

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

Rafael Cypriano Dutra

**AVALIAÇÕES FITOQUÍMICA E FARMACOLÓGICA DAS SEMENTES
DE *Pterodon emarginatus* Vogel**

Juiz de Fora – MG – Brasil

2008

RAFAEL CYPRIANO DUTRA

**AVALIAÇÕES FITOQUÍMICA E FARMACOLÓGICA DAS SEMENTES
DE *Pterodon emarginatus* Vogel**

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

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Nádia Rezende Barbosa

Juiz de Fora – MG – Brasil

2008

Dutra, Rafael Cypriano

Avaliações fitoquímica e farmacológica das sementes de *Pterodon emarginatus* Vogel/Rafael Cypriano Dutra ; orientador:
Profa. Nádia Rezende Barbosa. – 2008.
244 f. il.

Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Juiz de Fora.

1. Sementes. 2. *Pterodon emarginatus*. I. Barbosa, Nádia Rezende.

II.Título.

CDU 581.142:631.53.01

*Comece fazendo o necessário, depois o que é possível,
e de repente você estará fazendo o impossível.”*

(São Francisco de Assis).

*“Qualquer coisa que você possa fazer, ou sonha que
possa fazer, comece a fazê-la. A ousadia tem em si genialidade, força e magia”*

(Goethe, 1749 – 1832).

*Dedico este trabalho à minha avó
Francisca Cypriano,
fonte eterna de inspiração.*

AGRADECIMENTOS

A DEUS, pelo dom da vida, eterna fonte de iluminação, sabedoria, constante companhia.

À minha mãe, pelo incentivo, paciência, apoio e, principalmente, amor incondicional permitindo a conclusão de mais uma importante etapa da minha vida, obrigado por ter acreditado em mim.

Ao meu pai, pelo apoio moral e financeiro durante todos estes anos, obrigado por ter apostado em mim.

Ao meu irmão, fonte de inspiração e exemplo a ser seguido, obrigado pela fiel companhia e pelos sábios conselhos de vida.

À minha avó, Francisca, fonte eterna de sabedoria e exemplo, esta obra é dedicada à senhora.

À minha madrinha, exemplo de garra e persistência, obrigado pelo exemplo de vida.

Ao meu primo Bruno, pelo apoio e por sempre acreditar em meus ideais.

À Prof^a. Dr^a. Nádia Rezende Barbosa pela adorável e prazerosa amizade, orientação segura, oportunidade de amadurecimento profissional e, principalmente, pessoal, pela compreensão e apoio em todos os momentos, carinho maternal, conversas amigáveis, discussões necessárias, cobranças infinitas. Obrigado pelo carinho quando pensei em desistir de tudo.

Ao Prof. Dr. Orlando Vieira de Sousa, pela amizade, confiança e por ter acreditado no meu potencial científico desde o primeiro momento em que entrei no laboratório de Farmacodinâmica, seus ensinamentos foram imprescindíveis para a execução deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Daniel Sales Pimenta, professor e amigo, obrigado pelos ensinamentos científicos e os não-científicos, pela amizade e por sempre ter acreditado no meu potencial, sua contribuição neste trabalho é real.

À Prof^a. Dr^a. Magda Narciso Leite, pelos ensinamentos e aulas particulares inesquecíveis, pela amizade, confiança e apoio diário.

À Prof^a. Dr^a. Elaine Coimbra, pelo apoio e parceria.

Ao Prof. Dr. Mauro Vieira de Almeida, pela paciência, ensinamentos e apoio.

À Prof^a. Dr^a. Miriam Tereza P. Lopes da Farmacologia (UFMG), pelo apoio e parceria na execução da atividade antitumoral do óleo essencial das sementes de sucupira.

Ao Prof. Dr. Marcos Antônio Brandão, pelos conselhos e incentivos em momentos de desilusão e frustração, obrigado meu amigo.

À Pâmela Souza Silva, pela paciência, carinho e persistência eterna em me ajudar e sempre tentar me mostrar o melhor caminho.

A amizade dos irmãos eternos Adilson, Gustavo, Marcelo, Sávio e Carolzinha, obrigado pelo apoio nos momentos mais difíceis e pelos momentos inesquecíveis que vivemos todos juntos.

Ao amigo Frederico Pittella, pela sua amizade, confiança, conversas intermináveis, conselhos decisivos e por ter me incentivado quando tentei desistir de tudo. Obrigado meu irmão.

Aos amigos do NIQUA e FFB Alessandra, Aline, Camila, Enrico, Érika, Felipe, Humberto, Leandro, Mariana, Mariza, Priscila, Raphael e Vanessa, pelo convívio, auxílio e amizade.

À Fatinha e Vaneida pela amizade, carinho e ajuda incondicional.

Aos funcionários da FFB: Oscavo (Horto), Pitanga, Maura, Nádia e Roberto pelo apoio.

Ao amigo Láudio Alessi Machado pelo apoio e parceria.

A UFJF e a CAPES pela bolsa concedida.

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

Muito Obrigado!

RESUMO

DUTRA, R.C. **Avaliação fitoquímica e farmacológica das sementes de *Pterodon emarginatus* Vogel**. 2008. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, 2008.

Pterodon emarginatus Vogel (Leguminosae), popularmente conhecida como sucupira-branca ou faveiro, é uma planta nativa, dispersa por quase toda a região central do Brasil. A infusão de suas cascas, folhas e sementes têm eficiente ação anti-reumática, analgésica e antiinflamatória. O presente trabalho realizou análise fitoquímica e farmacológica do óleo essencial (OE) e frações obtidas das sementes de *P. emarginatus* Vogel. O OE foi extraído por hidrodestilação e as respectivas frações hexânica (FH), acetato de etila (FA), butanólica (FB) e metanólica (FM) foram preparadas utilizando aparelho de Soxhlet. Testes de classe de substâncias revelaram a presença de flavonóides, leucoantocianidinas, taninos, heterosídeos cardiotônicos, cumarinas e saponinas nas sementes, assim como taninos, leucoantocianidinas e heterosídeos cardiotônicos em todas as frações testadas. O OE das sementes apresentou atividade bactericida contra *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e toxicidade aguda frente à *Artemia salina*. As FH e FB apresentaram atividade leishmanicida frente às formas promastigotas de *Leishmania amazonensis*. As FB e FM apresentaram atividade antioxidante frente ao radical DPPH. O OE e as frações obtidos das sementes de *P. emarginatus* apresentaram atividade antinociceptiva, nos modelos de contorções abdominais induzidas por ácido acético, teste da placa quente e tempo de lambida da pata. O creme contendo OE e FH apresentaram potencial cicatrizante em modelo de queimaduras. O OE apresentou atividade gastroprotetora, nos modelos utilizando etanol absoluto, indometacina e HCl/etanol, atividade antiinflamatória no modelo de pleurisia induzida por carragenina e atividade antitumoral para todas as linhagens celulares tumorais utilizadas. Estes resultados são promissores, pois as sementes de *Pterodon emarginatus* Vogel possuem componentes ativos podendo constituir uma nova opção terapêutica.

ABSTRACT

DUTRA, R.C. **Phytochemistry and pharmacological evaluation of *Pterodon emarginatus* Vogel seeds.** 2008. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, 2008.

Pterodon emarginatus Vogel (Leguminosae), popularly Known as “sucupira-branca” or “faveiro”, is native plant, easily found all over central Brazil. The infusion of its bark leaves and seeds are effective action anti-rheumatic, analgesic and antiinflammatory. The present work available the phytochemistry and pharmacological potential of *P. emarginatus* Vogel seeds. The essential oil (EO) was extracted for hydrodistillation and the respective fractions hexanic (HF), ethyl acetate (AF), buthanolic (BF) and methanolic (MF) prepared using Soxhlet apparatus. Tests class of substances showed the presence of flavonoids, leucoantocianidines, tannins, cardiotoxic heterosides, coumarins and saponins in the seeds and leucoantocianidines, tannins, cardiotoxic heterosides in all fractions tested. The EO was active against *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 and showed acute toxicity against *Artemia salina*. The HF and BF showed leishmanicidal activity against *Leishmania amazonensis* promastigote forms. The BF and MF showed antioxidant activity against DPPH radicals. The EO and the fractions obtained of *P. emarginatus* seeds showed antinociceptive activity, in acetic acid-induced abdominal writhing, formalin test and hot plate test. The cream containing EO and HF produced potential activity against burns. The EO showed antiulcer activity in ethanol absolute, indomethacin and HCl/ethanol models, anti-inflammatory activity in the pleurisy induced by carrageenan and antitumoral activities for all tumor cells lines used in this work. These results are promising and the *Pterodon emarginatus* Vogel seeds seem have active components might be a new therapeutic option.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Rotas biossintéticas do metabolismo secundário das plantas	08
Figura 2	Representação esquemática da biossíntese dos flavonóides	11
Figura 3	Exemplos de éster do ácido gálico e galotanino	13
Figura 4	Exemplos de taninos elágicos monoméricos	14
Figura 5	Formação dos taninos condensados pela polimerização dos flavan-3-óis e flavan-3,4-dióis	15
Figura 6	Rota biossintética do ácido mevalônico e derivados	18
Figura 7	Representantes de terpenóides originados a partir de DMAPP, GPP, FPP ou GGPP	19
Figura 8	Representantes de monoterpénóides	20
Figura 9	Representantes de sesquiterpenóides	20
Figura 10	Espécime de <i>Pterodon emarginatus</i> Vogel encontrada no Horto Florestal do Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA) (FLONA), no município de Paraopeba/MG. Autor: Rafael Cypriano Dutra, 2006.	25
Figura 11	Espécime de <i>Pterodon emarginatus</i> encontrada no município de Três Marias/MG. Autor: Rafael Cypriano Dutra, 2006.	25
Figura 12	Fórmula estrutural do ácido 6 α ,7 β -dihidroxivouacapan-17-óico	27
Figura 13	Fórmula estrutural do 6 α -hidroxivouacapan-7 β ,17 β -lactona	28
Figura 14	Estruturas, dados físicos e parâmetros específicos das reações de obtenção das amidas sintetizadas a partir do ácido 6 α ,7 β -dihidroxivouacapan-17-óico isolado das sementes de <i>Pterodon emarginatus</i> Vogel	29
Figura 15	Mecanismo molecular da resposta inflamatória na fase aguda	46
Figura 16	Representação esquemática dos quadrantes e aplicação dos cremes no modelo de queimaduras	71
Figura 17	Metáfase mitótica de <i>Pterodon emarginatus</i> Vogel	86
Figura 18.A	Efeito analgésico do OE e FH das sementes de <i>Pterodon emarginatus</i> , no modelo de contorções abdominais induzidas por ácido acético	93
Figura 18.B	Efeito analgésico da FB e FM das sementes de <i>Pterodon emarginatus</i> , no modelo de contorções abdominais induzidas por ácido acético	94
Figura 19.A	Efeito analgésico do OE e FH das sementes de <i>Pterodon emarginatus</i> , no modelo de placa quente	96

Figura 19.B	Efeito analgésico da FB e FM das sementes de <i>Pterodon emarginatus</i> , no modelo de placa quente	97
Figura 20.A	Avaliação da atividade antinociceptiva do OE obtido das sementes de <i>Pterodon emarginatus</i> Vogel, através do tempo de lambida da pata induzida com injeção intraplantar de formalina	99
Figura 20.B	Avaliação da atividade antinociceptiva da FH obtida das sementes de <i>Pterodon emarginatus</i> Vogel, através do tempo de lambida da pata induzida com injeção intraplantar de formalina	100
Figura 20.C	Avaliação da atividade antinociceptiva da FB obtida das sementes de <i>Pterodon emarginatus</i> Vogel, através do tempo de lambida da pata induzida com injeção intraplantar de formalina	101
Figura 20.D	Avaliação da atividade antinociceptiva da FM obtida das sementes de <i>Pterodon emarginatus</i> Vogel, através do tempo de lambida da pata induzida com injeção intraplantar de formalina	102
Figura 21	Evolução das lesões no coelho número 04, tratado com OE de <i>Pterodon emarginatus</i> , no quarto (A e B) e sétimo (C e D) dia	104
Figura 22	Evolução das lesões no coelho número 07, tratado com FH de <i>Pterodon emarginatus</i> , no quinto (A e B) e oitavo (C e D) dia	105
Figura 23.A	Aspecto histológico das áreas tratadas com creme base e sulfadiazina de prata	107
Figura 23.B	Aspecto histológico das áreas tratadas com creme contendo OE 5% e 10%	108
Figura 23.C	Aspecto histológico das áreas tratadas com creme contendo FH 10% e 20%	109
Figura 24	Efeito de pré-tratamento do creme contendo OE 5% e 10% no número de células inflamatórias, número de fibroblastos, número de vasos sangüíneos e área de colágeno	110
Figura 25	Efeito de pré-tratamento do creme contendo FH 10% e 20% no número de células inflamatórias, número de fibroblastos, número de vasos sangüíneos e área de colágeno	112
Figura 26.A	Efeito gastroprotetor do OE das sementes de <i>Pterodon emarginatus</i> em úlceras induzidas com etanol absoluto	114
Figura 26.B	Efeito do OE no número de úlceras e índice ulcerogênico induzida por etanol absoluto	115
Figura 26.C	Efeito gastroprotetor do OE das sementes de <i>Pterodon emarginatus</i> em úlceras induzidas com indometacina	116

Figura 26.D	Efeito gastroprotetor do OE das sementes de <i>Pterodon emarginatus</i> em úlceras induzidas com HCl/etanol	117
Figura 27.A	Efeito de pré-tratamento com OE no volume de exsudato e número total de leucócitos no modelo de pleurisia induzida por carragenina	119
Figura 27.B	Efeito de pré-tratamento com OE no número de leucócitos polimorfonucleares e mononucleares no modelo de pleurisia induzida por carragenina	120
Figura 28	Efeito de pré-tratamento com OE na concentração de nitrato/nitrito no modelo de pleurisia induzida por carragenina	121

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Classificação das substâncias fenólicas, de acordo com o esqueleto básico	09
Tabela 2	Identificação de grupos de substâncias do metabolismo secundário nas sementes de <i>Pterodon emarginatus</i> Vogel	80
Tabela 3	Identificação de grupos de substâncias do metabolismo secundário na FH das sementes de <i>Pterodon emarginatus</i> Vogel	81
Tabela 4	Identificação de grupos de substâncias do metabolismo secundário na FA das sementes de <i>Pterodon emarginatus</i> Vogel	82
Tabela 5	Identificação de grupos de substâncias do metabolismo secundário na FB das sementes de <i>Pterodon emarginatus</i> Vogel	83
Tabela 6	Identificação de grupos de substâncias do metabolismo secundário na FM das sementes de <i>Pterodon emarginatus</i> Vogel	84
Tabela 7	Composição química do óleo essencial das sementes de <i>Pterodon emarginatus</i> Vogel determinada por CG/EM	85
Tabela 8	Constituintes fenólicos nas sementes de <i>Pterodon emarginatus</i> Vogel, submetidas a diferentes processos de extração	87
Tabela 9	Determinação dos teores de flavonóides nas sementes de <i>Pterodon emarginatus</i> Vogel, submetidas a diferentes processos de extração	88
Tabela 10	Atividade seqüestrante do OE e frações obtidas das sementes de <i>Pterodon emarginatus</i> Vogel frente ao radical DPPH	89
Tabela 11	Determinação da CL ₅₀ do OE e frações obtidos das sementes de <i>Pterodon emarginatus</i> Vogel, através do bioensaio em <i>Artemia salina</i>	90
Tabela 12	Atividade antimicrobiana do OE obtido das sementes de <i>Pterodon emarginatus</i> Vogel	91
Tabela 13	Determinação da CI ₅₀ do OE e frações obtidos das sementes de <i>Pterodon emarginatus</i> Vogel, frente às formas promastigotas de <i>Leishmania amazonensis</i> e <i>Leishmania chagasi</i>	92
Tabela 14	Citotoxicidade do OE das sementes de <i>Pterodon emarginatus</i> Vogel, em diferentes linhagens tumorais	122

LISTA DE ABREVIATURAS

- A549 – Linhagem celular tumoral de carcinoma de pulmão humano
- ADV – Ácido 6 α ,7 β -dihidroxiouacapan-17-óico
- AMP_c – Adenosina monofosfato cíclico
- ATCC – “American Type of Culture Collection” (Coleção de culturas típica dos Estados Unidos da América)
- ATP – Adenosina tri-fosfato
- B16-F1 – Linhagem celular tumoral de melanoma de camundongo
- BHK-21 – Linhagem celular normal de fibroblastos normais
- BHT – Butil-hidróxi-tolueno
- BSA – “Bovine serum albumine”(Soro fetal bovino)
- C6 – Linhagem celular tumoral de glioma de rato
- CBR – Centro de Biologia de Reprodução
- CCD – Cromatografia em camada delgada
- CEEA – Comissão de Ética na Experimentação Animal
- CG/EM – Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas
- CHO-K1 – Linhagem celular normal de ovário de hamster chinês
- CI₅₀ – Concentração eficaz 50%
- CL₅₀ – Concentração letal 50%
- CO₂ – Dióxido de carbono
- CoA – Coenzima A
- COBEA – Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
- COX – Ciclooxygenase
- CT26.WT – Linhagem celular de carcinoma de cólon de camundongo
- D₁ – Receptor dopaminérgico tipo 1
- D₂ – Receptor dopaminérgico tipo 2
- DMAPP – Pirofosfato de dimetilalila do éter alílico
- DMSO – Dimetilsulfóxido
- DPPH – 2,2-difenil-1,2-picrilhidrazil
- ERN – Espécie Reativa de Nitrogênio
- ERO – Espécie Reativa de Oxigênio
- FA – Fração acetato de etila
- FB – Fração butanólica
- FH – Fração hexânica

FM – Fração metanólica
FPP – Pirofosfato de farnesila
GMP_c – Guanosina monofosfato cíclico
GPP – Pirofosfato de trans-geranila
H₂O₂ – Peróxido de hidrogênio
H₃BO₃ – Ácido bórico
HCl – Ácido clorídrico
HMG-CoA – 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA
HQ – 8-hidroxiquinoleína
5-HT 5 – Hidroxitriptamina
ICB – Instituto de Ciências Biológicas
IK – Índice de Kovats
IL – Interleucina
IND – Indometacina
iNOS – Enzima óxido nítrico sintase
IPP – Pirofosfato de isopentenila
kg – kilograma
KOH – Hidróxido de potássio
LUV – Luz ultravioleta
MDA-MB-231 – Linhagem celular tumoral de carcinoma de mama de humanos
MeWo – Linhagem celular tumoral de melanoma humano
Mg – Magnésio
mg – Miligrama
MIC – “Minimum inhibitory concentration” (Concentração inibitória mínima)
mL – Mililitro
MTT – 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5 difenil tetrazólico
NaOH – Hidróxido de sódio
NO – Óxido nítrico
O₂ – Oxigênio
nm – Nanômetro
µL – Microlitro
µg – Micrograma
NADPH – Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
ND – Não detectado
NOS – Óxido nítrico sintase
OE – Óleo essencial
OMS – Organização Mundial da Saúde

p.a. – para análise
PG – Prostaglandinas
PLA – Fosfolipase A
RPMI – “Roswell Park Memorial Institute”
SFB - Soro fetal bovino
SOD - Superóxido desmutase
SNC – Sistema nervoso central
SPSS – “Statistical Package for the Social Sciences”
TNF – Fator de necrose tumoral
UFC – Unidades formadoras de colônias
UI – Unidade Internacional

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	1
1.1 REVISÃO DA LITERATURA	3
1.1.1 Biodiversidade do cerrado	3
1.1.2 Família Leguminosae	5
1.1.3 Metabolismo vegetal	6
1.1.3.1 Polifenóis	8
1.1.3.2 Óleos essenciais	16
1.1.3.3 Fatores que alteram o metabolismo das plantas	21
1.1.4 <i>Pterodon emarginatus</i> Vogel	23
1.1.4.1 Distribuição geográfica	23
1.1.4.2 Ecofisiologia	23
1.1.4.3 Aspectos morfológicos	24
1.1.4.4 Constituintes químicos	26
1.1.5 Potenciais farmacológicos	32
1.1.5.1 Espécies reativas de oxigênio	32
1.1.5.2 Potencial antimicrobiano de plantas medicinais	34
1.1.5.3 Leishmanioses	35
1.1.5.4 Processo doloroso	36
1.1.5.5 Pele e cicatrização	38
1.1.5.6 Úlceras pépticas	42
1.1.5.7 Resposta inflamatória	43
1.1.5.8 Câncer	46
2 OBJETIVOS	50
2.1 Geral	50
2.2 Específicos	50
3 MATERIAL E MÉTODOS	52
3.1 Coleta do material vegetal	52

3.2 Extração do óleo essencial	52
3.3 Preparo das frações	52
3.4 Preparo dos extratos	53
3.5 Triagem fitoquímica	54
3.5.1 Flavonóides	54
3.5.2 Leucoantocianidinas	55
3.5.3 Taninos	55
3.5.4 Cumarinas	56
3.5.5 Heterosídeos cardiotônicos	57
3.5.6 Saponinas	58
3.5.7 Alcalóides	58
3.5.8 Antraquinonas	59
3.6 Cinzas totais e teor de umidade	59
3.7 Análise cromatográfica do óleo essencial	60
3.8 Análise citogenética	61
3.9 Doseamento dos constituintes fenólicos totais	62
3.10 Determinação dos teores de flavonóides	63
3.11 Atividade antioxidante (atividade seqüestrante)	63
3.12 Toxicidade aguda	64
3.13 Atividade antimicrobiana	64
3.13.1 Difusão em ágar	65
3.13.2 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM)	66
3.14 Atividade leishmanicida	66
3.15 Animais	67
3.15.1 Camundongos	67
3.15.2 Coelhos	68
3.16 Atividade antinociceptiva	68
3.16.1 Contorções abdominais induzidas por ácido acético	67
3.16.2 Teste da placa quente (<i>Hot plate</i>)	69
3.16.3 Tempo da lambida da pata induzido pela injeção intraplantar de formalina	70
3.17 Atividade cicatrizante	70
3.17.1 Histopatologia e morfometria	72
3.18 Atividade gastroprotetora	73
3.18.1 Úlceras gástricas induzidas por etanol absoluto	73
3.18.2 Úlceras gástricas induzidas por antiinflamatório não-esteroidal	74

3.18.3 Úlceras gástricas induzidas por HCl/Etanol	74
3.19 Atividade antiinflamatória	75
3.19.1 Pleurisia induzida por carragenina	75
3.19.2 Concentração de óxido nítrico	76
3.20 Citotoxicidade	77
3.21 Análise estatística	78
4 RESULTADOS	79
4.1 Triagem fitoquímica	79
4.2 Análise cromatográfica do óleo essencial	79
4.3 Análise citogenética	86
4.4 Doseamento dos constituintes fenólicos totais	87
4.5 Determinação dos teores de flavonóides	88
4.6 Atividade antioxidante (atividade seqüestrante)	89
4.7 Toxicidade aguda	89
4.8 Atividade antimicrobiana	90
4.9 Atividade leishmanicida	91
4.10 Atividade antinociceptiva	92
4.10.1 Contorções abdominais induzidas por ácido acético	92
4.10.2 Teste da placa quente (<i>Hot plate</i>)	95
4.10.3 Tempo da lambida da pata induzido por injeção intraplantar de formalina	98
4.11 Atividade cicatrizante	103
4.11.1 Análise macroscópica	103
4.11.2 Histopatologia e morfometria	105
4.12 Atividade gastroprotetora	113
4.13 Atividade antiinflamatória	118
4.13.1 Migração leucocitária e volume de exsudato	118
4.13.2 Concentração de NO	121
4.14 Citotoxicidade	122
5 DISCUSSÃO	123
5.1 Triagem fitoquímica	123
5.2 Análise cromatográfica do óleo essencial	124

5.3 Análise citogenética	125
5.4 Doseamento dos constituintes fenólicos totais	126
5.5 Determinação dos teores de flavonóides	127
5.6 Atividade antioxidante (atividade seqüestrante)	127
5.7 Toxicidade aguda	129
5.8 Atividade antimicrobiana	131
5.9 Atividade leishmanicida	132
5.10 Atividade antinociceptiva	134
5.11 Atividade cicatrizante	138
5.12 Atividade gastroprotetora	142
5.13 Atividade antiinflamatória	145
5.14 Atividade antitumoral	147
6 CONCLUSÕES	149
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	150
ANEXO A – Ficha utilizada para avaliação da atividade terapêutica de creme contendo extratos de plantas empregando modelo experimental de queimadura em coelhos	188
ANEXO B – Artigo aceito para publicação	189
ANEXO C – Artigos submetidos para publicação	198
ANEXO D – Artigos em preparação para publicação	224

1 INTRODUÇÃO

Várias culturas têm explorado e utilizado as plantas para fins medicinais. A presença de plantas com propriedades medicinais em uma sepultura antiga no Iraque sugere o seu uso com finalidade terapêutica há mais de 60 mil anos. Os primeiros registros do uso de plantas provêm da China (~3000 a.C.), onde o Imperador Shen Nung compilou o *Pen Tsao* (Compêndio de Matéria Médica Chinesa). Este livro teve várias edições subseqüentes, e muitas das 1000 ou mais drogas descritas ainda são utilizadas na China (LANGMEAD e RAMPTON, 2001). O Papiro de Ebers, descoberto em uma sepultura no Egito em 1862, data de 1550 a.C. e é o texto médico mais antigo a subsistir. O papiro contém centenas de medicamento à base de plantas, incluindo o sene para constipação, dentre outros. A prática mesopotâmica está descrita em placas de barro datando do século 7 a.C., indicando novamente recursos derivados de plantas, óleo de rícino e sene, como laxativos (LANGMEAD e RAMPTON, 2001). Posteriormente, Teofrastus (370-287 a.C.), um botânico grego e pupilo de Aristóteles, e Dioscórides (40-90 a.C.), um cirurgião grego do exército de Nero, escreveram livros descrevendo o uso medicinal das plantas e seus produtos. Galeno (129-216 d.C.), médico grego, ampliou a obra de Dioscórides e preparou medicamentos vegetais combinados que hoje são conhecidos como preparações galênicas (COWEN e HELFAND, 1990). Perto do final do primeiro milênio, e influenciada fortemente pelos escritos de Galeno, a medicina árabe produziu um grande número de medicamentos derivados de plantas. Ao mesmo tempo, apareceu o primeiro manuscrito médico saxão o qual descrevia muitos medicamentos herbais e suas indicações (LANGMEAD e RAMPTON, 2001).

Até o início do século XIX, cerca de 90% dos medicamentos disponíveis compreendiam plantas medicinais, mas devido às dificuldades no controle de qualidade desses extratos vegetais, do ponto de vista físico-químico, farmacológico e toxicológico, seus derivados isolados ou quimicamente sintetizados predominaram no mercado (LAPA et al., 2000; CORRÊA et al., 2001).

Nos Estados Unidos, 24% das prescrições médicas utilizam um ou mais princípios ativos derivados de plantas e 2,5% utilizam o seu extrato bruto (CALIXTO et al., 1998).

No Brasil, aproximadamente 84% dos fármacos atualmente disponíveis no mercado são importados e 60% de todas as substâncias processadas são consumidas por 23% da população, fazendo com que os “medicamentos caseiros” à base de plantas medicinais sejam, ainda, a principal fonte de medicamentos para a maioria da população brasileira de baixa renda, a qual recorre às plantas medicinais para o tratamento dos seus males e enfermidades (ELISABETSKY e WANNMCHER, 1993; ELISABETSKY, 1999).

As plantas medicinais tornaram-se um tópico de importância global crescente nos últimos anos, tendo repercussões tanto sobre a saúde mundial quanto no comércio internacional. Nos últimos 10 anos, as plantas medicinais têm desfrutado de um renascimento e essa fase tem sido alimentada por muitos consumidores interessados na medicina preventiva e por desapontamento com os medicamentos alopáticos (MAHADY, 2001).

Na verdade, a origem trans-cultural das plantas medicinais e seu uso contínuo por séculos sugerem que ao menos alguns de seus constituintes possuem valor terapêutico. Apesar disso, o seu uso por mais de mil anos não garante sua eficácia ou sua segurança e, nesse sentido, as plantas medicinais não se diferenciam de qualquer outro xenobiótico e sua preconização, ou a autorização oficial do seu uso medicamentoso, devem ser fundamentadas em evidências experimentais comprobatórias de que os riscos a que se expõe àqueles que a utilizam são suplantados pelos benefícios que possam advir (LAPA et al., 2000; LANGMEAD e RAMPTON, 2001).

1.1 REVISÃO DA LITERATURA

Embora a fitoterapia já agregue um contingente apreciável de trabalhos realizados e publicados, constitui, ainda, um vasto campo para pesquisa. Nos últimos 10 anos, o número de publicações científicas, nos países latino-americanos, aumentou muito (CALIXTO, 2005). O interesse pela fitomedicina cresceu e está crescendo, devido à busca de novas alternativas terapêuticas para o tratamento de diversas doenças, cujos cuidados baseiam-se no uso de medicamentos que apresentam uma série de efeitos colaterais e muitas vezes aliviam parcialmente os sintomas sem tratar a doença (ALICE et al., 1995). Aliado à diversidade de compostos bioativos encontrados, especialmente nas plantas superiores, têm atraído a atenção da comunidade científica e das indústrias farmacêuticas que apostam na produção de fitoterápicos como um negócio lucrativo, uma vez que a utilização de plantas medicinais atinge um público cada vez maior (CALIXTO, 2005). O aumento do emprego dos produtos naturais traz consigo o uso indiscriminado de plantas sem qualquer conhecimento fitoquímico, farmacológico e toxicológico, o que é fato preocupante e também chama a atenção dos pesquisadores, uma vez que isto está acontecendo com a maioria das espécies vegetais consumidas pela população, em todo país (ALICE et al., 1995).

1.1.1 Biodiversidade do cerrado

O cerrado é um bioma de grande importância que ocorre no Brasil. Nele, encontramos 1,5 milhões de quilômetros quadrados contendo diversos representantes deste tipo de vegetação. Se considerarmos as manchas numerosas, por vezes extensas, de cerrados existentes na Amazônia, no nordeste, no sul, em São Paulo e no Paraná (estado em que o cerrado encontra seu limite nas latitudes sulinas), todas estas ocorrências nos levarão, sem dificuldades, a uma cifra que representa 23% de superfície do território nacional (RIBEIRO e WALTER, 1998; RATTER et al., 1999).

O ambiente do cerrado caracteriza-se por uma estação seca que pode perdurar 4-5 meses (maio a setembro), ocorrendo chuva nos meses restantes (1400-1500 mm). No sudeste e sul, quando comparados com as outras áreas de ocorrência do cerrado, as precipitações são um pouco menores, embora com temperaturas médias muito inferiores, havendo menos possibilidade de geadas (FERRI, 1980).

O solo do cerrado, também varia muito em topografia, em qualidade física e composição química, prevalecendo os terrenos planos. São em geral, solos ácidos e deficientes em numerosos componentes químicos. Mesmo na estação seca, estes solos contêm bastante água, armazenada durante o período das chuvas. As plantas encontram muita água no solo profundo do cerrado, de onde a retiram com suas raízes, as quais chegam a alcançar 18 metros de profundidade. Hoje sabemos que são fatores adácticos (do solo), relacionados com a falta de inúmeros elementos nutricionais, os quais são os responsáveis pela sua existência e por suas características (DURIGAN et al., 2004).

Calcula-se que possam existir de 4 a 10 mil espécies vasculares no cerrado brasileiro (PEREIRA, 1992; RATTER et al., 1996). As pesquisas relacionadas à flora do cerrado são bastante desenvolvidas, principalmente, na área de taxonomia e florística (RATTER, 1980; RIBEIRO et al., 1983; EITEN, 1990; FILGUEIRAS e PEREIRA, 1990; PEREIRA, 1992; SILVA JÚNIOR, 1992), sendo fundamentais para as pesquisas que visam o aproveitamento das plantas nativas. A utilização e o conhecimento das espécies do cerrado, em geral, estão detidos nas mãos de leigos, que vivem nas cidades do interior, sendo o uso das plantas relacionadas aos costumes locais.

Com relação à documentação existente sobre o uso das espécies do cerrado, grande parte se refere às plantas tidas como medicinais (CONCEIÇÃO, 1980; SIQUEIRA, 1981; GRADI, 1982; SIQUEIRA, 1982; BARROS, 1996). Considerando que apenas 1,5% da vegetação do cerrado encontram-se protegidas por lei em área de conservação, os pesquisadores acreditam na possibilidade de extinção de muitas espécies antes mesmo de serem classificadas, devido à fragilização dos ecossistemas (DIAS, 1993).

Segundo Barros (1997), em seu trabalho sobre a avaliação da ação antrópica sobre as plantas do cerrado com potencial econômico, das 328 espécies citadas em seu trabalho, 165 foram empregadas com objetivo medicinal. Com

relação ao ato de arrancar as plantas, corte ou coleta de flores, frutos e sementes, foram constatados que não existe nenhuma preocupação com a reprodução e o fruto das mesmas. No momento atual, é urgente que os órgãos competentes adotem medidas político-econômicas que visem ao aproveitamento dos recursos florísticos, a fim de gerar conhecimento e tecnologia necessários à conservação das espécies para salvaguardar o patrimônio genético nacional (DIAS, 1993).

1.1.2 Família Leguminosae

A ordem Fabales inclui a família Leguminosae, uma das maiores e mais importantes famílias botânicas, visto o grande número de espécies vegetais e a sua importância como fonte de produtos alimentares, medicinais, ornamentais, madeireira de grande valor econômico (CARVALHO, 2004).

A família Leguminosae, originalmente descrita por Antoine Laurent de Jussieu, inclui 642 gêneros, nos quais estão distribuídas 18 mil espécies cosmopolitas, representando uma das maiores famílias de Angiospermas, incluindo árvores, arbustos, lianas e ervas. Compreende três subfamílias, muitas vezes tratadas individualmente como famílias botânicas distintas, dependendo do arranjo adotado, conforme descrito a seguir. De acordo com o arranjo de Kubitzki, a partir do sistema de Cronquist (MABBERLEY, 1997), tem-se a divisão nas seguintes subfamílias:

Caesalpinioideae (Leguminosae I) ou família Caesalpiaceae;

Mimosoideae (Leguminosae II) ou família Mimosaceae;

Papilionoideae (Leguminosae III) ou família Fabaceae.

Importantes aplicações estão associadas com a família Fabaceae como, por exemplo, adubação verde, ornamentais, madeiras de excelente qualidade, entre outras. Como espécies principais, destacam-se aquelas utilizadas na alimentação, especialmente os feijões (*Phaseolus vulgaris* L.) (LEITÃO-FILHO, 1974), a soja (*Glycine Max* L.), o amendoim (*Arachis hypogaea* L.) (HOEHNE, 1940; HERMANN, 1953; KRAPOVICKAS e GREGORY, 1994; PITT e HOCKING, 2006), a ervilha (*Pisum sativum* L.), o tremoço (*Lupinus spp.*) (MONTEIRO e GIBBS, 1986), o grão de bico (*Cicer arietinum* L.), o tamarindo (*Tamarindus indica* L.), a copaíba

(*Copaifera langsdorfii* Desf.) (DWYER, 1951), o jacarandá-paulista (*Machaerium villosum* Vogel) (BASTOS, 1987), a cerejeira (*Amburana cearensis* (Arr. Cam.) A.C. Smith), o jatobá (*Hymenaea* ssp.), o pau-brasil (*Caesalpinia echinata* Lam.) nativo da Mata Atlântica e que deu nome ao nosso país, sendo responsável pelo seu primeiro ciclo econômico.

Espécies típicas da Mata Atlântica como, por exemplo, pau-cigarra (*Senna multijuga* Rich. H.S. Irwin & Barneby), e guapuruvu (*Schizolobium parahyba* Vell.), merecem destaque pelo número elevado de indivíduos. Esta última espécie possui rápido crescimento, com madeira macia utilizada pelos índios para construção de canoas. Nas matas ciliares e também em outros ambientes, merece destaque o ingá (*Ingá* spp.) (GARCIA, 1998), com diversas espécies com frutos comestíveis, muito procurados por macacos e outros animais.

Dentre as espécies pertencentes à família Leguminosae, o gênero *Pterodon* apresenta interesse pela comunidade científica desde a descoberta do composto 14,15-epoxigeranilgeraniol com ação anticercária e antimicrobiana “in vitro” (MAHJAN et al., 1970; FASCIO et al., 1975). O gênero *Pterodon* compreende cinco espécies nativas do Brasil; *Pterodon abruptus* Benth, *Pterodon apparicioi* Pedersoli, *Pterodon polygalaeflorus* Benth, *Pterodon emarginatus* Vogel e *Pterodon pubescens* Benth. Neste trabalho, os autores optaram em realizar o estudo utilizando as sementes de *Pterodon emarginatus* muitas vezes indicada e utilizada pela população.

1.1.3 Metabolismo vegetal

Admite-se que os lípidos, as proteínas, os carboidratos e os ácidos nucléicos, que são comuns aos seres vivos e essenciais para a manutenção das células, são originados do metabolismo primário. E as substâncias originadas a partir de rotas biossintéticas diversas, e que estão restritas a determinados grupos de organismos, são produtos do metabolismo secundário (VICKERY e VICKERY, 1981; MANN, 1987). A breve revisão feita a seguir sobre o metabolismo vegetal, foi baseada em informações contidas em Vickery e Vickery (1981) e Mann (1987).

Todo o metabolismo vegetal está condicionado aos processos fotossintéticos. Destes resultam todas as substâncias do metabolismo primário, as quais por sua vez irão originar os metabólitos secundários. As reações fotossintéticas podem ser agrupadas em duas categorias: reações de claro, nas quais a energia solar será absorvida por moléculas de clorofila e transferida destas para moléculas armazenadoras de energia (ATP e NADPH), e

reações de escuro, nas quais as moléculas de ATP e NADPH que servirão, respectivamente, como fonte de energia e força redutora no processo de fixação do CO₂, o qual será convertido principalmente em glicose (MANN, 1987).

Através do metabolismo da glicose são formados praticamente todos os metabólitos primários e secundários. Esta é convertida em moléculas de ácido pirúvico que podem seguir duas vias diferentes. Na primeira, 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, o piruvato continua sendo oxidado até a formação de moléculas de acetil-coenzima A (acetil-CoA). Estas podem seguir três vias diferentes: via do ciclo do ácido cítrico, via do mevalonato e via da condensação do acetato, formando os chamados derivados do acetato. Entrando no 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. A Figura 1 resume as vias biossintéticas e seus produtos (BRUNETON, 1991).

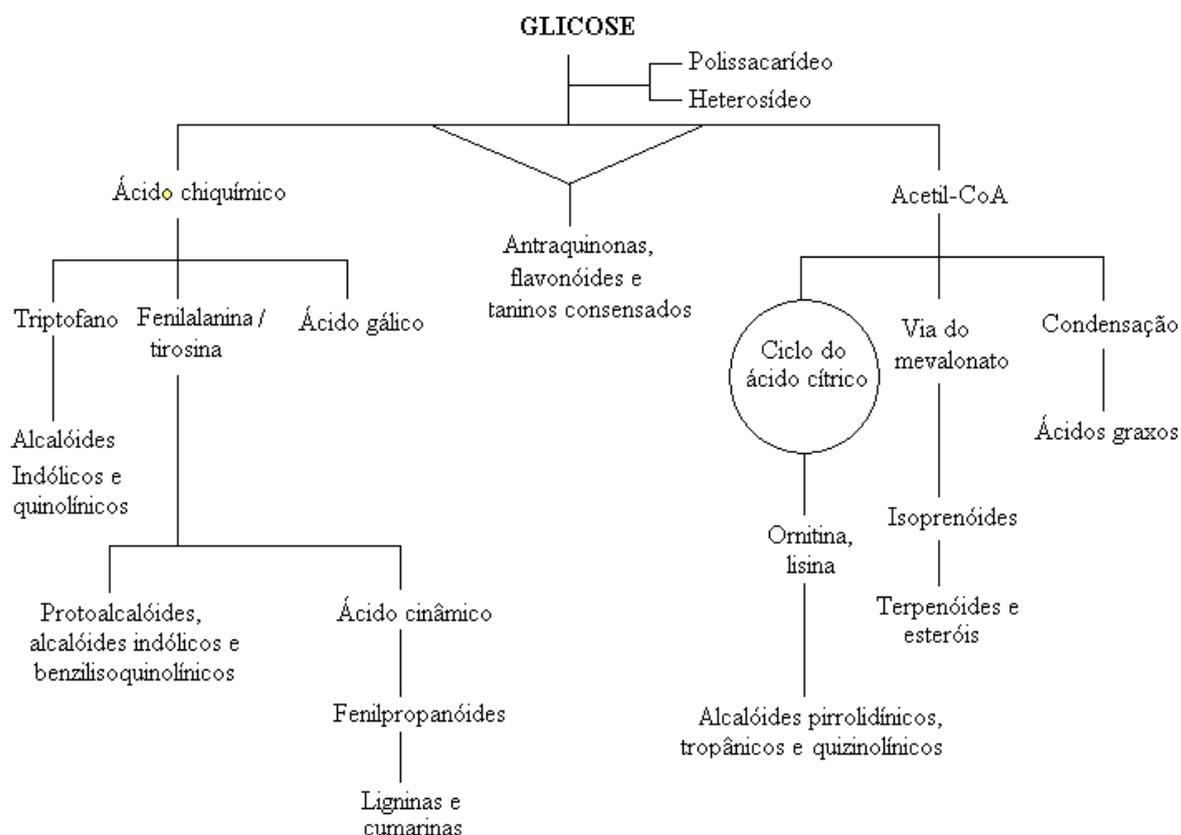


Figura 1 – Rotas biossintéticas do metabolismo secundário das plantas.
Fonte: <http://br.geocities.com/plantastoxicas/rotametabolica>

1.1.3.1 Polifenóis

Os polifenóis de origem vegetal são produtos de baixo peso molecular a pesos moleculares mais elevados, com estruturas mais complexas, como taninos condensados, hidrolisáveis e ligninas (BRUNETON, 1991; CARVALHO et al., 2000).

As substâncias fenólicas podem ser classificadas segundo o tipo de esqueleto básico apresentado na Tabela 1, onde C6 corresponde ao anel aromático e CX a cadeia substituinte com X átomos de carbono (CARVALHO et al., 2000).

A biossíntese das substâncias fenólicas pode ocorrer pela via do ácido chiquímico, via do acetato ou por ambas (via mista). Essas vias determinam o padrão de substituição da substância fenólica, ou seja, pela via do ácido chiquímico obtêm-se substâncias com grupos hidroxila na posição *orto*, que se formam a partir do ácido cinâmico e, pela via do acetato que origina substâncias com grupos hidroxilas dispostos em *meta*. Um exemplo de fenólico que ocorre pela via do acetato é o timol, um terpenóide fenólico (GEISSMAN e CROUT, 1969; SIMÕES et al., 2000).

Os constituintes fenólicos presentes nas plantas são responsáveis pelas propriedades de sabor, odor e coloração. Devido a essas propriedades, substâncias fenólicas são empregadas nas indústrias de alimentos e bebidas como flavorizantes e corantes. Constituintes fenólicos tais como: hidroquinona, ácido elágico e ésteres do ácido gálico possuem propriedades de defesa das plantas, além de participarem na inter-relação de animais e vegetais, com atividades de inibição da germinação de sementes, do crescimento de fungos e de plantas em geral. Alguns arilpropanóides têm importante papel na supressão do apetite de insetos (HARBORNE, 1997; LEITÃO et al., 1997).

TABELA 1 – Classificação das substâncias fenólicas, de acordo com o esqueleto básico.

Esqueleto básico	Classe de substâncias fenólicas
C6	Fenóis simples, benzoquinonas
C6-C1	Ácidos fenólicos
C6-C2	Acetofenonas e ácidos fenilacéticos
C6-C3	Fenilpropanóides: ácidos cinâmicos e substâncias análogas, fenilpropenos, cumarinas, isocumarinas e cromonas
C6-C4	Naftoquinonas

C6-C1-C6	Xantonas
C6-C2-C6	Estilbenos, antraquinonas
C6-C3-C6	Flavonóides e isoflavonóides
(C6-C3) ₂	Lignanas/neolignanas
(C6-C3-C6) ₂	Biflavonóides
(C6) _n	Melaninas vegetais
(C6-C3) _n	Ligninas
(C6-C1) _{glicosídeos}	Taninos hidrolisáveis
(C6-C3-C6) _n	Taninos condensados

Fonte: CARVALHO et al., 2000.

Dentre os constituintes fenólicos vegetais, os flavonóides e os taninos são as classes de substâncias fenólicas mais registradas na literatura, o que torna importante ressaltá-las neste trabalho.

Os flavonóides constituem uma importante classe de polifenóis presentes entre os metabólitos secundários de plantas. Mais de 2000 diferentes estruturas já foram descritas, podendo ser encontradas no estado livre ou como heterosídeos. Eles são de ampla distribuição na natureza e constituem também um grupo de pigmentos vegetais responsável pela coloração de flores, de folhas e de frutos (BRUNETON, 1991; ROBBERS et al., 1996; ZUANAZZI, 2000).

O núcleo básico dos flavonóides é constituído de dois anéis aromáticos (A e B) ligados por três átomos de carbono (C6-C3-C6). Esse núcleo é biossintetizado pelas vias do ácido chiquímico e do acetato. A fenilalanina, obtida a partir do ácido chiquímico, é o precursor do ácido cinâmico que dará origem ao anel B e a ponte dos três carbonos pela produção das 4-cumaroil-CoA. O anel A é proveniente de três unidades de acetil-CoA, via acetato/mevalonato. A ligação entre as partes produzirá uma chalcona. O fechamento da ponte das chalconas, formando o anel C, produzirá inicialmente as flavanonas (MANN, 1987; IKAN, 1991; ZUANAZZI, 2000) (Figura 2).

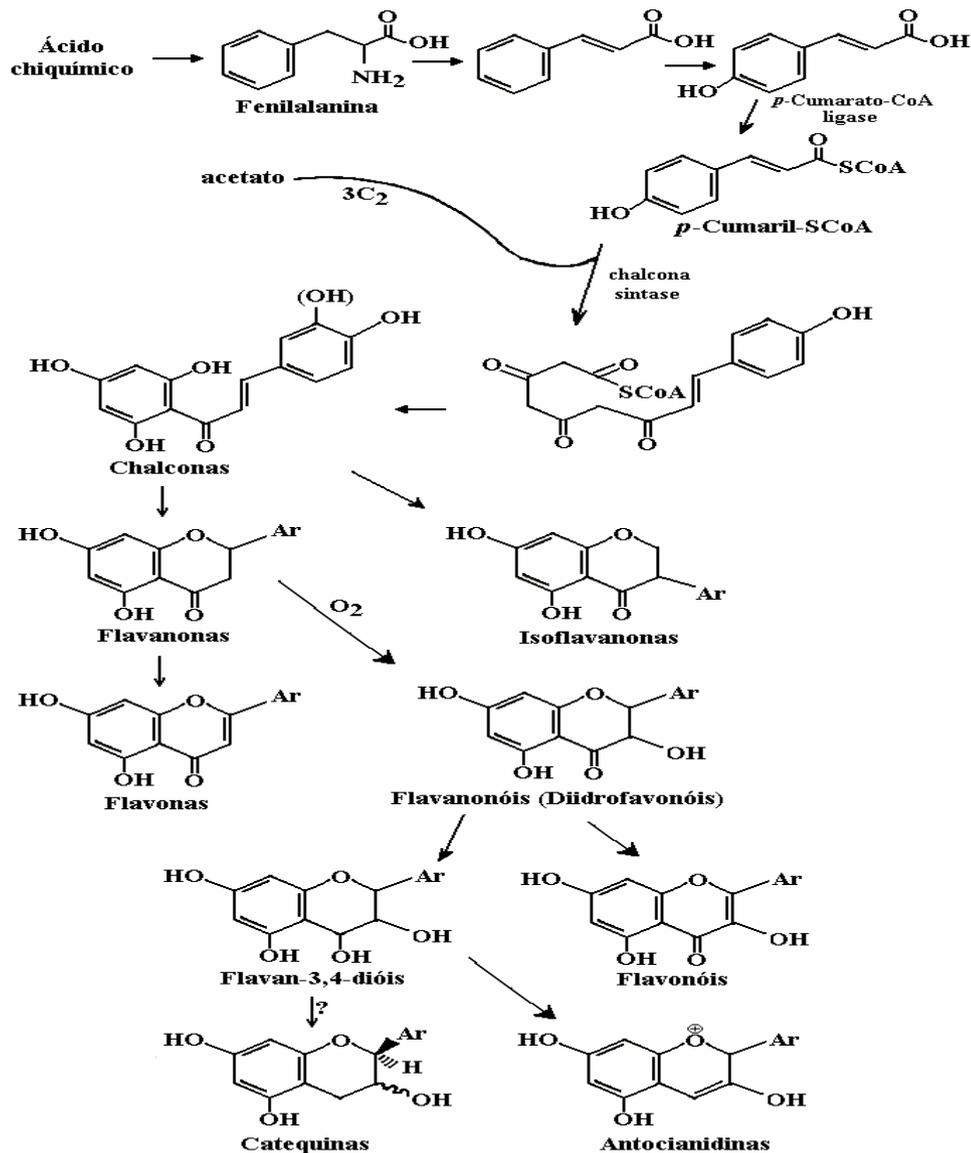


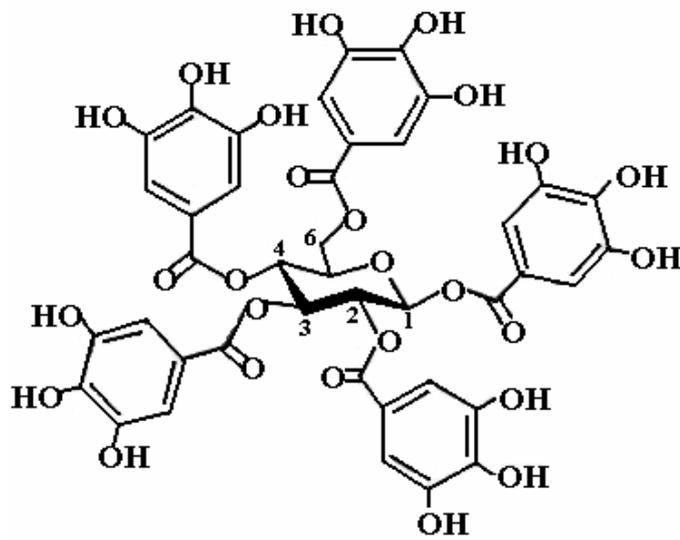
Figura 2 – Representação esquemática simplificada da biossíntese dos flavonóides. Ar = aril; S-CoA = acetil-coenzima A. Fonte: MANN, 1987.

