacterial activity of the prepared compounds was evaluated *in vitro* against *Staphylococcus aureus* ATCC 25932, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 90271 and *Streptococcus mutans* ATCC 25175 strains using the turbidimetric method for the determination of the minimum inhibitory concentration (MIC).

The antifungal activity *in vitro* was evaluated against yeast *Candida albicans* ATCC 10231 using a micro dilution broth test for the determination of the minimum inhibitory concentration.

The results of the biologic screening of the pyridines derivatives **4**, **6**, **7**, **8** and **9** are shown in table 2. For the sake of comparison, were included the values of minimum inhibitory concentration (MICs) standard of penicillin and amphotericin B.

Table 2. Antimicrobial and antifungal activities of compounds synthesized.

Compounds	MIC ( $\mu\text{g/mL}$ )			
	<i>S.aureus</i>	<i>S. mutans</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>C. albicans</i>
<b>4</b>	116 <sup>b</sup>	116 <sup>b</sup>	232 <sup>a</sup>	116 <sup>c</sup>
<b>6</b>	150 <sup>b</sup>	75 <sup>b</sup>	150 <sup>b</sup>	37,5 <sup>d</sup>
<b>7</b>	75 <sup>b</sup>	75 <sup>b</sup>	150 <sup>b</sup>	75 <sup>c</sup>
<b>8</b>	75 <sup>b</sup>	75 <sup>b</sup>	75 <sup>b</sup>	-
<b>9</b>	150 <sup>a</sup>	150 <sup>b</sup>	-	75 <sup>c</sup>
Penicillin	12,5		50	
Amphotericin B	-	-	-	25

<sup>a</sup> Bactericidal activity

<sup>b</sup> Bacteriostatical activity

<sup>c</sup> Fungicidal activity

<sup>d</sup> Fungiostatical activity

“-“ No inhibition at initial concentration

The results revealed that the compounds synthesized exhibited a wide range of *in vitro* activity against all tested mycobacterial and fungal. The MIC values are generally within the range of 37-232  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ .

The compounds **7** and **8** had the lowest MIC (75  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) for bacteriostatical activity of *S. aureus*, and **9** was the only compound that had bactericidal activity despite in the high concentration comparing to the reference drug. The compounds **6**, **7**, and **8** had the lowest MIC (75  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) for bactericidal activity against *S. mutans*. The compound **8** had the lowest MIC (75  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) for bactericidal activity against *P. aeruginosa*, while **4** was the only compound that had bactericidal activity against *P. aeruginosa*.

Both **6** and **7** derivatives had a significant antifungal activity being observed a MIC values of  $75 \mu\text{g.mL}^{-1}$ . However, compound **6** had the lowest concentration ( $37.5 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ) with antifungal activity. It exhibited *in vitro* fungistatic activity against *C. albicans*.

## Experimental

### Chemistry

Melting points were determined on an MQAPF-301 apparatus and are uncorrected. Infrared spectra were obtained on a Bomem FT IR MB-102 spectrometer in KBr pellets.  $^1\text{H}$  NMR (200 MHz) and  $^{13}\text{C}$  NMR (50 MHz) spectra were recorded on Bruker Avance DRX200 spectrometer at the Federal University of Minas Gerais. Column chromatography was performed using silica gel 60G 0,063-0,200 mm.(70-230 mesh ASTM ) Merck and silica gel 60G 0,2-0,5 mm VETEC. Solvent and reagent were purchased from Aldrich or Vetec and used without purification.

#### 4.1.1. General method for preparation of acid chlorides **2** and **3**.

The pyridine-2,6-dicarboxylic acid (0.5 g, 0.3 mol) was treated with thionyl chloride (1 or 2 mols/eq) in dichloromethane, in presence of a catalytic amount of DMF [18]. The mixture was stirred for 4 hours at room temperature and the solvent was removed under reduced pressure. The residue was used without further purification.

#### 4.1.2. General method for condensation reactions: preparation of compounds **4-9**.

To a stirred solution of amine (1 or 2 mmol) in dichloromethane were slowly added the acid chlorides **2** or **3** (1 mmol) and catalytic amount of DMF. The mixture was stirred at  $0^\circ\text{C}$  to room temperature for 6 hours. The solvent was removed by evaporation and the residue was extracted with water and dichloromethane. The organic layer was evaporated under reduced pressure to dryness and the residue was purified by column chromatography on silica gel (ethyl acetate/hexane).

Compound Number	$^1\text{H}$ NMR $\delta$ (ppm) and $^{13}\text{C}$ NMR $\delta$ (ppm)	IR $\nu$ , ( $\text{cm}^{-1}$ )
<u>4</u>	$^1\text{H}$ NMR (DMSO- <i>d</i> 6, 200MHz) $\delta$ 4,57 (d, 2H, $\underline{\text{CH}_2}$ ), $\delta$ 6,33 (d, 1H, $\underline{\text{H-Py}}$ ), $\delta$ 6,40 (dd, 1H, $\underline{\text{H-Py}}$ ), $\delta$ 8,17 (m, 4H), $\delta$ 9,65 (t, 1H, $\underline{\text{NH}}$ ). $^{13}\text{C}$ NMR (DMSO- <i>d</i> 6, 50MHz) $\delta$ 36,1 ( $\underline{\text{CH}_2}$ ), $\delta$ 107-150 ( $\underline{\text{C-Py}}$ and $\underline{\text{C-Furoic}}$ ), $\delta$ 162,8 ( $\underline{\text{CONH}}$ ), $\delta$ 164,9 ( $\underline{\text{COOH}}$ ).	3500-3100 (OH and NH, H-bridges), 1736 (C=O carboxylic acid), 1673 (C=O amide).
<u>5</u>	$^1\text{H}$ NMR (DMSO- <i>d</i> 6, 200MHz) $\delta$ 4,98 (s, 2H, $\underline{\text{CH}_2}$ ), $\delta$ 7,30 – 7,49 (m, 5H, $\underline{\text{H-Ph}}$ ), $\delta$ 8,22 (s, 3H, $\underline{\text{H-Py}}$ ), $\delta$ 12,34 (s, 1H, $\underline{\text{COOH}}$ ). $^{13}\text{C}$ NMR (DMSO- <i>d</i> 6, 50MHz) $\delta$ 77,4 ( $\underline{\text{CH}_2}$ ), $\delta$ 125,3-148,5 ( $\underline{\text{C-Py}}$ and $\underline{\text{C-Ph}}$ ), $\delta$ 160,4 ( $\underline{\text{CONH}}$ ), $\delta$ 164,7 ( $\underline{\text{COOH}}$ ).	3500-3100 (OH and NH, H-bridges), 1717 (C=O carboxylic acid), 1684 (C=O amide).
<u>6</u>	$^1\text{H}$ NMR (DMSO- <i>d</i> 6, 200MHz) $\delta$ 7,15 (t, 1H, $\underline{\text{H-Ph}}$ ), $\delta$ 7,34 (t, 2H, $\underline{\text{H-Ph}}$ ), $\delta$ 7,82 (d, 2H, $\underline{\text{H-Ph}}$ ), $\delta$ 8,23-8,47 (m, 3H, $\underline{\text{H-Py}}$ ), $\delta$ 10,8 (s, 1H, $\underline{\text{COOH}}$ ). $\delta$ 12,8 (sl, 1H, $\underline{\text{NH}}$ ). $^{13}\text{C}$ NMR (DMSO- <i>d</i> 6, 50MHz) $\delta$ 120,6-148,8 ( $\underline{\text{C-Py}}$ and $\underline{\text{C-Ph}}$ ), $\delta$ 161,3 ( $\underline{\text{CONH}}$ ), $\delta$ 164,6 ( $\underline{\text{COOH}}$ ).	3500 (OH and NH, H-bridges), 1701 (C=O carboxylic acid), 1666 (C=O amide).
<u>7</u>	$^1\text{H}$ NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 200MHz) $\delta$ 4,56 (d, 4H, $\underline{\text{CH}_2}$ ), $\delta$ 6,18-6,22 (m, 4H, $\underline{\text{H-Furoic}}$ ), $\delta$ 7,18-7,19 (d, 2H, $\underline{\text{H-Furoic}}$ ), $\delta$ 7,91 (t, 1H, $\underline{\text{H-Py}}$ ) $\delta$ 8,31 (d, 2H, $\underline{\text{H-Py}}$ ), $\delta$ 8,36 (t, 2H, $\underline{\text{NH}}$ ). $^{13}\text{C}$ NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 50MHz) $\delta$ 36,4 ( $\underline{\text{CH}_2}$ ), $\delta$ 107,6-110,4 ( $2\underline{\text{C-Furoic}}$ ), $\delta$ 125,2 ( $2\underline{\text{C-Py}}$ ), $\delta$ 138,9 ( $\underline{\text{C-Furoic}}$ ), $\delta$ 142,1 ( $\underline{\text{C-Py}}$ ), $\delta$ 148,6 ( $\underline{\text{C-Py}}$ ), 151,0 ( $\underline{\text{C-Furoic}}$ ), $\delta$ 163,6 ( $\underline{\text{CONH}}$ ).	3309 (NH, H-bridges), 2929-2858 (C-H aliphatic), 1661 (C=O amide).
<u>8</u>	$^1\text{H}$ NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 200MHz) $\delta$ 4,81 (s, 4H, $\underline{\text{CH}_2}$ ), $\delta$ 7,21 (s, 10H, $\underline{\text{H-Ph}}$ ), $\delta$ 7,89 (t, 1H, $\underline{\text{H-Py}}$ ), $\delta$ 8,22 (d, 2H, $\underline{\text{H-Py}}$ ), $\delta$ 10,9 (sl, 1H, $\underline{\text{NH}}$ ). $^{13}\text{C}$ NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 50MHz) $\delta$ 78,4 ( $\underline{\text{CH}_2}$ ), $\delta$ 121,6 ( $\underline{\text{C-Ph}}$ ), $\delta$ 125,4 ( $2\underline{\text{C-Ph}}$ ), $\delta$ 125,8 ( $\underline{\text{C-Ph}}$ ), $\delta$ 128,0 ( $\underline{\text{C-Ph}}$ ), 134,9 ( $2\underline{\text{C-Py}}$ ), $\delta$ 139,1 ( $\underline{\text{C-Py}}$ ), $\delta$ 147,8 ( $2\underline{\text{C-Py}}$ ), $\delta$ 161,3 ( $\underline{\text{CONH}}$ ).	3247 (NH, H-bridges), 3030 (C-H aromatic), 2937-2820 (C-H aliphatic), 1693 and 1649 (C=O amide).
<u>9</u>	$^1\text{H}$ NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 200MHz) $\delta$ 7,50 (d, 2H, $\underline{\text{H-Ph}}$ ), $\delta$ 7,64 (d, 2H, $\underline{\text{H-Ph}}$ ), $\delta$ 8,12 (t, 1H, $\underline{\text{H-Py}}$ ), $\delta$ 8,47 (d, 2H, $\underline{\text{H-Py}}$ ), $\delta$ 9,46 (sl, 1H, $\underline{\text{NH}}$ ). $^{13}\text{C}$ NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 50MHz) $\delta$ 117,8 ( $\underline{\text{C-Ph}}$ ), $\delta$ 121,7 ( $2\underline{\text{C-Ph}}$ ), $\delta$ 125,9 ( $2\underline{\text{C-Py}}$ ), $\delta$ 132,3 ( $2\underline{\text{C-Ph}}$ ), $\delta$ 136,1 ( $\underline{\text{C-Py}}$ ), $\delta$ 139,8 ( $\underline{\text{C-Ph}}$ ), $\delta$ 148,8 ( $2\underline{\text{C-Py}}$ ), $\delta$ 161,1 ( $\underline{\text{CONH}}$ ).	3316 (NH), 1674 (C=O amide), 1549 (C=N).