Entre as funções atribuídas aos flavonóides podem ser citadas: (a) proteger os vegetais contra a incidência de raios ultravioletas e visíveis; (b) proteger os vegetais contra predadores como insetos, fungos, vírus e bactérias; (c) atrair polinizadores; (d) atuar como antioxidantes; (e) controlar a ação de hormônios vegetais; (f) atuar como agentes alelopáticos e (g) inibir enzimas. Os flavonóides também funcionam como marcadores taxonômicos (BRUNETON, 1991; ZUANAZZI, 2000).

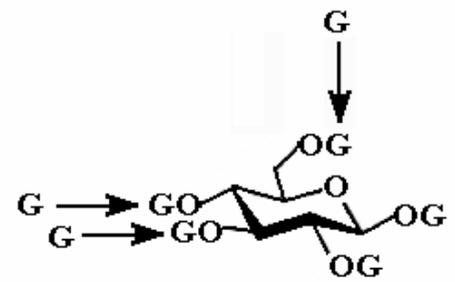
Os flavonóides são utilizados no tratamento de doenças circulatórias, hipertensão e agem como co-fator da vitamina C. Alguns pesquisadores mostraram

que os flavonóides possuem ações anticancerígenas, antivirais e anti-hemorrágicos (BRUNETON, 1991; ROBBERS et al., 1996; ZUANAZZI, 2000).

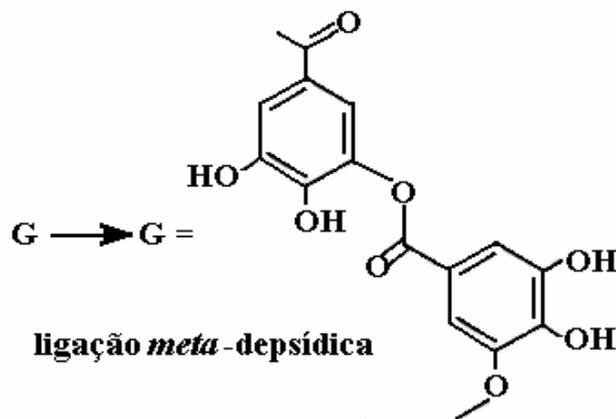
Do ponto de vista de quantificação, dentre os polifenóis presentes nas plantas, os taninos são a classe de polifenóis mais estudada, possivelmente, isso se deve a facilidade de executar as metodologias disponíveis. De acordo com Singleton e Kratzer (1973), taninos são substâncias polifenólicas que possuem massa molecular acima de 500 dáltons (D). São solúveis em água, possuem coloração que podem variar de branco a marrom-claro e com sabor adstringente. Esses polifenóis contêm um grande número de grupos hidroxila ou outros grupamentos funcionais e, por isso, são capazes de formar ligações cruzadas estáveis com proteínas e outras macromoléculas. Eles podem ser classificados como hidrolisáveis e condensados. Os taninos hidrolisáveis são biossintetizados pela via do ácido chiquímico. Eles contêm um núcleo central polihidroxilado, como a glicose, que são, parcialmente ou totalmente, esterificados com ácido gálico (taninos gálicos) ou ácido hexahidroxidifênico (taninos elágicos) (Figuras 3 e 4). Após hidrólise com ácidos, bases ou certas enzimas, os taninos gálicos produzem glicose e ácido gálico. O ácido hexahidroxidifênico dos taninos elágicos sofre lactonização para produzir o ácido elágico. O ácido tânico, como um exemplo de tanino hidrolisável, fornece glicose e ácido gálico na proporção de até sete resíduos de ácido gálico por unidade de glicose (BRUNETON, 1991; IKAN, 1991; COSTA, 1994; SANTOS e MELLO, 2000).



β -1,2,3,4,6-pentagalloyl-*D*-glucose



tânico gálico chinês, ácido tânico



ligação *meta*-depsídica

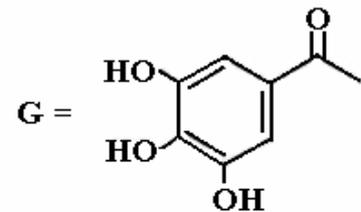


Figura 3 – Exemplos de éster do ácido gálico e galotanino. Fonte: SANTOS e MELLO, 2000.

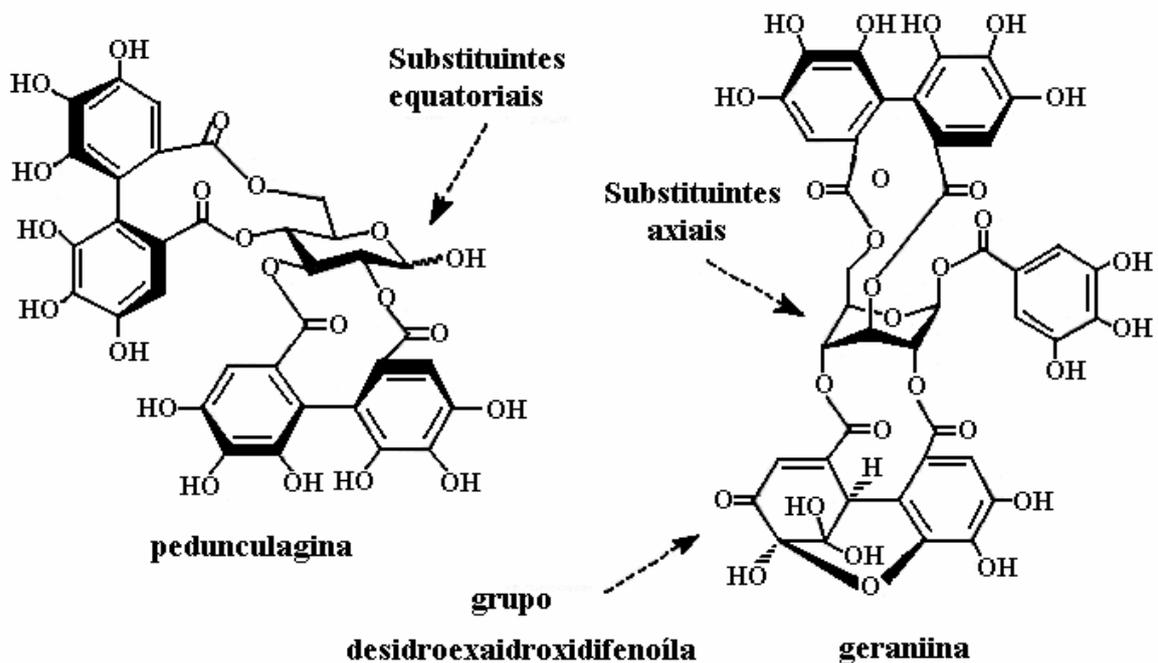


Figura 4 – Exemplos de taninos elágicos monoméricos. Fonte: SANTOS e MELLO, 2000.

Os taninos condensados são estruturalmente mais complexos que os hidrolisáveis. As proantocianidina são os precursores dos taninos condensados, desde que ao tratamento com ácido forte produzam monômeros de antocianidinas. Os taninos condensados são, principalmente, os produtos polimerizados dos flavan-3-óis e flavan-3,4-dióis, ou mistura dos dois (Figura 5). Os polímeros referidos como flavolanos são popularmente chamados de taninos condensados. Os taninos condensados são amplamente distribuídos nas diferentes partes do vegetal (MANN, 1987; BRUNETON, 1991; SANTOS e MELLO, 2000).

Plantas ricas em taninos são empregadas na medicina tradicional para o tratamento de diversos distúrbios orgânicos, tais como: diarreia, hipertensão arterial, reumatismo, hemorragias, feridas, queimaduras, problemas estomacais (azia, náusea, gastrite e úlcera gástrica), problemas renais e do sistema urinário e processos inflamatórios (HASLAM, 1996). Além disso, diferentes estudos têm demonstrado o potencial bactericida, fungicida, antiviral, moluscicida e inibição de enzimas. Ao precipitar proteínas, os taninos exercem seus efeitos antibacteriano e antifúngico. Devido as suas propriedades adstringentes, por via interna, exercem um efeito antidiarréico e antiséptico (MARSTON e HOSTETTMANN, 1985; OKUDA et al., 1989; HATTORI et al., 1990; BRUNETON, 1991; SCALBERT, 1991; OKUDA et al., 1993). Além disso, os taninos ajudam no processo de cura de feridas, queimaduras e inflamações através de uma camada protetora sobre a pele ou mucosa danificada (HASLAM, 1996).

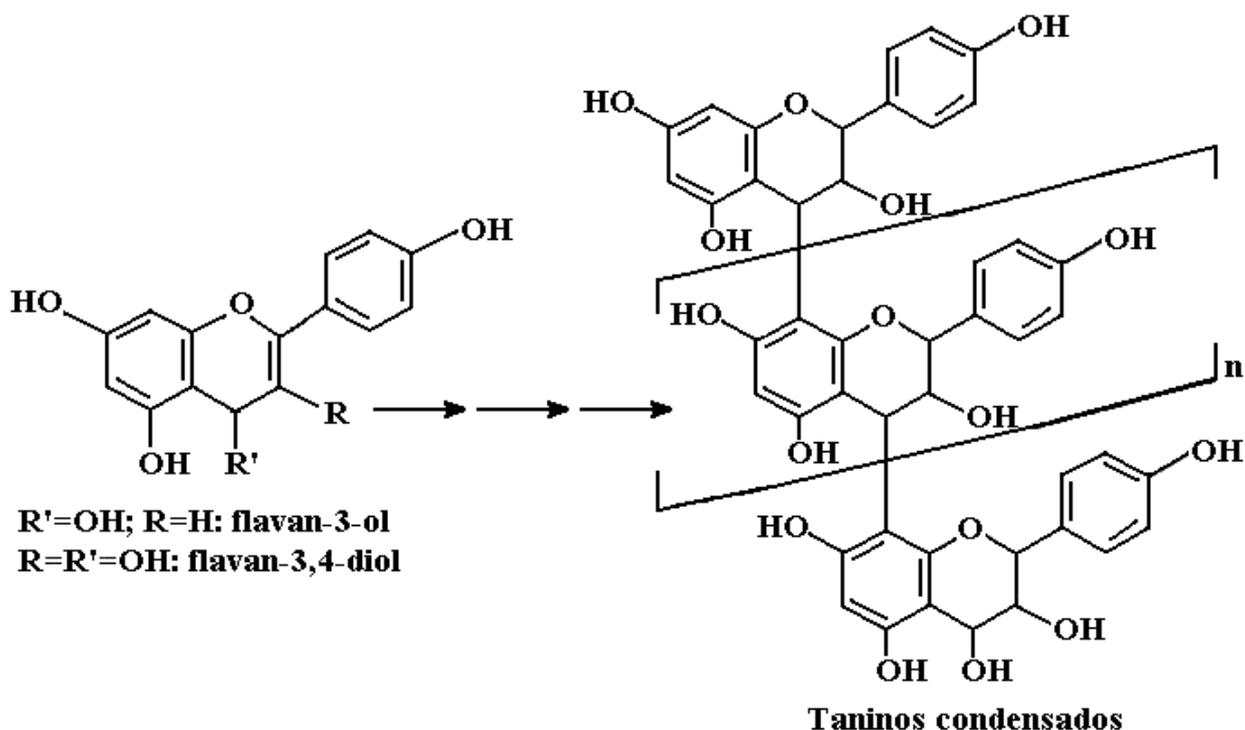


Figura 5 – Formação dos taninos condensados pela polimerização dos flavan-3-óis e flavan-3,4-dióis.
 Fonte: SIMÕES et al., 2000.

Santos e Mello (2000) demonstraram que vários taninos atuam como captadores de radicais livres, os quais interceptam o oxigênio ativo formando radicais estáveis. Bloqueio da peroxidação de lipídios em mitocôndrias hepáticas, da lipoxigenase em leucócitos, da xantinoxidase e a repressão da formação de radicais ânions superóxido assim como dos radicais 1,1-difenil-2-picril-hidrazila podem ter importância na prevenção e tratamento de doenças causadas pela lipoperoxidação, tais como câncer, esclerose múltipla e mal de Alzheimer.

1.1.3.2 Óleos essenciais

O termo “óleo essencial” é empregado para designar líquidos oleosos voláteis, dotados de aroma forte, quase sempre agradável, extraídos de plantas por alguns processos específicos, sendo o mais freqüente a destilação por arraste com vapor de água (CRAVEIRO, 1981). De forma geral, são misturas complexas de substâncias voláteis, lipofílicas, geralmente odoríferas e líquidas. Também podem ser chamados de óleos voláteis, óleos etéreos ou essências. Sua principal característica é a volatilidade, diferindo-se, assim, dos óleos fixos, mistura de substâncias lipídicas, obtidos geralmente de sementes. Quimicamente, a maioria dos óleos voláteis são constituídos de derivados fenilpropanóides e terpenoídicos (mono- e sesquiterpenóides) (MANN, 1987; IKAN, 1991; SIMÕES et al., 2004).

As substâncias odoríferas em plantas foram consideradas por muito tempo como “desperdício fisiológico” (KNOBLOCH et al., 1986) ou mesmo produtos de desintoxicação, como eram vistos os produtos do metabolismo secundário (MOTHES, 1980). Os óleos essenciais possuem propriedades químico-ecológicas de inibição da germinação e de proteção contra predadores. Estão envolvidos na polinização, na proteção contra a perda de água e aumento da temperatura (CRAVEIRO e MACHADO, 1986; HARBORNE, 1993). Os efeitos alelopáticos de inibição da germinação e do crescimento de plantas promovem a formação de zona de solos nus em torno das espécies. Por exemplo, óleo essencial de *Artemisia californica* B. Laciniatella e *Salvia leucophylla* Greene possuem esses efeitos (HARBORNE, 1993).

Os óleos essenciais têm demonstrado propriedades farmacológicas variadas (BRUNETON, 1991; SIMÕES e SPITZER, 2000): ação carminativa, antiespasmódica, estimulante do apetite, cardiovascular, anestésica local, ação antiinflamatória, anti-séptica, antimicrobiana e atua sobre o sistema nervoso central.

A toxicidade crônica dos óleos voláteis é pouco conhecida e ainda é necessário avaliar suas eventuais propriedades mutagênicas, teratogênicas e/ou carcinogênicas. A toxicidade aguda, entretanto, é mais conhecida. A toxicidade dos óleos essenciais é dependente da dose e da via de administração (BRUNETON, 1991; SIMÕES e SPITZER, 2000).

Os fenilpropanóides são biossintetizados pela via do ácido chiquímico a partir da fenilalanina. A fenilalanina sofre ação da fenilalanina amonialiase, originando o ácido cinâmico. Os ácidos cinâmicos são os precursores de substâncias chamadas metabólitos do chiquimato, isto é, substâncias de composição ArC_3 , ArC_1 , ArC_2 e ArC_3 (C_2) $_n$. As substâncias de composição ArC_3 são coletivamente denominadas de arilpropanóides e são provavelmente os metabólitos do chiquimato mais comuns. Na maioria dos organismos, ocorre a conversão do ácido cinâmico em ácido p-cumárico ao invés de utilizar a tirosina como precursor. Por reduções enzimáticas, os ácidos para-cumáricos produzem propenilfenóis e/ou alilfenóis e, por oxidações com degradação das cadeias laterais, geram aldeídos aromáticos e, por ciclizações enzimáticas intramoleculares formam as cumarinas (MANN, 1987; SIMÕES e SPITZER, 2004). Álcool coniferílico, eugenol, safrol e anetol são exemplos de substâncias formadas por redução dos ácidos cinâmicos (MANN, 1987).

Os terpenóides são largamente distribuídos na natureza e constituem uma grande variedade de substâncias vegetais. Eles são classificados de acordo com número de carbono: mono - (C_{10}), sesqui - (C_{15}), di - (C_{20}), tri - (C_{30}), tetra - (C_{40}) e politerpenóides (C_5) $_n$ (Figura 6). Os mono e os sesquiterpenóides são constituintes dos óleos essenciais.

Outras classes do metabolismo especial das plantas podem ser originadas a partir de terpenóides, tais como, esteróides, saponinas, heterosídeos (MANN, 1987; BRUNETON, 1991; IKAN, 1991; MCGARVEY e CROTEAU, 1995; SIMÕES e SPITZER, 2000). A origem biossintética dos terpenóides ocorre pela via acetato/mevalonato. Duas moléculas de acetil-CoA formam acetoacetil-CoA que, após condensação aldólica com outra molécula de acetil-CoA e uma hidrólise, sob a ação da acetil-CoA acetiltransferase e hidroximetilglutaril-CoA (HMG-CoA) sintase, origina a 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA que é reduzida a ácido mevalônico (Figura 7). O ácido mevalônico é convertido em pirofosfato de isopentenila (IPP), uma unidade de cinco átomos de carbono. A molécula de pirofosfato de isopentenila e seu isômero pirofosfato de dimetilalila éster alílico (DMAPP) formam pirofosfato de *trans*-geranila (GPP), a partir do qual se formam os demais terpenóides. Ligações cabeça-cauda entre pirofosfato de *trans*-geranila e pirofosfato de isopentenila resultarão em sesquiterpenos - (C_{15}). Reação de condensação cabeça-cauda entre pirofosfato de farnesila e pirofosfato de isopentenila levará a formação de diterpenóides (C_{20}). Já a

ligação cauda-cauda entre duas moléculas de pirofosfato de farnesila (FPP) dará origem ao esqualeno, o precursor dos triterpenóides e esteróides (MANN, 1987; BRUNETON, 1991; IKAN, 1991; MCGARVEY e CROTEAU, 1995; SIMÕES e SPITZER, 2000) (Figuras 6 e 7).

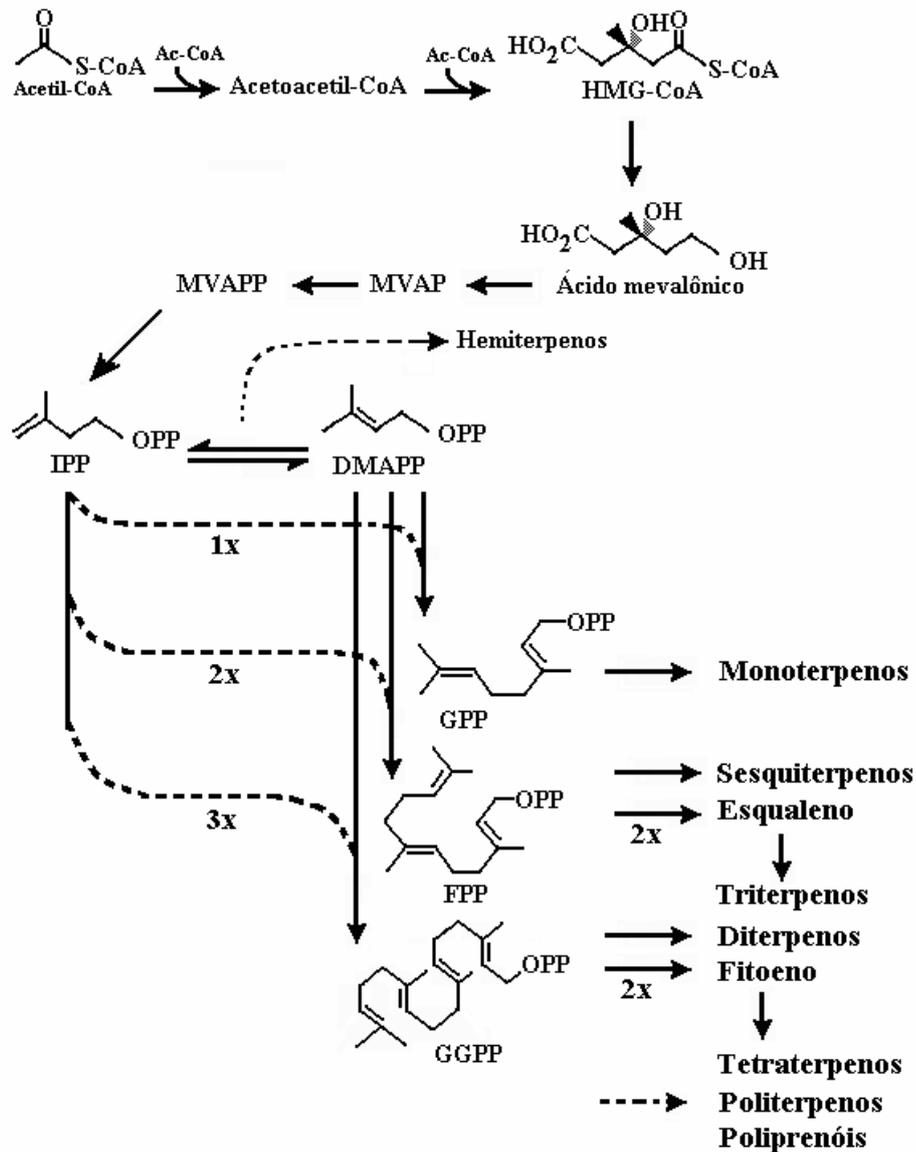


Figura 6 – Rota biossintética do ácido mevalônico e derivados. Dimetilalila éster alílico (DMAPP), pirofosfato de *trans*-geranila (GPP), isopentenila (IPP). Fonte: MCGARVEY e CROTEAU, 1995.

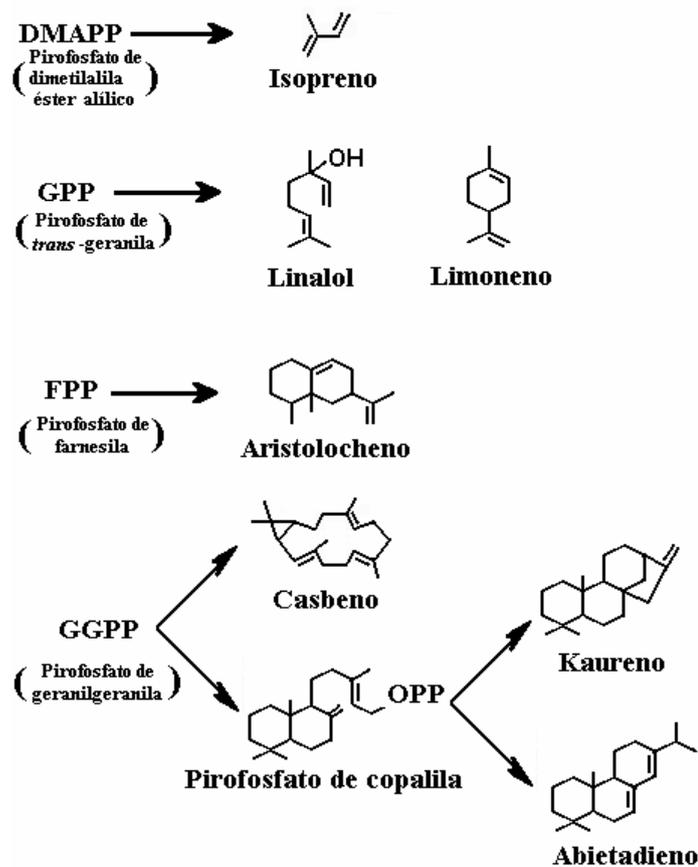


Figura 7 – Representantes de terpenóides originados a partir do DMAPP, GPP, FPP ou GGPP.
Fonte: MCGARVEY e CROTEAU, 1995.

Os monoterpenóides podem ser divididos em três principais subgrupos: acíclicos, monocíclicos e bicíclicos. Em cada um desses subgrupos, há ainda classificações: hidrocarbonetos não saturados (ocimeno e mirceno), álcoois (geraniol, nerol e linalol), aldeídos (geranial e neral) ou cetonas, lactonas e tropolonas (MANN, 1987; IKAN, 1991) (Figura 8).

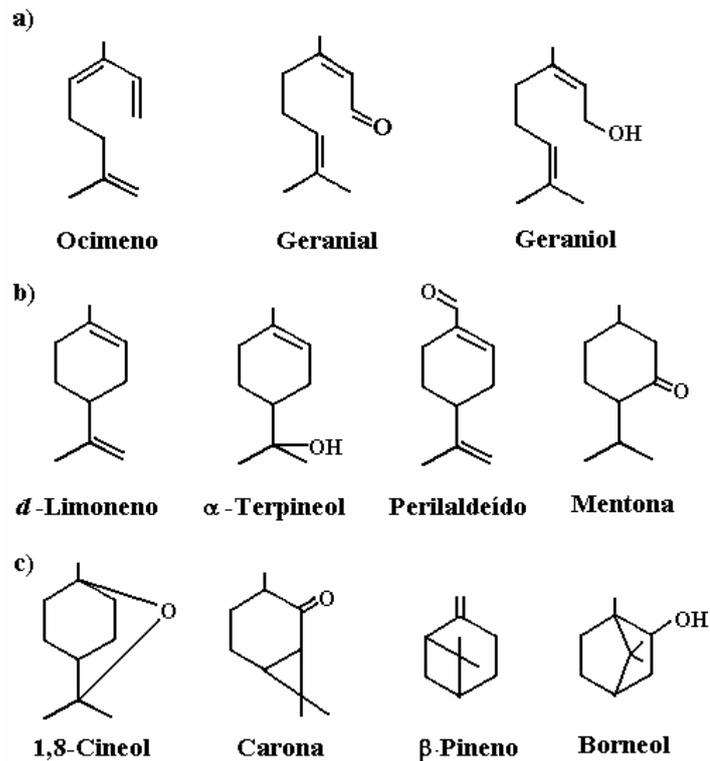


Figura 8 – Representantes de monoterpênoides: a) acíclicos b) monocíclicos e c) bicíclicos
 Fonte: MANN, 1987; IKAN, 1991.

Os sesquiterpenóides são formados pela união de três unidades de isopreno e podem ser acíclicos, monocíclicos ou bicíclicos ou lactonas sesquiterpênicas (MANN, 1987; IKAN, 1991) (Figura 9).

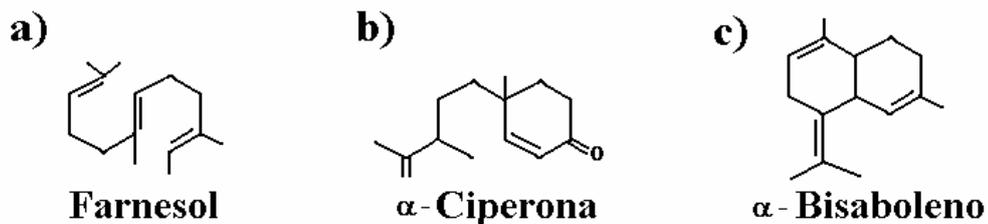


Figura 9 – Representantes de sesquiterpenóides: a) acíclico b) monocíclico e c) bicíclicos
 Fonte: MANN, 1987; IKAN, 1991.

Nas células vegetais, os óleos essenciais podem ser encontrados em estruturas secretoras especializadas, como tricomas glandulares, células parenquimáticas diferenciadas, canais oleíferos ou em bolsas lisígenas ou esquizolisígenas (ROBBERS et al., 1996; SIMÕES e SPITZER, 2000).

1.1.3.3 Fatores que alteram o metabolismo das plantas

Diversos estudos têm demonstrado que fatores genéticos, ecológicos e fisiológicos podem alterar o metabolismo das plantas. O conhecimento desses fatores e as alterações ocasionadas por esses, pode ser uma ferramenta importante na área de cultivo e produção de plantas para diferentes usos (BROWN JÚNIOR, 1988).

Os fatores genéticos são responsáveis pela regulação e manutenção das características próprias das plantas, em relação aos seus diversos aspectos, como a síntese de metabólitos (ANDRADE e CASALI, 1999).

Os fatores ecológicos podem ser divididos em bióticos e abióticos. Esses fatores promovem a interação das espécies com o ambiente, recebendo influência e interferindo no meio ao mesmo tempo (CASTELLANI, 1997).

Os fatores bióticos estão relacionados com as interações planta-microorganismos, planta-planta e planta-herbívoros e constituem respostas dos mecanismos que variam de acordo com suas relações ecológicas locais e imediatas, resultando em situações que podem alterar os processos internos de síntese de metabólitos (ANDRADE e CASALI, 1999). Dessa forma, as espécies vegetais estão sujeitas ao ataque por predadores e podem produzir substâncias aleloquímicas para sua proteção. Essas substâncias são originadas do metabolismo secundário e podem desempenhar função ecológica (GOTTLIEB, 1987). Por exemplo, furanocumarinas possuem propriedades tóxicas para muitos herbívoros, fenilpropanóides são tóxicos a certos insetos, monoterpenóides são agentes antimicrobianos, sesquiterpenóides podem repelir insetos e ésteres de ácidos graxos são tóxicos para certas larvas de lepdópteros (ZANGERL et al., 1997).

As variações climáticas encontram-se entre os diversos fatores abióticos. Devido a esses fatores, plantas que ocorrem ao longo de um gradiente ambiental variam quanto a sua constituição genética e atividade fisiológica. Mesmo plantas da mesma espécie podem responder de modo muito diferente a um dado grau de tensão ambiental (OLIVEIRA, 1997). As composições do óleo de sementes de muitas plantas podem ser afetadas pela localização geográfica e condições climáticas do local de crescimento (JOHANSSON et al., 1997). A espécie *Satureja obovata* Lag coletada em diferentes localidades apresentou variações qualitativas e

quantitativas do óleo essencial, da fração fenólica, bem como variou a atividade antimicrobiana e espasmolítica (NAVARRO et al., 1989).

A luz desempenha papel fundamental na vida das plantas influenciando na fotossíntese e em outros fenômenos fisiológicos, como crescimento e desenvolvimento. As plantas também respondem à luz e escuridão dentro de um ciclo de 24 horas, comportamento conhecido como fotoperiodismo, que em muitas espécies são responsáveis pela germinação de sementes e formações de bulbos e flores (ANDRADE e CASALI, 1999). O fotoperiodismo exerce influência na determinação do ponto de colheita, produção de sementes e escolha da época de plantio. Plantas em condições ambientais favoráveis têm capacidade para utilizar melhor a energia solar e realizar a fotossíntese com mais eficiência e, teoricamente, com maiores rendimentos. No entanto, a adaptação da planta ao local de crescimento pode levar às alterações morfológicas, anatômicas e produtivas (CASTELLANI, 1997). Após receber suplemento de luz, a espécie *Thymus vulgaris* L. produziu maior número de glândulas, maior teor de óleo essencial e maior deposição de cera na superfície foliar (LETCHAMO e GOSSELIN, 1996). *Centella erecta* (L. F.) Fernald, quando exposta ao sol, apresentou aumento no diâmetro do pecíolo, maior número de células parenquimáticas no limbo foliar e maior teor de saponinas triterpênicas (AZEVEDO et al., 1991), enquanto *Justicia pectoralis* apresentou maior teor de cumarinas (BARROS et al., 1992).

Na espécie *Mentha piperita* L., as respostas de produção de óleo essencial também são função do nível e duração do estresse (CHARLES et al., 1990). Após duas semanas de estresse osmótico, a produção total de óleo foi significativamente reduzida, porém com um aumento de sesquiterpenóides.

Em condições de estresse hídrico, foi demonstrado menor número de glândulas de óleo essencial e menor teor na espécie *Thymus vulgaris* L. No entanto, essa planta apresentou maior deposição de cera na superfície foliar, atuando como barreira aos óleos voláteis (LETCHAMO e GOSSELIN, 1996). Já nas espécies *Thymus capitatus* L., o estresse hídrico induziu altas produções de óleo essencial e marcante declínio da fração fenólica. A irrigação aumentou a quantidade total de ácido clorogênico, gálico e caféico (DELITALA et al., 1986). Em *Atropa belladonna* L., o maior número de irrigações teve efeito positivo em todas as fases de desenvolvimento, sendo que o nível de alcalóides diminuiu com o desenvolvimento e não foi afetado pela irrigação (FRANZ, 1983).

1.1.4 *Pterodon emarginatus* Vogel

1.1.4.1 Distribuição Geográfica

A sucupira-branca (*Pterodon emarginatus* Vogel) é freqüentemente encontrada em Minas Gerais, São Paulo, Tocantins, Goiás, Mato Grosso e Mato Grosso do Sul, principalmente no cerrado e na floresta semidecídua da bacia do Paraná (LEITE DE ALMEIDA et al., 1975; BARREIRA et al., 2002).

1.1.4.2 Ecofisiologia

Pterodon emarginatus Vogel conhecida na medicina popular como faveiro, sucupira-branca, fava-de-sucupira, sucupira ou sucupira-lisa, apresenta como sinonímia botânica *Pterodon pubescens* Benth. É uma planta semidecídua, heliófita, seletiva xerófila, características de terrenos secos e arenosos do cerrado e de sua transição para floresta semidecídua. Sua dispersão é irregular e descontínua, ocorrendo em agrupamentos densos e, muitas vezes até em populações puras. Um dos seus principais usos justifica-se pela sua madeira, considerada pesada (densidade 0,94 g/cm³), com tecido compacto e revesso, bastante dura, difícil de rachar, de longa durabilidade mesmo quando em contato com solo e umidade. Sua madeira, geralmente, é utilizada em construção civil e naval, pilares de pontes, postes, dormentes, assoalho de vagões e de carrocerias, carvão e lenha. A árvore é ornamental, porém, infelizmente ainda não foi devidamente aproveitada para o paisagismo; apesar de seu lento crescimento, pode ser usado com sucesso na arborização de ruas e praças. Como planta tolerante à luz direta e pouco exigente em solos, não pode faltar nos reflorestamentos mistos destinados à recomposição de áreas degradadas de preservação permanente (LORENZI, 1992).

A planta inteira é empregada na medicina popular em toda região de sua ocorrência natural. A casca produz um óleo volátil e aromático, muito eficiente no tratamento do reumatismo, possivelmente o mesmo encontrado nos alvéolos das

sementes. As túberas radiculares ou “batatas-de-sucupira” são empregadas no tratamento de diabetes (MORS et al., 1967).

1.1.4.3 Aspectos morfológicos

Trata-se de uma árvore de grande porte de copa piramidal e rala, com altura de 8-16 metros, com tronco cilíndrico de 30-40 centímetros de diâmetro revestido por casca lisa de cor branco-amarelada. Suas raízes ocasionalmente formam expansões ou túberas denominadas de “batata-de-sucupira”, constituindo-se em órgãos de reserva da planta. Possuem folhas compostas pinadas, com 20-36 folíolos de 3-4 centímetros de diâmetro e flores de cor rosada, dispostas em inflorescências paniculadas terminais. Os frutos são vagens tipo sâmara, arredondado, indeiscente e alado, contendo uma única semente fortemente protegida dentro de uma cápsula fibro-lenhosa e envolvida externamente por uma substância oleosa numa estrutura esponjosa como favos de mel (LORENZI e MATOS, 2000) (Figura 10). Em especial, as sementes contêm um endosperma nuclear que exhibe células periféricas com conteúdo denso e rico em substâncias lipídicas (OLIVEIRA e PAIVA, 2005). Uma outra espécie muito semelhante – *Pterodon polygalaeflorus* Benth, com os mesmos nomes populares e até considerada por alguns como a mesma espécie, é encontrada mais ao norte dos locais de ocorrência de *Pterodon emarginatus* Vogel e suas principais diferenças são flores azul-violeta e árvores mais altas (LORENZI, 1998). Além disso, a espécie também é frequentemente confundida na medicina tradicional com a espécie *Bowdichia virgilooides* Kunth, morfológicamente bem diferente daquela, principalmente com relação aos frutos (vagens), porém com os mesmos nomes populares.

A espécie *Pterodon emarginatus* Vogel, produz anualmente grande quantidade de sementes viáveis, que eventualmente podem ser atacadas por insetos e sua floração ocorre durante os meses de setembro – outubro (Figura 11) e a maturação dos frutos verificam-se nos meses de junho – julho com a planta já quase totalmente despida da folhagem; permanecendo, entretanto, na árvore por mais algum tempo. As sementes podem ser obtidas colhendo-se os frutos diretamente da árvore quando iniciarem a queda espontânea, ou recolhê-los no chão

após a queda. Os frutos assim obtidos podem ser diretamente utilizados para a semeadura, ou abertos manualmente para a retirada da semente; essa seria a situação ideal, entretanto, como é uma operação trabalhosa, pode-se cortar uma de suas extremidades e semeá-los dessa forma. Um quilograma de frutos contém, aproximadamente, 1200 unidades (LORENZI, 1998).



Figura 10 – Espécime de *Pterodon emarginatus* encontrada no Horto Florestal do Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA) (FLONA), no município de Paraopeba/MG. Autor: Rafael Cypriano Dutra, 2006.



Figura 11 – Espécime de *Pterodon emarginatus* encontrada no município de Três Marias/MG. Autor: Rafael Cypriano Dutra, 2006.

1.1.4.4 Constituintes químicos

Estudos fitoquímicos do gênero *Pterodon* têm demonstrado a presença de alcalóides nas cascas das árvores (TORRENEGRA et al., 1989), isoflavonas e alguns triterpenos (MARQUES et al., 1998); diterpenos na madeira (FASCIO et al., 1975; ARRIAGA et al., 2000) e isoflavonas no óleo das sementes (BRAZ FILHO e GOTTLIEB, 1971). Apesar de existirem estudos sobre a atividade citotóxica de alguns diterpenos (HAYASHI et al., 1992; DIMAS et al., 1998) e sesquiterpenos (BEEKMAN et al., 1996; KUBO et al., 1996), existem poucos estudos toxicológicos a respeito do óleo essencial das sementes de *Pterodon emarginatus* Vogel (DA LUZ DIAS et al., 1995).

Em 1967, o 14,15 - epoxigeranilgeraniol foi isolado dos frutos de *Pterodon pubescens*, o qual demonstrou ser eficiente protetor quanto à penetração das cercárias de *Schistosoma mansoni* (MORS et al., 1967). Em 1970, novo diterpeno o 14,15-dihidroxi-14,15-dihidrogeranilgeraniol foi obtido de *Pterodon emarginatus* Vogel (MAHJAN et al., 1970). Neste mesmo ano, dois novos monoterpenos foram isolados do óleo dos frutos de *Pterodon pubescens* (FASCIO et al., 1970), o 16 – epoxigeranilgeraniol e o 16,17 – epoxigeranilgeraniol.

Fascio et al. (1976) isolaram das sementes do gênero *Pterodon* os seguintes furanos diterpenos: *Pterodon apparicioi* (7 β -acetoxivouacapanato e metil 6 α -acetoxi-7 β -hidroxivouacapan-17-oato), *Pterodon emarginatus* (6 α ,7 β -diacetoxivouacapan-14 β -al, 6 α ,7 β -diacetoxivouacapan-14 β -oato, metil 6 α ,7 β -diacetoxi-14-hidroxivinhaticoato e metil 6 α ,7 β -diacetoxi-12,16-dihidro-12,14-dihidroxi-16-oxovinhaticoato) e *Pterodon polygalaeflorus* (ácido 6 α ,7 β -dihidroxivouacapan-17-óico, metil 6 α ,7 β -dihidroxivouacapan-17-oato, metil 6 α -acetoxi-7 β -dihidroxivouacapan-17-oato e vouacapano-6 α ,7 β ,14 β -triol.

Desde a descoberta destes furanos diterpenos, principalmente, do ácido 6 α ,7 β -dihidroxivouacapan-17-óico (ADV) (Figura 12), muitos foram os trabalhos que utilizaram este constituinte como protótipo para a síntese de novos constituintes ativos com atividades biológicas diversas. Além disso, acredita-se que as atividades biológicas do óleo das sementes das espécies do gênero *Pterodon* estejam diretamente relacionadas com este constituinte.

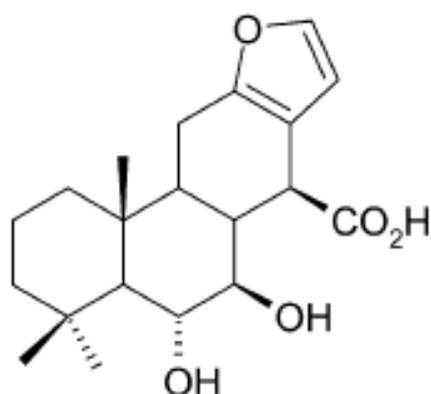


Figura 12 – Fórmula estrutural do ácido 6 α ,7 β -dihidroxiouacapan-17-óico isolado das sementes de *Pterodon polygalaeflorus*. Fonte: KING-DÍAZ et al., 2006.

Demuner et al. (1998) a partir do ácido 6 α ,7 β -dihidroxiouacapan-17-óico isolado das sementes de *Pterodon polygalaeflorus*, sintetizaram cinco novos derivados (ácido 6 α ,7 β -dihidroxi-12,13,15,16-tetrahidrovouacapan-17-óico; 6 α -hidroxi-12,13,15,16-tetrahidrovouacapano-7 β ,17 β -lactona; 21 α - flúor - 7 - norvouacapano - 17 β , 21 α - lactona; 21 α - flúor - 7- nor-12, 13, 15, 16 - tetradidrovouacapano - 17 β , 21 α - lactona e metil 6 α ,7 β -bis[metiltio(tiocarbonil) oxi] vouacapan-17 β -oato). Tais compostos foram testados no crescimento radicular de *Sorghum bicolor* L. (sorgo) e *Cucumis sativus* L. (pepino). Neste mesmo trabalho os autores concluíram que os novos diterpenos apresentaram um efeito inibitório no crescimento radicular de *Sorghum bicolor* e um pequeno efeito estimulatório nas raízes de *Cucumis sativus*, e adicionalmente concluíram que os grupamentos OH não parece ser essencial para suas atividades. Embora o mecanismo de ação destes novos diterpenos não seja conhecido e considerando as atividades apresentadas, parece que a estrutura dos diterpenos seja mais importante para a sua atividade biológica que os grupamentos funcionais, como no caso de algumas lactonas sesquiterpênicas. Estes resultados foram confirmados quando King-Díaz et al. (2006) testaram o derivado 6 α -hidroxivouacapan-7 β ,17 β -lactona, o qual apresentou efeito inibitório na fotossíntese nas raízes de *Spinacea oleracea* L (espinafre) (Figura 13).

Belinelo et al. (2001), a partir do ácido 6 α ,7 β -dihidroxiouacapan-17-óico isolado das sementes de *Pterodon polygalaeflorus*, obtiveram dez novas amidas derivadas (N-etil-6 α -acetoxi-7 β -hidroxivouacapan-17 β -amida; N-propil-6 α -acetoxi-7 β -hidroxivouacapan-17 β -amida; N-isopropil-6 α -acetoxi-7 β -hidroxivouacapan-17 β -

amida; N, N-dietil-6 α -acetoxi-7 β -hidroxivouacapan-17 β -amida; N, N-dimetil-6 α -acetoxi-7 β -hidroxivouacapan-17 β -amida; N-butil-6 α -acetoxi-7 β -hidroxivouacapan-17 β -amida; N-(t-butil)-6 α -acetoxi-7 β -hidroxivouacapan-17 β -amida; N-benzil-6 α -acetoxi-7 β -hidroxivouacapan-17 β -amida; N - (2-aminoetil) - 6 α - acetoxi - 7 β -hidroxivouacapan-17 β -amida e N-(6 α -acetoxi-7 β -hidroxivouacapan-17 β -óleo piperidina), das quais nove apresentaram efeito inibitório no crescimento radicular de *Sorghum bicolor* L. (sorgo) e *Cucumis sativus* L. (pepino) (Figura 14).

Estes trabalhos descritos acima apresentam grande importância no mundo científico e industrial, pois desde a descoberta do herbicida sintético, ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), em 1946, a indústria de agroquímicos se desenvolveu enormemente, e hoje há um grande número de herbicidas seletivos para diversas culturas (VAUGHN e SPENCER, 1993). O mercado mundial de agroquímicos movimenta em torno de 30 bilhões de dólares e, no Brasil, essa indústria tem crescido continuamente, sendo que em 1997 as vendas desses produtos atingiram 2,1 bilhões de dólares (ASSOCIAÇÃO NACIONAL DE DEFESA VEGETAL - ANDEF).

Um dos principais problemas associados ao uso de herbicidas é o aparecimento de espécies resistentes aos mesmos e, como consequência disso, existe uma demanda crescente por novos compostos, que possuam mecanismos de ação diferentes dos herbicidas em uso (JASIENIUK, et al., 1996; HEAP, 1997).

Os produtos naturais constituem-se fontes de novas estruturas com diversas atividades biológicas, e têm servido de modelo para o desenvolvimento de novos agroquímicos (DUKE e LYDON, 1987; DUKE e ABBAS, 1995; COPPING, 1996).

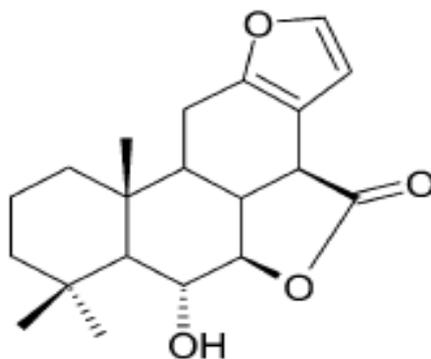
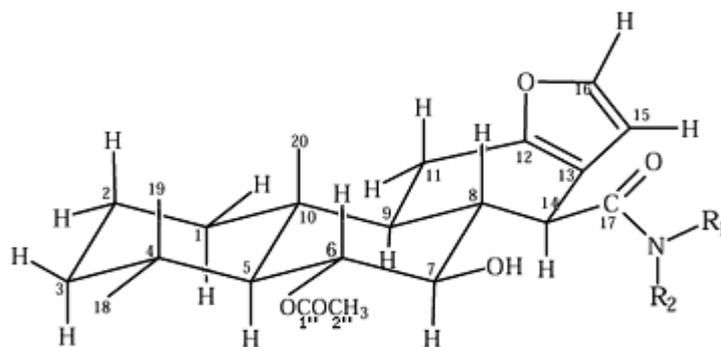


Figura 13 – Fórmula estrutural do 6 α -hidroxivouacapan-7 β ,17 β -lactona sintetizado a partir do ácido 6 α ,7 β -dihidroxivouacapan-17-óico isolado das sementes de *Pterodon polygalaeflorus*. Fonte: KING-DÍAZ et al., 2006.



Composto	R ₁	R ₂	Tempo de reação(h)	Fórmula molecular	Rendimento (%)	T _f (°C)
5	H	Et	1,5	C ₂₄ H ₃₅ NO ₅	88	112-113
6	H	Pr	3	C ₂₅ H ₃₇ NO ₅	81	95-98
7	H	<i>i</i> -Pr	6	C ₂₅ H ₃₇ NO ₅	85	172-176
8	Et	Et	12	C ₂₆ H ₃₉ NO ₅	85	231-233
9	Me	Me	1,5	C ₂₄ H ₃₅ NO ₅	62	220-222
10	H	Bu	6	C ₂₆ H ₃₉ NO ₅	75	143-146
11	H	<i>t</i> -Bu	8	C ₂₆ H ₃₉ NO ₅	92	201-205
12	H	Benzil	8	C ₂₉ H ₃₇ NO ₅	65	110-112
13	H	-CH ₂ CH ₂ NH ₂	4	C ₂₄ H ₃₆ N ₂ O ₅	80	120-122
14	-CH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₂ -		6	C ₂₇ H ₃₉ NO ₅	69	227-228

Figura 14 – Estruturas, dados físicos e parâmetros específicos das reações de obtenção das amidas sintetizadas a partir do ácido 6 α ,7 β -dihidroxivouacapan-17-óico isolado das sementes de *Pterodon polygalaeflorus*. R₁ e R₂: radicais de substituição e T_f: temperatura de fusão. Fonte: BELINELO et al., 2001.

Dentre as diversas classes de produtos naturais, observa-se que muitos monoterpenos e sesquiterpenos possuem atividade alelopática e, portanto, podem servir de modelo para o desenvolvimento de novos herbicidas. Entretanto, informação insuficiente sobre atividade alelopática causada por diterpenos é encontrada na literatura (RODRIGUES et al., 1976; PICMAN e PICMAN, 1984; ELAKOVICH, 1988; VAUGHN e SPENCER, 1993; FISCHER, et al., 1994) e por esta razão, os constituintes isolados a partir do ácido 6 α ,7 β -dihidroxivouacapan-17-óico podem ser de grande importância para o desenvolvimento de novos herbicidas de origem natural.