Table 3.  $^1\text{H}$  NMR,  $^{13}\text{C}$  NMR and IR spectroscopic data of the prepared compounds.

## **Microbiological Method**

### *Section of Microorganisms*

A screening was held to confirm activity of microorganisms and to select strains for the determination of the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) of new compounds. The strains selected were from American Type Culture Collection (ATCC): *S. aureus* ATCC 25932, *P. aeruginosa* ATCC 90271, *S. mutans* ATCC 25175, and *C. albicans* ATCC 10231.

### **Antibacterial and Antifungal activity**

To carry out the determination of MIC, a microbiologic suspension was prepared from diluting cultures incubated for 24 hours (bacteria) and 48 hours (fungi) with sterilized physiological solution. For the standardization of the microbiological suspension we used a spectrophotometer ( $\lambda = 580\text{nm}$ ), where the suspension mentioned above was diluted with sterilized physiological solution until we obtained a reading of 25% of transmittance.

The standardized microbiological solution was serially diluted in sterilized physiological solution, and the counting of colonies was held in Plate Counting Agar (PCA), by plating technique. Seeded broth was prepared in sterilized Tryptone soy Broth (TSB) for bacteria and Sabouraud Dextrose Broth for fungus, in double concentration. The colony forming units (CFU) of seeded broth was adjusted in a range of  $10^3$ - $10^4$  CFU/mL. 3mL of seeded broth was added to 1 mL of the solution with the test compound, to make one test tube. Other different concentration solutions of same test compound were tested. Solvent controls and seeded broth controls were also run simultaneously. The MIC was obtained by visual observation after 24 hours (bacteria) and 48 hours (fungi).

## **Conclusion**

This work describes the synthesis, characterization and antimicrobial evaluation of six disubstituted pyridines derivatives. These compounds were prepared using a simple

methodology and presented a moderate activity against *S. aureus*, *S. mutants* and *P. aeruginosa*. The amide derivative 6 presented MIC value of 37.5, which is 1.5 times less active than amphotericin B against *C albicans*.

## References

1. Klimesová, V.; Svoboda, M.; Waisser, K.; Pour, M.; Kaustova, J. *Il Farmaco* **1999**, *54*, 666.
2. Goda, F. E.; Abdel-Aziz, A. A. M.; Attef, O. A. *Bioorg. Med. Chem.* **2004**, *12*, 1845.
3. Pregnolato, M.; Terreni, M.; Ubiali, D.; Pagani, G.; Borgna, P.; Pastoni, F.; Zapollo, F. *Il Farmaco* **2000**, *55*, 669.
4. Elguero, J.; Katritzky, A. R.; Ress, C. W.; Scriven, E. F. In *Comprehensive Heterocyclic Chemistry II* Eds.; Pergamon Press: Oxford, UK, **1996**; Vol. 3, 70.
5. Lazaar, J.; Rebstock, A. S.; Mongin, F.; Godard, A.; Trecourt, F.; Marsais, F.; Queguiner, G. *Tetrahedron* **2002**, *58*, 6723.
6. Corredor, M. C.; Rodriguez Mellado, J. M. *Electrochimica Acta* **2004**, *49*, 1843.
7. Hichri, F.; Jannet, H. B.; Cheriaa, J.; Jegham, S.; Mighri, Z. *Comptes Rendus Chimie* **2003**, *6*, 473.
8. Pregnolato, M.; Terreni, M.; Ubiali, D.; Pagani, G.; Borgna, P.; Pastoni, F.; Zampollo, F. *Il Farmaco*, **2000**, *55*, 669.
9. Ianelli, S.; Mazza, P.; Orcesi, M.; Pelizzi, C.; Pelizzi, G.; Zani, F. *J. Inorg. Biochem.*, **1995**, *60*, 89.
10. Maccari, R.; Ottana, R.; Vigorita, M. G. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2001**, *11*, 301.
11. Henry, G. D. *Tetrahedron* **2004**, *60*, 6043.
12. Burki, N. K.; Diamond, L. *Clin. Pharmacol Ther.* **1978**, *24*, 84.
13. Irving, P. M.; Pasi, K. J.; Rampton, D. S. *Clin. Gastroenterol. Hepatol.* **2005**, *3*, 617.
- 14- Neri Seneri, G. G.; Coccheri, S.; Marubini, E.; Violi, F.; *European Heart Journal*, **2004**.  
Buscar pelo sciencefinder
15. Dignam, C. F.; Randall, L. A.; Blacken, R. D.; Cunningham, P. R.; Lester, S. K. G.; Brown, M. J.; French, S. C.; Wenzel, T. J. *Tetrahedron: Asymmetry* **2006**, *17*, 1199.
16. Rai, A. K.; Rai, D. K. *Spectrochim. Acta A Mol. Biomol. Spectrosc.* **2003**, *59*, 1673.

17. Momose, Y.; Meguro, K.; Ikeda, H.; Hatanaka, C.; Oi, S.; Sohda, T. *Chem. Pharm. Bull.*, **1991**, *39*, 1440.
18. De Souza, M. V. N.; De Almeida, M. V.; Le Hyaric, M., Cardoso, S. H., Amarante, G. *W. Quím. Nova* **2003**, *23*, 694.
19. The United States Pharmacopoeia. 24 ed. Rockville: *The United States Pharmacopoeial Convention*, 2000.