Rubinger et al. (2004) obtiveram do ácido 6 α ,7 β -dihidroxivouacapan-17-óico isolado das sementes de *Pterodon polygalaeflorus* o derivado metil 6 α ,7 β -tiocarbonildioxivouacapan-17 β -óico. Visando reunir dados para estudar a ação

biológica dos voucapanóides, Belinelo et al. (2002) isolaram seis novas amidas (N-etil-N-metil-16-(N, N-dimetilaminometil)-6 α ,7 β -dimetoxivouacapan-17 β -amida; N-etil-N-metil-16-(N, N-dietilaminometil)-6 α ,7 β -dimetoxivouacapan-17 β -amida; N-etil-N-metil-16-(N, N-dipropilaminometil)-6 α ,7 β -dimetoxivouacapan-17 β -amida; N-etil-N-metil-16-(1-piperidilmetil)-6 α ,7 β -dimetoxivouacapan-17 β -amida e N-etil-N-metil-16-(1-pirrolidinilmetil)-6 α ,7 β -dimetoxivouacapan-17 β -amida e N-etil-N-metil-16-(4-morfolinilmetil)-6 α ,7 β -dimetoxivouacapan-17 β -amida) derivadas do ácido 6 α ,7 β -dihidroxivouacapan-17-óico, contendo grupos alquilamidas no anel furânico, preparadas pela reação de Mannich, com sais de imínios pré-formados, e as testaram em *screening in vitro*, podendo indicar uma ação farmacológica sob células do sistema nervoso.

Embora apresente variadas atividades farmacológicas, extratos hidroalcoólico das sementes das espécies pertencentes ao gênero *Pterodon*, são muito utilizados pelas suas atividades anti-reumática, analgésica, antiinflamatória, quando ingeridos por via oral, em quantidades pequenas com doses regulares (PIO CORREIA, 1984; COELHO et al., 2005) e hipoglicemiante (MACEDO; FERREIRA, 2004). O uso popular do seu óleo, com efeito anti-reumático, tem sido relatado em livros brasileiros sobre plantas medicinais durante muito tempo (COIMBRA, 1942; CRUZ, 1965). Além disso, a atividade anti-reumática do extrato hidroalcoólico das sementes de *Pterodon pubescens* demonstrou aumento na produção de colágeno na artrite em camundongos *Swiss* (SABINO et al., 1999a).

Quatorze tipos de diterpenos foram descritos e isolados dos frutos do gênero *Pterodon*. Dentre as várias substâncias, quatro foram obtidas da espécie *Pterodon polygalaeflorus* Benth (FASCIO et al., 1975). Em 1982, foi reportada a atividade antiinflamatória do vouacapan, caracterizada pela redução do edema de pata induzido pela injeção intraplantar de carragenina, de serotonina e de histamina na pata de ratos (SILVA et al., 2004). Desde então, diversos pesquisadores tentam elucidar o mecanismo de ação dos constituintes voucapanóides.

Duarte et al. (1992) isolaram o 6 α -7 β -dihidroxivouacapan-17 β -oato das sementes de *Pterodon polygalaeflorus* Benth a fim de elucidar seu mecanismo de ação analgésico. Neste trabalho, os autores sugerem que o efeito analgésico causado pelo vouacapan seja devido à capacidade que este constituinte tem de aumentar a taxa de endomorfina (peptídeos endógenos). Além disso, a tolerância causada pela morfina, verificada durante os experimentos, associada ao SNC,

poderia sugerir que a tolerância desenvolvida pelo vouacapan também poderia ser por este processo. Assim sendo, a administração diária de vouacapan poderia aumentar a taxa de endopioides, e poderia também esgotar o depósito destes peptídeos, comprometendo assim seu poder analgésico. Parece que o efeito analgésico provocado pelo vouacapan seja mediado pelos receptores α -2 adrenérgicos, sugerindo o envolvimento do sistema opióides central e periférico.

Duarte et al. (1996), ao tentarem elucidar o mecanismo de ação analgésico do vouacapan, evidenciaram que a atividade antinociceptiva deste constituinte é bloqueada, parcialmente, pelos antagonistas opióides. Neste estudo, existem fortes evidências para o envolvimento da dopamina na resposta de antinocicepção específica do vouacapan, através dos receptores D_2 como, por exemplo, a antinocicepção do vouacapan foi parcialmente antagonizada pela domperidona, um bloqueador específico dos receptores D_2 ; a dopamina causou analgesia de forma dose-dependente no ensaio utilizado, sendo antagonizada pela domperidona (antagonista dos receptores tipo 2). Além disso, o agonista específico dos receptores D_2 (Ly171555) causou analgesia, enquanto um agonista específico dos receptores D_1 causou nocicepção; um efeito aditivo no potencial analgésico foi observado quando vouacapan e dopamina foram administrados em associação e o efeito analgésico do vouacapan foi antagonizado pela guanitidina, sugerindo, claramente, o envolvimento de catecolaminas neste efeito.

O envolvimento da dopamina na percepção da dor é conhecido e aceito, no qual a ativação dos receptores dopaminérgicos do tipo 2 (D_2) aumenta a antinocicepção. Em contrapartida, a ativação dos receptores do tipo 1 (D_1) causa nocicepção, ou seja, a administração de injeções intraventricular de dopamina ou Ly171555 agonistas de D_2 induz um maior período de latência no ensaio de *tail-flick*, enquanto um agonista de D_1 diminui este tempo. A administração sistêmica de dopamina induz analgesia. Guanitidina parece diminuir a concentração plasmática de dopamina e, principalmente, noradrenalina e esta causa nocicepção enquanto dopamina causam antinocicepção. Uma possível e consistente hipótese para o antagonismo da guanitidina sobre os efeitos do vouacapan pode ser especulada sendo causado por uma diminuição da concentração de dopamina, ao nível periférico. O depósito e secreção dos peptídeos opióides e catecolaminas parecem estar relacionado com o fechamento da medula adrenal e alguns nervos simpáticos. Além disso, a guanitidina também parece estar associada à diminuição das

catecolaminas, pela inibição dos peptídeos opióides, por esta razão acredita-se que o mecanismo de antinocicepção causado pelo vouacapan também possa estar associado com componentes opióides (DUARTE et al., 1996).

Campos et al. (1990), através do extrato hexânico obtido das sementes de *Pterodon polygalaeflorus* Benth, obtiveram o óleo essencial por arraste de vapor, no qual foram identificados constituintes como: ilangeno, α – copaeno, β – cariofileno, α – humuleno, γ – elemeno e δ – cadineno. Em continuação aos estudos fitoquímicos, dois novos diterpenos do tipo vouacapan o 6 α -hidroxi-7 β -acetoxi-17-metil - vouacapanoato e o 6 α -hidroxi-7 β -acetoxi-vouacapan-14(17)-eno foram isolados (CAMPOS et al., 1992).

O efeito antiinflamatório das sementes de *Pterodon emarginatus* foi comprovado por diferentes autores (SABINO et al., 1996; NUNAN et al., 2001; COELHO et al., 2004).

O óleo da semente de *Pterodon pubescens* não apresentou atividade mutagênica (SABINO et al., 1999b), embora estudos de DL₅₀ (dose letal 50%) e observação de sintomas tóxicos agudos do óleo das sementes demonstraram possíveis riscos após utilização da planta (DA LUZ DIAS et al., 1995). Outros estudos toxicológicos confirmam que elevadas doses do óleo das sementes não produzem efeitos tóxicos em camundongos Swiss (SABINO et al., 1999b).

1.1.5 Atividades farmacológicas

A revisão da literatura das atividades farmacológicas realizadas neste estudo será detalhada nos itens a seguir.

1.1.5.1 Espécies Reativas de Oxigênio (EROs)

O oxigênio 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 (ERO) (OGA, 2003). Estas abrangem moléculas com

um elétron desemparelhado no último orbital, ou seja, ocupando um orbital atômico ou molecular sozinho, também conhecido como radical livre. Os radicais livres são extremamente instáveis, extraordinariamente reativos, e com uma enorme capacidade para combinar-se com diversas moléculas integrantes da estrutura celular e derivado de cada uma delas.

ERO é um termo freqüentemente usado para incluir também espécies que não são radicais livres, mas algumas moléculas derivadas de O₂ (oxigênio), capazes de gerar radical livre, como por exemplo, o peróxido de hidrogênio (H₂O₂) (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2000). O O₂ envolvido no processo respiratório, em certas condições no organismo, pode ser transformado em ânion superóxido, radical hidroxil, oxigênio *singlet* e peróxido de hidrogênio, e todas essas variações estão muitas vezes associadas a circunstâncias patológicas, incluindo processos inflamatórios. Entretanto, também estão relacionadas a processos fisiológicos como, por exemplo, a resposta imune.

Estas formas de oxigênio são altamente prejudiciais para os constituintes celulares, incluindo o DNA, os lípidos, ácidos graxos e as proteínas (STORZ et al., 1987). O oxigênio atmosférico é o principal agente responsável pela deterioração de materiais orgânicos e alimentos expostos ao ar. Diversas classes de moléculas são susceptíveis ao ataque de O₂ e acabam formando hidroperóxidos. Tais hidroperóxidos contribuem para a deterioração e disfunção em células e membranas celulares (LARSON, 1988).

As EROs podem direcionar a produção de mais espécies reativas, particularmente através de processos endógenos, acontecendo em muitas células como consequência dos processos metabólicos. Também podem ser formadas pela exposição de células à radiação ionizante, pelo ciclo-redox químico presente no ambiente ou pela exposição a metais pesados (BRENNAN e SCHIEST, 1996). Apesar destes mecanismos, todos os organismos aeróbios estão continuamente expostos a oxidantes reativos, ocorrendo estresse oxidativo, onde a concentração destes oxidantes aumenta a capacidade de tamponamento antioxidante da célula. Dados os prejuízos naturais das EROs, a maioria dos organismos têm desenvolvido meios para proteção dos seus constituintes celulares contra os oxidantes reativos (GASPARRI, 2005).

1.1.5.2 Potencial antimicrobiano de plantas medicinais

Um dos maiores problemas de Saúde Pública, enfrentados nas últimas décadas, foi o agravamento da resistência a antimicrobianos em populações bacterianas, principalmente de origem hospitalar (OKEKE et al., 1999; OLIVEIRA et al., 2006 a,b). Atualmente, registra-se um aumento significativo na frequência do isolamento de bactérias que eram reconhecidamente sensíveis aos fármacos de rotina usados na clínica, mas que se apresentam agora resistentes a todos ou quase todos os fármacos disponíveis no mercado, como ocorre com várias bactérias multirresistentes (PIDDOCK et al., 1998; RATTAN et al., 1998; PITTET, 2002; SHIOMORI et al., 2002; SAKAGAMI e KAJAMURA, 2006).

Muitas linhagens multirresistentes de *Staphylococcus aureus* – “Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA)”, reconhecido patógeno associado à infecção hospitalar ou adquirida na comunidade, sensíveis apenas ao tratamento com vancomicina, mostram-se resistentes aos aminoglicosídeos, β -lactâmicos, macrolídeos, tetraciclina, quinolonas e outros quimioterápicos (SALYERS e AMÁBILE-CUEVAS, 1997; CHARTONE-SOUZA, 1998).

Atualmente, o problema da resistência microbiana tornou-se mais grave devido às dificuldades para a descoberta e o lançamento de novos antimicrobianos, quase sempre mais escassos e mais caros (PHELPS, 1989). Estima-se que são necessários mais de 10 anos, a um custo superior a 200 milhões de dólares, para que um antimicrobiano esteja à disposição da população (DICKSON e REDWOOD, 1998).

Uma das alternativas usadas pelas indústrias farmacêuticas têm sido a modificação química da estrutura dos antimicrobianos já existentes, na tentativa de torná-los mais eficientes ou de recuperar a atividade prejudicada pelos mecanismos bacterianos de resistência (CHARTONE-SOUZA, 1998). A mudança de paradigma pode ser uma das saídas futuras para o impasse, ao pesquisar em primeiro lugar o alvo e só depois preparar o princípio ativo contra ele, por técnicas de biologia molecular, neste sentido a nanotecnologia vêm a cada dia adquirindo maiores investimentos. Entretanto, as alternativas ecológicas, que enfatizam o respeito pelo meio ambiente, devem ser mais efetivas e de menor custo, uma vez que se baseiam no uso mais cuidadoso de alguns ambientes. Por outro lado, torna-se relevante a

pesquisa da ação inibitória do crescimento bacteriano ou do fluxo gênico de resistência ou mesmo de reversão dessa resistência com o uso de produtos de origem natural (LINDEN e PALADINO, 1998; BROWN, 1999).

Na busca de novos antimicrobianos devemos enfatizar aqueles de origem vegetal, uma vez que o Brasil apresenta a maior biodiversidade do planeta e que muitas plantas já vêm sendo vastamente usadas e testadas há centenas de anos com as mais diversas finalidades por populações do mundo inteiro. A maior parte da população brasileira (80%) consome apenas 37% dos medicamentos disponíveis, dependendo quase que exclusivamente de medicamentos de origem natural (FUNARI E FERRO, 2005). Para isso, antes da determinação das frações ativas por métodos bioquímicos sofisticados, agora disponíveis, torna-se necessário e útil o uso preliminar de métodos de triagem de domínio e usos populares como macerados, chás, extratos aquosos, alcoólicos e outros, a fim de elucidar as principais atividades farmacológicas (CARVALHO, 2003).

1.1.5.3 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). No Brasil, a LTA e a LV ocorrem em todo o território e são endêmicas nas regiões Norte e Nordeste, devido principalmente às características econômicas e culturais dessas populações, predominando nos estados da Bahia, Ceará, Piauí e Maranhão (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2000; RATH et al., 2003).

O tratamento das leishmanioses é feito à base de antimoniais pentavalentes (Sb^{+5}), 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⁺⁵, 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). As plantas são importantes fontes para a investigação de produtos biologicamente ativos. Cerca de um quarto dos medicamentos do mercado farmacêutico possuem extratos em sua composição, alguns dos quais têm sido, inclusive, utilizados como matéria-prima de fármacos semi-sintéticos (BERGMANN et al., 1997).

O uso de plantas no tratamento da Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) é uma prática antiga entre as populações das áreas endêmicas (FOURNET et al., 1992a; 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).

1.1.5.4 Processo doloroso

A dor é definida pela Associação Internacional para Estudos da Dor como uma experiência sensorial e emocional desagradável associada com dano tecidual real ou potencial, ou descrita em termos de tal lesão (DICKENSON E BESSON, 1997). É importante salientar que sempre que qualquer tecido estiver lesado, o organismo reage para desencadear o estímulo doloroso como um mecanismo de proteção (GUYTON e HALL, 2002; MILLAN, 2002). Entretanto, a dor é uma experiência complexa que não envolve apenas a transdução do estímulo nociceptivo ambiental, mas também cognitivo e emocional processado pelo cérebro (JULIUS e BASBAUM, 2001).

Os receptores da dor na pele e em outros tecidos estão presentes em terminações nervosas livres, sensíveis a estímulos dolorosos. A atividade no

nociceptor e a via nociceptiva e outros processos neurofisiológicos induzidos pelo estímulo doloroso é chamado de nocicepção (DICKENSON e BESSON, 1997).

A dor é usualmente desencadeada pela ativação de nociceptores específicos (dor nociceptiva). Entretanto, ela pode ser resultante de lesão nas fibras sensoriais, ou dano ocasionado no SNC (dor neuropática) (MILLAN, 1999).

Além disso, segundo Dickenson e Besson (1997), algumas alterações podem ocorrer como o aumento da resposta a um estímulo normalmente doloroso o qual é denominado de hiperalgesia. Esta normalmente é decorrente de importantes mudanças no processo central de sinalização da dor. Outras alterações sensoriais também podem aparecer, entre elas a alodínia que se refere à dor evocada por estímulos inócuos (MILLAN, 1999).

A sensação de dor nos alerta para uma real ou provável lesão e desencadeia respostas apropriadas para proteger o organismo. Contudo, freqüentemente a dor torna-se crônica e debilitante, em substituição a sua função de atuar como um sistema de aviso. A transmissão para a fase crônica envolve mudanças na medula espinhal e encéfalo, mas ocorre modulação significativa nos locais onde as mensagens da dor são iniciadas no nível do primeiro neurônio sensorial (JULIUS e BASBAUM, 2001).

Neste sentido, existem várias fontes importantes onde os mediadores que participam da resposta nociceptiva são gerados como: tecido lesado, sistema vascular, células imunes, tecidos adjacentes, nervos sensoriais e simpáticos. Esses mediadores atuam em receptores amplamente distribuídos no organismo. Alguns desses receptores são acoplados à proteína G e induzem a formação de segundos mensageiros. Outros receptores são acoplados a canais iônicos que regulam a permeabilidade e a concentração celular de íons (DICKENSON e BESSON, 1997).

Alguns desses mediadores que estimulam o tipo químico de dor incluem: bradicinina (BK), serotonina (5-HT), histamina, íons potássio, ácidos, acetilcolina e enzimas proteolíticas. Além destas, as prostaglandinas (PGs) e a substância P (SP) acentuam a sensibilidade das terminações da dor (GUYTON e HALL, 2002; MILLAN, 2002).

O método do tempo da lambida da pata é uma metodologia que melhor mimetiza a dor clínica e é constituída por duas fases dolorosas. A 1ª fase é típica de uma ação em nível de sistema nervoso central, onde as sinapses que contêm receptores opióides constituem um dos mecanismos que controla a dor. Fármacos

como a morfina podem agir centralmente nesses receptores e diminuir o estímulo doloroso. A morfina, por ser um fármaco opióide, age na 2ª fase (SHIBATA et al., 1989). A 2ª fase é caracterizada pelo surgimento de um processo inflamatório local, onde são produzidos mediadores da inflamação. Esses mediadores são inibidos por fármacos antiinflamatórios, tais como o ácido acetilsalicílico, indometacina e dexametasona (FARSAM et al., 2000).

O método de contorções abdominais induzidas por ácido acético 0,6% induz efeito doloroso e uma reação inflamatória aguda, devido à liberação de diversos mediadores semelhantes à citocinas e eicosanóides, por exemplo, aumento dos níveis de prostaglandinas E_2 e $F_{2\alpha}$ no fluido peritoneal (DERAEDT et al., 1980). Adicionalmente, tem sido demonstrado que citocinas, semelhantes ao fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), estão envolvidos na resposta nociceptiva das contorções induzidas por ácido acético (RIBEIRO et al., 2000).

No teste da placa quente (*hot plate*) avalia-se uma resposta antinociceptiva central específica, através dos antagonistas/receptores opióides supra-espinhais e espinhais (NEMIROVSKY et al., 2001). Neste modelo, a morfina é utilizada como padrão, já que causa analgesia por ativar as vias descendentes, por inibir a transmissão no corno dorsal e por inibir a excitação das terminações nervosas sensoriais na periferia (PERROT et al., 2001; SHANNON e LUTZ, 2002).

1.1.5.5 Pele e cicatrização

A pele por ser formada de diferentes tecidos que possuem atividades específicas pode ser considerada como um órgão, sendo por esse motivo um dos maiores em área superficial e peso (MOORE e DALLEY, 2001). Possui múltiplas funções, como proteção contra a perda de água, armazenamento de gordura, carboidratos e proteínas, ativação da vitamina dihidrocolecalciferol (vitamina D3), respostas imunes do organismo, recepção sensorial e circulação sangüínea (MOORE e DALLEY, 2001). É formada por três camadas: a epiderme, a derme e a hipoderme, sendo que a hipoderme também pode ser chamada de tecido subcutâneo ou tecido celular intermediário (BANKS, 1992).

Por ser a primeira barreira de proteção do organismo contra agentes externos, a pele está sujeita as constantes agressões e sua capacidade de reparação tecidual é de grande importância para a sobrevivência humana (MOORE e DALLEY, 2001; NOGUEIRA, 2005). Após agressões físicas, químicas e/ou biológicas ocorre um desequilíbrio entre as células do tecido normal, por essa razão observa-se resposta tissular à injúria. Esta resposta é caracterizada por uma cascata de eventos celulares e humorais que se iniciam com a coagulação e compreendem a inflamação, a proliferação de fibroblastos e o remodelamento, visando o reparo tecidual e a reposição de colágeno (CARDOSO, 2003; CARVALHO, 2002; MEDEIROS et al., 2005).

O processo de reparação tecidual não é um simples processo linear no qual fatores de crescimento disparam à 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). É um processo biológico complexo, que inclui inflamação, migração celular, angiogênese, síntese de matriz extracelular, depósito de colágeno, e re-epitelização (CLARK, 1993). 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 vazam para o espaço perivascular no local da inflamação, o que justifica o tumor ou tumefação; células fixas, como os mastócitos, fibroblastos, leucócitos e plaquetas que chegam ao local da inflamação através da corrente sanguínea e em mediadores da reação inflamatória, que consistem de proteínas, lipídeos ácidos e aminas vasoativas (ROBBINS et al., 1996).

Dois processos estão envolvidos na cicatrização da maioria das feridas: o reparo e a regeneração tecidual. A regeneração tecidual é a substituição do tecido lesado por um tecido semelhante àquele perdido na lesão, ocorre em tecidos com grande potencial mitótico, enquanto que o reparo tecidual é o processo pelo qual os defeitos teciduais são substituídos por uma cicatriz não funcional (CARVALHO, 2002; MEDEIROS et al., 2005). A inflamação se traduz por migração celular intensificada através das vênulas e extravasamento de moléculas séricas, anticorpos, complemento e proteínas pelos capilares. Estes eventos são controlados

pelo aumento do suprimento sangüíneo, pela vasodilatação e pelo aumento da permeabilidade capilar (MALE, 1998; CARVALHO, 2002).

Aminas vasoativas e produtos do sistema de cininas modulam a resposta imediata. Estes mediadores celulares originam-se de fibroblastos, macrófagos, neutrófilos, plaquetas, queratinócitos, células endoteliais e mastócitos (MARTIN, 1997; MEDEIROS, 2003). Os mastócitos e as plaquetas são importantes fontes de histamina e serotonina, substâncias que causam vasodilatação e aumento da permeabilidade vascular (MALE, 1998; CARVALHO, 2002).

Os macrófagos ativados secretam interleucina 1 (IL-1), interleucina 4 (IL-4), interleucina 6 (IL-6), fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), fator de crescimento de fibroblastos (FGF), fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), fator transformador de crescimento beta (TGF- β) e interferon gama (INF- γ). Estes mediadores aumentam a migração celular por estimularem as células endoteliais de vênulas vizinhas a expor moléculas de adesão para fagócitos, que saem dos vasos (LUSTER, 1998; MEDEIROS et al., 2003; CRUVINEL, 2002). Logo após a lesão, os leucócitos presentes nos vasos locais aderem ao endotélio e após 30 a 60 minutos, por esse motivo, todos os endotélios das vênulas locais estão cobertos por leucócitos aderentes, que começam a se movimentar através das lacunas nas paredes vasculares e terminam concentrando-se no local da lesão (KING, 1985; PROBST, 1998).

Neste período inicial do processo inflamatório, os neutrófilos e macrófagos retiram as bactérias, material estranho e fragmentos celulares da ferida. Os fibroblastos e as células epiteliais e endoteliais, sob ação das citocinas, crescem e dividem-se para criar novos tecidos e restaurar a função. Através dos fibroblastos e das células do tecido conjuntivo, a pele se renova (KING, 1985; LUSTER, 1998). Nessa fase, existem evidências de que as quimiocinas produzidas pelos macrófagos atraem as células mesenquimatosas e influencia sua diferenciação até fibroblasto (PROBST, 1998).

Com o crescimento dos fibroblastos a partir das margens da ferida, observamos simultaneamente a ocorrência da angiogênese. As células endoteliais no interior dos capilares intactos nas margens da ferida passam através da membrana basal da parede vascular, mediante a secreção de colagenase e do fator ativador do plasminogênio. Em seguida, essas células migram na direção do espaço ocupado pela ferida, utilizando como substrato a matriz extracelular ali presente.

Essas células migratórias diferenciam-se para formar novos tubos capilares, no que resulta a maior parte da neovascularização que ocorre na ferida, sendo secundária a diferenciação das células endoteliais migratórias (CARVALHO, 2002; CARDOSO, 2003;).

Em geral, a proliferação das células endoteliais ocorre apenas no vaso genitor, para a devida substituição das células que migraram. O broto capilar une-se ao capilar genitor, para que se estabeleça o fluxo sanguíneo. Os macrófagos situados na ferida são responsáveis pela elaboração de substância angiogênica e dos fatores de crescimento do fibroblasto (FGF). A neovascularização é essencial nesse estágio, porque permite a troca de gases e a nutrição das células metabolicamente ativas (CARVALHO, 2002).

O tecido epitelial, localizado nas bordas da lesão, inicia uma intensa reprodução migrando para o centro desta por cima do tecido conjuntivo de granulação. Simultaneamente na derme, elementos celulares produzem fibras de tecido conjuntivo, principalmente o colágeno (MARTIN, 1997). Nesta fase, o tecido de granulação tem aspecto granuloso, vermelho e úmido, sendo composto basicamente de colágeno tipo III, ácido hialurônico, moderada quantidade de proteoglicanos, pequenos vasos sanguíneos, fibroblastos, miofibroblastos, leucócitos e macrófagos (HUNT, 1981).

O colágeno é de grande importância no processo de reparação tecidual; sua produção pelos fibroblastos inicia-se entre o quarto e quinto dia após a injúria, resultando em uma significativa melhora da ferida. São produzidos colágeno tipo I e III, embora o tipo III seja o principal sintetizado no local da ferida, a quantidade de colágeno aumenta com o tempo e por volta de duas semanas suas fibras passam a predominar na matriz celular (CARDOSO, 2003). Segundo Swaim e Gillette (1998), qualquer substância com potencial para melhorar este processo ajudará na cicatrização.

A função de contrair a ferida é atribuída aos miofibroblastos. Quando a ferida se fecha, o número de células dos vasos sanguíneos e de miofibroblastos diminuem. Isto se deve ao fenômeno denominado apoptose ou morte celular programada, pelo qual o tecido de granulação evolui para a cicatriz (DESMOLIERE et al., 1995; MEDEIROS et al., 2003). Sempre que possível, a lesão do tecido epitelial deverá ser fechada, por aproximação direta das bordas, por retalho ou por enxerto. Estes procedimentos minimizam a perda de líquidos, de proteínas,

diminuem o processo doloroso, a contração da ferida, as cicatrizes hipertróficas e os quelóides, favorecendo dessa forma o processo de cicatrização (DESMOLIERE et al., 1995).

1.1.5.6 Úlceras pépticas

A formação da úlcera péptica é atribuída a um desequilíbrio entre fatores agressivos (ácido e pepsina) e fatores protetores (resistência da mucosa) (YESILADA et al., 2000). Na tentativa de proteger a mucosa gástrica do ácido gástrico, aumentar a cicatrização e prevenir a recorrência da úlcera, o controle farmacológico da secreção ácida gástrica tem representado um alvo desejável. Vários fármacos, como os antagonistas dos receptores histaminérgicos e colinérgicos, inibidores da enzima hidrogênio-potássio-ATPase (H^+/K^+ -ATPase) e agentes citoprotetores têm sido desenvolvidos e, muito deles, ativamente utilizados para o tratamento de doenças gástricas (AIHARA et al., 2003).

O primeiro antagonista dos receptores de próton, tipo 2 (H_2) como, por exemplo, cimetidina, ranitidina e famotidina inibem a produção ácida por competirem de modo reversível com a histamina pela ligação aos receptores na membrana basolateral das células parietais (HOOGERWERF e PASRICHA, 2003). Recentemente, os antagonistas dos receptores H_2 têm se tornado a primeira linha de terapia para doenças pépticas relacionadas ao ácido, levando a uma marcante melhora na qualidade de vida para um grande número de pacientes, bem como a uma redução dramática no uso de intervenção cirúrgica para o tratamento da úlcera (AIHARA et al., 2003).

A identificação da bomba de ácido, H^+/K^+ -ATPase, como o passo final da secreção ácida gástrica proporcionou uma oportunidade única para desenvolver uma nova classe de fármacos que hoje são os supressores da secreção ácida gástrica mais eficazes (AIHARA et al., 2003; HOOGERWERF e PASRICHA, 2003). Fellenius et al. (1981) descobriram que os derivados benzimidazóis inibiam fortemente a secreção ácida gástrica, dentre os quais merecem destaque o omeprazol, lansoprazol e pantoprazol.

Os antiácidos, como o bicarbonato de sódio, proporcionam imediatamente o alívio efetivo da dor pela neutralização do ácido intraluminal. Porém, como os fármacos antissecretores mais potentes e seguros, como os antagonistas dos receptores H₂ e inibidores da bomba de ácido, os antiácidos neutralizadores não são comumente utilizados na clínica médica para o tratamento da úlcera péptica (AIHARA et al., 2003).

Um dos maiores problemas relativo à úlcera gastroduodenal é que, embora a taxa de cicatrização com antagonistas H₂ e inibidor da bomba de prótons seja de 80-100% depois de uma terapia de 4 semanas, 40-80% dos pacientes apresentam recorrência da úlcera dentro de 1 ano. Por esta razão, a busca por novos mecanismos de ação, além da inibição da secreção ácida gástrica, para a cicatrização da úlcera tem aumentado. Os agentes citoprotetores (isoprostol e sucralfato) são capazes de potencializar os mecanismos de proteção da mucosa e/ou proporcionar uma barreira física sobre a superfície da úlcera (RANG et al., 2001).

O alto custo dos medicamentos é um fator de fundamental importância, que muitas vezes limita a utilização destes produtos e que justifica a busca por novas alternativas eficazes e seguras, como o uso de plantas medicinais para o tratamento das dispepsias e outras lesões gástricas. Relatos científicos mostram a existência de uma grande variedade dessas plantas com atividade gastroprotetora, com diferentes mecanismos de ação, indicando que as plantas medicinais constituem uma fonte de novos medicamentos. Dentre as plantas estudadas com potencial antiúlcera estão a *Maytenus ilicifolia* (Celastraceae), conhecida como espinheira santa; a *Baccharis illinita* DC (Asteraceae), conhecida como erva milagrosa e a *Pfaffia glomerata* (Spreng) Pedersen (Amaranthaceae), conhecida como paratudo (SOUZA-FORMIGONI et al., 1991; BAGGIO et al., 2003; FREITAS et al., 2004).

1.1.5.7 Resposta inflamatória

As plantas medicinais constituem importantes recursos terapêuticos para o tratamento de doenças inflamatórias, principalmente das populações mais carentes. Servem tanto à conhecida “medicina caseira”, que faz parte da cultura popular

destes países, como de matéria-prima para elaboração de anti-inflamatórios fitoterápicos ou extração de compostos químicos com atividade anti-inflamatória (FREITAS, 1999). A fitoterapia é praticada, principalmente, pelas populações mais carentes, o que representa grande perigo à saúde, pois neste caso, sua utilização ocorre desconsiderando os aspectos relativos ao controle de eficácia e segurança. É indiscutível a necessidade de um maior e melhor controle para estes produtos, já que os fitoterápicos representam uma alternativa economicamente viável à população (BENDAZZOLI, 2000).

Todos os organismos vivos, desde os procariontes até o homem, possuem mecanismos adaptativos para responder a estímulos agressivos no sentido de manter o equilíbrio homeostático. Nos vertebrados, esta resposta inclui uma série de alterações bioquímicas, fisiológicas e imunológicas coletivamente denominadas inflamação. Na maioria das vezes, os mediadores inflamatórios como, por exemplo, produtos de leucócitos e plaquetas ativados, do metabolismo do ácido araquidônico (prostaglandinas e leucotrienos) e das cascatas da coagulação e do complemento, agem localmente no sentido de restringir as conseqüências e a extensão do dano tecidual (ABBAS et al., 1994). Em condições em que a capacidade homeostática local é superada, ou pela magnitude do estímulo agressor ou pela insuficiência dos mecanismos reguladores, a resposta inflamatória extravasa os limites do seu microambiente e pode se manifestar de modo sistêmico em todo o organismo ou ainda, dependendo da quantidade de citocinas liberadas, pode ter conseqüências catastróficas, na forma de choque circulatório grave (ABBAS et al., 1994).

Atualmente, além das infecções, muitas outras formas de injúria tecidual, como trauma, isquemia, neoplasias e hipersensibilidade, desencadeiam alterações na concentração de várias proteínas plasmáticas, conhecidas como “proteínas de fase aguda” (PFAg). Elas constituem apenas uma parte da “reação ou resposta de fase aguda” (RFAg) que inclui febre, leucocitose e anormalidades metabólicas que produzem variada manifestação clínica e laboratorial. Na resposta inflamatória as várias PFAg exibem diferentes alterações na sua concentração sérica (muito ou pouco aumentada, ou mesmo diminuída) e propriedades biológicas. A magnitude, mas não a natureza, da resposta de fase aguda, medida pela concentração da proteína C reativa (PCR), depende do estímulo desencadeante. Quando este é auto-limitado ou controlado por tratamento, a inflamação é inibida e as PFAg retornam à concentração fisiológica em dias ou semanas, podendo, de outra maneira, persistir

ou recidivar, levando a um padrão de “RFAg crônica”, como ocorre em neoplasias, colagenoses e infecções crônicas (BALLOU e KUSNHER, 1993; BAUMANN e GAULDIE, 1994; VOLANAKIS, 1993).

Independentemente da natureza do estímulo desencadeante, as células ativadas do sistema fagocítico mononuclear (monócitos circulantes e macrófagos teciduais) iniciam a cascata de eventos da RFAg, secretando, em uma etapa inicial, citocinas da família da interleucina-1 (IL-1) e fator de necrose tumoral (TNF). Estas moléculas têm ação pleiotrópica, tanto a nível local como sistêmico. Localmente, agem sobre células da matriz ou estroma tecidual, principalmente fibroblastos e células endoteliais, causando a liberação de um segundo conjunto de citocinas que incluem, além dos próprios IL-1 e TNF, também interleucina-6 (IL-6) e interleucina-8 (IL-8) e as proteínas inflamatória (MIP-1) e quimiotática (MCP) de macrófago. Esta última proteína, juntamente com IL-1, IL-8 e TGF- β recruta para o foco inflamatório, monócitos e neutrófilos, os quais secretam um terceiro conjunto de citocinas, incluindo o TNF e outros fatores quimiotáticos, que retro alimentam o processo inflamatório (Figura 10) (STADNYK e GAULDIE, 1991).

O endotélio vascular desempenha papel central na comunicação entre o sítio inflamatório e os leucócitos circulantes, tanto pela expressão de moléculas de adesão (das famílias de ICAM e ELAM), que facilitam a migração tecidual de monócitos e neutrófilos, como pela modificação do tônus vascular mediado por metabólitos do ácido araquidônico (prostaglandinas, tromboxano e leucotrienos), pelo óxido nítrico e pelas cininas, causando vasodilatação (eritema), aumento da permeabilidade vascular (edema) e hipotensão arterial. A outra manifestação da inflamação, a dor, é mediada, além das prostaglandinas, pela bradicinina, um nonapeptídeo liberado pelo sistema cininogênio (também uma PFAg-cinina, que também participa da ativação da cascata da coagulação (BAUMANN e GAULDIE, 1994; STEEL e WHITEHEAD, 1994).

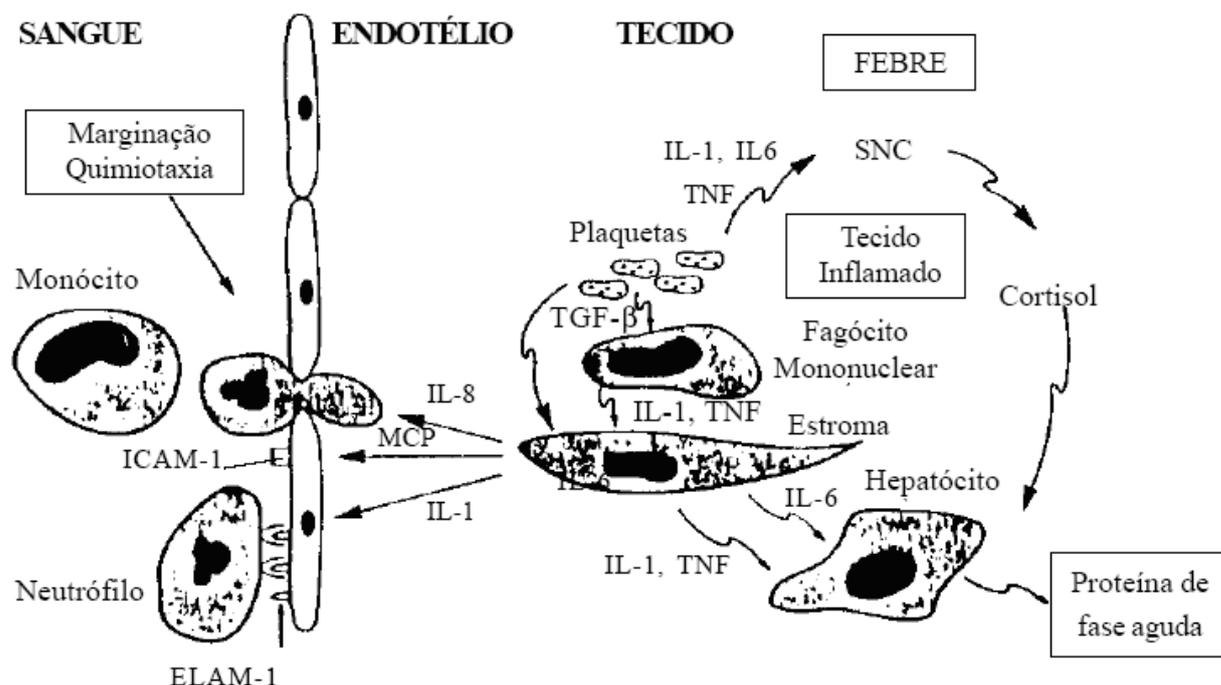


Figura 15 – Mecanismo molecular da resposta de fase aguda. No foco inflamatório, macrófagos (fagócitos mononucleares) liberam inicialmente duas citocinas (IL-1 e TNF) que agem sobre o estroma e endotélio adjacentes estimulando outras citocinas e iniciando o acúmulo de células inflamatórias com o auxílio do TGF- β produzido pelas plaquetas. As respostas hepáticas e do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal, incluindo a febre, são ativadas por um segundo conjunto de citocinas (IL-1, IL-6, TNF, IL-8 e outras). Fonte: BAUMANN e GAULDIE, 1994.

1.1.5.8 Câncer

O câncer, na maioria dos países desenvolvidos, constitui a segunda causa de morte da população, superado somente pelas doenças do sistema cardiovascular. Segundo estimativas da Organização Mundial da Saúde (OMS) surgem a cada ano 9 milhões de novos casos e 5 milhões de pessoas morrem em decorrência do câncer. No entanto, esses índices estão subestimados pelas dificuldades de notificação e registro dessa patologia em muitos países subdesenvolvidos. O aumento da incidência de câncer é, principalmente, consequência do aumento da expectativa de vida da população, pois o aparecimento dessa patologia é favorecido pelo envelhecimento do organismo (CAIRNS, 1981). Atualmente são conhecidos mais de 100 tipos de câncer, diferenciados pela etiologia, processo de evolução e forma de tratamento e, por isso,

o câncer não pode mais ser considerado como uma única patologia (CALABRESI e CHABNER, 1996; COELHO, 1998).

A célula cancerígena caracteriza-se pela perda de função em consequência da ausência de diferenciação, proliferação incontrolada, invasividade dos tecidos adjacentes e metástase. A origem dessa célula é consequência de alterações genéticas que podem ser produzidas por diversos mecanismos como a inativação de genes supressores de tumor, ativação de oncogenes, inativação de genes responsáveis pela apoptose e mutações produzidas por agentes químicos, físicos e biológicos (BRENTANI et al., 1998; SIMPSON et al., 1998).

Nos últimos 50 anos, a pesquisa de novos fármacos anticâncer introduziu na terapêutica cerca de 70 medicamentos e, quando se analisa a forma como esses compostos foram obtidos, é possível indicar novos rumos para o desenvolvimento de métodos de triagem de substâncias anticâncer. Entre 1955 e 1975, a triagem de novos compostos antineoplásicos foi realizada somente através de modelos experimentais de leucemias murinas (L1210 e P388) (BOYD, 1989; CRAGG e NEWMAN, 1999).

A análise dos resultados obtidos, pelos métodos de triagem utilizados até 1985, revela que as maiorias dos medicamentos desenvolvidos são úteis em tumores de crescimento rápido, como as leucemias e linfomas (MANN, 2002). Realmente, o sucesso da quimioterapia é maior quando os tumores pertencem ao sistema hematopoiético, enquanto que para os tumores sólidos as alternativas são escassas. Essa alta seletividade para leucemias e linfomas sugere que os métodos, até então utilizados, foram tendenciosos, orientando a descoberta de novos agentes para essas doenças, porém insuficiência de drogas para o tratamento de tumores sólidos. Além de uma seleção tendenciosa, a triagem de drogas antineoplásicas em modelos utilizando tumores murinos, revelou que a transposição para o homem dos resultados obtidos em animais falhou mais do que se poderia esperar. Dessa forma, ficou evidente a necessidade de modelos para a triagem de fármacos orientados para os tumores sólidos e com metodologia utilizando células originárias de câncer humano (BOYD, 1989; CRAGG e NEWMAN, 1999).

Com o aprimoramento da metodologia de cultura de células, foi possível o desenvolvimento de diversas linhagens celulares oriundas de tumores humanos, que possibilitaram o desenvolvimento da metodologia para triagem *in vitro*. Com esse objetivo, o Instituto Nacional do Câncer dos Estados Unidos da América desenvolveu

um painel de células cancerígenas que, atualmente, conta com 60 linhagens oriundas de oito tipos de tumores sólidos (pulmão, melanoma, mama, rim, cólon, próstata, ovário, cérebro) e do sistema hematopoiético (leucemia). Dessa maneira, essa metodologia permite a avaliação em diversos tipos de células neoplásicas, possibilitando a descoberta de drogas com maior especificidade para os diferentes tipos de tumores. Outra vantagem dessa triagem é a rapidez e eficiência do método, que em apenas 4 dias pode avaliar um número elevado de fármacos (RUBINSTEIN et al., 1990; MONKS et al., 1991). Por esta razão, atualmente os métodos de triagem *in vitro*, utilizando-se cultura de células tumorais humanas, são os mais utilizados para a descoberta e desenvolvimento de novas drogas (QUEIROZ et al., 1999; ITHARAT et al., 2004).

Atualmente, o tratamento do câncer tem baixa eficácia em virtude do mecanismo de ação que os medicamentos supressores possuem, inibindo o crescimento ou matando as células malignas. A maior parte desses quimioterápicos são genotóxicos, produzindo dano ao ácido desoxirribonucléico (DNA) e mutações, que podem induzir à formação de outras células neoplásicas. Os princípios ativos mais procurados são aqueles que induzem a apoptose, levando apenas células malignas à morte (SUBHASHINI et al., 2005).

Como já salientado, as descobertas de novos fármacos antineoplásicos de origem vegetal têm incentivado as pesquisas nessa área. Um dos exemplos mais importantes é o da *Catharanthus roseus*, conhecida também como *Vinca rosea*, utilizada pela população de Madagascar no tratamento do diabetes. Durante os testes de atividade hipoglicemiante, os extratos dessa espécie produziram granulocitopenia em consequência da supressão da medula óssea dos animais, sugerindo avaliação em modelos de leucemias e linfomas.

A confirmação da atividade nesses modelos levou ao isolamento dos alcalóides vimbastina e vincristina que, atualmente, são de grande utilidade no tratamento de leucemias, linfomas e câncer testicular (FELLOWS, 1995; CRAGG e NEWMAN, 1999; MANN, 2002).

Outra descoberta importante na área de câncer foi o paclitaxel (Taxol[®]), isolado da casca do teixo (*Taxus baccata* e *Taxus brevifolia*), em 1971 (WANI et al., 1971). Rowinsky et al. (1995) revelaram que essa substância era capaz de regredir o câncer de mama e de ovário, resistentes à terapia tradicional.

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

Avaliar o potencial fitoquímico e farmacológico das sementes de *Pterodon emarginatus* Vogel, através de ensaios *in vitro* e *in vivo*.

2.2 Específicos

1 – Realizar análise fitoquímica das principais classes do metabolismo secundário nas sementes de *Pterodon emarginatus*.

2 – Determinar os constituintes químicos presentes no OE das sementes de *P. emarginatus*, através de cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (CG/EM).

3 – Realizar o doseamento dos constituintes fenólicos totais e flavonóides nas sementes de *P. emarginatus*.

4 – Realizar a identificação citogenética da espécie *P. emarginatus*.

5 – Realizar a atividade antioxidante (atividade seqüestrante) do OE e frações obtidos das sementes de *P. emarginatus*.

6 – Determinar a toxicidade do OE e frações obtidos das sementes de *P. emarginatus*, através do bioensaio em *Artemia salina*.

7 – Avaliar o potencial antimicrobiano do OE das sementes de *P. emarginatus*.

8 – Avaliar a atividade leishmanicida do OE e frações obtidos das sementes de *P. emarginatus*.

9 – Avaliar a atividade antinociceptiva do OE e frações obtidos das sementes de *P. emarginatus*.

10 – Avaliar o potencial cicatrizante de cremes incorporados com OE e FH obtidos das sementes de *P. emarginatus*.

11 – Avaliar a atividade gastroprotetora do OE das sementes de *P. emarginatus*.

12 – Avaliar o potencial antiinflamatório do OE das sementes de *P. emarginatus*.

13 – Avaliar a atividade antitumoral do OE das sementes de *P. emarginatus*.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Coleta do material vegetal

As sementes da espécie *Pterodon emarginatus* Vogel foram coletadas no cerrado em setembro de 2006, no município de Três Marias/MG, com respectiva caracterização botânica realizada pela Dr^a. Fátima Regina Gonçalves Salimena e tombada na coleção do Herbário CESJ (n° 48077) do Departamento de Botânica da Universidade Federal de Juiz (UFJF), Juiz de Fora - Minas Gerais, Brasil.

3.2 Extração do óleo essencial

O óleo essencial (OE) foi extraído em aparelho de *Clevenger* pelo método de arraste de vapor (hidrodestilação, 100 °C) durante quatro horas. Foram pesados cerca de 30 g de sementes, as quais foram trituradas com auxílio de tesoura de poda e adicionadas ao balão de fundo redondo contendo 300 mL de água destilada, conforme descrito por Matos (1997). Após a extração, o óleo foi alíquotado em frasco âmbar e mantido sob refrigeração (*freezer* -20°C) e ao abrigo da luz, para posterior realização das análises. Em seguida, o OE foi submetido à análise por cromatografia em fase gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG/EM), na Central Analítica do Laboratório de Pesquisas em Produtos Naturais/Farmanguinhos/FIOCRUZ/RJ.

3.3 Preparo das frações

Todos os solventes empregados no preparo das frações foram p.a. (Dinâmica – Brasil).

O preparo das frações foi realizado de acordo com Costa (2000). Após a coleta, as sementes foram submetidas à extração com hexano, acetato de etila,

butanol e metanol, utilizando aparelho de *Soxhlet*. Cerca de 30 g de sementes de *Pterodon emarginatus* foram acondicionadas ao cartucho e acopladas ao extrator do aparelho. O balão foi adaptado e pelo extrator foi adicionado inicialmente hexano, em quantidade suficiente para atingir a primeira sinfonagem. Em seguida, foi adicionado um novo volume de hexano até nova sinfonagem, garantindo assim um excesso de solvente. Foi ligado a este conjunto o respectivo condensador, que foi arrefrido por água corrente. Foi utilizada manta de aquecimento (MA 553, Marconi – Brasil), o qual proporcionou o aquecimento e as sinfonagens até o esgotamento completo da extração (24 horas).

Ao final, o sistema foi desligado e o balão trocado, foi adicionado o novo solvente, neste caso, acetato de etila realizando os mesmos procedimentos supra citados. Foram, ainda, empregados butanol e metanol, no qual resultaram frações de diferentes polaridades. Para a eliminação dos solventes, as frações foram submetidas à rotaevaporação (R-114, Buchi – Suíça). Portanto, foram obtidas quatro frações de diferentes polaridades: fração hexânica (FH), acetato de etila (FA), butanólica (FB) e metanólica (FM).

3.4 Preparo dos extratos

Para o doseamento dos constituintes fenólicos totais e flavônicos nas sementes de *Pterodon emarginatus* foram utilizadas as frações obtidas anteriormente e extratos obtidos por quatro diferentes métodos de extração (5 mg/mL): sob refluxo a 80°C durante 30 minutos, ultra-som durante 30 minutos, maceração estática durante 48 horas e chapa de aquecimento a 100°C durante 45 minutos. Os extratos foram preparados utilizando etanol/água nas seguintes proporções (30:70, v/v), (50:50, v/v), (70:30, v/v) e água destilada como solventes.