## **ANEXO D – Artigo aceito para publicação**

### **1. Phytomedicine**

#### ***Centella asiatica* WATER EXTRACT INHIBITS iPLA<sub>2</sub> AND cPLA<sub>2</sub> ACTIVITIES IN RATS CEREBELLUM**

Nádia Rezende Barbosa<sup>a,b</sup>, Frederico Pittella<sup>a</sup>, Wagner Farid Gattaz<sup>b\*</sup>

<sup>a</sup> Faculty of Pharmacy and Biochemistry, Federal University of Juiz de Fora, Minas Gerais, Brazil.

<sup>b</sup> Laboratory of Neuroscience, Department and Institute of Psychiatry, Faculty of Medicine, University of São Paulo, São Paulo, Brazil.

#### **Mailing address:**

Prof. Wagner Farid Gattaz

Department and Institute of Psychiatry, Faculty of Medicine, University of São Paulo

Rua Doutor Ovídio Pires de Campos, nº 785

CEP 05403-010 - São Paulo - S.P. – Brazil

E-mail: gattaz@usp.br

Telephone number: (55–11–30697283)

Fax number: (55–11–30698010)

\* Corresponding author

## Abstract

*Centella asiatica* (L.) Urb. is widely distributed in South America and Asia and is known as a therapeutic agent capable of improving memory and treating several neurological disorders in folk medicine. Asiaticoside is one of the compounds found in *C. asiatica* leaves that is responsible for its pharmacological potential. Phospholipase A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) is a group of enzymes that has abnormal activity in central nervous system in some neuropsychiatric diseases. In this work the asiaticoside present in *C. asiatica* water extract was quantified by HPLC analysis. We also evaluated the activity of subtypes of PLA<sub>2</sub> in cerebellar samples from rats after *C. asiatica* water extract treatment by radioenzymatic assay. Asiaticoside was the major compound (84%) found in *Centella* water extract. We found a dose dependent inhibitory effect of *C. asiatica* water extract on the activity of iPLA<sub>2</sub> and cPLA<sub>2</sub>. The inhibition of these enzymes in the brain suggests that *C. asiatica* may be useful to treat conditions associated with increased PLA<sub>2</sub> activity in the brain, such as epilepsy, stroke, multiple sclerosis and other neuropsychiatric disorders.

**Keywords** – *Centella asiatica*, Umbelliferae, PLA<sub>2</sub>, rat, neuropsychiatric disorders.

## Introduction

*Centella asiatica* (L.) Urban is a member of the Umbelliferae family that has been used for centuries in traditional medicine to treat psychiatric disorders, asthma, leprosy, ulcers, eczema and to promote wound healing (Brinkhaus et al., 2000; Chen et al., 2006; Wijeweera et al., 2006).

*C. asiatica* contains not only triterpene glycosides such as asiaticoside, madecassoside and sceleffoleoside (Matsuda et al., 2001), but also asiatic and madecassic acids that were identified by thin layer chromatography and mass spectrometry (Bonfill et al., 2006). Asiaticoside (Fig. 1) is transformed into asiatic acid *in vivo* by hydrolysis. Asiatic acid induces apoptosis and cell cycle arrest in different sorts of cancer (Hsu et al., 2005; Park et al., 2007).

Phospholipases A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) are a family of key enzymes in the metabolism of phospholipids. In brain, these enzymes preferentially cleave membrane phosphatidylcholine to release free arachidonic acid (AA) and lysophosphatidylcholine, which are important mediators necessary for memory processing (Farooqui et al., 1997). Accordingly, alterations in PLA<sub>2</sub> activity were described in different neuropsychiatric disorders (Gattaz et al., 1987; Yegin et al., 2002; Gattaz et al., 2004; Forlenza et al., 2007). Different PLA<sub>2</sub> enzymes were identified in mammalian tissues (Kudo, 2004) and classified according to their structure, cellular function, subcellular localization and enzymatic properties (Sun et al., 2004; Farooqui et al., 2006). Stimulus-induced AA liberation is thought to be mediated mainly by secretory PLA<sub>2</sub> (sPLA<sub>2</sub>) and by cytosolic PLA<sub>2</sub> (cPLA<sub>2</sub>), whereas group VI Ca<sup>+2</sup>-independent PLA<sub>2</sub> (iPLA<sub>2</sub>) has been suggested to contribute to phospholipid remodeling (Murakami et al., 1998).

Our group explored the effects of *C. asiatica* water extract on activity of subtypes of PLA<sub>2</sub> in brain tissue from rats, and quantified by HPLC a possible molecule responsible for the activity, the asiaticoside present in water extract. *C. asiatica* inhibited both iPLA<sub>2</sub> and cPLA<sub>2</sub> activities in rats cerebellum.

## Material and methods

### Cerebellum samples

Adult male *Wistar* rats (n=8) (2.0–2.5 months old; 250–300 g) obtained from Federal University of São Paulo were used. The local Ethics Committee on Animal Experimentation approved the experimental protocol, following the international principles of ethics for animal experimentation. The rats were killed by decapitation and the brain was rapidly withdrawn, the cerebellum was dissected and homogenized in 10 vol. of 5mM Tris–HCl buffer pH 7.4.

Aliquots for PLA<sub>2</sub> activity determinations were separated and frozen at -70°C until use. Total protein levels were determined in the samples according to Lowry et al., 1951.

### ***Centella asiatica* extract**

*Centella asiatica* (L.) Urban fresh plant was collected in the Campus of the Federal University of Juiz de Fora (UFJF) - Brazil, and authenticated by Dr. Fátima Regina Gonçalves Salimena from the Botanic Department, UFJF. A voucher specimen (N° 24.610) is deposited at CESJ of the UFJF.

The aqueous extract was prepared by infusion of *C. asiatica* (200 g) in ultrapure water (4 L) followed by cold maceration for 24 h. The solution was filtered and then freeze-dried to yield a residue that was stored at -70°C until use. In order to carry out the radioenzymatic assay, aqueous residue was resuspended with 5 mM Tris-HCl buffer pH 7.4 to obtain a concentration of 0 to 500 µg/mL.

### **Determination of asiaticoside by HPLC**

HPLC analysis was used to determine the concentration of asiaticoside in Centella extract. Centella extract powder was dissolved in mobile phase and filtered by 0.22 µm membrane (Millipore Corp., Bedford, MA). The chromatographic system used consisted of a high pressure pump (LC-10AT), a controller system (SCL-10A), a diode array detector (SPD-M10A) set at 204 nm, a degasser (DGU14A), an autoinjector (SIL-10AF) and a data processor (LC-10Advp) all from Shimadzu (Japan). Separation was performed on a CN column (Shimadzu; 250 × 4.6 mm I.D., 5 µm particle size). Isocratic elution of mobile phase was performed with mixture of 0.5% phosphoric acid solution and acetonitrile (1:4,v/v) and pumped at a flow rate of 2.0 mL/min. Calibration plots (weighted regression line) were obtained from linear least-squares regression analysis plotting of peak-area ratios (asiaticoside/internal standard) versus the HPLC grade asiaticoside (Carl Roth, Germany) concentrations (31.5 to 500 µg/mL) into the column. The concentration of asiaticoside in Centella extract was calculated from the averaged peak-area ratios of the asiaticoside and internal standard (boldine – *Pharmacopeia*, Brazil) obtained from triplicate injections of 25 µL of Centella extract content boldine (100µg/mL).

## PLA<sub>2</sub> subtypes activities by radioenzymatic assay

The substrate used was L- $\alpha$ -1-palmitoyl-2-arachidonyl-phosphatidyl-choline labelled with [ $^{14}\text{C}$ ] in the arachidonyl tail at position *sn*-2 ( $^{14}\text{C}$ -PC) (48mCi/mmol specific activity, PerkinElmer, Boston, MA) previously diluted 1:10 (v/v) in a 0.14g/ml solution of the butylated hydroxytoluene prepared in toluol–ethanol (1:1, v/v). Prior to reaction,  $^{14}\text{C}$ -PC solution was nitrogen evaporated (0.075 $\mu\text{Ci}$ /sample), resuspended in 0.3 mg/mL human albumin solution and homogenized by sonication.

Total homogenates of brain tissue were diluted to a protein concentration of 1.5 mg/mL with 50 mM Tris-HCl (pH 8.5 for sPLA<sub>2</sub> and cPLA<sub>2</sub> or pH 7.5 for iPLA<sub>2</sub>). The assay samples containing 100 mM Tris-HCl buffer (pH 8.5 or pH 7.5), 1  $\mu\text{M}$  CaCl<sub>2</sub> (for cPLA<sub>2</sub> and iPLA<sub>2</sub>) or 2mM for sPLA<sub>2</sub>, 100  $\mu\text{M}$  BEL (Biomol, Plymouth Meeting, PA), 300 $\mu\text{g}$  of protein from diluted homogenates, *C. asiatica* extract (0 to 500  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) and 0.075 $\mu\text{Ci}$  arachidonyl-1- $^{14}\text{C}$ -PC. After an incubation time of 15 min at 37°C, the reaction was stopped by adding a mixture of HCl–isopropanol (1:12, v/v). The liberated [ $^{14}\text{C}$ ] AA was then extracted. Finally, the radioactivity of  $^{14}\text{C}$ -AA was measured in a liquid scintillation counter (Tri-Carb 2100 TR; Packard, Meriden, CT) and used for calculating the PLA<sub>2</sub> activities, which are expressed in pmol·mg protein·min<sup>-1</sup>. All experiments were performed in triplicate.

## Statistical Analysis

Data from PLA<sub>2</sub> activity determinations are reported as mean  $\pm$  standard error of the mean (SEM). One-way ANOVA followed by the Bonferroni's method using Statistical Package for Social Sciences version 10.0 (SPSS Inc., Chicago, IL) software. Probability level of statistical significance was set at  $p < 0.05$ .

## Results

HPLC analysis of asiaticoside standard showed a single peak at 204 nm with a retention time of 0.821 min. Centella extract gave a peak with the same wavelength and retention time of the asiaticoside standard, while the retention time of boldine was 2.677 min. The concentration of asiaticoside found in Centella extract powder (250  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) submitted to chromatographic analysis (n=3) was 211  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , calculated from the averaged peak-area ratios of the asiaticoside standard and boldine. As the main component in this extract, the concentration of asiaticoside was 84% (w/w). Other compounds were not detected by this HPLC method.

We found a dose dependent inhibitory effect of *C. asiatica* water extract (125 to 500 µg/mL) on iPLA<sub>2</sub> activity (Fig. 2). At 500µg/mL, the value of inhibition of iPLA<sub>2</sub> activity was maximal at 96%, whereas with 250 µg/mL the inhibition was 85% and with 125µg/mL was 39%, when compared to control. Centella water extract (12.5 to 500 µg/mL) also showed an dose dependent inhibition of cPLA<sub>2</sub> activity (Fig. 3). At 500µg/mL, the value of inhibition of cPLA<sub>2</sub> activity was maximal at 77%, when compared to control (without *C. asiatica* water extract). Interestingly, sPLA<sub>2</sub> activity was undetected, probably because its activity in cerebellum is very low, below the detection limit of our assay (0.01 pMol/mg protein/min) (data not shown).

## Discussion

In the present study, we found that *C. asiatica* water extract inhibited 96% and 77% the activity of iPLA<sub>2</sub> and cPLA<sub>2</sub>, respectively. The first is especially interesting due to our previous findings that iPLA<sub>2</sub> is responsible for about 80% of all PLA<sub>2</sub> activity in the brain (unpublished results). In our experiments, we identified asiaticoside as major compound (84%) present in Centella water extract by HPLC.