3.5 Triagem fitoquímica

Algumas classes de produtos do metabolismo secundário foram pesquisadas nas frações obtidas anteriormente e nas sementes trituradas de *Pterodon emarginatus* Vogel, através de reações de grupos funcionais da molécula, segundo Matos (1997): flavonóides, leucoantocianidinas, taninos, cumarinas, heterosídeos, saponinas, alcalóides e antraquinonas. Além disso, realizou-se a extração do óleo essencial (item 4.2) e o mesmo foi submetido à análise por cromatografia gasosa acoplada à espectrofotometria de massas (CG/EM). Embora não faça parte da análise fitoquímica, foram realizadas as determinações do teor de cinzas totais e umidade, para fim de controle de qualidade.

3.5.1 Flavonóides

Foram pesados cerca de 1 g das FH, FA, FB, FM e de sementes trituradas que foram transferidas para béqueres, e acrescentados 15 mL de solução de etanol 70%. Estes materiais foram aquecidos em chapa de aquecimento (60°C) (CERAMAC Midi, IKA – Estados Unidos da América) por 30 minutos. Posteriormente, foram filtrados em papel de filtro e os filtrados submetidos às reações para detecção de flavonóides:

- Reação com cloreto de alumínio 5% (AlCl_3): diferentes áreas de um papel de filtro foram umedecidas, com aproximadamente 5 gotas dos extratos obtidos anteriormente e foi acrescentado uma gota de solução etanólica de AlCl_3 a 5%. Fluorescência sob a luz ultravioleta ($\lambda = 365 \text{ nm}$) indica a presença de flavonóides.

- Reação com ácido bórico (H_3BO_3): a 5 mL dos extratos obtidos 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 (60°C) (CERAMAC Midi, IKA – Estados Unidos da América). Em seguida, após esfriamento na superfície de trabalho, foram adicionados 10 mL de éter etílico p.a. e observou sob a L.U.V. ($\lambda = 365 \text{ nm}$). O aparecimento de fluorescência amarela-esverdeada indica a presença de flavonóides.
- Reação com hidróxido de sódio (NaOH) 1N: a 5 mL dos extratos obtidos 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 dos extratos obtidos 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.

3.5.2 Leucoantocianidinas

Foram adicionadas a 2 mL dos extratos alcoólicos, obtidos anteriormente, três gotas de ácido sulfúrico (H_2SO_4) concentrado (VETEC – Brasil). Coloração fortemente avermelhada indica a presença de leucoantocianidinas.

3.5.3 Taninos

Foram pesados cerca de 1 g das FH, FA, FB, FM e de sementes trituradas transferidas para béqueres e adicionados 50 mL de solução de etanol 70%, levando à fervura em chapa de aquecimento (CERAMAC Midi, IKA – Estados Unidos da América) por 5 minutos. Os extratos foram filtrados em papel de filtro e os filtrados submetidos às reações para detecção de taninos:

- Reações de sais de ferro: aos extratos aquosos (2 mL) foram adicionados 5 mL de água destilada e algumas gotas de solução aquosa de cloreto férrico a 2%. Para reação positiva, foram observadas a formação e a coloração dos precipitados. 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 os extratos (2 mL) obtidos 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 os extratos (2 mL) obtidos 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.

3.5.4 Cumarinas

Foram pesados cerca de 1 g das FH, FA, FB, FM e de sementes trituradas transferidas para béqueres e adicionado 1 mL de solução de ácido clorídrico 10% e 10 mL de solução de etanol 70%, aquecido durante 2 x 10 minutos em chapa de aquecimento (60°C) (CERAMAC Midi, IKA – Estados Unidos da América). Após filtração em papel de filtro, os volumes foram reduzidos, na chapa de aquecimento (60°C), a 5 mL e extraídos com 10 mL de acetato de etila p.a., em funil de separação. Os extratos em acetato de etila foram concentrados, em chapa de aquecimento, a 5 mL e transferidos 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 L.U.V. ($\lambda = 365 \text{ nm}$) indica a presença de cumarinas.

3.5.5 Heterosídeos cardiotônicos

Foram pesados cerca de 2 g das FH, FA, FB, FM e de sementes trituradas que foram transferidas para béqueres e adicionados 20 mL de solução de etanol 50%, o qual levou a fervura por 30 minutos, em chapa de aquecimento (60°C) (CERAMAC Midi, IKA – Estados Unidos da América). Em seguida, os extratos foram mantidos em repouso na superfície de trabalho e estes foram filtrados em papel de filtro. Este procedimento foi repetido por mais 2 vezes, com 10 mL de etanol 50% por vez. Ao final, os extratos obtidos foram filtrados com papel de filtro e reunidos nos béqueres. Em seguida, foram adicionados 10 mL de solução saturada de acetato básico de chumbo ($\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2$). Os sobrenadantes, proveniente pela adição da solução saturada de acetato básico de chumbo, foram filtrados em papel de filtro e transferidos para funil de separação. Foram adicionados 10 mL de água destilada e extraídos a solução hidroalcoólica com duas porções de 15 mL de clorofórmio p.a. Os extratos clorofórmicos foram reunidos e concentrados, em chapa de aquecimento (60°C) (CERAMAC 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, em chapa de aquecimento (60°C), 3 mL dos extratos clorofórmicos obtidos anteriormente, no qual adicionou 4 gotas de solução etanólica 1% de ácido 3,5-dinitrobenzóico e 2 gotas de solução de hidróxido de potássio 1N. Coloração vermelha violácea intensa indica a presença de heterosídeos principalmente, lactonas α , β -insaturadas.
- Reação de *Lieberman-Buchard*: para esta reação foram utilizados 5 mL dos extratos clorofórmicos obtidos anteriormente, levando estes até resíduo, em chapa de aquecimento (60°C). Foram adicionados 0,5 mL de anidro acético aos resíduos e transferidos vagarosamente para tubos de ensaio que continham 1 mL de ácido sulfúrico concentrado. O aparecimento de coloração castanho-avermelhada na interface indica a presença de constituintes triterpênicos, principalmente, os que possuem núcleo esteroidal.

3.5.6 Saponinas

Foram pesados cerca de 2 g das FH, FA, FB, FM e de sementes trituradas transferidas para béqueres e adicionados 80 mL de água destilada. Esses extratos foram neutralizados com 10 mL de solução de carbonato de sódio 20%, e aquecidos até fervura em chapa de aquecimento (60°C) (CERAMAC Midi, IKA – Estados Unidos da América). Estes foram resfriados na superfície de trabalho, filtrados em papel de filtro e transferidos para balões 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 10 mL do extrato. Cada tubo foi vedado com parafilme e agitado manualmente durante 15 segundos. A bateria de tubos permaneceu em repouso por 15 minutos. Espuma persistente por 15 minutos indica a presença de saponinas. Para cada fração foi realizada uma bateria de tubos diferentes.

3.5.7 Alcalóides

Foram pesados cerca de 2 g das FH, FA, FB, FM e de sementes trituradas transferidas para béqueres e adicionados 20 mL de solução de ácido clorídrico 1%, aquecidos por 10 minutos em chapa de aquecimento (60°C) (CERAMAC Midi, IKA – Estados Unidos da América). Após esfriamento na superfície de trabalho, as soluções foram filtradas em papel de filtro para funil de separação e alcalinizadas com 10 mL de solução de hidróxido de amônia 10%. Os filtrados alcalinos foram extraídos com 2 porções de 10 mL de clorofórmio p.a. e filtrados com papel de filtro para o béquer. O clorofórmio foi evaporado em banho-maria a temperatura de 37°C e os resíduos ressuspensos em 5 mL de solução de ácido clorídrico 1%. Em tubos de ensaio foi adicionado 1 mL dos resíduos ressuspensos e adicionados o reagente de *Dragendorff*. O aparecimento de precipitado marrom indica a presença de alcalóides.

3.5.8 Antraquinonas

- Reação de *Borntraeger*: cerca de 0,2 g das FH, FA, FB, FM e de sementes trituradas foram transferidas para béqueres. Foram adicionados 10 mL de solução de ácido sulfúrico 2N, e mantidas em ebulição na chapa de aquecimento por 10 minutos. Estes foram resfriados na superfície de trabalho e filtrados com papel de filtro para funil de separação, onde foram adicionados 10 mL de acetato de etila p.a.. Após agitação, as fases em acetato de etila (superior) foram recolhidas e foram adicionados 2 mL de solução de hidróxido de sódio 2N com posterior agitação em vórtex (G560, Scientific Industries – Estados Unidos da América). A presença de coloração vermelha na camada aquosa (superior) indica a presença de antraquinonas.

3.6 Cinzas totais e teor de umidade

Foram pesados cerca de 3 g da semente triturada em balança analítica modelo HR-200 (AND, Japão) e este conteúdo foi transferido para cadinho (de porcelana) previamente pesado após ser calcinado em 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 (2,5°C/mim). Em seguida, foi calculada a porcentagem de cinzas conforme descrito abaixo:

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

Para avaliar o teor de umidade, as sementes foram reduzidas a pequenos fragmentos com auxílio de tesoura de poda, pesados cerca de 1 a 2 g, os quais foram transferidos para um cadinho de porcelana. A umidade foi determinada em um

sistema de infravermelho (SI4040 BG200, GEHAKA – Brasil). Foi calculado o teor de umidade pela diferença entre os pesos iniciais e finais dos cadinhos.

$$\% \text{ teor de umidade} = \frac{\text{peso inicial do cadinho} - \text{peso final do cadinho}}{\text{peso inicial do cadinho}} \times 100$$

3.7 Análise cromatográfica do óleo essencial

O OE foi submetido à análise cromatográfica em fase gasosa (6890N, HP – Estados Unidos da América) acoplada à espectrometria de massas (5973N, HP – Estados Unidos da América). Para determinação das substâncias com os sinais correspondentes nos cromatogramas foi utilizado o banco de dados (Willey 275.1). Literatura especializada (ADAMS, 1995) foi utilizada para comparação dos Índices de Kovats (IK) citados, com os índices calculados a partir da utilização de uma amostra-padrão constituída de uma mistura de hidrocarbonetos (C8-C24; C28; C32; C36; C40). Foi utilizada uma coluna capilar do tipo DB-5MS (Shimadzu – Japão) com 0,25 μm de espessura do filme, 30 m de comprimento e 250 μm de diâmetro interno. O gás de arraste foi o hélio (1 mL/min) e as separações foram realizadas com injetor (250°C), detector (280°C), com a seguinte rampa de temperatura: 70°C aumentando 20°C/minuto até atingir a temperatura de 300°C. O impacto de elétrons para a ionização foi de 70 eV (5973N, HP – Estados Unidos da América), com detector seletivo de massas. Os IK, para cada componente do óleo, foram calculados com base numa curva-padrão de uma série homóloga de n-alcenos (C7 – C22). A identificação dos constituintes foi baseada na comparação dos IK e espectros de massas de cada substância com dados da literatura. A fórmula usada para calcular o IK ou índice de retenção foi a seguinte:

$$IK = 100 \times NCHmn + 100 \times \frac{TRO - TRHmn}{TRHmr - TRHmn}$$

Onde,

IK = Índice de Kovats ou Índice de retenção de Kovats;

NCHmn = N^o de carbono na molécula do hidrocarboneto imediatamente menor;

TRO = Tempo de retenção do componente do óleo essencial;

TRHmn = Tempo de retenção do hidrocarboneto imediatamente menor e

TRHmr = Tempo de retenção do hidrocarboneto imediatamente maior.

3.8 Análise citogenética

A análise citogenética foi realizada a partir das raízes provenientes da germinação das sementes de *Pterodon emarginatus* Vogel, de acordo com Coelho et al. (2001). As raízes com aproximadamente 1 cm, foram submetidas a tratamentos de bloqueio celular, os quais consistiram na submersão das mesmas em solução de 8-hidroxiquinoleína (HQ) 2 mM, durante o intervalo de tempo de 2, 4, 6 e 8 horas, mantidas em temperatura ambiente. Após o tratamento, as raízes foram lavadas com água destilada durante 15 minutos e fixadas em ácido acético p.a.: metanol p.a. (1:4, v/v) por no mínimo 24 horas à temperatura ambiente, em seguida armazenada 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 para microtubos contendo 1,5 mL de solução enzimática Pectinex Ultra SP-L e mantidas por 3 horas em banho-maria a temperatura de 34°C. Após a digestão, foi novamente lavada com água destilada, fixadas com ácido acético:metanol, 1:4, v/v, e armazenadas a temperatura de -20°C, até o momento do preparo da lâmina para a visualização de metáfase mitótica, em microscópio óptico. Para a confecção das lâminas, as raízes foram hidrolisadas utilizando solução de ácido clorídrico 5 N por 11 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 ácido acético:metanol, 1:4, v/v, 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 secas em chapa de aquecimento a temperatura de 50°C. Em seguida, foram coradas com solução de *Giemsa* 5% por 4 minutos, lavadas com água destilada e seca em chapa de aquecimento a temperatura de 50°C. As lâminas foram analisadas sob microscópio óptico e, as células que apresentaram cromossomos bem espelhados e com nível de condensação desejável, foram capturadas por uma câmara de vídeo acoplado ao microscópio (BX51, Olympus - Japão) digitalizados e analisados por meio do *software* Image-Proplus (Media Cybernetics), o qual possui ferramentas para a determinação do tamanho dos cromossomos.

3.9 Doseamento dos constituintes fenólicos totais

O doseamento dos constituintes fenólicos totais foi realizado segundo 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). Extratos ou frações (descritos acima) foram dissolvidos em metanol na concentração de 0,5 mg/mL. O reagente de *Folin-Dennis* (100 µL) foi adicionado ao tubo teste que continha 10 µL de extratos ou frações na concentração desejada. Em seguida os tubos foram agitados manualmente e adicionado 200 µL de uma solução saturada de carbonato de sódio e 1,69 mL de água deionizada, ajustando o volume final para 2 mL, em cada tubo de ensaio. Foi preparado o branco o qual continha todos os reagentes, excetos os extratos vegetais. O ácido tânico foi utilizado como padrão para a construção da curva de calibração (concentração: 2-10 µg/mL). O ensaio foi realizado em triplicata. A absorvância foi determinada em 760 nm, com auxílio do espectrofotômetro (UV mini 1240, Shimadzu - Japão).

3.10 Determinação dos teores de flavonóides

O procedimento utilizado para o doseamento de flavonóides é baseado na reação dos flavonóides com o cloreto de alumínio o que produz um complexo de coloração amarela que pode ser analisado por espectrofotômetro em 420 nm (VENNAT et al., 1992). A rotina foi utilizada como padrão para a construção da curva de calibração (concentração: 2-30 µg/mL). Para o doseamento dos constituintes flavônicos foram utilizadas as FH, FA, FB, FM e extratos etanólicos descritos anteriormente. Utilizando tubos cônicos de centrífuga foram adicionados, na ordem indicada, 10 mL das amostras obtidas anteriormente, 4 mL de clorofórmio p.a. e 6 mL de água destilada. Após homogeneização, esta solução foi centrifugada por 3 minutos a 2430 g. Em seguida, uma alíquota de 2 mL da camada hidrometanólica foi retirada com auxílio de uma pipeta de *Pasteur* e transferida para um balão volumétrico de 25 mL. Foi adicionada 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 cloreto de alumínio hexahidratado 8%, em metanol. O volume do balão foi completado com água e após um intervalo de 15 minutos foi realizada a leitura da absorvância em 420 nm, com auxílio de espectrofotômetro (UV mini 1240, Shimadzu - Japão).

3.11 Atividade antioxidante (atividade seqüestrante)

A atividade seqüestrante de radicais 2,2-difenil-1,2-picrilhidrazil (DPPH) (Sigma – Estados Unidos da América) foi determinada de acordo com o método de Sreejavan e Rao (1997), com pequenas modificações. Ao tudo de ensaio foi adicionado 1,5 mL da solução etanólica de DPPH 0,05 mM e 500 µL de uma solução etanólica do OE e frações obtidos das sementes de *Pterodon emarginatus* Vogel, nas concentrações de 250; 125; 62,50; 31,25; 15,62; 7,81; 3,90; 1,95; 0,97 µg/mL. Os ensaios foram realizados em triplicata. Essa reação transcorreu em temperatura ambiente, por 30 minutos no escuro, e em seguida a absorvância foi determinada por espectrofotômetro (UV mini 1240, Shimadzu - Japão) em 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 BHT foram usados como padrão nas mesmas concentrações (250 – 0,97 µg/mL). A inibição do radical DPPH foi calculada usando a seguinte equação:

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

onde:

A_0 = absorvância do controle negativo

A_s = absorvância da amostra teste

O valor de IC_{50} representa a concentração do OE e frações obtidas das sementes de *Pterodon emarginatus* que causou 50% de inibição do radical DPPH.

3.12 Toxicidade aguda

O ensaio de toxicidade aguda em *Artemia salina* foi realizado conforme Meyer et al. (1982). Foram transferidas 10 larvas de *Artemia salina* para tubos de ensaio, em quadruplicata, contendo diferentes concentrações (1 – 1000 µg/mL) do OE e frações obtidos das sementes de *Pterodon emarginatus*. Os tubos foram mantidos sob iluminação direta e as larvas sobreviventes foram contadas após 24 horas de exposição às amostras-teste. O timol foi utilizado como referência, nas concentrações de 1 – 1000 µg/mL. A CL_{50} 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).

3.13 Atividade antimicrobiana

A atividade antimicrobiana foi realizada utilizando cinco microorganismos-padrão: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (Gram-positivo), *Streptococcus mutans* ATCC 25175 (Gram-positivo), *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 90271 (Gram-

negativo), *Escherichia coli* ATCC10530 (Gram-negativo) e *Candida albicans* ATCC 10231 (Fungo), do *American Type of Culture Collection* (ATCC). Para a realização desta atividade, dois métodos foram utilizados: o método de difusão em ágar (MISLIVEC et al., 1992; SWANSON et al., 1992) e a determinação da concentração inibitória mínima (CIM) (CANDAN et al., 2003).

3.13.1 Difusão em ágar

O ensaio da atividade antimicrobiana foi realizado através do método de difusão em ágar estabelecido por Mislivec et al. (1992) e Swanson et al. (1992). Os microorganismos foram cultivados em meio inclinado anti-1 (*S. aureus*, *S. mutans* e *E. coli*), *Tryptone Soy Agar* (TSA) (*P. aeruginosa*) e *Sabouraud Dextrose Agar* (SDA) (*C. albicans*) por um período mínimo de 24 horas a temperatura de 35°C em estufa bacteriológica (502C – ORION, FANEM - Brasil). Após este período, uma suspensão microbiana foi preparada e padronizada utilizando solução fisiológica estéril (NaCl 9,0 g/L) contendo $10^3 - 10^4$ UFC/mL. Para a padronização desta suspensão, foi utilizado espectrofotômetro (UV mini 1240, Shimadzu - Japão) ($\lambda=580$ nm). A suspensão foi diluída com solução fisiológica estéril até a obtenção de 25% de transmitância. As placas de *Petri* (dimensões: 15 mm de altura e 90 mm de diâmetro) foram preparadas com 22 mL de meio de cultura (TSA), resultando desta forma meio de cultura, com 3 mm de profundidade. Cilindros de aço inoxidáveis estéreis (dimensões: 10 mm de altura e 6 mm de diâmetro) contendo 50, 25 e 10 mg do OE das sementes de *Pterodon emarginatus* foram inseridos no meio de cultura. Todas as placas foram incubadas em ambiente aeróbico a temperatura de 35°C por 24 horas (bactérias) e a temperatura de 22°C por 48 horas (fungo) em estufa bacteriológica (502C – ORION, FANEM - Brasil). A inibição do crescimento foi medida, com auxílio de paquímetro, pela formação de halos, expressos em milímetros (mm). O ensaio foi realizado em triplicata e os resultados expressos como média \pm desvio padrão. Penicilina (1 UI/mL) e nistatina (20 UI/mL) foram utilizados como fármacos de referência.

3.13.2 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM)

Para a determinação da CIM, uma suspensão bacteriana (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923) foi preparada com solução fisiológica estéril (NaCl 9,0 g/L) até a obtenção de 25% de transmitância com auxílio do espectrofotômetro (Shimadzu UV mini 1240 – Japão) ($\lambda=580\text{nm}$). A suspensão microbiana padronizada foi submetida à diluição seriada com solução fisiológica estéril e a contagem das unidades formadoras de colônias (UFC) foi realizada utilizando o ágar padrão para contagem (PCA) após um período de 24 horas. Foram preparadas 5 diluições sucessivas do OE (10 – 0,625 mg/mL). Para o preparo do controle positivo foram adicionados a um tubo de ensaio, 4 mL de caldo caseína inoculado com a suspensão de *S. aureus* ($10^3 - 10^4$ UFC/mL) preparada anteriormente e 1 mL de solução fisiológica estéril. Para o controle negativo, foram adicionados a um tubo de ensaio, 4 mL de caldo caseína estéril e 1 mL de solução fisiológica estéril. O procedimento foi realizado em triplicata. No preparo dos tubos-teste foram acrescentados, 4 mL de caldo caseína inoculado e 1 mL de cada concentração da amostra-teste utilizada. Os tubos foram incubados em estufa bacteriológica (502C – ORION, FANEM - Brasil) durante 24 horas. A concentração inibitória mínima foi determinada através da observação de turvação dos meios de cultura, após o período de 24 horas (CANDAN et al., 2003).

3.14 Atividade leishmanicida

A atividade leishmanicida foi realizada de acordo com Braga et al. (2007). 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 Dickinson, 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 a temperatura de

24°C. O *screening* foi realizado em placas de 96 poços, mantidas a temperatura de 24°C em estufa (ES P.F.G, 2476 – FANEM – Brasil). 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 *Neubauer*. Foram adicionados a cada poço da placa 100 µL da suspensão padronizada de parasitos e estas foram incubadas a temperatura de 24°C por uma hora. Após este período, as amostras de OE e frações obtidos das sementes de *Pterodon emarginatus*, foram dissolvidas com solução de dimetilsulfóxido (DMSO, VETEC – Brasil) 0,08% e adicionadas a cada poço da placa. Cada concentração (100 – 6,25 µg/mL) foi testada em triplicata. A viabilidade celular de ambas as formas promastigotas foram determinadas, após 24 horas, 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 concentração inibitória (IC₅₀) de cada amostra-teste.

3.15 Animais

3.15.1 Camundongos

Foram utilizados camundongos (*Mus musculus*) *Swiss* (com peso de 25-30 g) machos, provenientes do Centro de Biologia da Reprodução da Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF). Os animais foram mantidos em gaiolas apropriadas para o modelo animal com ração e água *ad libitum* em sala com temperatura e umidade monitoradas com auxílio de termohigrômetro. Doze horas antes da realização das experiências, os animais foram privados de ração. Todos os procedimentos estavam de acordo com os princípios éticos na experimentação animal, adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e pela Comissão de Ética na Experimentação Animal (CEEA) da Pró-Reitoria de Pesquisa/UFJF, sob os números 059-064/2006 e 064-066/2007.

3.15.2 Coelhos

Foram utilizados coelhos (*Oryctolagus cuniculus*) albinos da Nova Zelândia (com peso de 1,5 a 2,0 kg) machos, provenientes da Fundação de Estudos e Pesquisa de Medicina Veterinária e Zootecnia, Fazenda Experimental Prof. H. Barbosa – Igarapé/MG. Os animais foram mantidos em gaiolas apropriadas para o modelo animal com ração e água *ad libitum* em sala com temperatura e umidade monitoradas com auxílio de termohigrômetro. Todos os procedimentos estavam de acordo com os princípios éticos na experimentação animal, adotado pelo COBEA e pela Comissão de Ética na Experimentação Animal (CEEA) da Pró-Reitoria de Pesquisa/UFJF, sob o número 52/2006.

3.16 Atividade antinociceptiva

3.16.1 Contorções abdominais induzidas por ácido acético

O teste da atividade antinociceptiva pelo método de avaliação das contorções abdominais em camundongos (*Mus musculus*) *Swiss* foi realizado de acordo com Koster et al. (1959). Os animais, com peso entre 25-30 g, foram divididos em cinco grupos (n = 8/grupo). O OE e as frações obtidos das sementes de *Pterodon emarginatus* foram solubilizados com 300 µL de solução de DMSO: *Tween* 80 (1:2, v/v) (VETEC – Brasil) em salina *q.s.p.* 5 mL, e administrados por via oral (gavagem). As doses das substâncias testes administradas foram de 100, 300 e 500 mg/kg. Uma hora após o tratamento dos animais com as soluções-teste, a solução de ácido acético 0,6% (10 mL/kg) foi administrada intraperitonealmente em cada camundongo e o número de contorções abdominais foi contado entre 10 e 30 minutos (20 minutos de avaliação), após aplicação da solução de ácido acético. No grupo controle, foram administrados 0,3 mL/30 g da solução de DMSO: *Tween* 80 (1:2, v/v) (VETEC – Brasil) em salina *q.s.p.* 5 mL, por via oral (gavagem). A

indometacina foi utilizada como fármaco de referência, na dose de 5 mg/kg e também administrada por via oral (gavagem).

3.16.2 Teste da placa quente (*Hot plate*)

O teste da atividade antinociceptiva pelo método da placa quente (*Hot Plate*) foi realizado em camundongos (*Mus musculus*) *Swiss* de acordo com Franzotti et al., (2000), seguido de algumas modificações. Animais com peso entre 20-30 g foram divididos em cinco grupos (n = 10/grupo). O OE e as frações obtidos das sementes de *Pterodon emarginatus* foram solubilizados com 300 µL de solução de DMSO: *Tween* 80 (1:2, v/v) (VETEC – Brasil) em salina *q.s.p.* 5 mL. Neste teste foi avaliado o tempo que cada animal resistia quando colocado sobre uma placa aquecida a temperatura de $55 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$. Foi considerado como resposta, o ato dos animais lambere as patas anterior-posteriores ou saltarem sobre a placa, registrados por meio de cronômetro. Inicialmente, foi determinado o tempo de latência (que equivale ao tempo decorrido desde que o animal foi colocado sobre a placa quente até o aparecimento da resposta), e se em 15 segundos o animal não saltasse ou lambesse as patas, o mesmo foi retirado da placa para evitar danos teciduais que poderiam afetar as leituras subseqüentes. A resposta foi avaliada 30, 60, 90 e 120 minutos após a administração do OE e frações, sendo que cada animal permaneceu na placa por no máximo 30 segundos. A administração das amostras-teste (via oral – gavagem) nas doses de 100, 300 e 500 mg/kg foram realizadas imediatamente após a medida da latência, expressos em minutos. No grupo controle foram administrados 0,3 mL/30 g da solução de DMSO: *Tween* 80 (1:2, v/v) (VETEC - Brasil) em salina *q.s.p.* 5 mL, por via oral (gavagem). A morfina foi utilizada como fármaco de referência na dose de 5 mg/Kg administrada por via subcutânea.

3.16.3 Tempo da lambida da pata induzido por injeção intraplantar de formalina

O teste da atividade antinociceptiva pelo método do tempo da lambida da pata induzido por injeção intraplantar de formalina 2,5% foi realizado em camundongos (*Mus musculus*) Swiss de acordo Hudanskaar e Hole (1987). Animais com pesos entre 25-30 g foram divididos em cinco grupos (n = 10/grupo). Foram injetados 20 µL de uma solução de formalina 2,5% (em salina estéril) no espaço subplantar da pata direita dos animais e a duração do tempo da lambida foi determinada de 0 a 5 minutos (1ª fase - neurogênica) e 15 a 30 minutos (2ª fase - inflamatória), após aplicação da solução de formalina 2,5 %. O OE e as frações obtidos das sementes de *Pterodon emarginatus* foram solubilizados com 300 µL de solução de DMSO: Tween 80 (1:2, v/v) (VETEC - Brasil) em salina *q.s.p.* 5 mL, e administrados nas doses de 100, 300 e 500 mg/kg, por via oral, 1 hora antes da injeção da solução de formalina 2,5%. No grupo controle foram administrados 0,3 mL/30 g da solução de DMSO: Tween 80 (1:2, v/v) em salina *q.s.p.* 5 mL, por via oral (gavagem). Morfina (10 mg/kg, via subcutânea) foi usada como fármaco de referência.

3.17 Avaliação da atividade cicatrizante

Para avaliar o efeito cicatrizante de *Pterodon emarginatus* foram formulados cremes contendo diferentes concentrações do OE e FH, já que ambos foram os que apresentaram os maiores rendimentos durante o processo de extração. Após testes com bases de diferentes polaridades: creme *pollawax*, gel carbopol e creme *lanette*, foi selecionado para uso o creme base *lanette*, visto que este possibilitou a incorporação de forma ideal, tanto do OE quanto da FH. Desta maneira, o OE e a FH foram pesados e incorporados em creme *Lanette*, nas concentrações: OE (5 e 10%) e FH (10 e 20%). Foram preparados 50 g de cremes para cada concentração utilizada. O creme contendo OE apresentou coloração branca, com odor agradável característico. Já o creme contendo FH apresentou coloração amarelada com odor

característico e com aspecto aerado. Todas as concentrações apresentaram viscosidade satisfatória.

Para este ensaio foram utilizados coelhos albinos da Nova Zelândia, machos, pesando entre 1,5 a 2,0 kg, separados em dois grupos (n = 5/grupo), mantidos por 10 dias. 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 - Brasil). Os animais foram devidamente numerados (1 -10) e tiveram o dorso dividido em 4 quadrantes, através de tricotomia, sendo que cada quadrante recebeu um tipo diferente de creme. Numerados de 1 a 10, nos coelhos de 1 a 5 foi testado o creme contendo OE 5% e 10%, enquanto nos coelhos 6 a 10, foram testados os cremes contendo FH 10% e 20%. O creme de sulfadiazina de prata 1% e o creme lanette foram utilizados como controle positivo e negativo, respectivamente. Os cremes foram aplicados de acordo com o esquema representado na Figura 16.

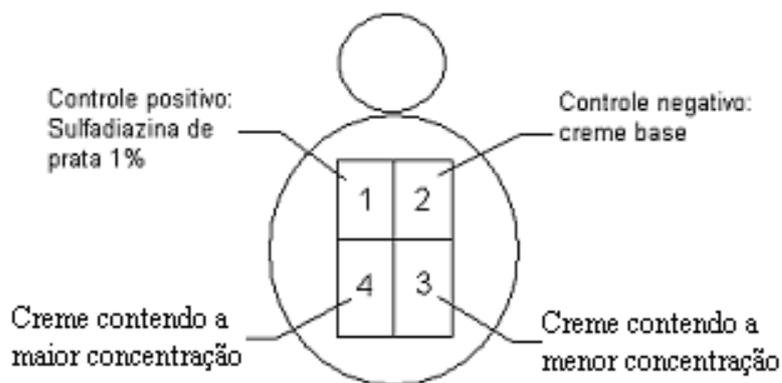


Figura 16 – Representação dos quadrantes e aplicação dos cremes no modelo utilizado.

Após a remoção dos pêlos do dorso dos animais, foram feitas queimaduras com barra de ferro de 5 cm² aquecidas em banho de água fervente, por um período de 10 segundos. Foi aplicado como anestésico local, a lidocaína 2% (0,2 mL, via subcutânea/quadrante). Após este procedimento, os animais foram colocados nas gaiolas com ração e água *ad libitum*. Dipirona foi adicionada 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 auxílio de uma espátula metálica, foi retirada uma pequena quantidade da amostra, correspondente a aproximadamente 5 g, espalhado, de maneira uniforme,

sobre toda a área da queimadura. Sobre cada área foi colocada gaze estéril cortada em quadrados, depois com uma bandagem não oclusiva, o animal foi devidamente enfaixado, a fim de prender a gaze no local e evitar a remoção da substância e ingestão da mesma. Na segunda aplicação, foram retiradas a bandagem e a gaze com uma tesoura estéril, e com gaze e solução fisiológica estéril as feridas foram limpas e as amostras de creme foram reaplicadas repetindo assim, o procedimento colocação de gaze e bandagem e assim sucessivamente, até o final do experimento.

Cada animal continha uma ficha de avaliação (Apêndice) no qual 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. Tais amostras foram utilizadas para a análise histopatológica e morfométrica, visando uma avaliação mais detalhada do efeito cicatrizante do creme.

3.17.1 Histopatologia e morfometria

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 6 µm de espessura. As lâminas histopatológicas foram mantidas em estufa para secagem, e os cortes, posteriormente, submetidos à coloração por hematoxilina e eosina, para análise histopatológica.

As lâminas foram analisadas sob microscópio óptico e capturadas por uma câmara de vídeo acoplado ao microscópio (BX51, Olympus - Japão) digitalizados e analisados por meio do *software* Image-Proplus (Media Cybernetics). Foi realizada captura de imagens de cinco campos microscópios aleatórios de cada amostra de

tecido na lâmina histológica com câmera digital (ampliação total de 400x). As imagens foram arquivadas e submetidas à contagem de células inflamatórias, células fibroblástica, número de vasos e avaliação das áreas de colágeno de todas as lesões com auxílio de marcação digital (ROCHA JÚNIOR et al., 2006).

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, os polimorfonucleares (PMN), eosinófilos, mastócitos, neutrófilos, plasmócitos e macrófagos.

3.18 Atividade gastroprotetora

3.18.1 Úlceras gástricas induzidas por etanol absoluto

O teste da atividade gastroprotetora pelo método de indução de úlceras gástricas induzidas por etanol absoluto em camundongos (*Mus musculus*) Swiss, foi realizado de acordo com o método proposto por Gupta et al. (2005). Após 12 h de jejum, os animais com peso entre 20-30 g foram divididos em cinco grupos (n = 6/grupo). O primeiro grupo foi tratado com salina (10 mL/kg) e o segundo foi tratado com ranitidina (60 mg/kg). Outros três grupos foram tratados com 100, 300 e 500 mg/kg de OE de *Pterodon emarginatus*, respectivamente. Uma hora após o tratamento (via oral), os animais receberam 0,2 mL de etanol 99,5% a fim de induzir úlceras gástricas. Uma hora após, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical e os estômagos foram removidos e abertos pela grande curvatura. Os estômagos foram lavados com solução salina 0,9% gelada e analisados por planimetria (mm²), avaliando-se o número de úlceras e o índice ulcerogênico (IU) seguindo o seguinte sistema: 0, mucosa normal; 0,5, coloração vermelha; 1, pontos hemorrágicos ou edema; 2, ≤ 10 petéquias; 3, > 10 petéquias; 2 x (número de úlceras ou erosões < 1mm); 3 x (número de úlceras ou erosões > 1 mm); 4 x (número de úlceras com perfurações) (ADAMI et al., 1964).

O percentual de inibição foi calculado através da fórmula para cada grupo em comparação com o grupo controle salina:

$$[(IU_{\text{controle}} - IU_{\text{tratado}})/IU_{\text{controle}}] \times 100.$$

3.18.2 Úlceras gástricas induzidas por antiinflamatório não-esteroidal

O teste da atividade gastroprotetora pelo método de indução de úlceras gástricas induzidas por antiinflamatório não-esteroidal em camundongos (*Mus musculus*) Swiss, foi realizado de acordo com o método proposto por Raji et al. (2004). Após 12 h de jejum, os animais com peso entre 20-30 g foram divididos em cinco grupos (n = 6/grupo). O primeiro grupo foi tratado com salina (10 mL/kg) e o segundo foi tratado com ranitidina (60 mg/kg). Outros três grupos foram tratados com 100, 300 e 500 mg/kg de OE de *Pterodon emarginatus*, respectivamente. Uma hora após o tratamento (via oral), os animais receberam indometacina (20 mg/kg) a fim de induzir úlceras gástricas. Seis horas após o tratamento com indometacina, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical e os estômagos foram removidos e abertos pela grande curvatura. Os estômagos foram lavados com solução salina 0,9% gelada e analisados por planimetria (mm²) conforme descrito previamente.

3.18.3 Úlceras gástricas induzidas por HCl-Etanol

O teste da atividade gastroprotetora pelo método de indução de úlceras gástricas induzidas por HCl/etanol em camundongos (*Mus musculus*) Swiss, foi realizado de acordo com o método proposto por Yesilada et al. (2000). Após 12 h de jejum, os animais com peso entre 20-30 g foram divididos em cinco grupos (n = 6/grupo). O primeiro grupo foi tratado com salina (10 mL/kg) e o segundo foi tratado com omeprazol (30 mg/kg). Outros três grupos foram tratados com 100, 300 e 500 mg/kg de OE de *Pterodon emarginatus*, respectivamente. Trinta minutos após o

tratamento (via oral), os animais receberam 0,2 mL de solução de HCl-etanol (0,3 M ácido clorídrico e etanol 60% - HCl/EtOH) a fim de induzir úlceras gástricas. Uma hora após o tratamento com HCl/EtOH, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical e os estômagos foram removidos e abertos pela grande curvatura. Os estômagos foram lavados com solução salina 0,9% gelada e analisados por planimetria (mm²) conforme descrito acima.

3.19 Atividade antiinflamatória

Os seguintes grupos foram estudados: pré-tratamento com OE obtido das sementes de *Pterodon emarginatus* (100, 300 e 500 mg/kg) administrado previamente no modelo de pleurisia induzida por carragenina; salina estéril (NaCl 0,9% - grupo controle negativo) ou apenas com o agente flogístico (carragenina). Indometacina (10 mg/kg, via oral) e celecoxib (18 mg/kg, via oral) foram utilizados como fármacos de referência. Todos os animais foram tratados oralmente (gavagem) 1 h antes da indução da pleurisia pela administração da carragenina.

Migração celular e volume de exsudato foram avaliados 4 horas após a administração da carragenina. As concentrações de mieloperoxidase (MPO) e nitrato/nitrito (NO_x) foram determinados no fluido pleural. Amostras do exsudato coletados da cavidade pleural foram armazenadas em tubos “ependorf” estéril, na temperatura de -20°C. A determinação de migração celular, volume de exsudato, NO e MPO, foram processados em diferentes dias, conforme os protocolos específicos.

3.19.1 Pleurisia induzida por carragenina

O teste da atividade antiinflamatória pelo método da pleurisia induzida por carragenina em camundongos (*Mus musculus*) Swiss, foi realizado de acordo com o método proposto por Saleh et al. (1996). Após 12 h de jejum, os animais com peso entre 20-30 g foram divididos em sete grupos (n = 6/grupo). Os animais foram tratados por via oral (v.o.) com salina, OE de *Pterodon emarginatus* (100, 300 e 500

mg/kg), indometacina (10 mg/kg, v.o.) e celecoxib (18 mg/kg, v.o.), 1 h antes da indução da pleurisia. Pleurisia foi induzida com injeção única de 0,1 mL de uma suspensão de carragenina 1% (p/v). Quatro horas após a injeção de carragenina, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical e o exsudato pleural foi coletado com 2,0 mL de tampão fosfato estéril (PBS, pH 7,4, composição mMol: NaCl 137, KCl 2,7, NaHPO₄.H₂O 8,4 e KH₂PO₄ 1,6) contendo heparina (20 UI/mL). O volume de exsudato foi calculado subtraindo o volume injetado dentro da cavidade pleural (2,0 mL) pelo volume final coletado. Diversas amostras do fluido pleural foram coletadas para contagem de leucócitos, concentração de MPO e nitrato/nitrito. A contagem de leucócitos totais foi realizada em câmara de Neubauer após diluição do exsudato com solução de Türk (1:20, v/v). O esfregaço celular foi preparado com uma alíquota de 0,1 mL do fluido pleural para a contagem específica de leucócitos. As lâminas foram coradas com corante de May-Grünwald – Giemsa e analisadas com auxílio de microscópio de luz na objetiva de imersão, no qual foram contadas 100 células inflamatórias/lâmina.

3.19.2 Concentração de óxido nítrico (NO_x)

Óxido nítrico foi avaliado pelos produtos oriundos de quebra enzimática do nitrito (NO₂⁻) e nitrato (NO₃⁻), através do método de Griess (DI ROSA et al., 1996). Amostras dos exsudatos obtidos dos animais controle (tratados apenas com salina estéril), tratados apenas com carragenina, animais pré-tratados com OE, indometacina e celecoxib foram coletadas, separadas e estocadas em *freezer* (-20°C). O nível de nitrato/nitrito foi determinado como descrito previamente por Saleh et al. (1999); as amostras foram homogeneizadas com ácido tricloroacético 50% e centrifugadas a 14.000 rpm por 10 min. Após centrifugação, foram adicionados 100 µL do sobrenadante de cada amostra e 100 µL do reagente de Griess a cada poço da placa. Foi preparado o branco o qual continha 100 µL de água destilada e 100 µL do reagente de Griess. Solução de nitrato de sódio (NaNO₂) foi utilizada com padrão para a construção da curva de calibração (concentração: 0,012 – 200 µM). A concentração de nitrito/nitrato foi estimada através de reação colorimétrica, com auxílio de leitor de placa (Organon Tecknica, Roseland, NJ, USA)

em 540 nm. As análises foram realizadas em duplicata e os resultados foram expressos como μM .

3.20 Citotoxicidade

As linhagens celulares utilizadas foram: C6 (glioma de rato), MeWo (melanoma humano), CT26.WT (carcinoma de cólon de camundongo), MDA-MB231 (câncer de mama humano), A549 (carcinoma de pulmão humano), B16-F1 (melanoma de camundongo), CHO-K1 (célula normal de ovário de hamster chinês) e BHK-21 (fibroblasto normal de rim de hamster). As células foram cultivadas rotineiramente em meio *Roswell Park Memorial Institute* (RPMI) 1640 enriquecido com 5% (v/v) de soro fetal bovino (SFB). As culturas foram incubadas em atmosfera úmida com 5% de CO_2 , à temperatura de 37 °C, em ambiente escuro.

A determinação da atividade citotóxica do OE em diferentes linhagens celulares foram avaliadas pela inibição da viabilidade celular através da metabolização do MTT, de acordo com Denizot et al. (1986).

Solução estoque de OE (5 mg/mL) em 0,05% de DMSO/água destilada foi preparada, filtrada em membrana filtrante de 0,22 μm e estocada a -20°C até o uso. Antes do uso, esta solução foi diluída em meio RPMI 1640 até a obtenção das concentrações desejadas do OE (20 – 50 $\mu\text{g/mL}$).

As linhagens testadas foram cultivadas rotineiramente em *Roswell Park Memorial Institute* (RPMI) 1640 suplementado com 5% (v/v) de soro fetal bovino (SFB). As culturas foram incubadas em atmosfera úmida com 5% de CO_2 , 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 5×10^3 células/poço, após contagem em câmara de Neubauer. As células foram incubadas em atmosfera úmida a 5% de CO_2 a temperatura de 37°C. Após 24

horas, foi adicionado o OE de *Pterodon emarginatus* nas concentrações desejadas (20 – 50 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 (50 µg/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% (CI₅₀), 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 (CE₅₀), 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.).

3.21 Análise estatística

Para todos os ensaios, exceto para as análises histopatológicas e morfométricas, foram realizadas análises descritivas dos dados através de medidas de posição e de dispersão: média ± erro padrão da média (E.P.M). Para avaliar a significância das diferenças entre as médias dos resultados dos grupos de estudo foi aplicada à análise de variância (ANOVA) e teste *post Hoc* de *Bonferroni*, no qual foi utilizado o *software* *Statistical Package for the Social Sciences*, versão 11.0 (SPSS). Foi estabelecido como limite de significância $p < 0,05$.

A análise estatística do ensaio de histopatologia e morfometria foi através da média ± E.P.M. Para avaliar a significância das diferenças entre as médias dos resultados dos grupos de estudo foi aplicada à análise de variância (ANOVA) e teste *post Hoc* de *Bonferroni*, com auxílio do *software* *Statistical GraphPad Prisma 3.0* (GraphPad Software, Inc.). Foi estabelecido como limite de significância $p < 0,05$.

4 RESULTADOS

4.1 Triagem fitoquímica

As Tabelas 2, 3, 4, 5 e 6 mostram constituintes do metabolismo secundário presentes nas sementes; fração hexânica (FH), fração acetato de etila (FA), fração butanólica (FB) e fração metanólica (FM), respectivamente. Os teores de cinzas totais e umidade para as sementes de *Pterodon emarginatus* foram, respectivamente, de 0,46% e 3,08%.

4.2 Análise cromatográfica do óleo essencial

Durante a extração do óleo essencial (OE) foi verificado um grande rendimento 1,4 mL (rendimento = 5,41%), com uma massa de material considerada pequena (25,86 gramas) de sementes.

Na Tabela 7 estão descritos os constituintes químicos do OE obtidos das sementes de *Pterodon emarginatus*, após análise por cromatografia em fase gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG/EM). A análise do OE identificou como constituintes majoritários: *trans*-cariofileno (35,9%); β -elemeno (15,3%); germacreno-D (9,8%); α -humuleno (6,8%); espatulenol (5,9%); biciclogermacreno (5,5%); *cis*-acetato de farnesil (4,9%) e δ -elemeno (4,7%) (Figura 16). Nesta tabela, ainda são mostrados as porcentagens e os índices de Kovats (IK) de cada componente identificado.

Tabela 2 – Identificação de grupos de substâncias do metabolismo secundário nas sementes de *P. emarginatus*.

Classes de substâncias	Reações químicas	Resultados
Flavonóides	AlCl ₃	+
	H ₃ BO ₃	+
	NaOH 1N	+
	<i>Shinoda</i>	+
Leucoantocianidinas	H ₂ SO ₄ concentrado	+
Taninos	Alcalóide	+
	Gelatina	+
	Sais de ferro	+
Heterosídeos cardiotônicos	<i>Lieberman-Buchard</i>	+
	<i>Kedde</i>	-
Cumarinas	KOH 2N	+
Saponinas	Índice de Espuma	Tubo 5 – 1:200
Alcalóides	<i>Dragendorf</i>	-
Antraquinonas	<i>Borntraeger</i>	-
Óleo essencial		1,4 mL – 5,41%

Legenda: – = não detectado
+ = resultado positivo

Tabela 3 – Identificação de grupos de substâncias do metabolismo secundário na FH das sementes de *P. emarginatus*.

Classes de substâncias	Reações químicas	Resultados
Flavonóides	AlCl ₃	-
	H ₃ BO ₃	-
	NaOH 1N	-
	<i>Shinoda</i>	-
Leucoantocianidinas	H ₂ SO ₄ concentrado	+
Taninos	Alcalóide	+
	Gelatina	+
	Sais de ferro	+
Heterosídeos cardiotônicos	<i>Lieberman-Buchard</i>	+
	<i>Kedde</i>	+
Cumarinas	KOH 2N	-
Saponinas	Índice de Espuma	-
Alcalóides	<i>Dragendorf</i>	-
Antraquinonas	<i>Borntraeger</i>	-

Legenda: – = não detectado
 + = resultado positivo

Tabela 4 – Identificação de grupos de substâncias do metabolismo secundário na FA das sementes de *P. emarginatus*.

Classes de substâncias	Reações químicas	Resultados
Flavonóides	AlCl ₃	+
	H ₃ BO ₃	+
	NaOH 1N	+
	<i>Shinoda</i>	+
Leucoantocianidinas	H ₂ SO ₄ concentrado	+
Taninos	Alcalóide	+
	Gelatina	+
	Sais de ferro	+
Heterosídeos cardiotônicos	<i>Lieberman-Buchard</i>	+
	<i>Kedde</i>	-
Cumarinas	KOH 2N	-
Saponinas	Índice de Espuma	Tubo 6 – 1:166
Alcalóides	<i>Dragendorf</i>	-
Antraquinonas	<i>Borntraeger</i>	-

Legenda: – = não detectado
 + = resultado positivo

Tabela 5 – Identificação de grupos de substâncias do metabolismo secundário na FB das sementes de *P. emarginatus*.

Classes de substâncias	Reações químicas	Resultados
Flavonóides	AlCl ₃	+
	H ₃ BO ₃	+
	NaOH 1N	+
	<i>Shinoda</i>	-
Leucoantocianidinas	H ₂ SO ₄ concentrado	+
Taninos	Alcalóide	-
	Gelatina	-
	Sais de ferro	-
Heterosídeos cardiotônicos	<i>Lieberman-Buchard</i>	-
	<i>Kedde</i>	-
Cumarinas	KOH 2N	+
Saponinas	Índice de Espuma	Tubo 5 – 1:200
Alcalóides	<i>Dragendorf</i>	-
Antraquinonas	<i>Borntraeger</i>	-

Legenda: – = não detectado
 + = resultado positivo

Tabela 6 – Identificação de grupos de substâncias do metabolismo secundário na FM das sementes de *P. emarginatus*.

Classes de substâncias	Reações químicas	Resultados
Flavonóides	AlCl ₃	+
	H ₃ BO ₃	+
	NaOH 1N	+
	<i>Shinoda</i>	+
Leucoantocianidinas	H ₂ SO ₄ concentrado	+
Taninos	Alcalóide	-
	Gelatina	-
	Sais de ferro	-
Heterosídeos cardiotônicos	<i>Lieberman-Buchard</i>	+
	<i>Kedde</i>	-
Cumarinas	KOH 2N	+
Saponinas	Índice de Espuma	Tubo 4 – 1:250
Alcalóides	<i>Dragendorf</i>	-
Antraquinonas	<i>Borntraeger</i>	+

Legenda: – = não detectado
+ = resultado positivo

Tabela 7 – Composição química do OE das sementes de *Pterodon emarginatus* determinada por CG/EM.

Substância	Tempo de Retenção (min)	IK	Porcentagem (%)
δ -elemeno	15,64	1327	4,7
β -elemeno	15,67	1380	15,3
<i>trans</i> -cariofileno	18,16	1411	35,9
β -gurjuneno	18,49	1423	4,6
α - humuleno	19,23	1449	6,8
γ -muroleno	19,44	1456	2,7
germacreno-D	19,97	1475	9,8
biciclogermacreno	20,44	1492	5,5
espatulenol	22,53	1570	5,9
óxido de cariofileno	22,72	1577	3,8
<i>cis</i> -acetato de farnesil	26,34	1815	4,9
Total			99,9

Legenda: Índice de Kovats (IK).

4.3 Análise citogenética

Foi realizada uma caracterização citogenética da espécie em estudo, a fim de confirmar sua verdadeira identificação, já que a espécie *Pterodon emarginatus* é por diversas vezes confundida com *Pterodon polygalaeflorus*. Para a espécie *Pterodon emarginatus*, o tratamento com 8-HQ 2 mM, por 6 horas em temperatura ambiente, foi ideal para contagem do número cromossômico de $2n = 16$. Através da visualização de aproximadamente 10 metáfases, foram realizadas medidas dos cromossomos metafásicos demonstrando um cariótipo unimodal para a espécie, cujo tamanho cromossômico variou de 1,5 μm a 2,3 μm , constituindo, em sua maioria, de cromossomos metacêntricos, conforme mostra a Figura 17.

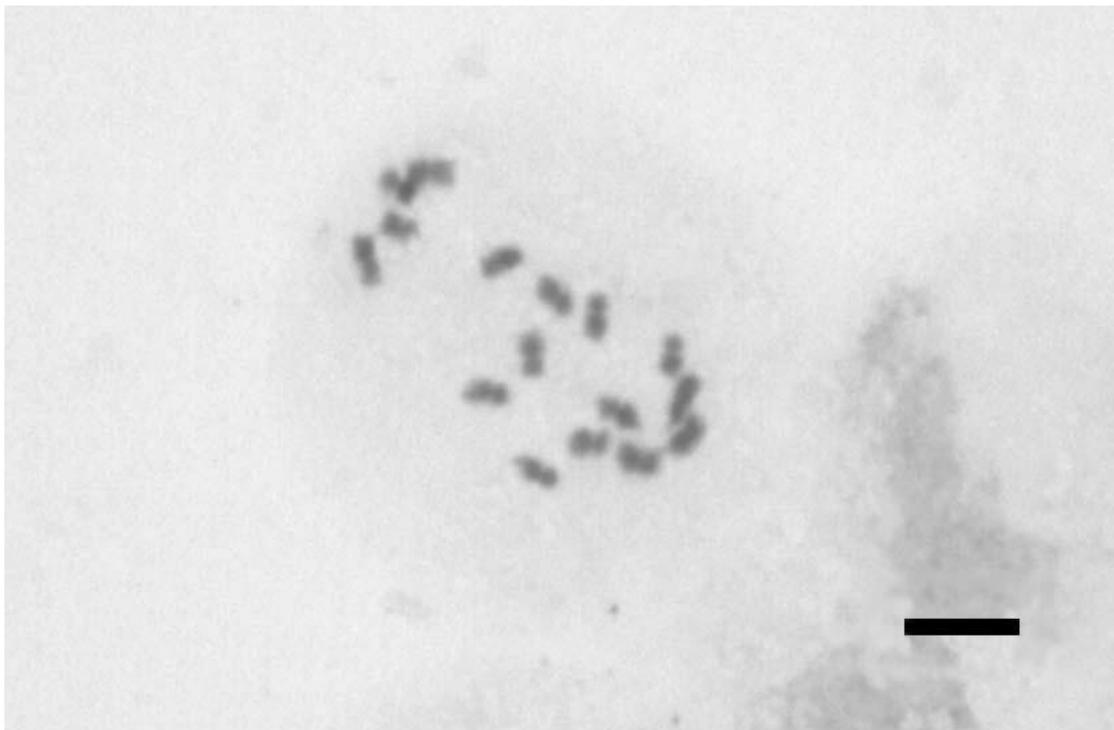


Figura 17 – Metáfase mitótica de *Pterodon emarginatus* Vogel. Barra correspondente a 5 μm .

4.4 Doseamento dos constituintes fenólicos totais

As concentrações dos constituintes fenólicos totais presentes nas sementes de *Pterodon emarginatus* são mostrados na Tabela 8. Os resultados demonstraram que o refluxo e a chapa de aquecimento foram mais eficazes na extração dos constituintes fenólicos, o que mostra a eficiência do aquecimento em extrair estes compostos. Entretanto, comparando a chapa de aquecimento com o refluxo, na extração com etanol/água (70:30, v/v), uma menor concentração de constituintes fenólicos foi observado o que nos sugere que este procedimento pode estar degradando alguns compostos polifenólicos. Dentre estes, a extração feita sob refluxo utilizando etanol/água (70:30, v/v) foi a que apresentou a maior taxa de polifenóis, sendo este então considerado o método ideal para a extração de tais constituintes. Não foi possível detectar constituintes fenólicos nas frações obtidas das sementes de *Pterodon emarginatus*, no modelo utilizado.

Tabela 8 – Constituintes fenólicos nas sementes de *Pterodon emarginatus* submetidas a diferentes processos de extração[#].

Método de Extração	Constituintes fenólicos (mg/100g)			
	Água	Etanol/água (30:70, v/v) ¹	Etanol/água (50:50, v/v)	Etanol/água (70:30, v/v) ²
Refluxo ^a	ND	5,20 ± 0,25	600,30 ± 2,51	852,60 ± 2,51
Maceração	ND	ND	ND	501,00 ± 1,73
Ultra-som	ND	ND	ND	603,00 ± 2,08
Chapa de aquecimento ^b	113,00 ± 1,00	332,60 ± 2,51	536,30 ± 1,52	781,60 ± 1,52

[#]Dados são expressos como média ± desvio padrão (n=3). Significância estatística foi calculada pela Análise de Variância (ANOVA) seguida pelo Teste de Tukey. Letras indicam diferenças estatística entre linhas. Números indicam diferenças estatística entre colunas.

a, b, 1, 2 todos os métodos mostraram diferença estatística.

4.5 Determinação dos teores de flavonóides

A determinação dos teores de flavonóides presentes nas sementes de *Pterodon emarginatus* é mostrada na Tabela 9. Os teores médios de flavonóides obtidos quando foi utilizada a chapa de aquecimento foram menores em relação aos outros métodos empregados, o que leva a concluir que sob tais condições pode ter ocorrido à degradação dos constituintes flavônicos. As frações apresentaram 2,92; 3,16 e 3,00 mg/100mg, respectivamente para FA, FB e FM. Não foi possível detectar constituintes flavônicos na FH das sementes de *P. emarginatus*.

Tabela 9 – Determinação dos teores de flavonóides nas sementes de *Pterodon emarginatus* submetidas a diferentes processos de extração[#].

Método de Extração	Flavonóides (mg/100g)			
	Água ⁶	Etanol/água (30:70, v/v) ¹	Etanol/água (50:50, v/v)	Etanol/água (70:30, v/v)
Refluxo	132,00 ± 1,00	122,00 ± 2,00 ^a	106,06 ± 3,05 ^{b,2}	120,30 ± 1,53 ^{a,4}
Maceração	110,00 ± 1,00 ^d	103,30 ± 2,30 ^c	110,60 ± 1,15 ^{d,2}	123,00 ± 1,73 ⁴
Ultra-som	101,70 ± 1,53 ^f	92,60 ± 2,50 ^e	96,30 ± 1,53 ^e	131,30 ± 1,53
Chapa de aquecimento	68,00 ± 1,00	67,00 ± 1,00	73,70 ± 1,15 ^{g,3}	68,00 ± 1,00 ⁵

[#]Dados são expressos como média ± desvio padrão (n=3). Significância estatística foi calculada pela Análise de Variância (ANOVA) seguida pelo Teste de Tukey. Letras indicam diferenças estatística entre linhas. Números indicam diferenças estatística entre colunas.

^a p<0,05 comparado com água e etanol/água (50:50, v/v); ^b p<0,05 comparado com água; ^c p<0,05 comparado com água, etanol/água (50:50, v/v) e etanol/água (70:30, v/v); ^d p<0,05 comparado com etanol/água (30: 70, v/v) e etanol/água (70:30, v/v); ^e p<0,05 comparado com água e etanol/água (70:30, v/v); ^f p<0,05 comparado com etanol/água (70:30, v/v); ^g p<0,05 comparado com água, etanol/água (30:70, v/v) e etanol/água (70:30, v/v); ^{1, 6} todos os métodos mostraram diferença estatística; ² p<0,05 comparado com ultrassom e chapa de aquecimento; ³ p<0,05 comparado com ultrassom, maceração e refluxo; ⁴ p<0,05 comparado com ultrassom e chapa de aquecimento; ⁵ p<0,05 comparado com ultrassom, maceração e refluxo.

4.6 Atividade antioxidante (atividade seqüestrante)

O resultado da atividade antioxidante foi expresso em percentual de inibição das amostras em relação ao controle, através do qual foi calculada a concentração inibitória 50% (CI₅₀), expressa em µg/mL. As frações obtidas das sementes de *Pterodon emarginatus* apresentaram capacidade seqüestrante satisfatória frente ao radical DPPH (Tabela 10), no entanto OE e FH não apresentaram capacidade seqüestrante.

Tabela 10 – Atividade seqüestrante do OE e frações obtidos das sementes de *Pterodon emarginatus* frente ao radical DPPH.

Amostras	CI ₅₀ (µg/mL)
Óleo essencial	ND
Fração hexânica	ND
Fração acetato de etila	163,22
Fração butanólica	18,89
Fração metanólica	10,15
Ácido ascórbico	2,50
BHT	7,58

ND: não detectado.

4.7 Toxicidade aguda

As frações demonstraram, através do bioensaio em *Artemia salina*, potencial tóxico frente ao modelo experimental utilizado. Na Tabela 11, encontram-se os valores da concentração letal em 50% dos indivíduos (CL₅₀), determinada pela regressão linear entre o logaritmo da dose fornecida e as unidades probabilísticas de porcentagem de artemias mortas pelo teste dos probitos. Verificou-se que a toxicidade do OE > FH > FA. Enquanto as FB e FM obtidas das sementes de *Pterodon emarginatus* não foram consideradas tóxicas, utilizando-se *Artemia salina*.

Observou-se que o OE obtido das sementes de *Pterodon emarginatus*, nas concentrações testadas, apresentou um valor de $CL_{50} = 1,63 \mu\text{g/mL}$, sendo cerca de 250 vezes mais potentes que o timol ($CL_{50} = 480,20 \mu\text{g/mL}$).

Tabela 11 – Determinação da CL_{50} ($\mu\text{g/mL}$) do óleo essencial e frações obtidos das sementes de *Pterodon emarginatus*, através do bioensaio em *Artemia salina*.

Amostras	Concentração ($\mu\text{g/mL}$)	CL_{50} ($\mu\text{g/mL}$)	Intervalo de confiança (95%)
Óleo essencial	0,50 – 50	1,63	1,34 – 1,99
Fração hexânica	1 – 100	8,06	5,04 – 12,87
Fração acetato de etila	10 – 1000	214,90	153,35 – 301,15
Fração butanólica	10 – 1000	> 1000	–
Fração metanólica	10 – 1000	> 1000	–
Timol	10 – 1000	480,22	337,37 – 683,50

4.8 Atividade antimicrobiana

Os resultados obtidos no ensaio da atividade antimicrobiana são mostrados na Tabela 12. O OE obtido das sementes de *Pterodon emarginatus* apresentou atividade bactericida contra *S. aureus* ATCC 25923 (CIM = 2,5 mg/mL), mas não apresentou atividade antimicrobiana contra *S. mutans* ATCC 25175, *P. aeruginosa* ATCC 90271, *E. coli* ATCC10530 e *C. albicans* ATCC 10231.

Tabela 12 – Atividade antimicrobiana do OE obtido das sementes de *Pterodon emarginatus* contra microorganismos padrão.

Microorganismos	Zonas de inibição (mm) ^a			Penicilina (1 UI/mL)	Nistatina (20 UI/mL)	CIM (mg/mL)
	OE					
	10 mg	25 mg	50 mg			
<i>Staphylococcus aureus</i>	10,6 ± 0,6	10,3 ± 0,6	10,2 ± 0,3	15,3 ± 0,6	NT	2,5
<i>Streptococcus mutans</i>	–	–	–	9,5 ± 0,6	NT	NT
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	–	–	–	8,7 ± 0,6	NT	NT
<i>Escherichia coli</i>	–	–	–	9,3 ± 0,2	NT	NT
<i>Candida albicans</i>	–	–	–	NT	8,7 ± 0,3	NT

Legenda: OE = óleo essencial

NT = não testados

^a Resultados expressos como média ± desvio-padrão (n = 3)

4.9 Atividade leishmanicida

Neste trabalho avaliou-se a possível atividade leishmanicida do OE e frações obtidos das sementes de *Pterodon emarginatus* Vogel frente às formas promastigotas de *Leishmania amazonensis* e *Leishmania chagasi*, isoladas de pacientes apresentando manifestações clínicas de ambas as patologias. A partir do teste de viabilidade celular, determinou-se a concentração inibitória mínima (CI₅₀, expressa em µg/mL) de cada amostra teste (Tabela 13). As FH (CI₅₀ = 50,06 µg/mL) e FB (CI₅₀ = 46,65 µg/mL) apresentaram atividade leishmanicida frente apenas as formas promastigotas de *Leishmania amazonensis*. O OE, assim como a FM não apresentaram atividade frente às formas promastigotas de ambas *Leishmanias* utilizadas.

Neste ensaio, não foi testada a FA, pois esta não foi solúvel em DMSO puro, solvente utilizado durante o ensaio com a finalidade de solubilizar o OE e as frações obtidas das sementes de *Pterodon emarginatus* Vogel.

Tabela 13 – Determinação da CI_{50} do OE e frações obtidos das sementes de *Pterodon emarginatus*, frente às formas promastigotas de *Leishmania amazonensis* e *Leishmania chagasi* [#].

Amostras	CI_{50} ($\mu\text{g/mL}$)	
	<i>Leishmania amazonensis</i>	<i>Leishmania chagasi</i>
Óleo Essencial	> 100	> 100
Fração Hexânica	50,1 \pm 1,2	> 100
Fração Butanólica	46,7 \pm 3,1	> 100
Fração Metanólica	>100	> 100
Anfotericina B	0,9 \pm 0,1	1,9 \pm 0,1

[#]Resultados expresso como média \pm desvio padrão (n=3)

4.10 Atividade antinociceptiva

4.10.1 Contorções abdominais induzidas por ácido acético

O OE e a FH, nas doses de 300 e 500 mg/kg, demonstraram atividade antinociceptiva com percentual de inibição de 61% e 70%, 66% e 75%, respectivamente (Figura 18.A). A indometacina inibiu em 70,78% o número de contorções abdominais, ratificando sua eficácia como agente analgésico. A FB apresentou atividade, apenas na dose de 500 mg/kg (% de inibição: 51%), enquanto a FM não apresentou atividade antinociceptiva no modelo de contorções abdominais, nas concentrações testadas (Figura 18.B).

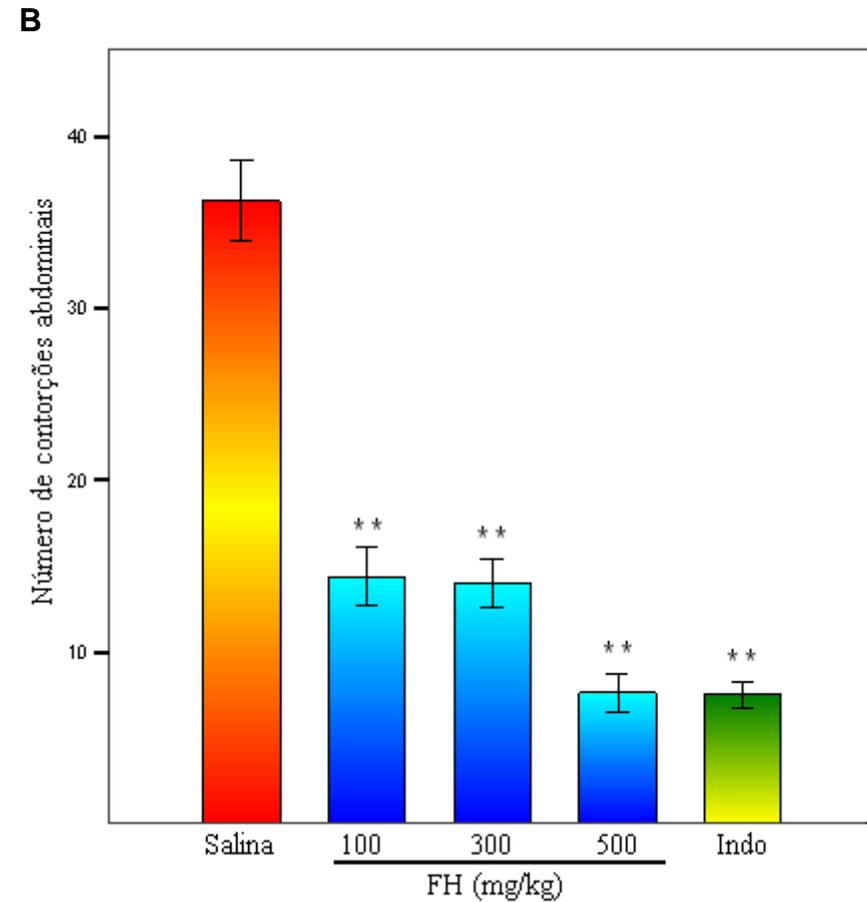
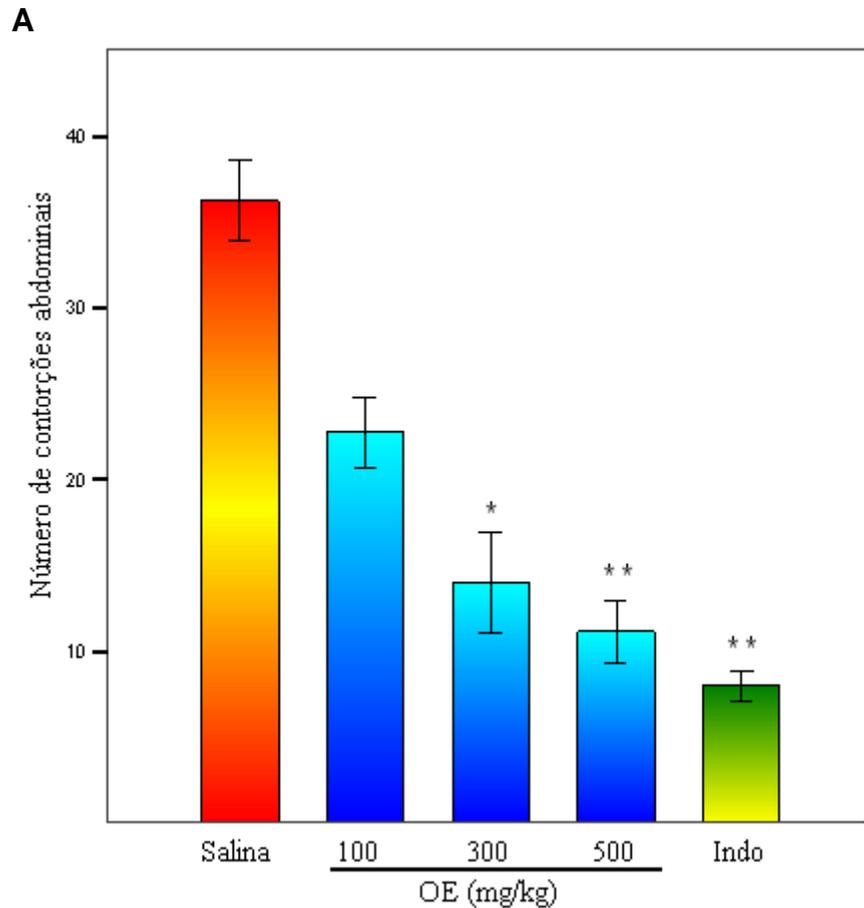


Figura 18.A – Efeito do óleo essencial (OE: 18.A, v.o.) e da fração hexânica (FH: 18.B, v.o.) obtidos das sementes de *Pterodon emarginatus* sobre número de contrações abdominais induzidas por ácido acético 0,6% em camundongos. Indo (Indometacina: 5 mg/kg). Dados são expressos como média \pm E.P.M. (n=8/grupo). * $p < 0,05$ e ** $p < 0,001$ indica diferença estatisticamente significativa comparado ao grupo salina (ANOVA; Teste de Bonferroni).

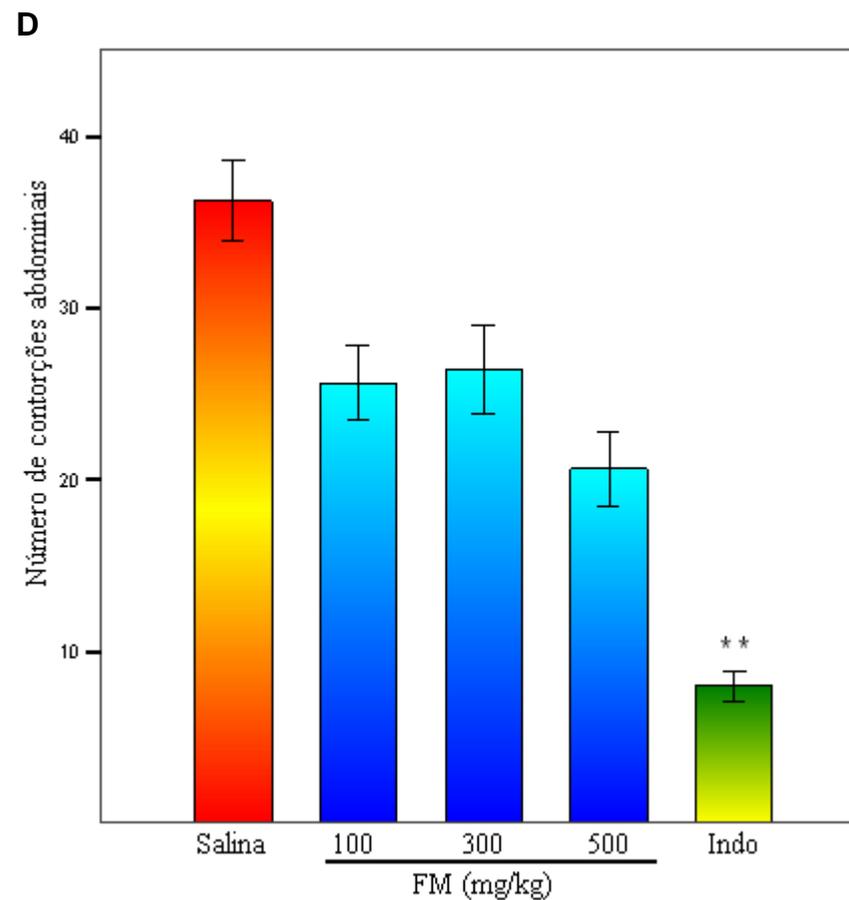
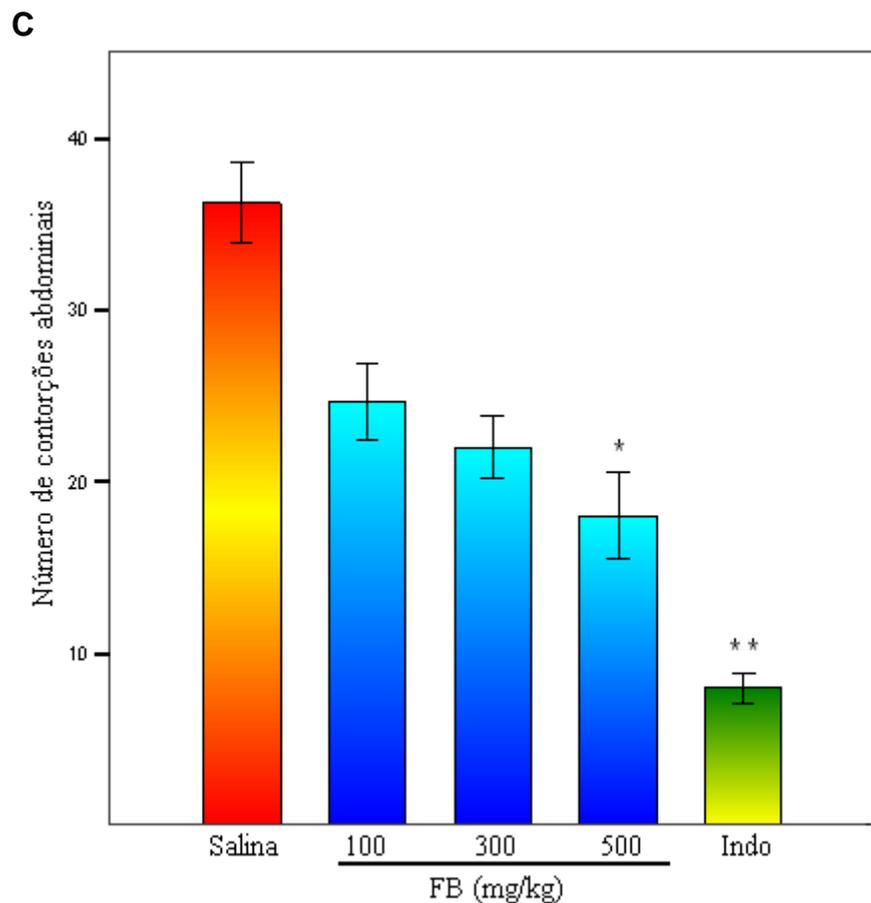


Figura 18.B – Efeito da fração butanólica (FB: 18.C, v.o.) e da fração metanólica (FM: 18.D, v.o.) obtidas das sementes de *Pterodon emarginatus* sobre número de contorções abdominais induzidas por ácido acético 0,6% em camundongos. Indo (Indometacina: 5 mg/kg). Dados são expressos como média ± E.P.M. (n=8/grupo). * $p < 0,05$ e ** $p < 0,001$ indica diferença estatisticamente significativa comparado ao grupo salina (ANOVA; Teste de *Bonferroni*).

4.10.2 Teste da placa quente (*Hot plate*)

O OE nas doses de 100, 300 e 500 mg/kg demonstrou atividade antinociceptiva no modelo da placa quente, apenas no tempo de 30 minutos, com percentual de inibição de 53%, 52% e 54%, respectivamente. A FH aumentou o tempo de resposta em 60, 90 e 120 minutos, nas doses de 100 e 300 mg/kg (Figura 19.A).

No modelo da placa quente, as FB e FM não apresentaram atividade antinociceptiva, nas concentrações testadas (Figura 19.B). A morfina apresentou atividade antinociceptiva em todos os tempos analisados, ratificando sua eficácia como analgésico.

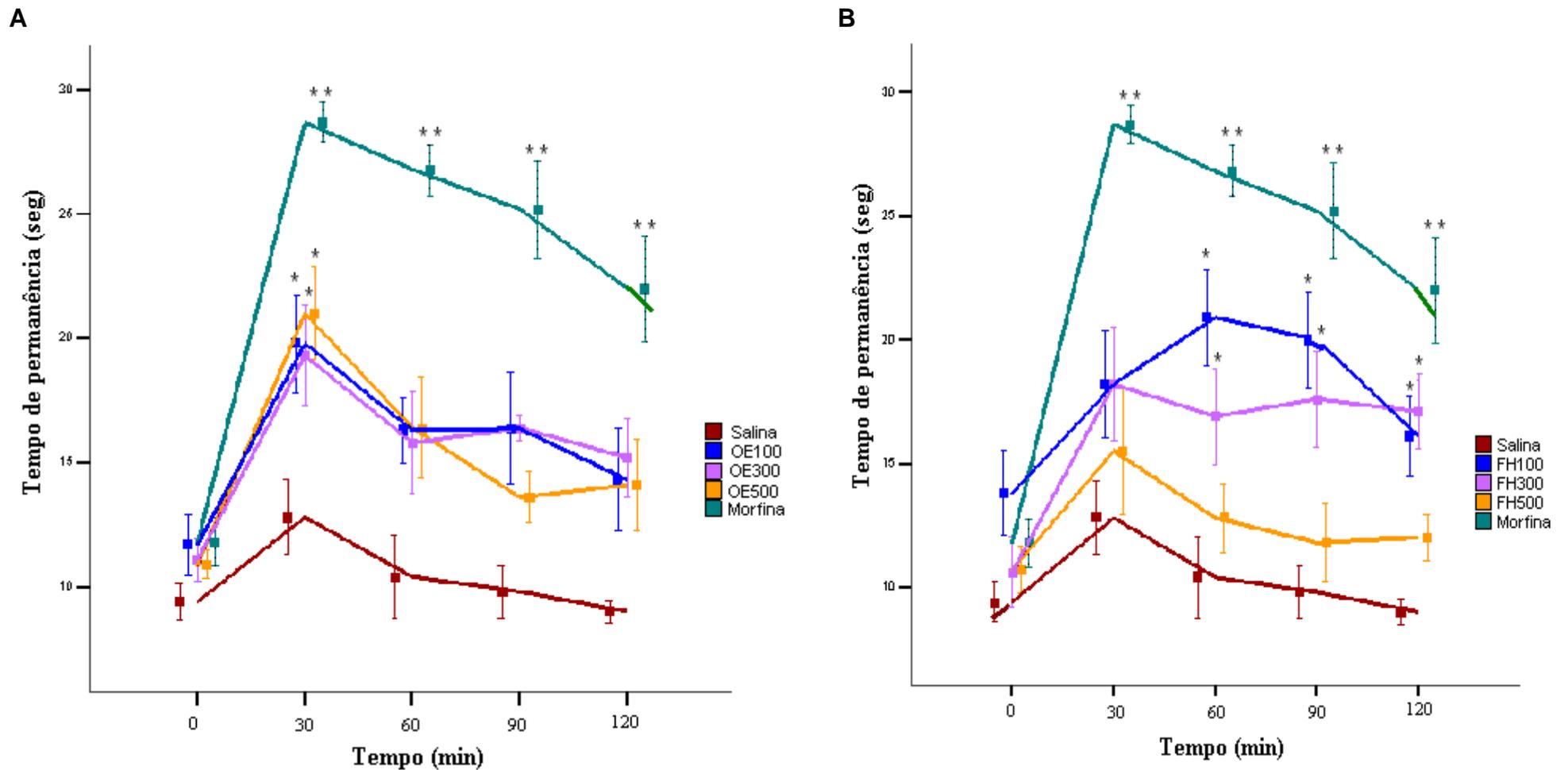


Figura 19.A – Efeito do óleo essencial (OE: 19.A, v.o.) e da fração hexânica (FH: 19.B, v.o.) obtidos das sementes de *Pterodon emarginatus*, sobre a resposta dos animais no modelo da placa quente. Morfina (5mg/kg). Dados são expressos como média \pm E.P.M. (n=10/grupo). * $p<0,05$ e ** $p<0,001$ indica diferença estatisticamente significativa comparado ao grupo salina (ANOVA; Teste de Bonferroni).

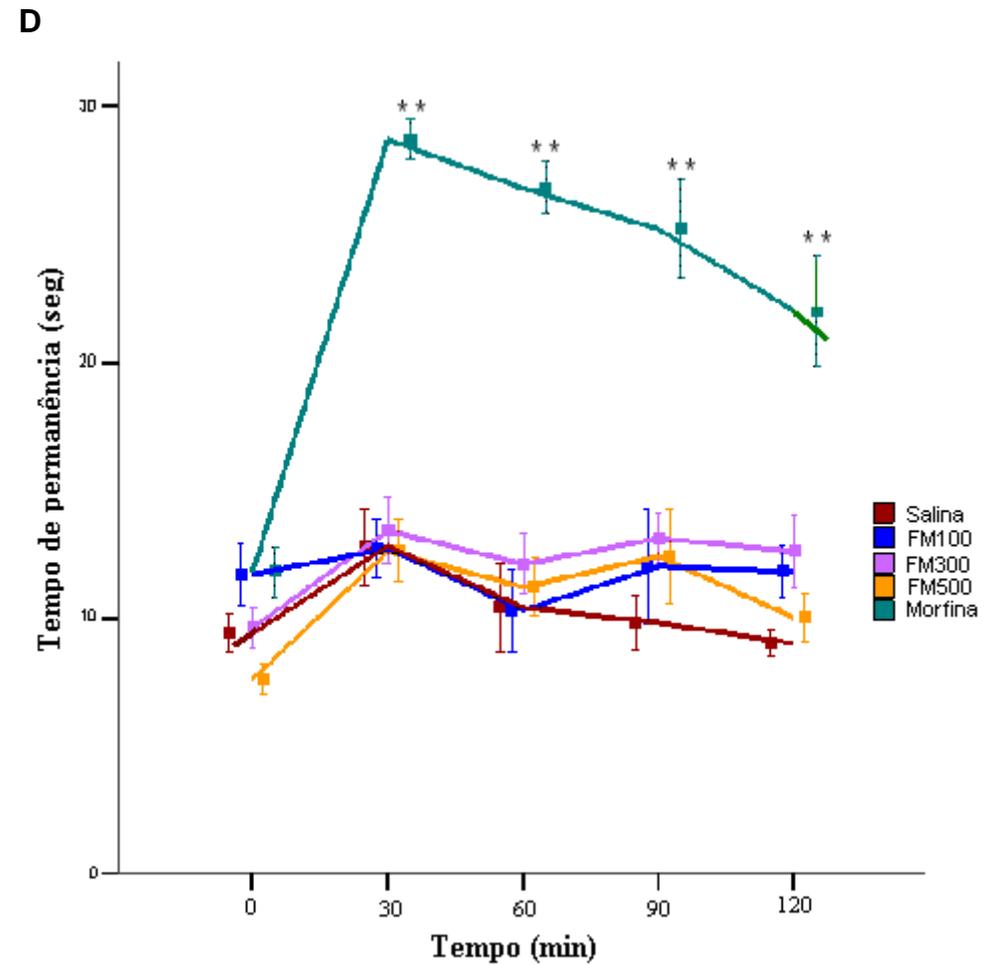
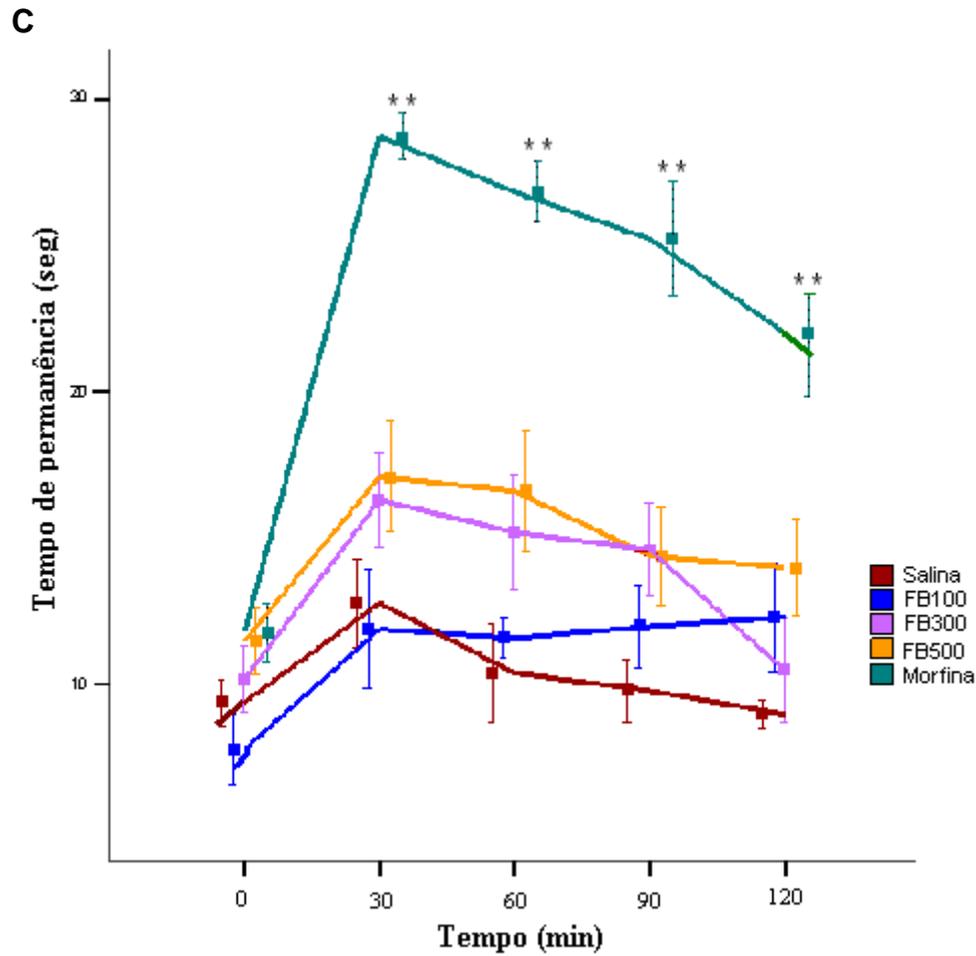


Figura 19.B – Efeito da fração butanólica (FB: 19.C, v.o.) e da fração metanólica (FM: 19.D, v.o.) obtidas das sementes de *Pterodon emarginatus*, sobre a resposta dos animais no modelo da placa quente. Morfina (5mg/kg). Dados são expressos como média \pm E.P.M. (n=10/grupo). * $p < 0,05$ e ** $p < 0,001$ indica diferença estatisticamente significativa comparado ao grupo salina (ANOVA; Teste de *Bonferroni*).

4.10.3 Tempo da lambida da pata

A avaliação da atividade antinociceptiva, através do método de lambida da pata induzida com injeção intraplantar de formalina 2,5%, foi utilizado a fim de confirmar a atividade antinociceptiva do OE e frações obtidas das sementes de *Pterodon emarginatus* Vogel. As figuras 20.A, 20.B, 20.C e 20.D mostram os resultados dos tempos de lambida da pata durante as duas fases de análise: primeira fase - neurogênia e a segunda fase – inflamatória. Ambos, OE e FM apresentaram uma resposta bifásica, nas doses utilizadas, enquanto as FH e FB apenas apresentaram atividade na primeira fase, nas doses testadas.

A

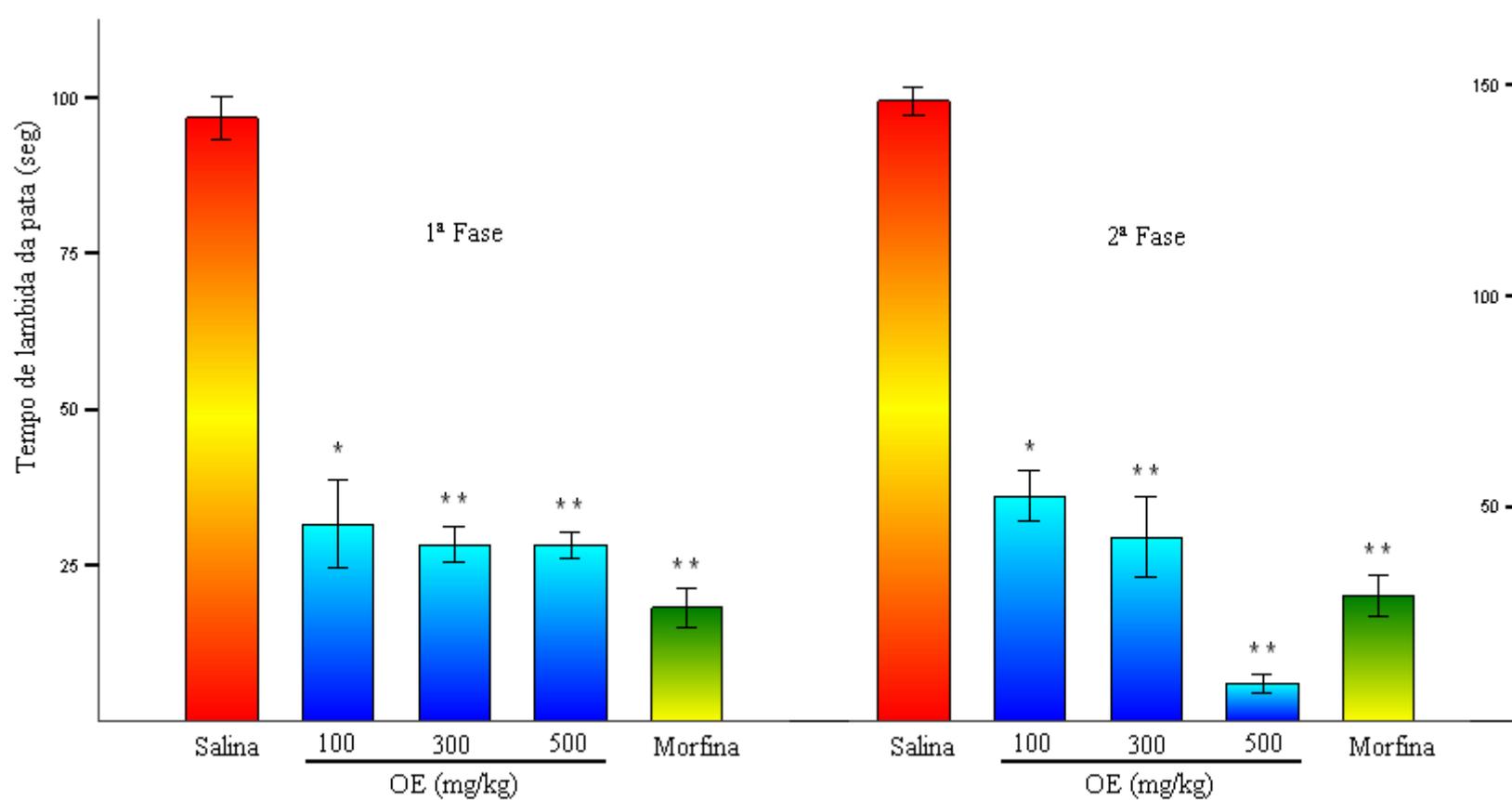


Figura 20.A – Efeito analgésico do óleo essencial (OE: 20.A, v.o.) obtido das sementes de *Pterodon emarginatus* no teste da formalina em camundongos. Indo (Indometacina: 5 mg/kg). Dados são expressos como média \pm E.P.M. (n=8/grupo). * $p < 0,05$ e ** $p < 0,001$ indica diferença estatisticamente significativa comparado ao grupo salina (ANOVA; Teste de *Bonferroni*).

B

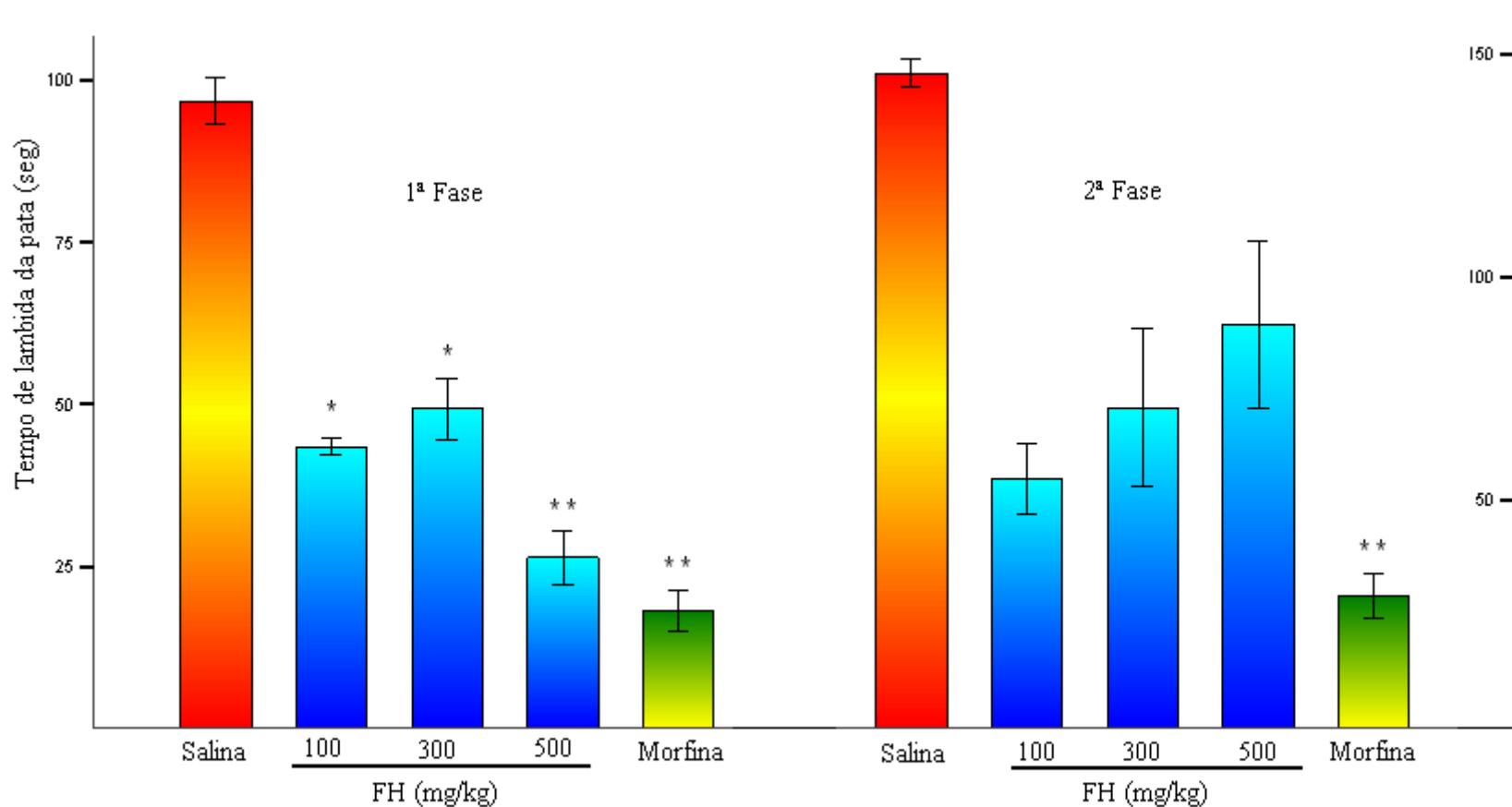


Figura 20.B – Efeito analgésico da fração hexânica (FH: 20.B, v.o.) obtida das sementes de *Pterodon emarginatus* no teste da formalina em camundongos. Indo (Indometacina: 5 mg/kg). Dados são expressos como média \pm E.P.M. (n=8/grupo). * $p < 0,05$ e ** $p < 0,001$ indica diferença estatisticamente significativa comparado ao grupo salina (ANOVA; Teste de *Bonferroni*).

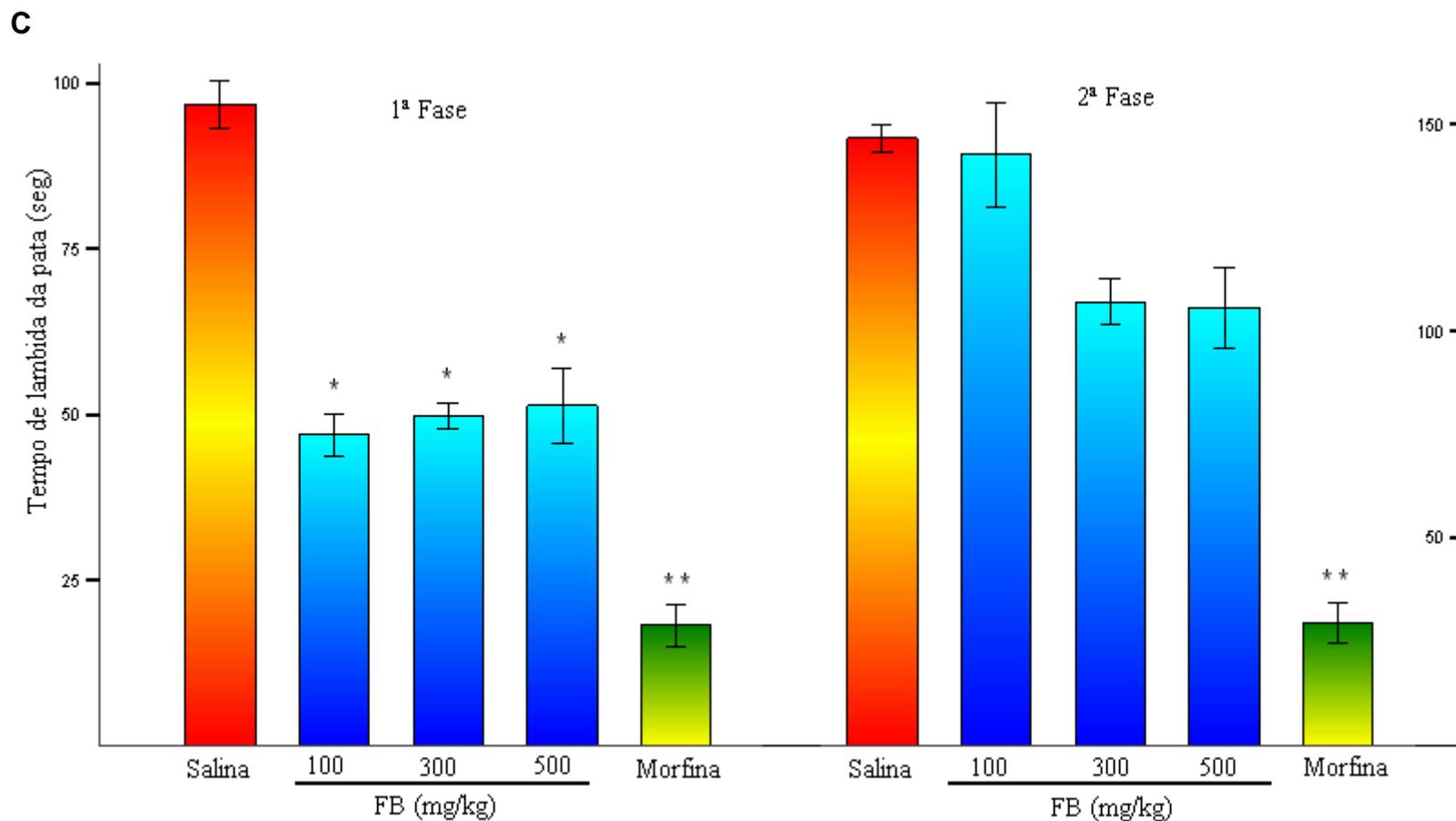


Figura 20.C – Efeito analgésico da fração butanólica (FB: 20.C, v.o.) obtida das sementes de *Pterodon emarginatus* no teste da formalina em camundongos. Indo (Indometacina: 5 mg/kg). Dados são expressos como média \pm E.P.M. (n=8/grupo). * $p < 0,05$ e ** $p < 0,001$ indica diferença estatisticamente significativa comparado ao grupo salina (ANOVA; Teste de *Bonferroni*).