The interest of *C. asiatica* effectiveness in the treatment of neurodegenerative disorders is increasing. Subathra et al. (2005) reported that *C. asiatica* prevents oxidative damage, improving antioxidant status in brain. Kim et al. (2004) reported that asiatic acid improves acetylcholine synthesis, which is fundamental in memory processes. Kumar and Gupta (2003) reported that *C. asiatica* water extract dose-dependently normalized brain enzyme levels of malondialdehyde, catalase and glutathione, whereas derivatives of asiaticoside and asiatic acid showed protective effect against beta amyloid-induced neurotoxicity (Inhee et al., 1999; Sang-sup et al., 2000).

Our findings suggest that *C. asiatica* may be useful in the treatment of disorders associated with an increment of PLA<sub>2</sub> activity in the brain. Increased brain PLA<sub>2</sub> activity results in profound changes in the physicochemical properties of neuronal membranes, which influence, for instance, signal transduction, synthesis and release of neurotransmitter, receptors function and neuronal viability (Sun et al., 2004). These mechanisms may underlie a number of conditions in which increased PLA<sub>2</sub> activity has been described, such as schizophrenia (Gattaz et al., 1987, Smesny et al., 2005), epilepsy (Yegin et al., 2002), Parkinson's disease and multiple sclerosis (review in Farooqui et al., 2006).

Novel, potent and specific inhibitors of PLA<sub>2</sub> are emerging as potential therapeutic agents for neuroinflammation and oxidative stress. The need of specific and nontoxic potent inhibitors provides new perspective

for the research in this field. Therefore, *C. asiatica* water extract becomes a candidate with pharmacological activities in brain and with a very low toxicity attested by its long popular use as a natural product in the treatment of neuropsychiatric disorders.

## Acknowledgements

The Laboratory of Neuroscience receives financial support from the Associação Beneficente Alzira Denise Herzog da Silva.

## References

- Bonfill, M., Mangas, S., Cusidó, R.M., Osuna, L., Piñol, M.T., Palazón, J., 2006. Identification of triterpenoid compounds of *Centella asiatica* by thin-layer chromatography and mass spectrometry. *Biomed. Chromatogr.* 20, 151–153.
- Brinkhaus, B., Lindner, M., Schuppan, D., Hahn, E.G., 2000. Chemical, pharmacological and clinical profile of the East Asian medical plant *Centella asiatica*. *Phytomedicine* 7 (5), 427-48.
- Chen, S.W., Wang, W.J., Li, W.J., Wang, R., Li, Y.L., Huang, Y.N., Liang, X., 2006. Anxiolytic-like effect of asiaticoside in mice. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 85, 339–344.
- Farooqui, A.A., Yang, H.C., Rosenberger, T.A., Horrocks, L.A., 1997. Phospholipase A<sub>2</sub> and its role in brain tissue. *J. Neurochem.* 69, 889–901.
- Farooqui, A.A., Ong, W.Y., Horrocks, L.A., 2006. Inhibitors of Brain Phospholipase A<sub>2</sub> Activity: Their Neuropharmacological Effects and Therapeutic Importance for the Treatment of Neurologic Disorders. *Pharmacol. Rev.* 58, 591–620.

- Forlenza, O.V., Schaeffer, E.L., Gattaz, W.F., 2007. The role of phospholipase A<sub>2</sub> in neuronal homeostasis and memory formation: implications for the pathogenesis of Alzheimer's disease. *J. Neural Transm.* 114, 231-238.
- Gattaz, W.F., Kollisch, M., Thuren, T., Virtanen, J.A., Kinnunen, P.K., 1987. Increased plasma phospholipase A<sub>2</sub> activity in schizophrenic patients: reduction after neuroleptic therapy. *Biol. Psychiatry* 22, 421–426.
- Gattaz, W.F., Forlenza, O.V., Talib, L.L., Barbosa, N.R., Bottino, C.M., 2004. Platelet phospholipase A<sub>2</sub> activity in Alzheimer's disease and mild cognitive impairment. *J. Neural Transm.* 111, 591-601.
- Hsu, Y.L., Kuo, P.L., Lin, L.T., Lin, C.C., 2005. Asiatic Acid, a Triterpene, Induces Apoptosis and Cell Cycle Arrest through Activation of Extracellular Signal-Regulated Kinase and p38 Mitogen-Activated Protein Kinase Pathways in Human Breast Cancer Cells. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 313, 333–344.
- Inhee, M.J., Eun, S.J., Hwan, Y.S., Kyoon, H., Young, K.J., Keun, P.H., Sang-Sup, J., Whan, J.M., 1999. Protective effects of asiaticoside derivatives against beta-amyloid neurotoxicity. *J. Neurosci. Res.* 58, 417–425.
- Kim, S.R., Koo, K.A., Lee, M.K., Park, H.G., Sang-sup, J., Cha, K., Kim, Y.C., 2004. Asiatic acid derivatives enhance cognitive performance partly by improving acetylcholine synthesis. *J. Pharm. Pharmacol.* 56, 1275–1282.
- Kudo, I., 2004. Diversity of phospholipase A<sub>2</sub> enzymes. Foreword. *Biol. Pharm. Bull.* 27, 1157.
- Kumar, M.H.V., Gupta, Y.K., 2003. Effect of *Centella asiatica* on cognition and oxidative stress in an intracerebroventricular streptozotocin model of Alzheimer's disease in rats. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 30, 336–342.
- Lowry, O.H., Rowebrough, N.J., Farr, L.A., Randall, R.J., 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265–275.
- Matsuda, H., Morikawa, T., Ueda, H., Yoshikawa, M., 2001. Medicinal foodstuffs. XXVII. Saponin constituents Gotu Kola (2): Structures of new ursane- and oleanane-type triterpene oligoglycosides, centellasaponin B, C, and D, from *Centella asiatica* cultivated in Sri Lanka. *Chem. Pharm. Bull.* 49, 1368–1371.