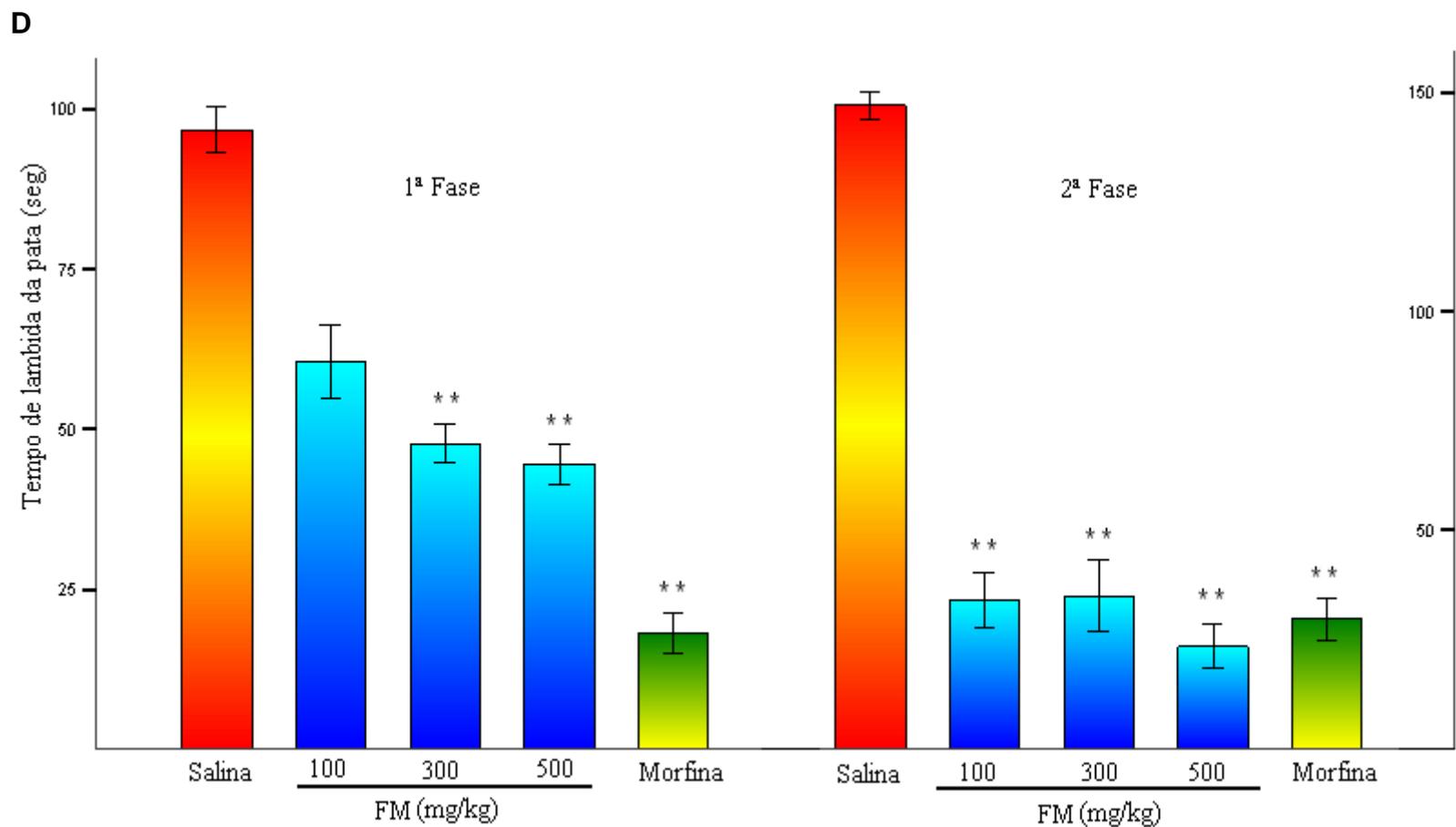


Figura 20.D – Efeito analgésico da fração metanólica (FM: 20.D, v.o.) obtida das sementes de *Pterodon emarginatus* no teste da formalina em camundongos. Indo (Indometacina: 5 mg/kg). Dados são expressos como média \pm E.P.M. ($n=8$ /grupo). * $p<0,05$ e ** $p<0,001$ indica diferença estatisticamente significativa comparado ao grupo salina (ANOVA; Teste de *Bonferroni*).

4.11 Avaliação da atividade cicatrizante

4.11.1 Análise macroscópica

A análise macroscópica das lesões revelou a eficiência do OE, quando comparado ao grupo controle tratado com creme base, porém o mesmo efeito não foi observado com o creme contendo a FH nas duas diferentes concentrações.

Para os animais tratados com cremes contendo OE, nos três primeiros dias do ensaio as feridas apresentavam-se esbranquiçadas, devido à lesão (queimadura) induzida. No quarto dia de análise, praticamente, todos os quatro quadrantes apresentavam as feridas abertas, com bordas avermelhadas, porém com ausência de secreção, escara e pus (Figura 21). A partir do sétimo dia de análise, os quadrantes tratados com sulfadiazina de prata (medicamento de referência) e cremes contendo OE nas concentrações de 5 e 10%, já apresentavam sinais de melhora como, por exemplo, diminuição dos pontos de hemorragia (principalmente no quarto quadrante, tratado com OE na concentração de 10%, assim como o quadrante tratado com sulfadiazina de prata) e bordas cicatrizadas (Figura 21).

Porém, o quadrante 2, tratado apenas com o creme base, apresentava presença de sangramento, lesões nas bordas e feridas ainda abertas. A partir do oitavo dias, os quadrantes 1, 3 e 4 (Figura 16), apresentaram as lesões, totalmente cicatrizadas, enquanto a ferida tratada apenas com creme base não apresentou cicatrização completa durante os dez dias de análises.

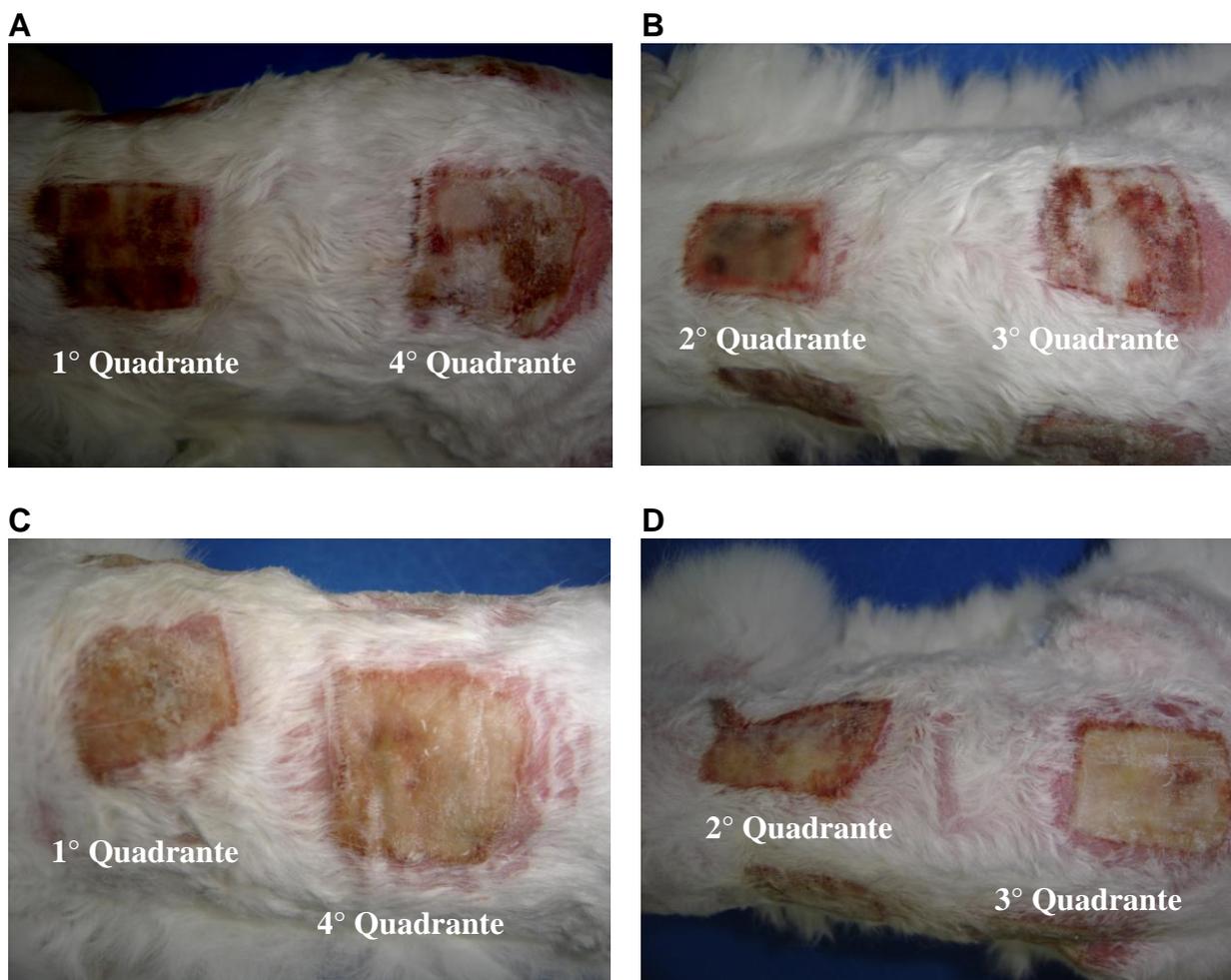


Figura 21 – Evolução das lesões no coelho número 04 tratado com creme contendo óleo essencial das sementes de *Pterodon emarginatus* Vogel no quarto (A e B) e sétimo dias (C e D). 1° quadrante: sulfadiazina de prata 1%; 2° quadrante: creme base; 3° quadrante: OE 5% e 4° quadrante: OE 10%.

Para os animais tratados com cremes contendo FH nos três primeiros dias do ensaio as feridas apresentavam-se esbranquiçadas, devido à lesão (queimadura) induzida. Durante os dias de ensaio, macroscopicamente, não foi observada uma eficiência nos quadrantes tratados com cremes de FH, estes durante os dez dias de avaliação, apresentaram-se muito semelhantes ao quadrante tratado com creme base, com presença de forte sangramento e feridas bem abertas observados, principalmente, durante o quinto e sexto dia de análise (Figura 22). Além disso, a partir do oitavo dia foi observado o surgimento de uma reação de hipersensibilidade ao redor das lesões tratadas com os cremes de FH nas concentrações de 10 e 20%, em praticamente, todos os animais (Figura 22). A partir do sétimo dia, o quadrantes

1 (tratado com sulfadiazina de prata) apresentava lesões, totalmente cicatrizadas, confirmando sua eficácia terapêutica.

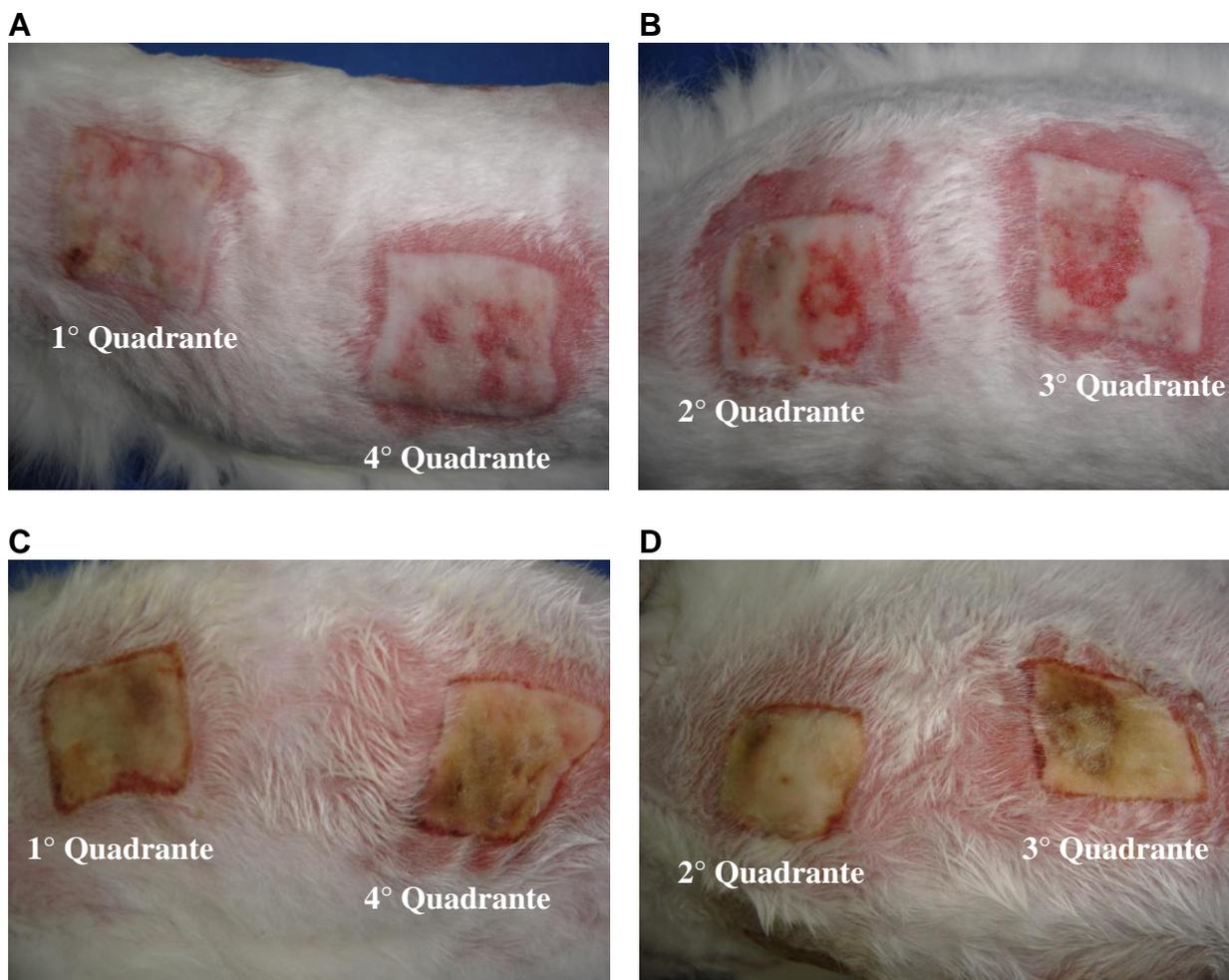


Figura 22 – Evolução das lesões no coelho número 07 tratado com creme contendo fração hexânica das sementes de *Pterodon emarginatus* Vogel no quinto (A e B) e oitavo dias (C e D). 1° quadrante: sulfadiazina de prata 1%; 2° quadrante: creme base; 3° quadrante: FH 10% e 4° quadrante: FH 20%.

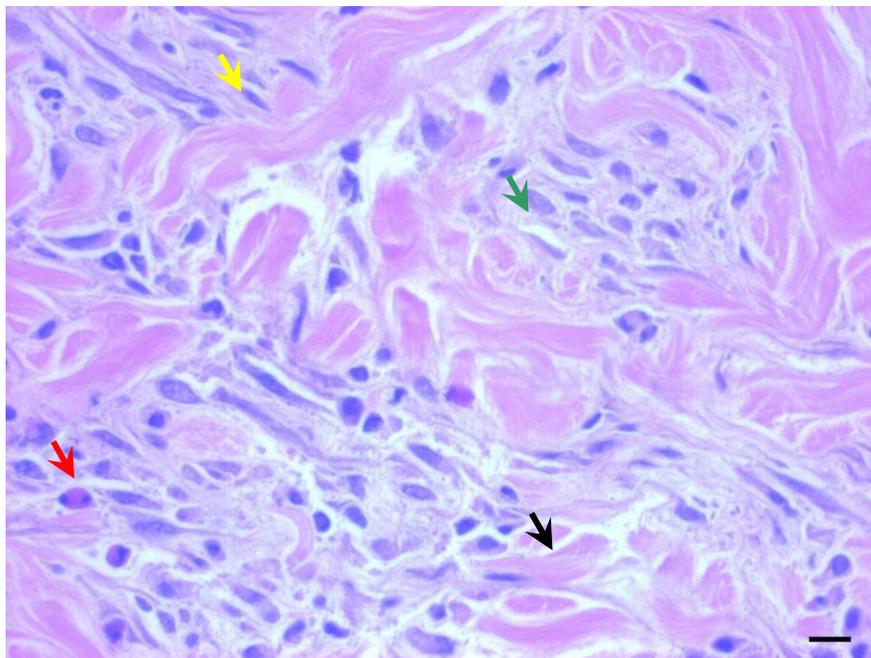
4.11.2 Histopatologia e morfometria

As análises histopatológicas e morfométrica foram realizadas para a comparação quantitativa entre os cremes testes e controles, através da análise das lâminas obtidas das lesões. Foram analisadas características como número de células inflamatórias (leucócitos polimorfonucleares – PMN), número de fibroblastos, número de vasos sanguíneos e área de colágeno.

As Figuras 23.A, 23.B e 23.C mostram as imagens capturadas das áreas tratadas com creme base (controle negativo) e sulfadiazina de prata 1% (controle positivo), OE nas concentrações de 5% e 10% e FH nas concentrações de 10% e 20%, respectivamente. Nas fotos estão em destaque os parâmetros avaliados neste estudo: número de células inflamatórias, número de fibroblastos, número de vasos sanguíneos e área de colágeno.

A administração dos cremes contendo OE nas duas concentrações testadas apresentou uma diminuição no número de células inflamatórias comparado ao grupo tratado com a sulfadiazina de prata (medicamento de referência), porém não foi observada diferença significativa quando comparado ao grupo tratado apenas com o creme lanette (Figura 24.A). As áreas tratadas com sulfadiazina de prata 1% e OE nas concentrações testadas apresentaram um maior número de fibroblastos em comparação com a área tratada apenas com creme base ($p < 0,01$) (Figura 24.B). O creme contendo OE na concentração de 10%, assim como a área tratada com sulfadiazina de prata 1% aumentou o número de vasos sanguíneos em comparação com a área tratada com o creme lanette ($p < 0,01$) (Figura 24.C). Não foi observado efeito das áreas tratadas com sulfadiazina de prata 1% e OE em ambas as concentrações, na área de colágeno (Figura 24.D).

1



2

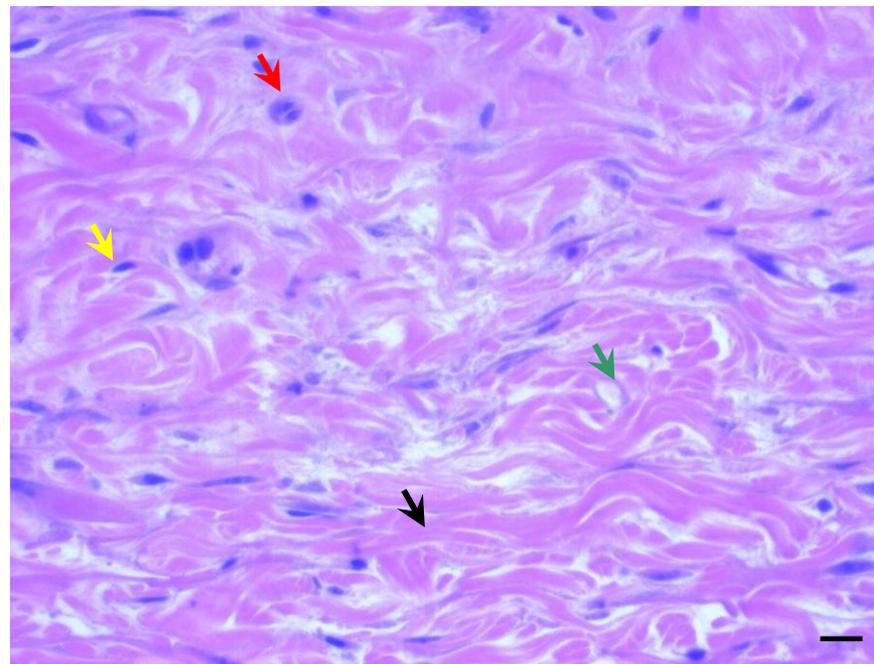
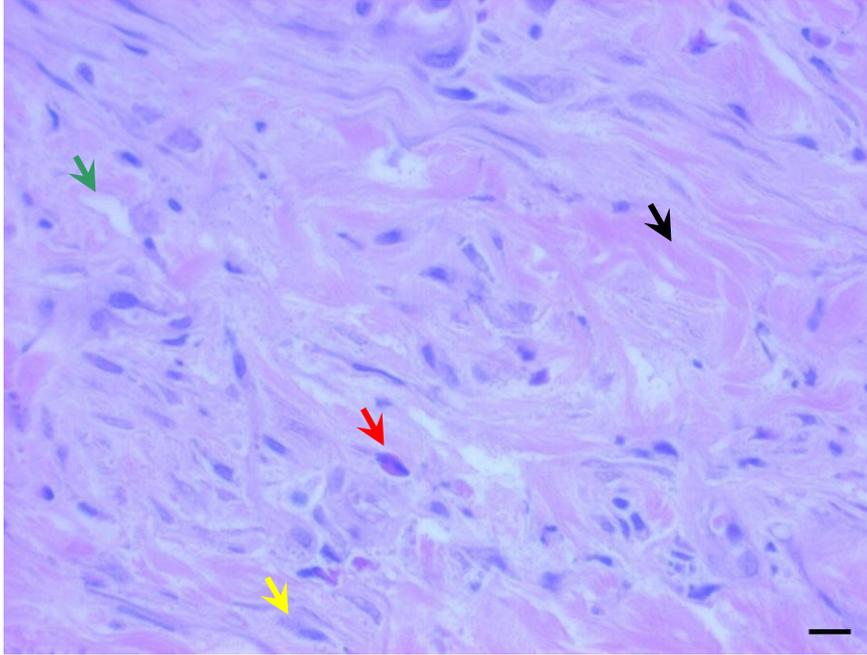


Figura 23.A – Aspecto histológico da área tratada com creme base (controle negativo – 1) e sulfadiazina de prata 1% (controle positivo – 2), com presença de células inflamatórias (setas vermelhas), fibroblastos (setas amarelas), vasos sanguíneos (setas verdes) e colágeno (setas pretas). Lâminas coradas com hematoxilina-eosina, analisadas sob microscópio óptico (400x), digitalizadas por meio do *software* Image-Proplus (Media Cybernetics). Barra correspondente a 10 μ m.

3



4

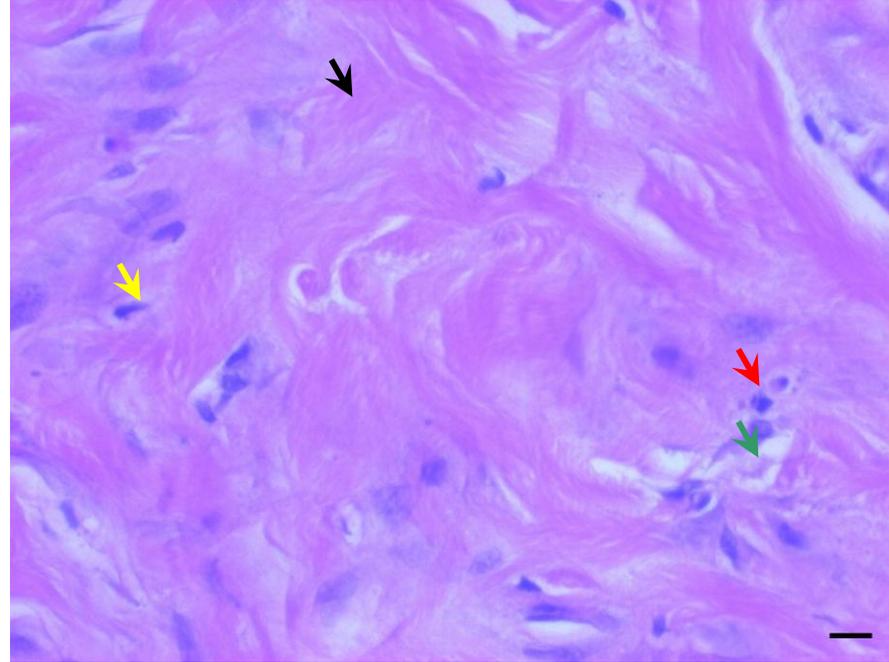
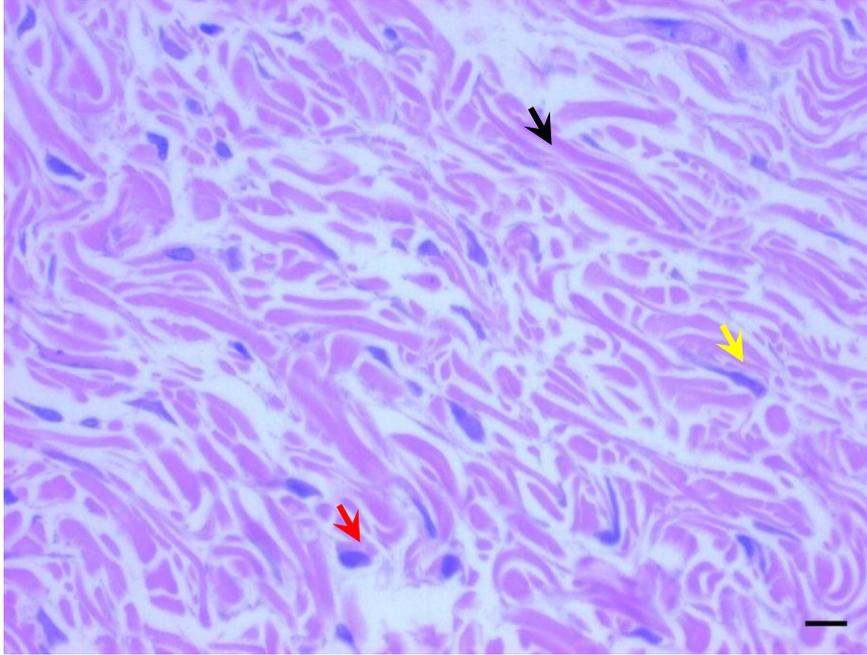


Figura 23.B – Aspecto histológico da área tratada com OE 5% (3) e OE 10% (4), com presença de células inflamatórias (setas vermelhas), fibroblastos (setas amarelas), vasos sanguíneos (setas verdes) e colágeno (setas pretas). Lâminas coradas com hematoxilina-eosina, analisadas sob microscópio óptico (400x), digitalizadas por meio do *software* Image-Proplus (Media Cybernetics). Barra correspondente a 10 μ m.

5



6

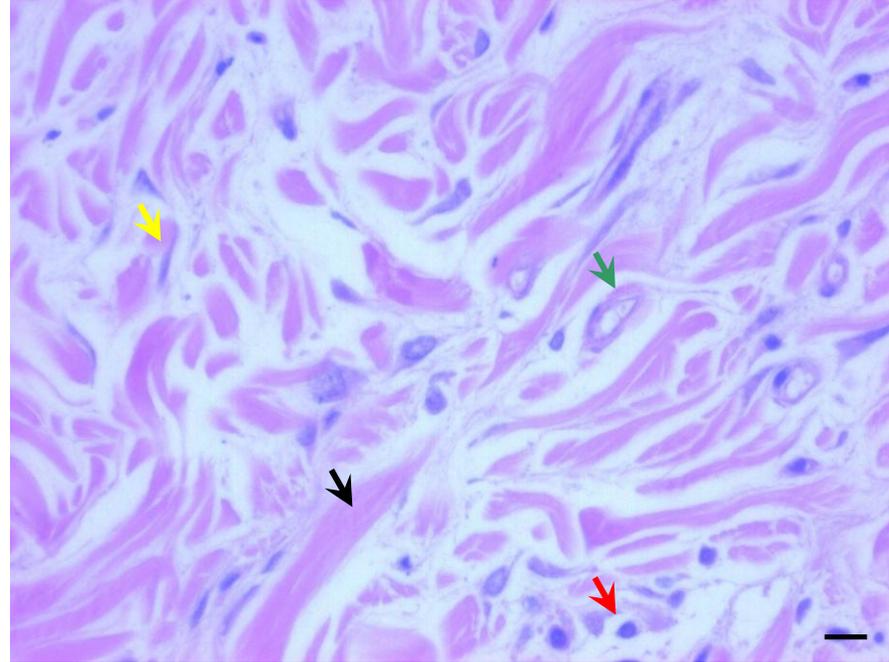


Figura 23.C – Aspecto histológico da área tratada com FH 10% (5) e FH 20% (6), com presença de células inflamatórias (setas vermelhas), fibroblastos (setas amarelas), vasos sanguíneos (setas verdes) e colágeno (setas pretas). Lâminas coradas com hematoxilina-eosina, analisadas sob microscópio óptico (400x), digitalizadas por meio do *software* Image-Proplus (Media Cybernetics). Barra correspondente a 10 μ m.

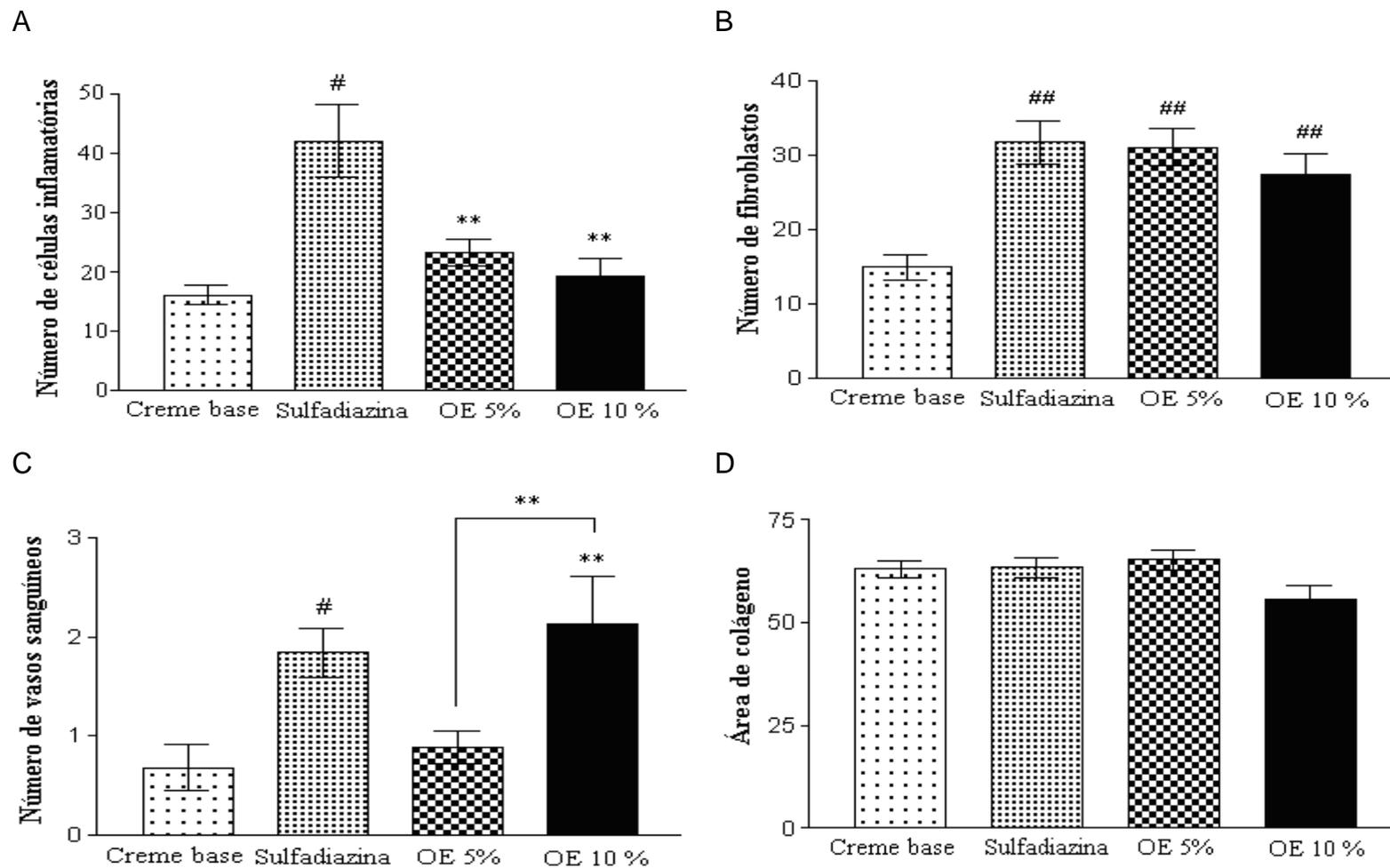


Figura 24 – Efeito do pré-tratamento do creme de óleo essencial de *Pterodon emarginatus* (5% e 10%, durante 10 dias consecutivos) no número de células inflamatórias (A), número de fibroblastos (B), número de vasos sanguíneos (C) e na área de colágeno (D) em coelhos albinos submetidos ao modelo experimental de queimadura induzida. Creme base, área tratada apenas com creme base. Sulfadiazina, área tratada com sulfadiazina de prata 1%. Dados são expressos como média \pm E.P.M. (n=5/grupo). Diferenças estatisticamente significativa (ANOVA seguida pelo Teste de Bonferroni) quando comparado ao creme base (#) ou tratado com sulfadiazina (**).

p<0,01.

A administração dos cremes contendo FH nas duas concentrações testadas apresentou uma diminuição no número de células inflamatórias comparado ao grupo tratado com a sulfadiazina de prata (medicamento de referência), porém não foi observada diferença significativa quando comparado ao grupo tratado apenas com o creme lanette (Figura 25.A). As áreas tratadas com sulfadiazina de prata 1% e FH na concentração de 10% apresentaram um maior número de fibroblastos em comparação com a área tratada apenas com creme base ($p < 0,01$) (Figura 25.B). O creme contendo FH na concentração de 20%, assim como a área tratada com sulfadiazina de prata 1% aumentou o número de vasos sanguíneos em comparação com a área tratada com o creme lanette ($p < 0,01$) (Figura 25.C). Não foi observado efeito das áreas tratadas com sulfadiazina de prata 1% e FH em ambas as concentrações, na área de colágeno (Figura 25.D).

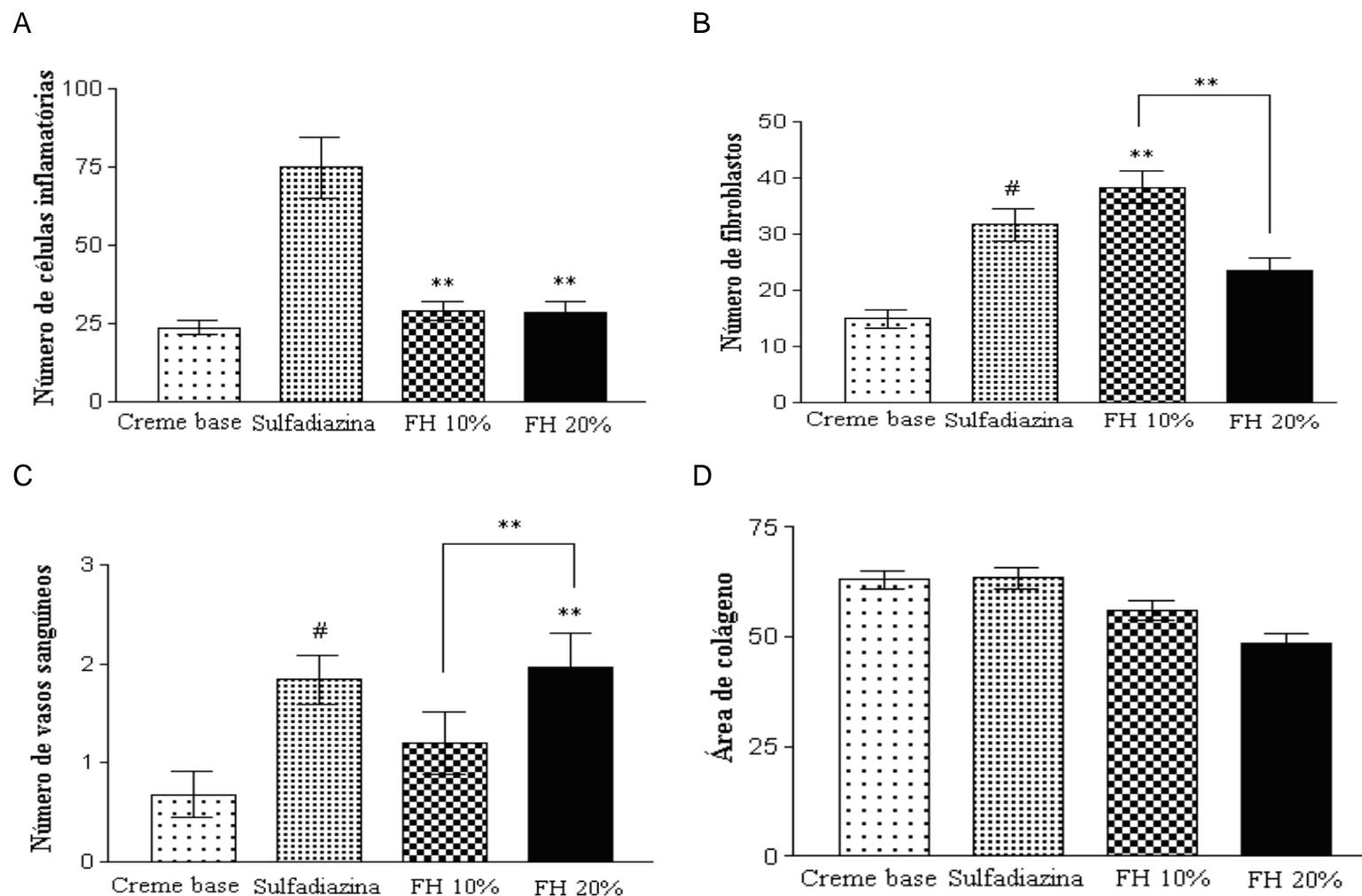


Figura 25 – Efeito do pré-tratamento do creme contendo fração hexânica de *Pterodon emarginatus* (5% e 10%, durante 10 dias consecutivos) no número de células inflamatórias (A), número de fibroblastos (B), número de vasos sanguíneos (C) e na área de colágeno (D) em coelhos albinos submetidos ao modelo experimental de queimadura induzida. Creme base, área tratada apenas com creme base. Sulfadiazina, área tratada com sulfadiazina de prata 1%. Dados são expressos como média \pm E.P.M. (n=5/grupo). Diferenças estatisticamente significativa (ANOVA seguida pelo Teste de Bonferroni) quando comparado ao creme base (#) ou tratado com sulfadiazina (*). ** $p < 0,01$.

4.12 Atividade gastroprotetora

No presente estudo, o OE foi avaliado no modelo de úlceras gástricas induzidas por etanol absoluto, os resultados são mostrados na Figura 26.A e 26.B. A administração oral de 0,2 mL produziu severas lesões gástricas no grupo tratado apenas com salina (controle negativo). O tratamento oral dos animais com OE (100, 300 e 500 mg/kg) e ranitidina (60 mg/kg) reduziu significativamente o número de úlceras e o índice ulcerogênico (IU) em comparação com o grupo controle negativo ($p < 0,05$). O percentual de inibição das úlceras foi de 88%, 87%, 80% e 66% para os grupos tratados com 100, 300 e 500 mg/kg do OE de *Pterodon emarginatus* e controle positivo (ranitidina), respectivamente.

A Figura 26.C mostra o número de úlceras e o IU produzido pela administração oral de indometacina (20 mg/kg). O grupo controle (salina, v.o.) apresentou um número de úlceras $8,00 \pm 1,71$ e IU de $12,33 \pm 1,86$, enquanto os animais pré-tratados com OE das sementes de *Pterodon emarginatus* apresentaram nas doses utilizadas (100, 300 e 500 mg/kg) elevada redução no número de lesões 87%, 86% e 79%, respectivamente quando comparados ao grupo tratado apenas com salina e o IU em 70%, 69% e 62%, respectivamente. A ranitidina apresentou uma redução no número de úlceras em 92% e o IU em 72%.

Os resultados da atividade antiulcerogênica do OE no modelo de úlceras induzidas pela administração da solução de HCl-etanol são mostrados na Figura 26.D. Administração oral da solução de HCl-etanol claramente produziu danos à mucosa estomacal, caracterizados por múltiplos pontos hemorrágicos de diferentes tamanhos ao longo da mucosa gástrica. O pré-tratamento dos animais com OE produziu significativa atividade gastroprotetora de forma dose-dependente, comparado com o grupo controle. O percentual de inibição das úlceras foi de 46%, 78%, 79% e 82% para os grupos tratados com 100, 300 e 500 mg/kg do OE de *Pterodon emarginatus* e controle positivo (omeprazol), respectivamente.

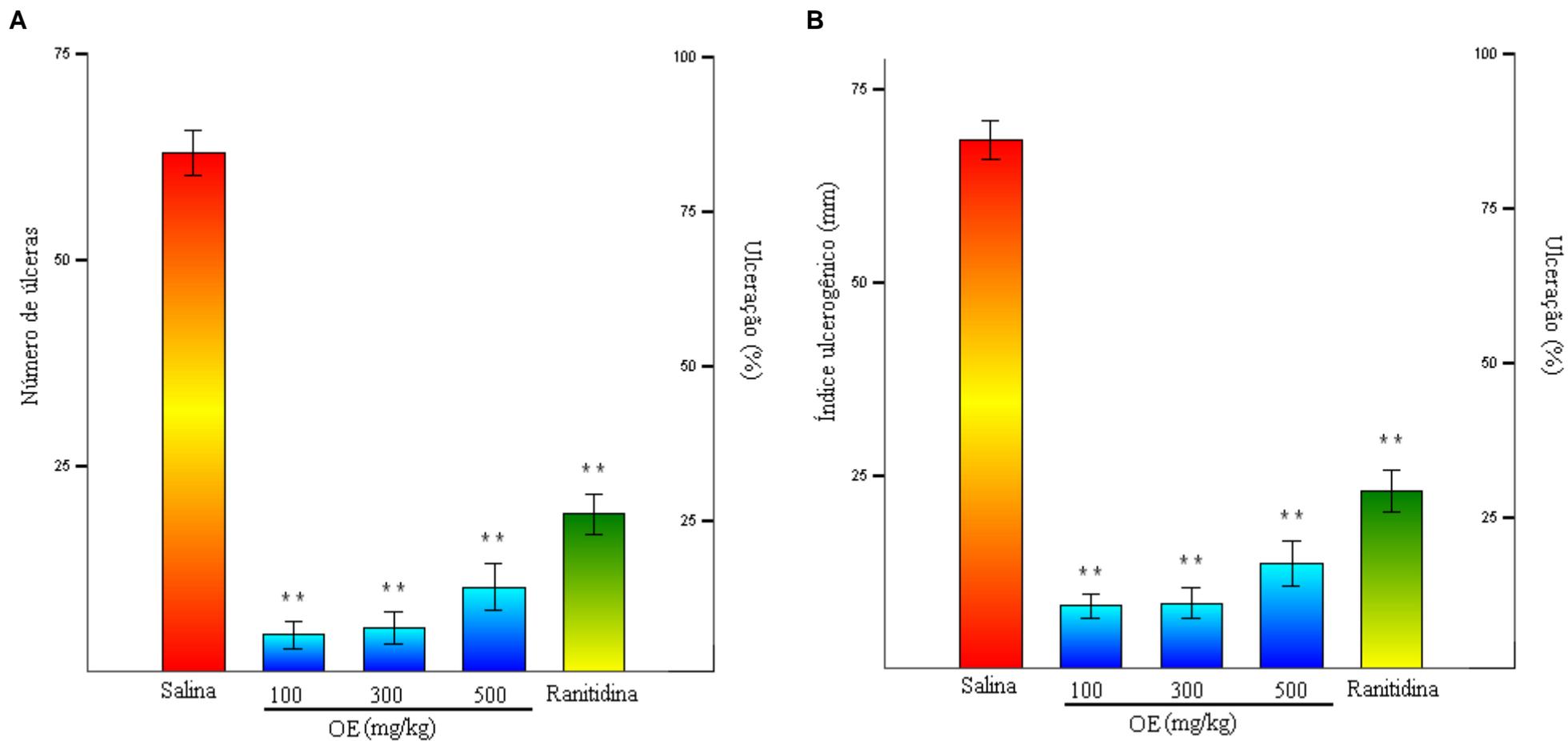


Figura 26.A – Efeito do óleo essencial (OE A e B, v.o.) das sementes de *Pterodon emarginatus* sobre o número de úlceras e índice ulcerogênico induzida por etanol absoluto em camundongos. Ranitidina (60 mg/kg). Dados são expressos como média \pm E.P.M. de 6 camundongos por grupo. ** $p < 0,001$ indica diferença significativa comparado ao grupo salina (ANOVA; Teste de *Bonferroni*).



Figura 26.B – Efeito do óleo essencial (OE C, D, E e F, v.o.) obtido das sementes de *Pterodon emarginatus* no número de úlceras e índice ulcerogênico induzida por etanol absoluto em camundongos. Ranitidina (60 mg/kg).

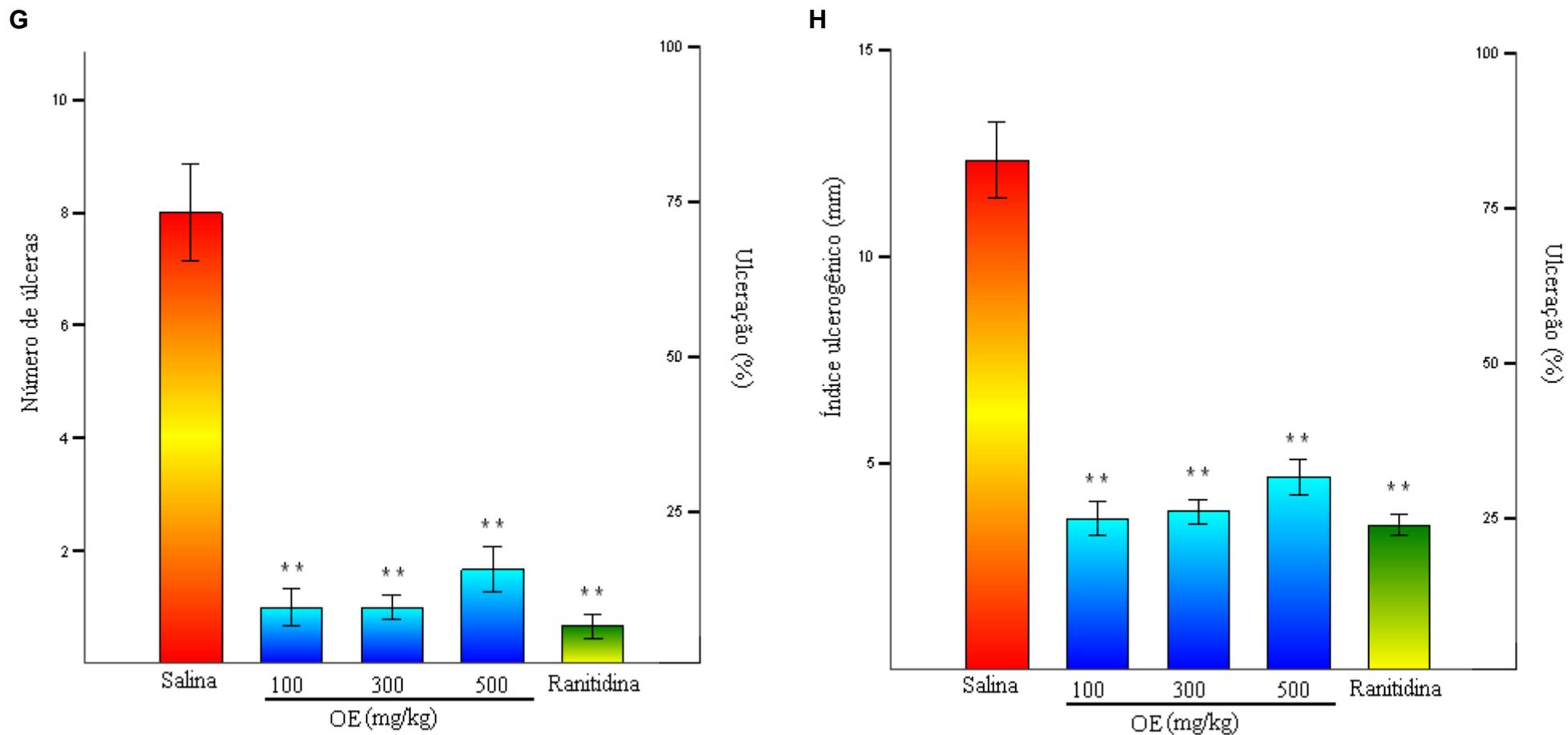


Figura 26.C – Efeito do óleo essencial (OE G e H, v.o.) obtido das sementes de *Pterodon emarginatus* no número de úlceras e índice ulcerogênico induzida por indometacina em camundongos. Ranitidina (60 mg/kg). Dados são expressos como média \pm E.P.M. de 6 camundongos por grupo. ** $p < 0,001$ indica diferença significativa comparado ao grupo salina (ANOVA; Teste de *Bonferroni*).