- Murakami, M., Shimbara, S., Kambe, T., Kuwata, H., Winstead, M.V., Tischfield, J.A., Kudo, I., 1998. The Functions of Five Distinct Mammalian Phospholipase A<sub>2</sub>s in Regulating Arachidonic Acid Release. *J. Biol. Chem.* 273, 14411–14423.
- Park, B.C., Paek, S.H., Lee, Y.S., Kim, S.J., Lee, E.S., Choi, H.G., Yong, C.S., Kim, J.A., 2007. Inhibitory Effects of Asiatic Acid on 7,12-Dimethylbenz[*a*]anthracene and 12-*O*-Tetradecanoylphorbol 13-Acetate-Induced Tumor Promotion in Mice. *Biol. Pharm. Bull.* 30, 176–179.
- Sang-Sup, J., Chi-Hyoung, Y., Doo-Yeon, L., Heeman, K., Inhee, M.J., Min, W.J., Heesung, C., Young-Hoon, J., Heedoo, K., Hyeung-Geun, P., 2000. Structure–activity relationship study of asiatic acid derivatives against beta amyloid (A- $\beta$ )-induced neurotoxicity. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 10, 119–121.
- Smesny, S., Kinder, D., Willhardt, I., Rosburg, T., Lasch, J., Berger, G., Sauer, H., 2005. Increased calcium-independent phospholipase A<sub>2</sub> activity in first but not in multipisode chronic schizophrenia. *Biol. Psychiatry* 57, 399–405.
- Subathra, M., Shila, S., Devi, M.A., Panneerselvam, C., 2005. Emerging role of *Centella asiatica* in improving age-related neurological antioxidant status. *Exp. Gerontol.* 40, 707-715.
- Sun, G.Y., Xu, J.F., Jensen, M.D., Simonyi, A., 2004. Phospholipase A<sub>2</sub> in the central nervous system: implications for neurodegenerative diseases. *J. Lipid. Res.* 45, 205–213.
- Wijeweera, P., Arnason, J.T., Koszycki, D., Merali, Z., 2006. Evaluation of anxiolytic properties of Gotukola – (*Centella asiatica*) extracts and asiaticoside in rat behavioral models. *Phytomedicine* 13, 668–676.
- Yegin, A., Akbas, S.H., Ozben, T., Korgun, D.K., 2002. Secretory phospholipase A<sub>2</sub> and phospholipids in neural membranes in an experimental epilepsy model. *Acta Neurol. Scand.* 106, 258–262.

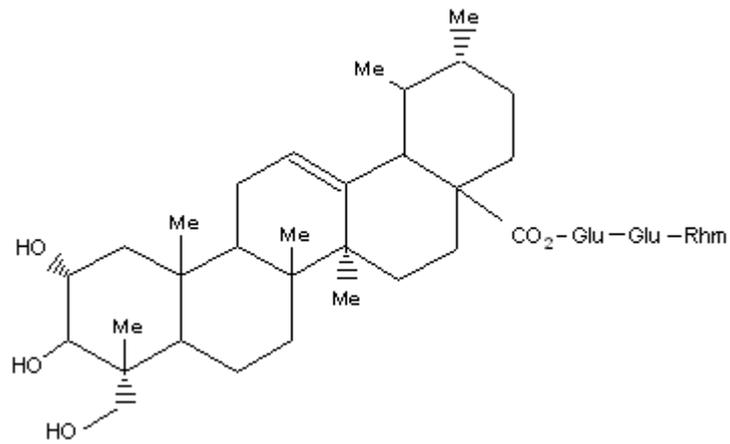


Fig. 1 - Structural formula of asiaticoside . Glu = glucose; Rhm = rhamnose; Me = methyl.

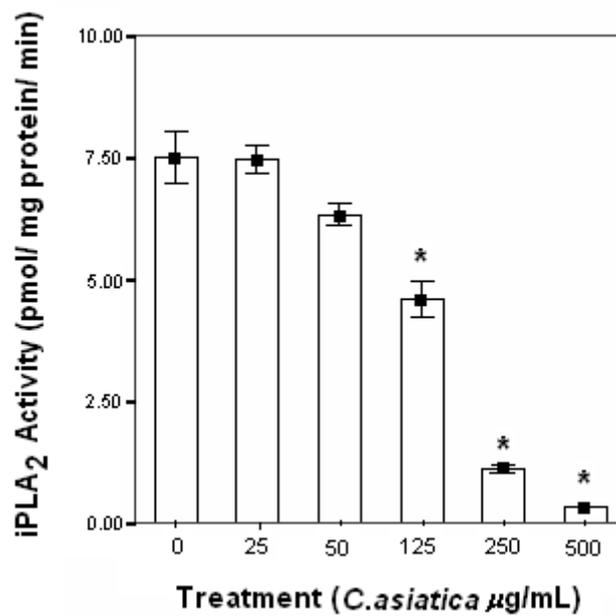


Fig. 2 – Inhibitory effect of *Centella asiatica* water extract on iPLA<sub>2</sub> activity in rats cerebellum, determined by radioenzymatic assay. Data are means ± SEM (n=3). \*Significantly different from control ( $p < 0.05$ ).