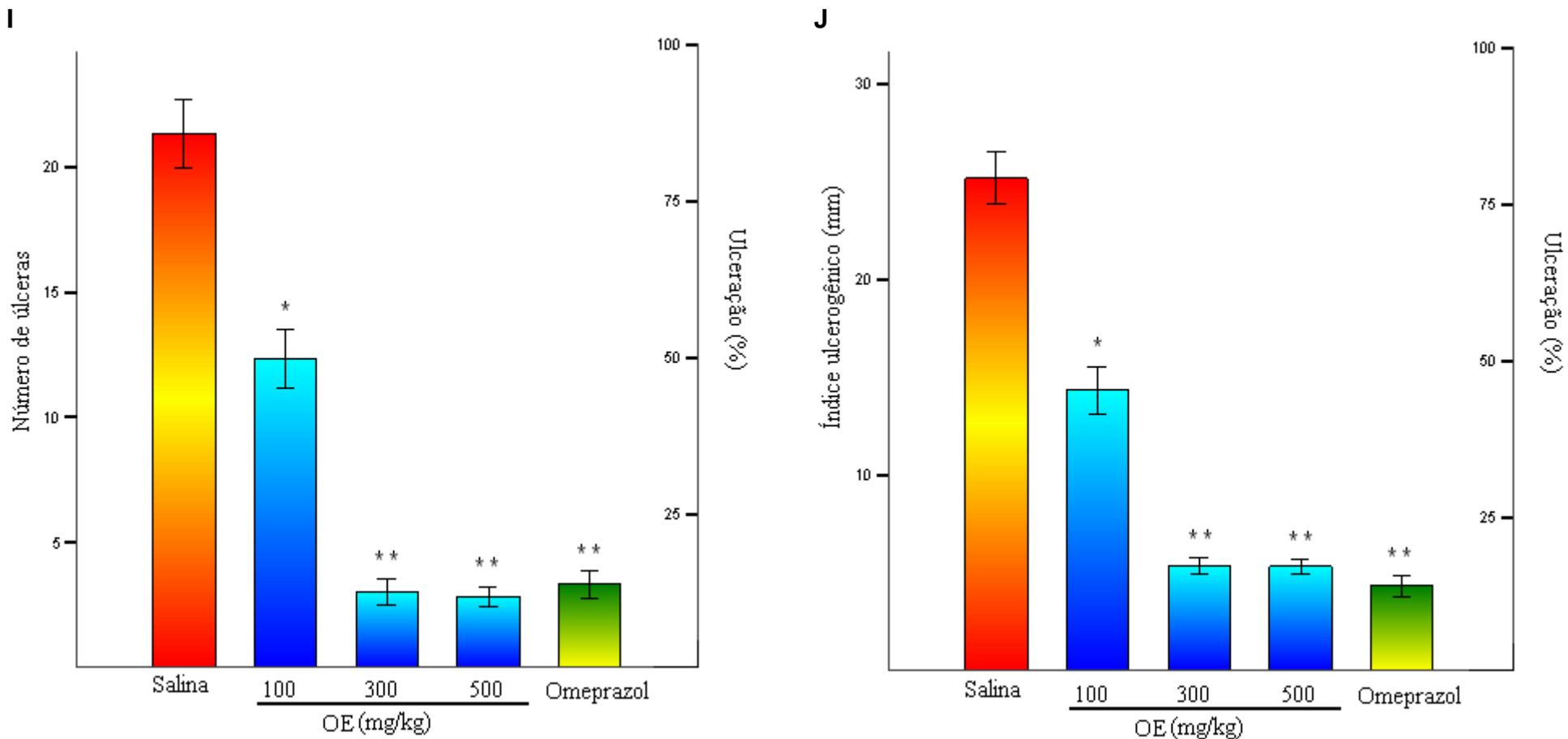


Figura 26.D – Efeito do óleo essencial (OE I e J, v.o.) obtido das sementes de *Pterodon emarginatus* no número de úlceras e índice ulcerogênico induzida por HCl/etanol em camundongos. Ranitidina (60 mg/kg). Dados são expressos como média \pm E.P.M. de 6 camundongos por grupo. * $p < 0,05$; ** $p < 0,001$ indica diferença significativa comparado ao grupo salina (ANOVA; Teste de *Bonferroni*).

4.13 Atividade antiinflamatória

4.13.1 Migração leucocitária e volume de exsudato

O OE de *Pterodon emarginatus* (300 e 500 mg/kg, v.o.) causou uma marcante redução no volume de exsudato produzido (53%, 47%; Figura 27.A), na migração leucocitária (17%, 46%; Figura 27.A) e no número de leucócitos polimorfonucleares presentes na cavidade pleural (63%, 66%; Figura 27.B), comparado com o grupo tratado apenas com a carragenina. Por outro lado, nenhum efeito foi observado no número de leucócitos mononucleares (Figura 27.B). Indometacina, antiinflamatório não-esteroidal e celecoxib, inibidor seletivo de ciclooxigenase 2 (COX-2), apresentaram efeito similar no volume de exsudato, no número total de leucócitos e no número de leucócitos polimorfonucleares (Figura 27 A-D).

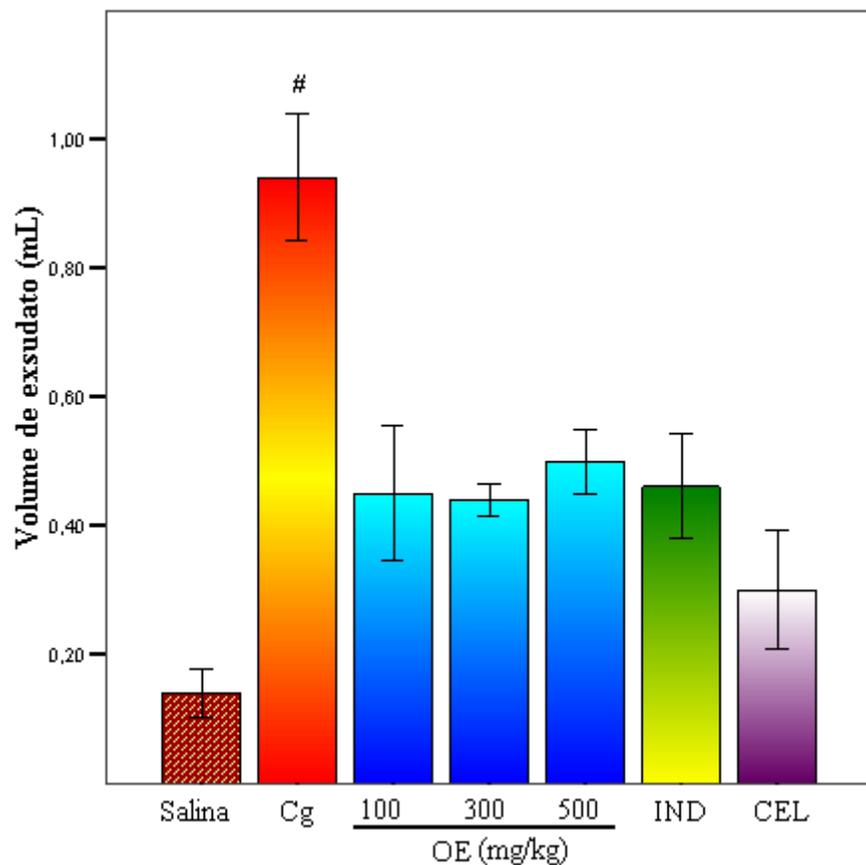
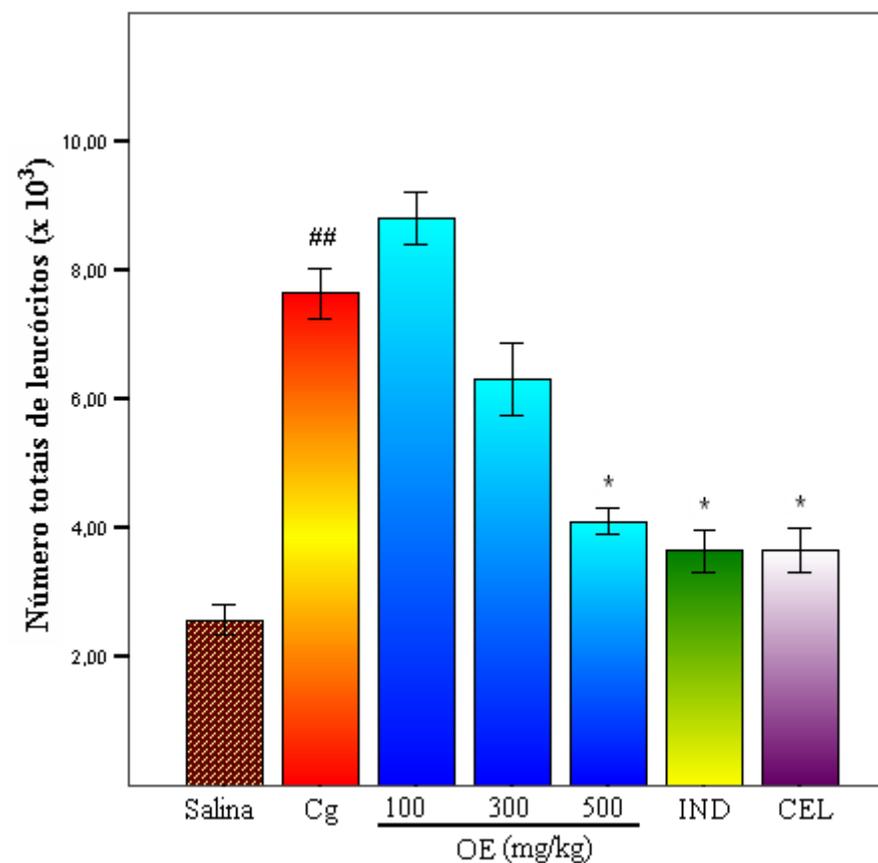
A**B**

Figura 27.A – Efeito do pré-tratamento com OE de *Pterodon emarginatus* (100 – 500 mg/kg, v.o., 1 h antes da injeção de carragenina) no volume de exsudato (A) e número total de leucócitos (B) no modelo de pleurisia induzida por carragenina. Salina, corresponde aos animais tratados apenas com salina estéril (NaCl 0,9%). Cg corresponde aos animais tratados apenas com carragenina. IND corresponde aos animais tratados com indometacina (10 mg/kg, v.o., 1 h antes da injeção de carragenina). CEL corresponde aos animais tratados com celecoxib (18 mg/kg, v.o., 1 h antes da injeção de carragenina). Dados são expressos como média \pm E.P.M. (n=8/grupo). Diferenças estatisticamente significante (ANOVA seguida pelo Teste de Bonferroni) quando comparado ao grupo salina (#) ou tratado apenas com carragenina (*). * p<0,05

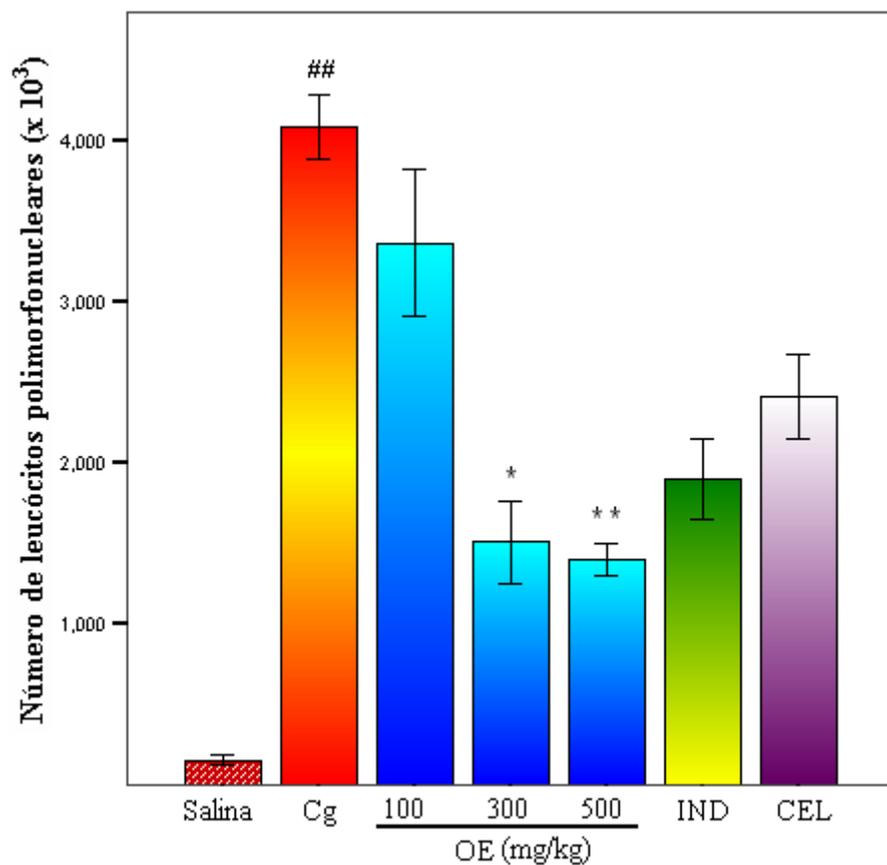
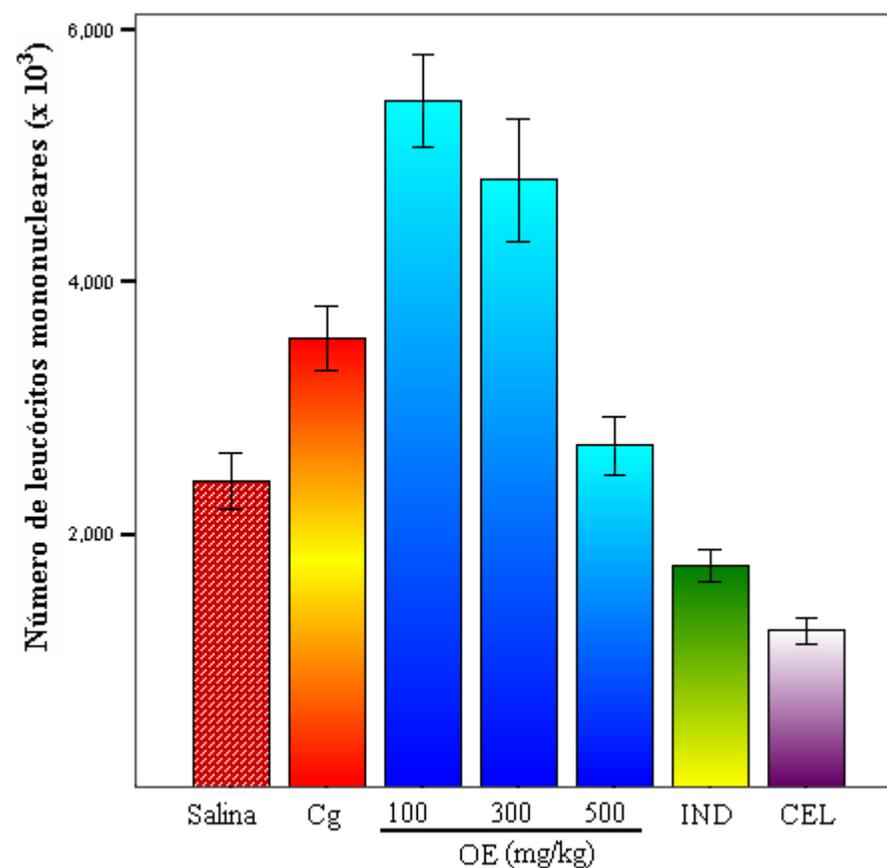
C**D**

Figura 27.B - Efeito do pré-tratamento com OE de *Pterodon emarginatus* (100 – 500 mg/kg, v.o., 1 h antes da injeção de carragenina) no número de leucócitos polimorfonucleares (C) e mononucleares (D) no modelo de pleurisia induzida por carragenina. Salina, corresponde aos animais tratados apenas com salina estéril (NaCl 0,9%). Cg corresponde aos animais tratados apenas com carragenina. IND corresponde aos animais tratados com indometacina (10 mg/kg, v.o., 1 h antes da injeção de carragenina). CEL corresponde aos animais tratados com celecoxib (18 mg/kg, v.o., 1 h antes da injeção de carragenina). Dados são expressos como média \pm E.P.M. (n=8/grupo). Diferenças estatisticamente significante (ANOVA seguida pelo Teste de Bonferroni) quando comparado ao grupo salina (#) ou tratado apenas com carragenina (*). * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

4.13.2 Concentração de NO

O pré-tratamento (1 h) dos animais com o OE de *Pterodon emarginatus* diminuiu significativamente a concentração de NO, com percentual de inibição de 88%, 78% e 82%, respectivamente para as doses de 100, 300 e 500 mg/kg ($p < 0,001$) (Figura 28).

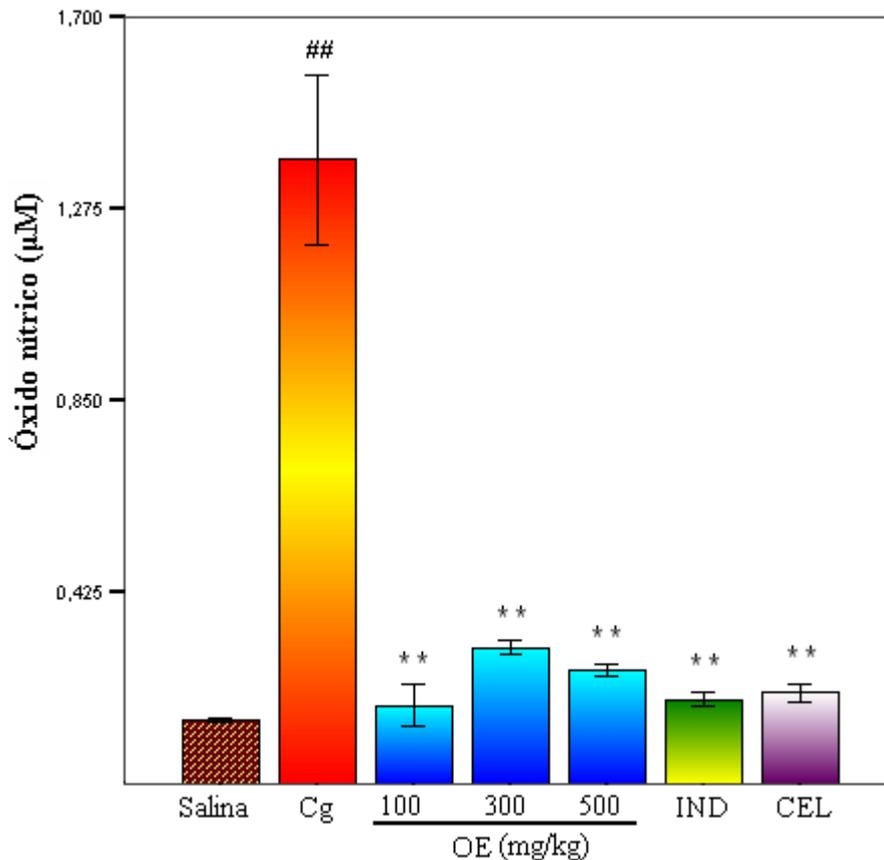


Figura 28 – Efeito do pré-tratamento com OE de *Pterodon emarginatus* (100 – 500 mg/kg, v.o., 1 h antes da injeção de carragenina) na concentração de nitrato/nitrito (NO) (A) no modelo de pleurisia induzida por carragenina. Salina, corresponde aos animais tratados apenas com salina estéril (NaCl 0,9%). Cg corresponde aos animais tratados apenas com carragenina. IND corresponde aos animais tratados com indometacina (10 mg/kg, v.o., 1 h antes da injeção de carragenina). CEL corresponde aos animais tratados com celecoxib (18 mg/kg, v.o., 1 h antes da injeção de carragenina). Dados são expressos como média \pm E.P.M. ($n=8$ /grupo). Diferenças estatisticamente significante (ANOVA seguida pelo Teste de Bonferroni) quando comparado ao grupo salina (#) ou tratado apenas com carragenina (*). * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

4.14 Citotoxicidade

Para avaliar a atividade citotóxica *in vitro* do OE das sementes de *Pterodon emarginatus* foram utilizadas 6 linhagens de células tumorais e 2 linhagens de células normais e os valores de CI_{50} foram determinados a partir da curva dose-resposta. Os valores das CI_{50} e os percentuais de inibição do OE são mostrados na Tabela 14.

O OE foi ativo contra todas as células testadas, incluindo as linhagens normais. O percentual de células mortas, na concentração máxima testada, foi de 55,6 – 98,4 %. O menor valor de CI_{50} foi obtido para a linhagem celular normal C_6 (24,9 $\mu\text{g/mL}$), enquanto o percentual máximo obtido (98,4%) foi para a linhagem de melanoma humano.

Tabela 14 – Citotoxicidade celular do OE obtido das sementes de *Pterodon emarginatus* em diferentes linhagens tumorais (CI_{50} $\mu\text{g/ mL}$).

	Linhagens celulares	CI_{50} ($\mu\text{g/mL}$)
Células tumorais	C_6 – glioma de rato	24,9
	MeWO – melanoma humano	25,5
	$CT_{26.WT}$ – carcinoma de cólon de camundongos	32,0
	MDA – câncer de mama	33,5
	A_{549} – carcinoma de pulmão	47,0
	$B_{16}F_1$ – melanoma de camundongo	43,4
Células normais	CHO – ovário de hamster normal	25,2
	BHK – fibroblasto de rim de hamster normal	38,0

5 DISCUSSÃO

Atualmente, a pesquisa de novos fitomedicamentos tem recebido muita atenção tanto por parte da comunidade científica, quanto pelas indústrias farmacêuticas. 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. Por esta razão, tornam-se necessários estudos mais detalhados no sentido de verificar e assegurar sua qualidade, segurança e eficácia.

5.1 Triagem fitoquímica

A pesquisa fitoquímica tem como objetivo principal 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 certa 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 e, neste estudo, demonstraram a presença de flavonóides, leucoantocianidinas, taninos, cumarinas, saponinas, triterpenos/esteróides e óleo essencial (OE), nas sementes de *Pterodon emarginatus* (Tabela 2), assim como taninos e heterosídeos cardiotônicos na fração hexânica (FH) (Tabela 3); flavonóides, leucoantocianidinas, taninos, heterosídeos e saponinas, na fração acetato de etila (FA) (Tabela 4); flavonóides, leucoantocianidinas, cumarinas e saponinas, na fração butanólica (FB) (Tabela 5) e flavonóides, leucoantocianidinas, heterosídeos cardiotônicos, cumarinas, saponinas e antraquinonas, na fração metanólica (FM) (Tabela 6), obtidas das sementes de *Pterodon emarginatus*. Os teores de cinzas totais e umidade para as sementes de *Pterodon emarginatus* foram,

respectivamente, de 0,46% e 3,08% o que está de acordo com os valores preconizados por Farias (2003).

A ausência ou presença de certos constituintes químicos detectados na triagem fitoquímica podem ser explicadas pela época da colheita, pelo manejo e acondicionamento da planta ou pela degradação dos constituintes por fatores ambientais (SIMÕES et al., 2004). Porém, essas reações são, geralmente, inespecíficas e ocorrem em grupos funcionais ou estruturas comuns a várias substâncias, exceto as de alcalóides e antraquinonas, as quais são reações consideradas específicas devido à presença de estruturas típicas a uma única classe de substância.

Os resultados fitoquímicos apresentados neste estudo estão de acordo com Marques et al. (1998), que detectaram a presença de isoflavonas e alguns triterpenos nas sementes de *Pterodon emarginatus*, assim como na madeira. No entanto, nesta triagem não foi possível detectar a presença de alcalóides, encontrados nas cascas das árvores conforme descrito por Torrenegra et al. (1989). Possivelmente, este resultado possa ser justificado pelo fato deste constituinte ser exclusivo das cascas desta espécie ou por este constituinte estar em pequena concentração nas sementes (BROWN JÚNIOR, 1988; CASTELLANI, 1997).

5.2 Análise cromatográfica do óleo essencial

Durante a extração do OE foi verificado um grande rendimento deste (1,4 mL), originado de uma massa de material considerada pequena (25,86 g) de sementes, demonstrando uma priorização anatômica e química na produção dos óleos essenciais, como forma de adaptação ao ambiente. Segundo Carvalho (2004), esta priorização pode ser explicada, pelo menos em parte, pelo fato da espécie *Pterodon emarginatus* ser típica do cerrado brasileiro e, muitas vezes, necessita de fonte de reserva para conseguir sobreviver às alterações bióticas e abióticas.

A análise da composição química do OE revelou o predomínio de sesquiterpenos, assim como detectado por Coelho et al. (2005), que também identificaram estes sesquiterpenos no extrato etanólico, obtido por maceração

estática (15 dias) das sementes de *Pterodon pubescens* Benth (sinonímia botânica com *Pterodon emarginatus* Vogel).

Os constituintes majoritários, no OE das sementes de *Pterodon emarginatus* Vogel foram sesquiterpenos, sendo o *trans*-cariofileno em maior concentração. Esses achados confirmam os propostos por Carvalho (2004), porém não se verificou a presença de α -cariofileno (CARVALHO, 2004) e isoflavonas no OE das sementes de *Pterodon emarginatus* Vogel (BRAZ-FILHO e GOTTLIEB, 1971).

Não foram detectados no OE das sementes de *Pterodon emarginatus* Vogel os diterpenos (FASCIO et al., 1975; ARRIAGA et al., 2000) presentes no extrato etanólico das sementes como, por exemplo, 6 α -hidroxi-7 β -acetoxivouacapano-14(17)-eno, metil 6 α ,7 β -dihidroxivouacapan-17 β -oato e metil 6 α -acetoxi-7 β -hidroxivouacapan-17 β -oato (FASCIO et al., 1975).

Os teores de *trans*-cariofileno (35,9%) e α -humuleno (6,8%) foram considerados elevados, em relação ao rendimento dos outros constituintes identificados no OE das sementes, o que indica uma excelente qualidade do OE, devido à menor formação de óxido de cariofileno e ausência do hipóxido.

5.3 Análise citogenética

O estudo de caracterização citogenética (mitótica) revelou o número cromossômico de $2n = 16$, corroborando com a literatura descrita para caracterização meiótica da espécie (COLEMAN e DEMENEZES, 1980). Desta forma foi possível caracterizar a espécie em estudo, confirmando a identificação botânica. Os cromossomos metafásicos demonstraram um cariótipo unimodal. Esta caracterização foi extremamente importante, já que no começo do presente trabalho, os autores estavam com dificuldade quanto à padronização das sementes utilizadas e após a caracterização citogenética a espécie em estudo foi caracterizada quanto ao real número cromossômico.

5.4 Doseamento dos constituintes fenólicos totais

A análise dos resultados descritos na Tabela 8 mostra que o aumento no teor alcoólico do líquido extrator conduz à maior eficácia na extração de constituintes fenólicos. Pois, quando foram utilizados os métodos a frio de maceração e ultra-som utilizando etanol 70% observou-se elevada concentração de tais constituintes. Comparando os resultados obtidos sob refluxo, com os resultados obtidos quando se utiliza a chapa de aquecimento, observa-se um menor rendimento de fenóis totais (quando se utiliza etanol 50% e 70%), o que implica em dizer, que esta forma de aquecimento direto na chapa, possa estar conduzindo a degradação parcial de tais constituintes. No entanto, quando se utiliza o etanol 30% e água como líquido extrator, observa-se maior rendimento, comparado com o método sob refluxo, o que nos leva a concluir que o aumento no teor aquoso do líquido extrator, sob forte aquecimento, contribui para a extração de taninos de maior peso molecular (SINGLETON e KRATZER, 1973; XU e CHANG, 2007). Dentre os constituintes fenólicos detectados na faixa do comprimento de onda utilizado neste modelo ($\lambda = 760$ nm), podemos sugerir que estamos quantificando taninos hidrolisáveis e outros polifenóis que tenham o ácido gálico em sua estrutura, já que o padrão utilizado (ácido tânico) é um tanino hidrolisável com presença de ácido gálico (BRUNETON, 1991; IKAN, 1991; COSTA, 1994; SANTOS e MELO, 2000). Nas frações obtidas das sementes de *Pterodon emarginatus* não foi possível detectar constituintes fenólicos no modelo utilizado.

A temperatura durante os processos extrativos afeta diretamente a estabilidade dos compostos, devido à decomposição química e enzimática, perda de volatilização ou decomposição térmica (SOONG, 2004). A decomposição térmica é o principal mecanismo pelo quais os compostos fenólicos são reduzidos. Por esta razão, o aquecimento proporcionado pelo método do refluxo é suficiente para a extração dos constituintes polifenólicos, porém o aquecimento direto da chapa provoca a degradação destes.

5.5 Determinação dos teores de flavonóides

A determinação dos teores de flavonóides presentes nas sementes de *Pterodon emarginatus* é mostrada na Tabela 9. Os resultados não demonstraram diferença entre os métodos de extração (refluxo, maceração e ultra-som), porém no método da chapa de aquecimento os teores de flavonóides detectados foram menores, pois sob tais condições pode estar ocorrendo a degradação dos constituintes flavônicos presentes na amostra analisada. Um outro ponto importante evidenciado na análise dos resultados é a elevada concentração de constituintes flavônicos quando foi utilizada a água como líquido extrator. Este resultado sugere que boa parte dos constituintes flavônicos presentes nas sementes de *Pterodon emarginatus* encontram-se na forma de heterosídeos. Tal dado é totalmente plausível, já que os flavonóides podem ser encontrados na natureza no estado livre ou na forma de glicosídeos (BRUNETON, 1991; ROBBERS et al., 1996; ZUANAZZI, 2000). Dentre as frações analisadas, somente as polares (FA, FB e FM) apresentaram constituintes flavônicos, enquanto na fração apolar (FH), não foi possível detectar os constituintes flavônicos. Isto está de acordo, pois os flavonóides, possivelmente na forma de heterosídeos, são constituintes com caráter polar, sendo extraídos de forma mais eficaz com solventes polares (ZUANAZZI et al., 2000).

5.6 Atividade antioxidante (atividade seqüestrante)

O envelhecimento é um processo natural que apresenta 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. O estresse oxidativo de envelhecimento provoca a perda da capacidade funcional associada à senescência, 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).

Atualmente, existe um grande interesse no estudo dos antioxidantes devido, principalmente, às descobertas sobre o efeito prejudiciais dos radicais livres produzidos em excesso no organismo. A oxidação é parte fundamental da vida aeróbica e do nosso metabolismo e, assim, os radicais livres são produzidos naturalmente ou por alguma disfunção biológica. Nos radicais livres, o elétron desemparelhado encontra-se nos átomos de oxigênio ou nitrogênio, sendo denominados espécies reativas de oxigênio (ERO) ou espécies reativas de nitrogênio (ERN) (FINKEL et al., 2000; HALLIWELL et al., 2000; PIETTA et al., 2000; VISIOLI et al., 2000). No organismo, os radicais livres estão envolvidos na produção de energia, fagocitose, regulação do crescimento celular, sinalização intercelular e síntese de substâncias biológicas importantes.

Os antioxidantes são capazes de estabilizar ou desativar os radicais livres antes que ataquem os alvos biológicos nas células (EL-AGAMEY et al., 2004; VALKO et al., 2004). Os antioxidantes provenientes da dieta, mais comumente utilizados pelo organismo a fim de combater os radicais livres, são α -tocoferol (vitamina-E), β -caroteno (pró-vitamina-A), ácido ascórbico (vitamina-C) e compostos fenólicos, dentre os quais se destacam os flavonóides (KANAKIS et al., 2006; HALLIWELL, 2000; PIETTA et al., 2000; BASILE et al., 2005).

De modo geral, os polifenóis, particularmente os flavonóides e taninos, possuem estrutura ideal para o seqüestro de radicais, sendo antioxidantes mais efetivos que as vitaminas C e E (SANTOS e MELO, 2000). A atividade antioxidante dos flavonóides depende da sua estrutura e pode ser determinada principalmente por seis fatores: reatividade como agente doador de hidrogênio e elétrons, estabilidade do radical flavanoil formado, reatividade frente a outros antioxidantes, capacidade de quelar metais de transição e solubilidade e interação com as membranas. A atividade de seqüestro está diretamente ligada ao potencial de oxidação dos flavonóides e das espécies a serem seqüestradas. Quanto menor o potencial de oxidação do flavonóide, maior é sua atividade como seqüestrador de radicais livres (BASILE et al., 2005). Quanto maior o número de hidroxilas, maior a atividade como agente doador de H e de elétrons (CAO et al., 1997).

Flavonóides com potencial de oxidação menor que o dos íons Fe^{+3} e Cu^{+2} e seus complexos podem reduzir esses metais, sendo potencialmente pró-oxidantes, tendo em vista que os íons Fe^{+2} e Cu^{+} participam da reação de *Fenton*, geradora de radicais livres (RICE-EVANS et al., 1997). Flavonóides monohidroxilados

apresentam atividade antioxidante muito baixa, como por exemplo, a 5-hidroxi-flavona. Flavonas que possuem apenas uma hidroxila na posição 3, 6, 3' ou 4', assim como flavanonas que apresentam apenas uma hidroxila na posição 2'-OH, 3'-OH, 4'-OH, 6-OH também mostram fraca atividade antioxidante. A 7-hidroxi-flavanona representa uma exceção, que pode ser justificada pela tendência maior da 7-OH em doar H•, devido à estabilização do radical formado por deslocalização com a carbonila em C-4.

Para a atividade de quelação de metais de transição é fundamental a presença de grupos *orto*-difenólicos, onde o mais comum é o sistema 3',4'-dihidroxi, associado a uma unidade catecol na posição B e/ou estruturas cetol como 4-ceto-3-hidroxi e 4-ceto-5- hidroxi. A substituição de qualquer uma das hidroxilas envolvidas na quelação de metais reduz essa atividade, devido principalmente, ao impedimento estérico provocado. Outros sistemas *orto*-difenólicos em flavonóides menos comuns também podem quelar os metais de transição como, por exemplo, o 6,7-dihidroxi ou 7,8-dihidroxi (RICE-EVANS et al., 1997; BORS et al., 1998; PIETTA et al., 2000) apresentando atividade antioxidante satisfatória.

Constituintes fenólicos e, principalmente, constituintes flavônicos foram evidenciados nas sementes de *Pterodon emarginatus*, conforme descrito anteriormente nas Tabelas 8 e 9. A presença de tais constituintes podem justificar a elevada capacidade antioxidante observada nas FB e FM, o que pode vir a justificar o uso desta semente, como importante modelo a ser utilizado no combate aos radicais livres.

5.7 Toxicidade aguda

O ensaio de letalidade para larvas de *Artemia salina* tem sido introduzido na rotina de muitos grupos de pesquisa envolvidos com isolamento, purificação e elucidação estrutural, já que muitos laboratórios de fitoquímica não estão preparados para a realização de ensaios biológicos mais elaborados como, ensaios farmacológicos *in vivo* (MCLAUGHLIN, 1991; FALKENBERG et al., 1999; MACIEL et al., 2002; RUIZ et al., 2005). Os cistos de *Artemia salina* são de baixo custo e facilmente encontrados no comércio, além de permanecerem viáveis por anos no

estado seco (MEYER et al., 1982). Essas vantagens contribuíram para a popularização do bioensaio, sobretudo a partir da década de 90.

O ensaio foi proposto inicialmente por Michael, Thompson e Abramovitz (1956), posteriormente, desenvolvido por Vanhaecke 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). Solis et al. (1993) propuseram a substituição dos tubos de ensaio pelas microplacas e sugeriram a utilização do ensaio também para triagem de novos fármacos antiespasmódicos e antimaláricos.

Esta metodologia tem sido empregada para detectar toxicidade preliminar de compostos oriundos de algas marinhas (ARA et al., 1999); triagem de toxinas fúngicas (HARWING e SCOTT, 1971); efeitos de exposição a metais pesados (MARTINEZ et al., 1999) e pesticidas (BARAHONA et al., 1999) e, ainda, para testes de toxicidade de materiais de uso odontológico (PELKA et al., 2000).

Dollabela (1997) estabeleceu que extratos vegetais com CL_{50} menor que 145 $\mu\text{g}/\text{mL}$, em modelo experimental de *Artemia salina*, foram capazes de inibir, de maneira dose dependente, a formação de calos em discos de batata, sendo relacionada com a atividade citotóxica. Meyer et al. (1982) determinaram que extratos com valores de CL_{50} menores que 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ em *Artemia salina* foram considerados tóxicos. Leboeuf et al. (1980) propuseram que os extratos brutos com CL_{50} menor que 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ e substâncias puras com CL_{50} menor que 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ fossem consideradas tóxicas. Após a determinação dessa correlação realizada por Meyer (1982), vários estudiosos de produtos naturais passaram a utilizar esta referência para a avaliação prévia de extratos obtidos de plantas (JIMÉNEZ et al., 2001) especificamente para avaliação quanto as atividades antimicrobiana e citotóxica (ALALI et al., 1998; BATTINELLI et al., 2001; COLOMBO et al., 2001; CUNHA, 2002). Além disso, o bioensaio de toxicidade em *Artemia salina* demonstra boa correlação com atividade antitumoral (AJAIYEGBA et al., 2006).

O OE, as FH e FA obtidos das sementes de *Pterodon emarginatus* Vogel, nas concentrações testadas, apresentaram um valor de CL_{50} de 1,63 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 8,06 $\mu\text{g}/\text{mL}$ e 214,90 $\mu\text{g}/\text{mL}$, respectivamente. Destaca-se a atividade do OE, já que este apresentou uma potência de aproximadamente 250 vezes maior que o timol, utilizado como fármaco de referência ($CL_{50} = 480,20 \mu\text{g}/\text{mL}$) quanto à toxicidade em

Artemia salina podendo representar, desta forma, um possível potencial antitumoral. Esta atividade pode estar associada à concentração de flavonóides nas sementes de *Pterodon emarginatus* Vogel, que está presente em grande quantidade, já que diversos trabalhos realizados (SILVA et al., 1995; LEE et al., 1996; HEO, 2001) associam diferentes classes de flavonóides com o controle de cânceres, principalmente, devido ao seu potencial antioxidante.

5.8 Atividade antimicrobiana

O entusiasmo em relação ao uso de plantas medicinais e seus extratos na assistência à saúde podem ser entendidos pela sua aceitabilidade, derivada da inserção cultural e pela atual disponibilidade desses recursos, ao contrário do que ocorre com outros medicamentos, que na sua maioria são dependentes de matéria-prima e tecnologias externas (SCHENKEL et al., 1985; SIMÕES et al., 1986). Segundo Verdi et al. (2005), o uso de plantas para o tratamento de diferentes patologias, incluindo as infecciosas, tem sido extensivamente utilizado pelas pessoas, mesmo estas não tendo comprovação científica. Além disso, a grande incidência de infecções, principalmente em indivíduos imunocomprometidos, justifica a realização de estudos científicos para a descoberta de novos compostos terapêuticos oriundos de material vegetal e/ou por via biotecnológica (MITSCHER et al., 1987; CARRICONDE et al., 1996).

A avaliação da atividade antimicrobiana do OE das sementes de *Pterodon emarginatus* demonstrou que o mesmo apresenta potencial bactericida sobre o crescimento de *S. aureus* ATCC 25923, com uma concentração inibitória mínima (CIM) de 2,5 mg/mL. O mesmo não foi evidenciado com as outras cepas microbianas, pois não houve inibição no crescimento de *Streptococcus mutans* ATCC 25175, *Escherichia coli* ATCC10530, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 90271 e *Candida albicans* ATCC 10231. Desta maneira, o OE das sementes de *Pterodon emarginatus* apresenta possibilidade de ser utilizado como uma alternativa terapêutica, de uso tópico ou sistêmico, contra *S. aureus*, responsável por quadros de piodermites, abscessos, pneumonia, meningite e septicemia (JAWETZ et al., 2000).

Esta atividade pode ser decorrente da presença dos constituintes *trans*-cariofileno e α -humuleno, uma vez que já foi relatada tal atividade para estes constituintes (PICHETTE et al., 2006; SONBOLI et al., 2006).

5.9 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 apresenta elevada taxa de mortalidade em populações da África, Ásia e América Latina (DUJARDIN, 2006; BEZERRA et al., 2006; WHO, 2007). Tanto a leishmaniose visceral (LV) como a leishmaniose tegumentar americana (LTA) ocorre em todo o território nacional, as quais são endêmicas no Nordeste, devido principalmente às características econômicas e culturais dessas populações, predominando principalmente nos estados da Bahia, Ceará, Piauí e Maranhão (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2000; RATH et al., 2003).

O tratamento das leishmanioses é feito à base de antimoniais pentavalentes, anfotericina B e pentamidinas, que são tóxicos, de custo elevado, de difícil administração e para os quais o parasito pode desenvolver resistência (CROFT e COOMBS 2003; RATH et al., 2003;). Novas substâncias ativas como miltefosine, um hexadecil-fosfocolina, têm demonstrado ser efetivos para o tratamento de LV, muito embora apresentem também elevada toxicidade (SINDERMANN et al., 2004). A internação prolongada e a ocorrência de efeitos adversos (alterações cardíacas, renais, pancreáticas e hepáticas) dificultam a adesão do paciente ao tratamento. Considerando as dificuldades de tratamento e a ausência de vacinas, há urgência na busca de novas substâncias terapêuticas, dentre as quais se incluem os fitoterápicos (CARVALHO e FERREIRA, 2001; PAULA et al., 2003; NAKAMURA et al., 2006).

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), as espécies vegetais são a melhor e maior fonte de fármacos para humanidade. Estudos etnobotânicos têm demonstrado a eficácia de plantas no tratamento das leishmanioses tanto por via oral, como na aplicação tópica sobre as lesões cutâneas (FRANÇA et al., 1993; 1996; MATHIAS e EMILY, 1993; SILVA et al., 1995;

MOREIRA et al., 2002). Diversos compostos químicos isolados de extratos vegetais têm demonstrado atividade leishmanicida sobre as formas promastigotas e/ou amastigotas de *Leishmania* em ensaios *in vitro*. Já foi relatada a atividade leishmanicida de terpenóides (SAUVAIN et al., 1996; CAMACHO et al., 2000), aminoglicosteróides e aminosteróides (KAM et al., 1997), naftoquinonas (FOURNET et al., 1992; KAYSER et al., 2000), chalconas (CHEN et al., 1993; BOECK et al., 2006), glicosídeos iridóides (MITTAL et al., 1998), flavonóides (ARAÚJO et al., 1998), lignanas (BARATA et al., 2000; ROYO et al., 2003) e de alcalóides (MAHIOU et al., 1994; FOURNET et al., 1996; QUEIROZ, et al., 1996). Apesar dos vários estudos nesta área, ainda existem muitas espécies vegetais com potencial leishmanicida a serem avaliadas. Diversos autores identificaram alguns destes grupos de constituintes nas sementes de *Pterodon emarginatus* (BRAZ-FILHO e GOTTLIEB, 1971; FASCIO et al., 1976; TORRENEGRA et al., 1989; MARQUES et al., 1998; ARRIAGA et al., 2000), por esta razão, acredita-se que a atividade leishmanicida demonstrada pelas FH e FB possa estar relacionada à presença destes compostos.

Algumas espécies do gênero *Pterodon* possuem importantes diterpenos nas sementes como, por exemplo, 6 α -hidroxi-7 β -acetoxivouacapano-14(17)-eno, metil 6 α ,7 β -dihidroxivouacapan-17 β -oato e metil 6 α -acetoxi-7 β -hidroxivouacapan-17 β -oato (FASCIO et al., 1975) que foram eficientes protetores químicos contra a penetração das cercárias de *Schistosoma mansoni* (MORS et al., 1967; FASCIO et al., 1970; MAHJAN et al., 1970). As frações ativas (FH com IC₅₀ = 50,06 μ g/mL e FB com IC₅₀ = 46,65 μ g/mL) das sementes de *Pterodon emarginatus*, podem possuir estes constituintes, apresentando uma atividade leishmanicida frente às formas promastigotas de *Leishmania amazonensis* podendo representar um alvo potencial para fins terapêuticos. Apesar de a anfotericina B ter sido usada como fármaco de referência, esta não deve servir como única base para comparações, uma vez que a mesma é um produto puro, diferente do óleo e frações de *Pterodon emarginatus* usados neste estudo.

5.10 Atividade antinociceptiva

Estudos preliminares das espécies do gênero *Pterodon* sugerem que as espécies possuem atividade antinociceptiva, suscitando o interesse na continuidade da investigação das propriedades farmacológicas (FASCIO et al., 1975; DUARTE et al., 1992; SILVA et al., 2004). Atualmente, o interesse para o uso clínico de novas substâncias com atividade analgésica utilizadas, principalmente, para o tratamento de vários tipos de dor (tanto de origem neurogênica quanto inflamatória), vem aumentando significativamente. Vários modelos de nocicepção em animais de laboratórios podem ser utilizados para se verificar a atividade analgésica de extratos e seus compostos. No entanto, esses modelos devem exibir desejáveis características, tais como: simplicidade, reprodutibilidade e validade dos resultados obtidos e, principalmente, a possibilidade de serem correlacionados com estudos clínicos (DICKENSON e BESSON, 1997). Por preencherem estes critérios, neste estudo foram adotados os modelos de contorções abdominais induzidas por ácido acético, placa quente e tempo de lambida da pata em camundongos.

O teste das contorções abdominais induzidas pela injeção intraperitoneal de ácido acético é um modelo relativamente simples e com pouca especificidade, mas de fácil observação, rápido e com boa sensibilidade a vários fármacos analgésicos e antiinflamatórios não-esteroidal, bem como os fármacos semelhantes à morfina, além de outros analgésicos que atuam centralmente. Além disso, os resultados obtidos com as várias classes de substâncias analgésicas, neste modelo, mostraram boa correlação com a ação analgésica encontrada em outros modelos pré-clínicos, bem como em estudos clínicos (SIEGMUND et al., 1957 a,b; KOSTER et al., 1959; BLUMBERG et al., 1965).

Foi postulado por Whittle (1964) que o ácido acético atua indiretamente causando a liberação de mediadores endógenos envolvidos na modulação da nocicepção, incluindo a bradicinina, serotonina, histamina e as prostaglandinas. Ribeiro et al. (2000) demonstraram que a nocicepção induzida pelo ácido acético depende da liberação de citocinas, como IL-1 β , TNF- α e a IL-8, a partir de macrófagos e basófilos residentes na cavidade abdominal, e que em conjunto com outros mediadores como, por exemplo, prostaglandinas, podem induzir a nocicepção característica observada nesse modelo.

O OE nas doses de 300 e 500 mg/kg demonstrou atividade antinociceptiva, através do modelo de contorções abdominais, assim como a FH, a qual apresentou a maior atividade biológica neste modelo experimental. A FB apresentou atividade, apenas na dose de 500 mg/kg, enquanto a FM não apresentou atividade antinociceptiva no modelo de contorções abdominais (Figura 18.A e 18.B).

Considerando que a nocicepção de origem neurogênica é complexa e que, até o momento, não existem alternativas terapêuticas satisfatórias para o seu tratamento, esses resultados podem abrir perspectivas para o desenvolvimento de novas moléculas, com potencial terapêutico no tratamento da dor, assim como preconizado por alguns autores (MACFARLANE et al., 1997; FURST, 1999; MILLAN, 1999).

Também foi empregado neste estudo, o modelo de nocicepção que utiliza estímulos nocivos térmicos, como é o caso do modelo da placa quente. Este modelo foi descrito inicialmente por Woolfe e Macdonald (1944) e posteriormente modificado por Eddy e Leimback (1953), sendo bastante sensível para as substâncias que atuam em nível central. Além disso, este teste pode determinar hiperalgesia térmica, servindo como ferramenta para pesquisa de fármacos analgésicos e anti-hiperalgésicos (WOOLFE e MACDONALD, 1944; HWANG e WILCOX, 1987; CARTER, 1991).