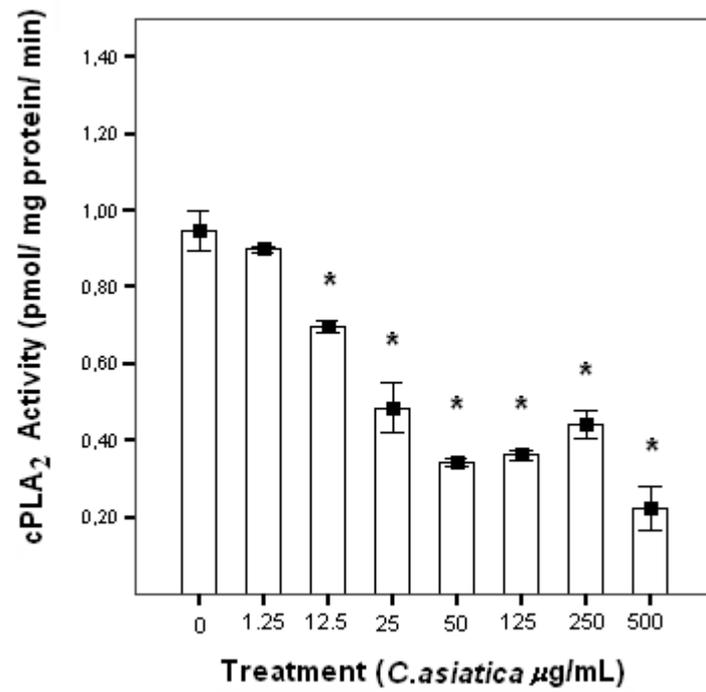


Fig. 3 - Inhibitory effect of *Centella asiatica* water extract on cPLA<sub>2</sub> activity in rats cerebellum, determined by radioenzymatic assay. Data are means  $\pm$  SEM (n=3). \*Significantly different from control ( $p < 0.05$ ).

## **ANEXO E – Artigos em preparação para publicação**

### **1. GC-MS analysis of *Pterodon emarginatus* essential oil and cytotoxic activity on cancer cell lines**

Rafael C. Dutra<sup>1</sup>, Frederico Pittella<sup>1</sup>, Dalton Dittz Junior<sup>3</sup>, Daniel S. Pimenta<sup>2</sup>, Ana Cláudia F. Amaral<sup>4</sup>, Miriam Tereza P. Lopes<sup>3</sup>, Nádia R. Barbosa<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Núcleo de Identificação e Quantificação Analítica (NIQUA)- Faculdade de Farmácia e Bioquímica- Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF) – Brazil

<sup>2</sup> Instituto de Ciências Biológicas (ICB) - Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF) - Brazil

<sup>3</sup> Laboratório de Substâncias Antitumorais – Instituto de Ciências Biológicas (ICB) – Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) – Brazil

<sup>4</sup> Laboratório de Plantas Medicinais e Derivados – FIOCRUZ - Rio de Janeiro - Brazil

### **2. Antioxidant and Antitumor Activities of *Centella asiatica* (L) Urb. Aqueous Extract**

Frederico Pittella<sup>1</sup>, Dalton Dittz Junior<sup>2</sup>, Rafael C. Dutra<sup>1</sup>, Miriam Tereza P. Lopes<sup>2</sup>, Nádia R. Barbosa<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Núcleo de Identificação e Quantificação Analítica (NIQUA)- Faculdade de Farmácia e Bioquímica- Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF) – Brazil

<sup>2</sup> Laboratório de Substâncias Antitumorais – Instituto de Ciências Biológicas (ICB) – Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) – Brazil

### **3. Cremes contendo extratos de *Centella asiatica* apresentam atividade cicatrizante em modelo *in vivo* de queimadura**

Frederico Pittella<sup>1</sup>, Rafael C. Dutra<sup>1</sup>, Rogério Estevam Farias<sup>2</sup>, Nádia R. Barbosa<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Núcleo de Identificação e Quantificação Analítica (NIQUA)- Faculdade de Farmácia e Bioquímica- Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF) – Brazil

<sup>2</sup>Instituto de Ciências Biológicas (ICB) - Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF) - Brazil

## **ANEXO F - Resumos apresentados em congressos**

- 1 - Barbosa, N.R.; Silva, F.P.; Gattaz, W.F. *Centella asiatica* water extract inhibits calcium independent phospholipase  $a_2$  (iPLA<sub>2</sub>) activity in cerebellum samples. In: 3<sup>o</sup> Simpósio de Avanços em Pesquisas Médicas, 2007, São Paulo – SP.
  
- 2 - Silva, F.P.; Dutra, R.C.; Barbosa, N.R. Análise fitoquímica e toxicidade aguda do extrato etanólico das folhas de *Terminalia fagifolia*. In: II Reunião Regional da Federação de Sociedades de Biologia Experimental - FeSBE, 2007, Recife - PE. II Reunião Regional da FeSBE, 2007.
  
- 3 - Silva, F.P.; Paes, C.Q.; Pimenta, D.S.; Barbosa, N.R. Análise fitoquímica e toxicidade em *Artemia salina* de extratos de *Centella asiatica*. In: II Reunião Regional da Federação de Sociedades de Biologia Experimental - FeSBE, 2007, Recife - PE. II Reunião Regional da FeSBE, 2007.
  
- 4 - Silva, F.P.; Ferreira, A.S.; Dutra, R.C.; Barbosa, N.R. Estudo fitoquímico e atividade antimicrobiana do extrato etanólico das folhas de *Tabernaemontana latea*. In: II Reunião Regional da Federação de Sociedades de Biologia Experimental - FeSBE, 2007, Recife - PE. II Reunião Regional da FeSBE, 2007.
  
- 5 - Silva, F.P.; Paes, C.Q.; Pimenta, D.S.; Barbosa, N.R. Verificação *in vivo* do efeito cicatrizante de *Centella asiatica*. In: XXII Reunião Anual da Federação de

Sociedades de Biologia Experimental - FeSBE, 2007, Águas de Lindóia - SP. XXII Reunião Anual da Fesbe - 2007, 2007.

6 - Dutra, R.C.; Silva, F.P.; Barbosa, N.R. Doseamento dos constituintes fenólicos e atividade antioxidante das folhas de *Terminalia Fagifolia*. In: 58º Congresso Nacional de Botânica, 2007, São Paulo - SP. Anais do 58º Congresso Nacional de Botânica, 2007.

7 - Silva, F.P.; Vale, M.L.; Ferreira, R.R.C.; Pimenta, D.S.; Barbosa, N.R. Determinação do teor de asiaticosídeo em extrato de *Centella asiatica* por HPLC. In: XXI Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental - FeSBE, 2006, Águas de Lindóia. XXI Reunião Anual da FeSBE, 2006.