O teste da placa quente caracteriza-se por produzir uma resposta rápida ao estímulo nocivo, mediada pela ativação dos neurônios nociceptores (fibras C e A δ), conduzindo o impulso ao corno dorsal da medula espinhal, e posteriormente, a centros corticais, sendo que a resposta é proporcional à frequência e classe de fibras responsáveis pela mensagem (DICKENSON e BESSON, 1997). Estas fibras são estimuladas após a ativação dos receptores vanilóides, entre outros, especificamente o tipo VRL-1, responsáveis pela resposta do aumento da temperatura, sendo os receptores VRL-1 os mais importantes na mediação da resposta a estímulos térmicos nocivos (JULIUS e BASBAUM, 2001).

O OE nas doses de 100, 300 e 500 mg/kg demonstrou atividade antinociceptiva, através do modelo da placa quente, assim como a FH, a qual aumentou o tempo de resposta em 60, 90 e 120 minutos, nas doses de 100 e 300 mg/kg (Figura 19.A). No modelo da placa quente, as FB e FM não apresentaram atividade antinociceptiva (19.B).

Também foi observado que o agonista opióide morfina foi efetivo em aumentar a latência dos animais na nocicepção térmica, conforme descrito na literatura científica (JANSSEN et al., 1963; TABER, 1974; MEYER et al., 1985; NUNEZ-GUILLEN et al., 1997; JULIUS e BASBAUM, 2001).

A atividade antinociceptiva do OE e frações obtidas das sementes de *Pterodon emarginatus* foram confirmadas na nocicepção induzida pela injeção intraplantar de formalina em camundongos. Esse modelo descrito inicialmente em gatos e em ratos por Dubuisson e Dennis (1977), vem desde então, sendo sistematicamente empregado para o estudo de substâncias analgésicas (HUNSKAAR et al., 1985; HUNSKAAR e HOLE, 1987; ROSLAND, 1991; CORRÊA e CALIXTO, 1993; SEGUIN et al., 1995; SANTOS e CALIXTO, 1997a).

O modelo de nocicepção da formalina consiste na injeção intraplantar de solução de formaldeído na pata posterior do animal, a qual desencadeia intensa nocicepção por estimulação direta dos neurônios nociceptores. A nocicepção causada pela injeção intraplantar de formalina é caracterizada por vigorosas lambidas, mordidas e batidas na pata injetada com o irritante. A maioria dos estudos realizados com esse modelo utiliza roedores, predominantemente ratos e camundongos. Este teste é caracterizado por apresentar duas fases distintas de nocicepção, que parecem envolver diferentes mediadores (DUBUISSON e DENNIS, 1977; HUNSKAAR et al., 1985; HUNSKAAR e HOLE, 1987; ROSLAND, 1991; CORRÊA e CALIXTO, 1993; SEGUIN et al., 1995; SANTOS e CALIXTO, 1997a) além de ser considerado atualmente o modelo que mais se aproxima da dor clínica (TJOLSEN e HOLE, 1997).

A primeira fase da nocicepção inicia-se imediatamente após a injeção da formalina, estendendo-se pelos primeiros 5 minutos, o que se acredita ser devido à estimulação química direta dos nociceptores (DUBUISSON e DENNIS, 1977; HUNSKAAR et al., 1985), predominantemente das fibras aferentes do tipo C e, em parte, as do tipo A δ (HEAAPY et al., 1987) e, ainda, esta associada à liberação de aminoácidos excitatórios, óxido nítrico e substância P, dentre outros.

A segunda fase desse modelo ocorre entre 15 – 30 minutos após a injeção de formalina e está relacionada principalmente com a liberação de vários mediadores pró-inflamatórios como a bradicinina, histamina, prostaglandina e serotonina, entre outros (HUNSKAAR e HOLE, 1987; CORRÊA e CALIXTO, 1993; SEGUIN et al., 1995; SANTOS e CALIXTO, 1997a; TJOLSEN e HOLE, 1997).

A injeção intraplantar de solução de formalina 2,5% promoveu uma resposta bifásica para o OE, com duração do tempo de lambida na primeira fase (0-5 minutos) de $31,63 \pm 14,17$ s; $28,38 \pm 5,72$ s e $28,25 \pm 4,19$ s, respectivamente para as doses de 100, 300 e 500 mg/kg e na segunda fase (15-30 minutos) de $53,50 \pm 11,96$ s; $43,75 \pm 18,91$ s e $9,00 \pm 4,41$ s, respectivamente para as doses de 100, 300 e 500 mg/kg (Figura 20.A).

A FM apresentou duração do tempo de lambida na primeira fase (0-5 minutos) $60,50 \pm 11,61$ s; $47,75 \pm 6,13$ s e $44,63 \pm 6,33$ s, respectivamente para as doses de 100, 300 e 500 mg/kg e na segunda fase (15-30) $34,13 \pm 12,38$ s; $35,13 \pm 16,35$ s e $23,50 \pm 10,18$ s, respectivamente para as doses de 100, 300 e 500 mg/kg das sementes de *Pterodon emarginatus* Vogel. Os resultados demonstraram efeito do OE (94% de inibição), assim como da FM (84% de inibição) obtida das sementes de *Pterodon emarginatus*, sendo a inibição produzida por ambos tão significativa como àquela produzida pela morfina (80% de inibição), fármaco de referência utilizado no ensaio (Figura 20.D).

As atividades antinociceptivas descritas para o OE e as frações obtidos das sementes de *Pterodon emarginatus* podem estar relacionadas com a redução dos mediadores inflamatórios ou bloqueio dos receptores destes mediadores resultando, desta maneira, no efeito antinociceptivo periférico, embora neste estudo estes mediadores não tenham sido avaliados. Outra possibilidade para explicar este fato, pode ser um bloqueio associado com a liberação dos eicosanóides, ou seja, determinados constituintes químicos presentes no óleo essencial como, por exemplo, os sesquiterpenos α – humuleno e *trans*-cariofileno (PASSOS et al., 2007) podem inibir a fosfolipase A₂ ou bloquear a enzima ciclooxigenase, evitando, desta maneira, a instalação de um processo inflamatório e doloroso.

Com estes resultados pode-se especular que, principalmente, o OE das sementes de *Pterodon emarginatus* Vogel possa atuar, via inibição da cascata do ácido araquidônico, inibindo a enzima ciclooxigenase e/ou lipoxigenase e conseqüentemente a liberação de prostaglandinas que são importantes mediadores dos processos inflamatórios.

A análise conjunta dos dados oriundos dos modelos de nocicepção utilizados evidencia a potencialidade de se descobrir novas moléculas bioativas com potencial terapêutico para o controle da nocicepção tanto de origem neurogênica, quanto inflamatória a partir das sementes desta planta, já que nos três modelos

nociceptivos utilizados neste estudo, o OE e as frações obtidas das sementes de *Pterodon emarginatus* apresentaram atividade antinociceptiva.

5.11 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. Esses processos compreendem três fases: inflamação, granulação e formação de matriz extracelular (CLARK, 1985).

Atualmente, o medicamento padrão para o tratamento de queimaduras é a Sulfadiazina de prata 1% já que esta tem a capacidade de desbridar tecidos necrosados e combater infecção local (WARD e SAFLE, 1995). A Sulfadiazina de prata 1% é um composto de nitrato de prata e sulfadiazina de sódio, efetivo contra diversos microorganismos como, por exemplo, bactérias gram-negativas como *Escherichia coli*, *Enterobacter*, *Klebsiella ssp* e *Pseudomonas aeruginosa* e gram-positivas como *Staphylococcus aureus*, além de leveduras como *Candida albicans* (FERREIRA et al., 2003). É um medicamento análogo estrutural do ácido para-aminobenzóico (PABA), inibindo competitivamente a dihidropteroato sintase, enzima bacteriana que catalisa a incorporação do PABA no ácido dihidrofólico. Isso impede a biossíntese do ácido dihidrofólico e diminui a quantidade de ácido tetrahidrofólico 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 pus 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 trocado duas vezes ao dia em razão da oxidação da prata (FERREIRA et al., 2003). É facilmente aplicada e removida, não provoca dor e apresenta poucos efeitos colaterais. Como um dos efeitos colaterais, tem sido relatado episódios de leucopenia depois de poucos dias de uso e reações de hipersensibilidade 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 compostos ativos para enriquecer o tratamento dermatológico. O creme Lanette por si só é umectante, conferindo emoliência e suavidade à pele (PRISTA et al., 2002). Neste ensaio, foi utilizado como controle negativo e veicular.

No experimento de cicatrização deste trabalho, o detalhamento da evolução das lesões pôde ser acompanhado utilizando-se 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 (Apêndice).

Através da análise macroscópica, foi observado durante os primeiros 6 dias, um processo de cicatrização e re-epitelização eficiente para os cremes contendo OE, 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. Cabe ressaltar que a partir do oitavo dia, as lesões estavam totalmente cicatrizadas. Tal evolução e melhora não foram observadas nas áreas tratadas com os cremes contendo FH nas concentrações de 10% e 20%.

Na avaliação histopatológica e morfométrica, diversas características que influenciam no processo de cicatrização foram analisadas separadamente. Dentre estas características estão o número células inflamatórias, fibroblastos, vasos sanguíneos e área de colágeno. Desta maneira, os cremes contendo OE (5% e 10%) e FH (10% e 20%) das sementes de *Pterodon emarginatus* foram avaliados.

Um creme cicatrizante deve acelerar a migração e proliferação da principal célula cicatricial, o fibroblasto. Os cremes contendo OE em ambas as concentrações apresentaram um aumento no número de fibroblastos. Em contrapartida, nos cremes formulados com a FH, apenas a concentração de 10%, mostrou-se eficaz em aumentar o número de fibroblastos (Figuras 24 e 25).

Da mesma maneira, um creme cicatrizante deve, em um segundo momento, reduzir a quantidade de células inflamatórias presentes no local da ferida. Ao verificar essa característica após os 10 dias de tratamento, ambos os cremes testados apresentaram uma diminuição significativa no número de células inflamatórias (Figuras 24 e 25).

Durante o processo de cicatrização a neovascularização é essencial durante a proliferação celular, pois permite a troca de gases e a nutrição das novas células metabolicamente ativas (CARVALHO, 2002). No presente estudo, ambos os cremes contendo OE e FH, nas concentrações mais altas, foram capazes de aumentar o número de vasos sanguíneos, caracterizando uma maior atividade cicatrizante.

A cicatrização caracteriza-se por um processo complexo, envolvendo diferentes tipos celulares e uma típica resposta inflamatória. Durante uma resposta inflamatória, as citocinas desempenham papel chave na emissão de sinais de comunicação entre as células, propagação e modulação da resposta inflamatória. As citocinas, geralmente, iniciam sua ação pela ligação a receptores específicos na superfície celular e esta ligação, ativa sistemas de segundos mensageiros intracelulares que, posteriormente, desencadeiam respostas na célula-alvo. Desta forma, as citocinas não funcionam somente como proteínas imunorregulatórias, mas também como fatores de crescimento, diferenciação e morte celular. A maioria tem ações autócrina, atuando sobre os receptores das próprias células que as produzem, ou parácrina, atuando em células-alvo vizinhas ou distantes. Em geral, as citocinas são pleiotrópicas, isto é, têm múltiplos efeitos: uma única citocina pode interagir com mais de um tipo de célula, ter múltiplas atividades biológicas, interagir com outras citocinas, com as quais pode ter sobreposição de atividades (MOSMANN e COFFMAN, 1989).

Dentre as citocinas, o TNF- α apresenta papel essencial na instalação e modulação da resposta inflamatória. O TNF α é produzido, predominantemente, por macrófagos ativados, mas também podem ser secretadas por células T estimuladas pelo antígeno, células NK e mastócitos (SEDGWICH *et al.*, 2000). O TNF- α e a IL-1

estão entre os mais importantes indutores da resposta inflamatória aguda, em que os hepatócitos produzem quantidades aumentadas de certas proteínas plasmáticas, como fator C3 do complemento, proteína C reativa, IL-6 e proteína de ligação da manose. É o TNF- α que faz com que as células endoteliais expressem receptores de superfície, tornando a superfície endotelial adesiva, inicialmente, para os neutrófilos e subsequente, para os monócitos e linfócitos que induzem o recrutamento dos leucócitos para a área inflamada.

Como já demonstrado neste estudo os constituintes majoritários presentes no OE foram: *trans*-cariofileno (35,9%); beta-elemeno (15,3%); germacreno-D (9,8%); alfa-humuleno (6,8%); espatulenol (5,9%); biciclogermacreno (5,5%). Dentre estes constituintes, Abreu Gonzaga et al. (2003), demonstraram que o biciclogermacreno apresenta atividade antiinflamatória e antibacteriana, enquanto Fernandes et al. (2007) demonstraram que os constituintes *trans*-cariofileno e α -humuleno apresentam efeito antiinflamatório no modelo de pleurisia induzida por carragenina em camundongos por inibição na produção de TNF- α . Por esta razão, acredita-se que o efeito cicatrizante apresentado pelo OE neste estudo possa estar diretamente relacionado a estes constituintes que apresentam efeito antiinflamatório comprovado, já que foi observado uma diminuição no número de células inflamatórias nas áreas tratadas por estes cremes.

Carvalho et al. (1999) demonstram o efeito antiinflamatório da FH obtida das sementes de *Pterodon emarginatus* no modelo de edema de pata induzido por carragenina, dexam, histamina e nistatina em ratos *Wistar*, além da inibição da migração leucocitária no modelo de peritonite induzida pela injeção de carragenina. Além disso, Sabino et al. (1999) utilizando modelo de artrite induzida por colágeno tipo III em camundongos *Swiss*, demonstrou que o extrato hidroalcoólico obtido das sementes de *Pterodon pubescens* inibiu a proliferação de linfócito *in vitro*, induziu a apoptose dos linfócitos e inibiu a expressão de citocinas pró-inflamatórias como a IL-6. Por esta razão, o creme contendo a FH das sementes de *Pterodon emarginatus* utilizado neste estudo pode estar apresentando atividade cicatrizante pela inibição do processo inflamatório, re-epitelização tecidual e aumento da vascularização do tecido, já que estes cremes apresentaram a capacidade de diminuir o número de células inflamatórias e aumentar o número de fibroblastos e vasos sanguíneos no local das feridas.

Acredita-se que o constituinte majoritário presente na FH das sementes de *Pterodon emarginatus* seja o ácido $6\alpha,7\beta$ -dihidroxiouacapan-17-óico. Este diterpeno voucapanóide isolado da fração apolar das sementes das espécies do gênero *Pterodon* apresentam grande interesse devido as suas propriedades hipoglicemiantes, anti-reumática, analgésica e antiinflamatória (PIO CORREIA, 1984; MACEDO e FERREIRA, 2004; COELHO et al., 2005). Silva et al. (2004) demonstraram o efeito antiinflamatório do ácido $6\alpha,7\beta$ -dihidroxiouacapan-17-óico caracterizado pela redução do edema de pata induzido pela injeção intraplantar de carragenina, serotonina e histamina na pata de ratos *Wistar*, por esta razão os autores acreditam que o potencial cicatrizante apresentado neste estudo pela FH, possa ser explicado, pelo menos em parte, pelo potencial antiinflamatório do ácido $6\alpha,7\beta$ -dihidroxiouacapan-17-óico.

Desta forma, a análise conjunta dos dados apresentados no modelo de cicatrização após indução de queimaduras em coelhos albinos, evidencia a potencialidade terapêutica dos cremes contendo OE e FH para o tratamento de de queimaduras.

5.12 Atividade gastroprotetora

Em desordens gastrointestinais, as úlceras necessitam estratégias terapêuticas. Diversos medicamentos, incluindo inibidores da bomba de próton e antagonistas dos receptores H_2 são referências neste tipo de patologia, mas estudos clínicos destes medicamentos mostram diversos efeitos colaterais e interações medicamentosas (MCINTOSH et al., 1991; PIPER, 1995; SONTAG, 1997). Por esta razão, o desenvolvimento de novos medicamentos gastroprotetores e a pesquisa para a descoberta de novas moléculas têm ampliado o estudo das plantas medicinais com este propósito. Embora, seja aceito que o surgimento das úlceras ocorra por uma falha no balanço entre fatores agressivos e mecanismos de defesa, acredita-se que os extratos vegetais apresentam efeito por inibir a produção de secreção ácida ou por ativar os mecanismos de defesa da mucosa gástrica (GOYAL e SAIRAM, 2002). Dentre estes mecanismos, merecem destaque o aumento na produção de muco protegendo desta forma a superfície epitelial do estômago ou a

interferência na síntese de prostaglandinas (PG) (CHARLET et al., 1985; BORRELLI e IZZO, 2000). Danos gastrointestinais são causados por diversos agentes químicos (DESAI et al., 1996).

O etanol tem sido amplamente utilizado para o estudo da atividade gastroprotetora de diferentes substâncias. O etanol administrado por via oral (v.o.) em animais de experimentação induz a formação de úlceras pela redução do fluxo sanguíneo na mucosa gástrica e pela produção de muco. Além disso, o etanol diminui os níveis de glutathiona e prostaglandinas, aumenta o processo isquêmico, a liberação de histamina, o efluxo sódio-potássio, assim como a geração de radicais livres e produção de leucotrienos. (GLAVIN e SZABO, 1992). Por esta razão, estas informações sugerem que compostos antioxidantes podem ser efetivos na proteção da mucosa gástrica contra os danos causados pela administração do etanol (SIEGMUND et al., 2003). Além disso, segundo diversos autores, o etanol provoca uma diminuição da função da barreira mucobicarbonato e do grupamento sulfidrílico não-protéico (GSH), aumento da permeabilidade epitelial e danos à mucosa principalmente, devido aos danos vasculares e diminuição do fluxo sanguíneo da mucosa gástrica (REPETTO e LLESUY, 2002; SIEGMUND et al., 2003). Por esta razão, uma possível justificativa para o elevado efeito gastroprotetor do OE seria o aumento da quantidade de GSH na mucosa gástrica, impedindo a ação lesiva dos radicais livres sobre as células.

Neste estudo, o grupo controle tratado com etanol (v.o.), apresentou elevado número de úlceras com áreas de necrose (Figura 26.A e 26.B). Em contrapartida, o pré-tratamento dos animais com OE nas doses de 100, 300 e 500 mg/kg, diminuiu o número de úlceras em 93%, 91% e 84%, respectivamente, quando comparados ao grupo controle e o índice ulcerogênico (IU) em 88%, 87% e 80%. A ranitidina, utilizada como fármaco de referência reduziu o número de úlceras e também o IU em 69% e 66%, respectivamente (Figura 26.A e 26.B).

A inibição da ciclooxigenase pela indometacina, um antiinflamatório não-esteroidal, promove a diminuição da produção de prostaglandinas, responsáveis pela manutenção da integridade da mucosa gástrica (através da inibição da secreção ácida), estimulação da secreção de muco e bicarbonato, inibição da ativação de mastócitos, diminuição da aderência leucocitária ao endotélio vascular, inibição da apoptose, aumento ou manutenção do fluxo sanguíneo da mucosa e assim prevenindo a isquemia (ATAY et al., 2000).

A Figura 26.C mostra o número de úlceras e o IU produzido pela administração oral de indometacina (20 mg/kg). O grupo controle (salina, v.o.) apresentou um número de úlceras $8,00 \pm 1,71$ e IU de $12,33 \pm 1,86$. Por outro lado, os animais pré-tratados com OE das sementes de *Pterodon emarginatus* apresentaram elevada redução no número de lesões 87%, 86% e 79% e no IU em 70%, 69% e 62%, respectivamente para as doses de 100, 300 e 500 mg/kg. A ranitidina apresentou uma redução no número de úlceras em 92% e o IU em 72%.

A indução de úlceras com HCl/etanol em camundongos é possível pela produção de leucotrienos e envolvimento da enzima 5-lipooxigenase. A ação protetora é explicada, possivelmente, pela produção da síntese de PG, o qual está envolvido na proteção da mucosa gástrica (MALAIRAJAN et al., 2007).

Os resultados da atividade antiulcerogênica do OE no modelo de úlceras induzidas pela administração da solução de HCl-etanol são mostrados na Figura 26 D. Administração oral da solução de HCl-etanol claramente produziu danos à mucosa estomacal, caracterizados por múltiplos pontos hemorrágicos de diferentes tamanhos ao longo da mucosa gástrica. O pré-tratamento dos animais com OE produziu significativa atividade gastroprotetora de forma dose-dependente, comparado com o grupo controle. O percentual de inibição das úlceras foi de 46%, 78%, 79% e 82% para os grupos tratados com 100, 300 e 500 mg/kg do OE de *Pterodon emarginatus* e controle positivo (omeprazol), respectivamente. Desta forma, acredita-se que o efeito gastroprotetor apresentado pelo OE de *Pterodon emarginatus* seja devido à interferência na síntese 5-lipooxigenase ou leucotrienos.

A partir dos dados apresentados percebe-se que as concentrações usadas apresentaram um nítido efeito protetor da mucosa gástrica, uma vez que os animais tratados com o OE das sementes de *Pterodon emarginatus* exibiram um menor índice de ulceração de magnitude comparável aos obtidos pelo tratamento prévio com a ranitidina e omeprazol, o que demonstra, objetivamente, atividade protetora desse óleo frente aos efeitos gastrolesivos do etanol, da indometacina e do HCl/etanol, nos modelos experimentais trabalhado.

Embora as doses de OE utilizadas durante os experimentos, fossem maiores do que a dose de ranitidina e omeprazol (fármacos de referência) cabe salientar que o OE não é uma substância pura, além de apresentar constituição e concentração diferentes de diversos constituintes. Um outro ponto importante é que não se sabe a lipossolubilidade do OE, o que pode também interferir na sua

absorção sanguínea e tecidual. Porém, ainda assim uma potente atividade gastroprotetora foi observada nos modelos experimentais utilizados.

5.13 Atividade antiinflamatória

A inflamação é um processo extremamente complexo, o qual é freqüentemente associado à dor envolvendo diversos eventos, como: aumento da permeabilidade vascular, aumento da migração celular de leucócitos granulócitos e mononucleares, assim como proliferação granulocítica tecidual. Medicamentos antiinflamatórios podem atuar em diferentes etapas do processo inflamatório. Por exemplo, podem bloquear a biossíntese de mediadores pró-inflamatórios, pela interação direta com enzima chave (inibição da enzima ciclooxigenase-2 (COX-2)) ou pela diminuição da expressão enzimática (antiinflamatórios esteróides) ou ainda pela redução dos níveis de ácido araquidônico. Além disso, os fármacos antiinflamatórios podem inibir a liberação de outros mediadores inflamatórios, como por exemplo: histamina, bradicinina, prostaglandinas, dentre outros (SAFAIHY e SAILER, 1997).

Diversos protocolos experimentais de inflamação são utilizados a fim de avaliar o potencial antiinflamatório de novos compostos. Neste estudo, investigou-se o potencial antiinflamatório do OE das sementes de *Pterodon emarginatus* no modelo de pleurisia induzida por carragenina. Carragenina administrada na cavidade intrapleural tem sido um dos modelos mais amplamente utilizados para investigar o potencial antiinflamatório de novos compostos, principalmente para a descoberta de novos fitomedicamentos (DI ROSA e WILLOUGHBY, 1971; VINEGAR et al., 1973; FERNANDES et al., 2007; PASSOS et al., 2007). Como esperado, neste estudo a injeção intra-pleural de carragenina causou elevado acúmulo de fluido pleural na cavidade torácica seguida de intensa migração de células inflamatórias (Figura 27.A). O tratamento dos animais com o OE de *Pterodon emarginatus* (100, 300 e 500 mg/kg) reduziu o volume de exsudato produzido em resposta a injeção de carragenina. Além disso, o OE também inibiu a migração total de leucócitos e de leucócitos polimorfonucleares, nas doses de 300 e 500 mg/kg, embora não tenha

apresentado efeito na diminuição da contagem de células mononucleares na cavidade pleural nas doses testadas (Figura 27.A e 27.B).

No modelo de pleurisia induzida por carragenina, a mudança da concentração de nitrato, reflete indiretamente a produção de NO, devido a estimulação constitutiva e/ou induzida da enzima óxido nítrico sintase (iNOS) na cavidade pleural (SALEH et al., 1999; GROOTEMAN et al., 2000; FRÖDE e MEDEIROS, 2001; LAKSHMI et al., 2005). Além disso, NO também modula a migração de neutrófilos *in vitro*, pela influência na expressão das moléculas de adesão do tipo selectina do tipo E (E-selectina) e moléculas de adesão intercelular do tipo 1 (ICAM-1) (WONG et al., 2004). Por esta razão, a elevada diminuição da concentração de NO nos grupos tratados com OE de *Pterodon emarginatus* (100, 300 e 500mg/kg) pode explicar, pelo menos em parte, a diminuição no volume de exsudato produzido, assim como a diminuição da migração total de leucócitos e de leucócitos polimorfonucleares.

Pinheiros e Calixto et al. (2002) demonstraram que a injeção intra-plantar de carragenina nas patas de ratos, aumenta a produção de citocinas pró-inflamatórias no tecido subcutâneo, particularmente interleucina 1 beta (IL-1 β) e fator de necrose tumoral alfa (TNF- α). Atualmente, existem numerosas estratégias terapêuticas capazes de inibir a produção destas citocinas, podendo ser utilizadas para o tratamento clínico de diversos distúrbios inflamatórios crônicos como, por exemplo, artrite reumatóide (VAN ASSCHE e RUTGEERTS, 2000; FELDMANN, 2002). Por esta razão seria interessante verificar a interferência do OE das sementes de *Pterodon emarginatus* na concentração de citocinas pró-inflamatórias como, por exemplo, TNF- α e IL-1 β , a fim de tentar elucidar o mecanismo de ação antiinflamatório apresentado pelo OE neste estudo.

O ensaio de atividade antiinflamatória através do modelo de pleurisia induzida pela injeção intra-pleural de carragenina evidencia a potencialidade de se descobrir novas moléculas bioativas, a partir das sementes desta planta, com potencial terapêutico para o controle e tratamento de desordens inflamatórias agudas e/ou crônicas como, por exemplo, artrite reumatóide, Alzheimer, esclerose múltipla, entre outras.

5.14 Atividade antitumoral

Atualmente existe grande interesse pela comunidade científica na pesquisa de novas substâncias para o tratamento do câncer, especialmente produtos isolados de plantas medicinais. As linhagens celulares tumorais apresentam diferentes escalas de citotoxicidade, por esta razão o uso de células de diversas origens histológicas é necessária para a avaliação da atividade antitumoral dos compostos vegetais.

Após os resultados promissores encontrados no ensaio de citotoxicidade aguda em *Artemia salina*, o OE foi avaliado *in vitro* em diferentes linhagens celulares de câncer e células normais. A atividade citotóxica *in vitro* de extratos vegetais e/ou de substâncias puras é avaliada pela redução do radical MTT nas mitocôndrias (BEEKMAN et al., 1996; KUBO et al., 1996; DIMAS et al., 1998). As mitocôndrias são organelas essenciais que apresentam uma importante função no metabolismo celular, que em condições fisiológicas geram adenosina trifosfato (ATP), após oxidação de substratos, principalmente o succinato (FOWLER et al., 1994). Quando se utiliza o MTT nos ensaios *in vitro*, avalia-se o dano mitocondrial pela redução do MTT através da atividade da enzima succinato desidrogenase. Desta forma, apenas células viáveis são capazes de reduzir o MTT, indicando assim sua viabilidade.

O OE das sementes de *Pterodon emarginatus* apresentou atividade citotóxica frente a todas linhagens celulares tumorais utilizadas. Diversos autores têm estudado o potencial antitumoral de produtos naturais. Kamuhabwa et al. (2000) estudaram 47 extratos de plantas típicas da Tanzânia, enquanto Yoo et al. (2007) estudaram 3 espécies citotóxicas da Coreia. Kaileh et al. (2007) avaliaram o potencial antitumoral de 24 plantas típicas da Palestina e encontraram valores de CI_{50} de 55 a 2000 $\mu\text{g/mL}$. Fiore et al. (2006) avaliaram 6 diferentes espécies de *Salvia* e encontraram valores de CI_{50} que variaram de 89,6 a 405,1 $\mu\text{g/mL}$. Jacaranone, um quinóide isolado da *Senecio ambiguus* por Loizzo et al. (2007), apresentou valores de CI_{50} entre 4,32 – 7,39 $\mu\text{g/mL}$. Em outro estudo, Lin et al. (2004) isolaram o constituintes berberino e coptisino da *Coptis chinensis*, e os valores de IC_{50} para estes compostos foram de 0,6 e 15,2 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. Comparativamente, nossos achados são promissores já que o OE das sementes de

Pterodon emarginatus não é um composto isolado e apresentou valores de CI_{50} baixos (faixa de 22,5 – 47,0 $\mu\text{g/mL}$) frente as linhagens celulares tumorais utilizadas

Os resultados aqui apresentados demonstram que a atividade antitumoral apresentada pelo OE possa estar relacionada com os constituintes majoritário presentes no óleo. Entretanto, os constituintes minoritários, ou o sinergismo entre eles também deve ser considerado. Alfa-humuleno e *trans*-cariofileno foram encontrados no OE das sementes de *Pterodon emarginatus*, assim como em outras espécies (SAROGLOU et al., 2006; PASSOS et al., 2007). Loizzo et al. (2007) identificaram estes constituintes majoritários em diversos extratos vegetais, no qual sugeriram serem, porém não os únicos, os compostos responsáveis pela atividade citotóxica em linhagens celulares tumorais.

Apesar do OE não ter apresentado seletividade quanto a citotoxicidade celular apresentada, este apresenta potencialidade para se descobrir novas moléculas bioativas, a partir das sementes desta planta, com potencial terapêutico para o controle e tratamento de doenças neoplásicas de diferentes origens embrionárias como, por exemplo, melanoma, carcinoma de pulmão e câncer de mama.

6 CONCLUSÕES

É notório o uso de plantas com finalidades terapêuticas por comunidades tradicionais, permitindo que este conhecimento se mantenha incrustado na cultura humana ao longo dos séculos. Os resultados obtidos neste estudo confirmam e estendem os dados descritos na literatura sobre a diversidade das atividades fitoquímicas e farmacológicas das sementes de *Pterodon emarginatus*.

Testes de classe de substâncias revelaram a presença de flavonóides, leucoantocianidinas, taninos, heterosídeos cardiotônicos, cumarinas e saponinas nas sementes, assim como taninos, leucoantocianidinas e heterosídeos cardiotônicos em todas as frações testadas. Os doseamentos indicaram a presença de constituintes polifenólicos e flavônicos nas sementes de *Pterodon emarginatus*.

O OE das sementes apresentou atividade bactericida contra *S. aureus* ATCC 25923 e toxicidade aguda frente à *Artemia salina*. Atividade antinociceptiva, em todos os modelos de nocicepção testados (contorções abdominais induzidas por ácido acético, teste da placa quente e tempo de lambida da pata). Atividade antiinflamatória no modelo de pleurisia induzida por carragenina, potencial cicatrizante em modelo de queimaduras, atividade gastroprotetora, nos modelos utilizando etanol absoluto, indometacina e HCl/etanol, e atividade antitumoral para todas as linhagens celulares tumorais utilizadas.

As FH e FB apresentaram atividade leishmanicida frente às formas promastigotas de *Leishmania amazonensis*. As FB e FM apresentaram atividade antioxidante frente ao radical DPPH. Todas as frações testadas apresentaram potencial antinociceptivo nos modelos de nocicepção utilizados neste estudo.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS, R. 1995. **Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Mass Spectroscopy**. Allured Publishing Corporation, Illinois.

ABBAS, A.K.; LITCHMAN, A.H.; POBER, J.S. 1994. **Cellular and molecular immunology**. W. B. Saunders, Philadelphia.

ABREU GONZAGA, W.; WEBER, A.D.; GIACOMELLI, S.R.; SIMIONATTO, E.; DALCOL, I.I.; DESSOY, E.C.; MOREL, A.F. 2003. Composition and antibacterial activity of the essential oils from *Zanthoxylum rhoifolium*. **Planta Medica**, **69**: 773–775.

AIHARA, T.; NAKAMURA, E.; AMAGASE, K.; TOMITA, K.; FUJISHITA, T.; FURUTANI, K.; OKABE, S. 2003. Pharmacological control of gastric acid secretion for the treatment of acid-related peptic disease: past, present, and future. **Pharmacology & Therapeutics**, **98**: 109-127.

AJAIYEGBA, E. O.; ABIODUN, O.O.; FALADE, M.O.; OGBOLE, N.O.; ASHIDI, J. S.; HAPPI, C.T.; AKINBOYE, D.O. 2006. *In vitro* cytotoxicity studies of 20 plants used in Nigerian antimalarial ethnomedicine. **Phytomedicine**, **13**: 295–298.

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

AKTAN, F. 2004. iNOS-mediated nitric oxide production and its regulation. **Life Science**, **75**: 639–653.

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

ALICE, D.; SIVAPRAKASAM, K. 1995. Antibiotics and garlic clove extract--inhibitory agents of cell wall degrading enzymes. **Hindustan Antibiotics Bulletin**, **37**, **1-4**: 44-47.

ANDEF - Associação Nacional de Defesa Vegetal. 2007. www.andef.com.br Consultado em 10/04/07.

ANDRADE, F.M.C.; CASALI, V.W.D. 1999. **Plantas medicinais e aromáticas: relação com o ambiente, colheita e metabolismo secundário**. Editora UFV, Viçosa.

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

ARA, J.; SULTANA, V.; EHTESHAMUL-HAQUES, S.; QASIM, R.; AHMAD, V. U. 1999. Cytotoxic activity of marine macro-algae on *Artemia salina* (brine shrimp). **Phytotherapy Research**, **13**: 304-307.

ARAÚJO, C.A.C.; ALEGRIO, L.V.; LEON, L.L. 1998. Antileishmanial activity of compounds extracted and characterized from *Centrolobium sclerophyllum*. **Phytochemistry**, **49**: 751-754.

ARRIAGA, A.M.C.; CASTRO, M.A.B.; SILVEIRA, E.R.; BRAZ-FILHO, R. 2000. Further diterpenoids isolated from *Pterodon polygalaeiflorus*. **Journal of the Brazilian Chemistry Society**, **1**: 187-190.

ATAY, S.; TARNAWSKI, A. S.; DUBOIS, A. 2000. Eicosanoids and the stomach. **Prostaglandins & other Lipids Mediators**, **61**: 105-124.

AZEVEDO, A.S.; SATO, E.; GOMES, J.M.; PIMENTA, D.S. 1996. **Tratos culturais e sazonalidade na anatomia e produção de princípios ativos em *Centella erecta* L.** In: SIMPÓSIO DE PLANTAS MEDICINAIS DO BRASIL, 14, 1996, Florianópolis. Livro de Resumos. Florianópolis: UFSC, p. 31.

BAGGIO, C.H.; FREITAS, C.S.; RIECK, L., MARQUES, M.C.A. 2003. Gastroprotective effects of a crude extract of *Baccharis illinita* DC in rats. **Pharmacological Research**, **47**: 93-98.

BALLOU, S.P.; KUSNHER, I. 1993. **Laboratory evaluation of inflammation**. In: KEL LEY, W.N. Textbook of rheumatology. W. B . Saunders, Philadelphia.

BANKS, J.W. **Histologia veterinária aplicada**. Manole, São Paulo.

BARATA, L.E.S.; SANTOS, L.S.; FERRI, P.H.; PHILLIPSON, J.D.; PAINE, A.; CROFT, S.L. 2000. Anti-leishmanicidal activity of neolignans from *Viola* species and synthetic analogues. **Phytochemistry**, **55**: 589-595.

BARAHONA, M.V.; SÁNCHEZ-FORTÚN, S. 1999. Toxicity of carbamates to the brine shrimp *Artemia salina* and the effect of atropine, BW284c51, iso-OMPA and 2-PAM on carbaryl toxicity. **Environmental Pollution**, **104**: 469-476.

BARREIRA, S.; SCOLFORO, J.R.S.; BOTELHO, S.A.; MELLO, J.M. 2002. Estudo da estrutura da regeneração natural e da vegetação adulta de um serrado *sensu stricto* para fins de manejo florestal. **Annals of Forest Science**, **61**: 64-78.

BARROS, M.A.G. 1996. **Plantas Medicinais do Cerrado**. In: ANAIS DO II CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA E TERAPIAS NATURAIS, 1996, Brasília. Livro de Resumos, p. 28-29.

BARROS, M.A.G. 1997. **Contribuição ao conhecimento ecológico do cerrado**. In: 3º CONGRESSO DE ECOLOGIA DO BRASIL, 1997, Brasília. Avaliação da ação antrópica sobre as plantas do cerrado com potencial econômico. Brasília: Universidade de Brasília, p. 257-261.

BARROS, R.F.M.; ANDRADE, L.H.C.; SILVA, N.H. 1992. **Efeito da radiação solar e disponibilidade de nutrientes sobre a produção de cumarinas em *Justicia pectoralis* Jacq. Var. *Stenophylla***. In: SIMPÓSIO DE PLANTAS MEDICINAIS DO BRASIL, 12, 1992, Curitiba. Livro de Resumos. Curitiba: UFPR, p. 220.

BASILE, A.; FERRARA, L.; DEL POZZO, M.; MELE, G.; SORBO, S.; BASSI, P.; MONTESANO, D. 2005. Antibacterial and antioxidant activities of ethanol extract from *Paullinia cupana* Mart. **Journal of Ethnopharmacology**, **102**: 32-36.

BASTOS, M.N.C. 1987. Contribuição ao estudo sistemático de algumas espécies do gênero *Machaerium* Persoon (Leguminosae -Papilionoideae) ocorrentes na Amazônia Brasileira. **Boletim do Museu Paraense Emílio Goeldi Histologia Natural**, **3**, **2**: 183-278.

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

BAUMANN, H.; GAULDIE, J. 1994. The acute phase response. **Immunology Today** **15**: 74-80.

BEEKMAN, A.C.; WOERDENBAG, H.J.; KAMPINGA, H.H.; KONINGS, A.W.T. 1996. Cytotoxicity of artemisin, a dimer of dihydroartemisin, artemisitene and eupatoriopicrin as evaluated by the MTT and clonogenic assay. **Phytotherapy Research**, **10**: 140-144.

BELINELO, V.J.; PILÓ-VELOSO, D.; BORGES, E.E.L.; ALVES, D.L.F.; REIS, G. T. 2001. Synthesis and phytotoxic activity of new amide derivatives of 6a,7b-dihydroxyvouacapan-17b-oic acid. **Revista Eclética Química**, **26**: 25-39.

BELINELO, V.J.; REIS, G.T.; STEFANI, G.M.; FERREIRA-ALVES, D.L.; PILÓ-VELOSO, D. 2002. Synthesis of 6a,7b-Dihydroxyvouacapan-17b-oic Acid Derivatives. Part IV: Mannich Base Derivatives and its activities on the electrically stimulated guinea-pig ileum preparation. **Journal of the Brazilian Chemistry Society**, **13**: 830-836.

BENDAZZOLI, W.S. 2000. **Fitomedicamentos: perspectivas de resgate de uma terapia histórica**. Mundo saúde, São Paulo.

BERGMANN, B.R.; COSTA, S.S.; MORAES, V.L.G. 1997. Brazilian medicinal plants: a rich source of immunomodulatory substances. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, **49**: 395-402.

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.

BLUMBERG, H.; WOLF, P.S.; DAYTON, H.B. 1995. Use of the writhing test for evaluating analgesic activity of narcotic antagonists. **Proceedings Society Experimental Biological Medical**, **118**: 763-766.

BOECK, P.; FALCÃO, C.A.B.; LEAL, P.C.; YUNES, R.A.; CECHINEL FILHO, V.; TORRES-SANTOS, E.C.; ROSSI-BERGMANN, B. 2006. Synthesis of chalcone analogues with increased antileishmanial activity. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, **14**: 1538-1545.

BORS, W.; HELLER, W.; MICHEL, C.; SARAN, M. 1990. **Methods in Enzimology**. Academic Press, New York, p. 343.

BOTTING, J. 2000. Defining the role of COX-2 inhibitors in inflammatory and other diseases. **Drug News Perspectives**, **13**: 560–566.

BOYD, M.R. 1989. Status of the NCI Preclinical Antitumor Drug Discovery Screen. **Principles & Practice of Oncology**, **10**, **3**: 1-12.

BRAZ FILHO, R.; GOTTLIEB, O.R.; ASSUMPÇÃO, R.M.V. 1971. The isoflavones of *Pterodon pubescens*. **Phytochemistry**, **10**: 2835-2836.

BRAGA, F.G.; COIMBRA, E.S.; MATOS, M.O.; CARMO, A.M.L.; CANCIO, M.D.; DA SILVA, A.D. 2007. Synthesis and biological evaluation of some 6-substituted purines. **European Journal of Medical Chemistry**, **42**: 530-537.

BRENNAN, R.J.; SCHIEST, R.H. 1996. Cadmium is an inducer of oxidative stress in yeast. **Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, **356**: 171-178.

BRENTANI, R.R.; CHAMMAS, R.; COELHO, F.R.G. 1998. **Mecanismos de invasão e metástases**. In: Brentani, M.N.; Coelho, F.R.G.; Iyeyasu, H.; Kowalski, L.P., ed. – Bases da Oncologia. 1aed., Livraria e Editora Marina, São Paulo, p. 91-98.

BROWN, C. 1999. Resistance mechanisms to drugs. In: Brown R, Boger-Brown U, editors. **Cytotoxic drug resistance mechanisms**. Humana Press, Totowa.

BROWN JÚNIOR, K.S. 1988. Engenharia ecológica: novas perspectivas de seleção e manejo de plantas medicinais. **Acta Amazônica**, **18**, **2**: 291-302.

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

CAIRNS, J. 1981. The origin of human cancers. **Nature**, **289**: 353-357.

CALABRESI, P.; CHABNER, B.A. 1996. **Chemotherapy of neoplastic diseases**. In: Gilman, A.G.; Goodman, L.S., ed. – The Pharmacological Bases of Therapeutics. 9a ed., McGraw-Hill Companies, New York, p. 1225-1232.

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

CAMACHO, M.R.; PHILLIPSON, J.D.; CROFT, L.S.; KIRBY, G.C.; WARHURST, D.C.; SOLIS, P.N. 2000. Terpenoids from *Guarea rhopalocarpa*. **Phytochemistry**, **56**: 203-210.

CAMPOS, A.M.; SILVEIRA, E.R.; TEIXEIRA, T.C. 1990. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE QUÍMICA, 1990, Caxambu. CD de Resumos. Caxambu.

CAMPOS, A.M.; SILVEIRA, E.R.; TEIXEIRA, T.C. 1992. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE QUÍMICA, 1992, Caxambu. CD de Resumos. Caxambu.

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.

CARDOSO, C.R.B. **Influência da administração tópica dos ácidos graxos essenciais w3 e w6 e do não essencial w9 na cicatrização de feridas cutâneas induzidas cirurgicamente**. Dissertação (mestrado). Universidade Federal de Uberlândia, Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicada. Uberlândia, Minas Gerais, 2003.

CARRICONDE, C.; MORES, D.; VON FRITSCHEN, M.; CARDOZO-JUNIOR, E.L. 1996. **Plantas medicinais e alimentícias**. Centro Nordeste de Medicina Popular, Olinda, p.45-47.

CARTER, R.B. 1991. Differentiating analgesic and non-analgesic drug activities on rat hot plate: effect of behavioral endpoint. **Pain**, **47**: 211-220.

CARVALHO, I. 2003. Introduction to molecular modeling of drugs in the medicinal chemistry experimental course. **Química Nova**, **26**: 428-438.

CARVALHO, J.C.T. 2004. **Fitoterápicos antiinflamatórios: aspectos químicos, farmacológicos e aplicações terapêuticas**. Tecmedd, Ribeirão Preto.

CARVALHO, J.C.T.; SERTIÉ, J.A.A.; BARBOSA, M.V.J.; PATRÍCIO, K.C.M.; CAPUTO, L.R.G.; SARTI, S.J. FERREIRA, L.P.; BASTOS, J. K. 1999. Anti-inflammatory activity of the crude extract from the fruits of *Pterodon emarginatus* Vog. **Journal of Ethnopharmacology** **64**: 127–133.

CARVALHO, J.C.T.; GOSMANN, G.; SCHENKEL, E.P. 2000. **Compostos fenólicos simples e heterosídeos**. 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. Editora UFRGS, Porto Alegre, Editora UFSC, Florianópolis.

CARVALHO, P.B.; FERREIRA, E.I. 2001. Leishmaniasis phytotherapy. Nature's leadership against an ancient disease. **Fitoterapia**, **72**: 599-618.

CARVALHO, P.T.C. **Análise da cicatrização de lesões cutâneas através da espectrofotometria: estudo experimental em ratos diabéticos.** Dissertação (Mestrado)-Área interunidades em Bioengenharia da EESC/FMRP/IQSC Universidade de São Paulo, 2002.

CASTELLANI, D.C. **Crescimento, anatomia e produção de ácido erúcido em *Tropaeolum majus* L.** 1997. 108 f. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) – Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 1997.

CHARLES, D.J.; JOLY, R.J.; SIMON, J.E. 1990. Effects of osmotic stress on the essential oil content and composition of peppermint. **Phytochemistry**, **29**, **9**: 2837-2840.

CHARLET, N.; GALLO-TORRES, H.E.; BOUNAMEAUX, Y.; WILLS, R.J. 1985. Prostaglandins and the protection of the gastroduodenal mucosa in humans: a critical review. **Journal of Clinical Pharmacology**, **25**: 564–582.

CHARTONE-SOUZA, E. 1998. Bactérias ultra-resistentes: uma guerra quase perdida. **Ciência Hoje**, **23**: 26-35.

CHEN, M.; BROGGER CHRISTENSEN, S.; BLOM, J.; LEMMICH, E.; NADELMANN, L.; FICH, K.; THEANDER, T.G.; KHARAZMI, A. 1993. Licochalcone A, a novel antiparasitic agent with potent activity against human pathogenic protozoan species of *Leishmania*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, **37**: 2550-2556.

CLARK, R.A.F. 1985. Cutaneous tissue repair. Basic biologic consideration. **Journal 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, F.R.G.O. 1998. **Controle do câncer.** In: Brentani, M.N.; Coelho, F.R.G.; Iyeyasu, H.; Kowalski, L.P., ed. – Bases da Oncologia. 1a ed., Livraria e Editora Marina, São Paulo, p. 1-21.

COELHO, L.P.; REIS, P.A.; CASTRO, F.L.; GAYER, C.R.M.; LOPES, C.S.; SILVA, M.C.C.; SABINO, K.C.C.; TODESCHINI, A.R.; COELHO, M.G.P. 2005. Antinociceptive properties of ethenolic extract and fractions of *Pterodon pubescens* Benth. seeds. **Journal of Ethnopharmacology**, **98**: 109-119.

COELHO, M.A.F.; PINTO, J.E.B.P.; MORAIS, A.R.; CID, L.P.B.; LAMEIRA, O.A. 2005. Germinação de sementes de Sucupira-branca (*Pterodon pubescens* Benth) *in vitro* e *ex vitro*. **Revista de Ciências Agrotécnicas**, **25,1**: 38-38.

COELHO, M.G.P.; SABINO, K.C.C.; DALMAU, S.R. 2004. Immunomodulatory effects of sucupira (*Pterodon pubescens*) seed infusion on collagen-induced arthritis. **Clinical and Experimental Rheumatology**, **22**: 213-218.

COELHO, F.B.R.; DAL BELO, C.A.; LOLIS, S.F.; SANTOS, M.G. 2005. Levantamento etnofarmacológico realizado na comunidade Mumbuca localizada no Jalapão – TO. **Revista Eletrônica de Farmácia**, **2, 2**: 52-55.

COIMBRA, R. 1942. **Notas de Fitoterapia. Catálogo dos dados principais sobre plantas utilizadas em Medicina e Farmácia**. Edição de Carlos Silva Araújo, Portugal.

COLEMAN, J.R.; DEMENEZES, E.M. 1980. Chromosome numbers in Leguminosae from the State of São Paulo, Brazil. **Rhode Island**, **82**: 475-481.

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 síntesis of coptisine from berberine. **Farmaco**, **56, 5-7**: 403-409.

CONCEIÇÃO, M. 1980. **As plantas medicinais do ano 2000**. TAO editora, Brasília.

COPPING, L.G. 1996. **Crop protection agents from nature: natural products and analogues**. Editora SCI, Cambridge.

CORRÊA, A.D.; BATISTA, R.S.; QUINTAS, L.E.M. 2001. **Plantas medicinais: do cultivo à terapêutica**. 4. ed. Vozes, Petrópolis, p. 164-165.

CORRÊA, C.R.; CALIXTO, J.B. 1993. Evidence for participation of B₁ and B₂ kinin receptors in formalin-induced nociceptive response in mouse. **Brazilian Journal of Pharmacology**, **110**: 193-198.

COSTA, A. F. 1994. **Farmacognosia**. 5. ed. Fundação Calouste Gulbenkian, Lisboa.

COSTA, A. F. 2000. **Farmacognosia**. v.3, 2. ed. Fundação Calouste Gulbenkian, Lisboa.

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.

COWAN, M.M. 1999. Plant products as antimicrobial agents. **Clinical Microbiology Reviews**, **12**, **4**: 564-582.

COWEN, D.L.; HELFAND, W.H. 1990. **Pharmacy: an illustrated history**. Harry N. Abrams, Korea, p.272

CRAGG, G.M.; NEWMAN, D.J. 1999. Discovery and development of antineoplastic agents from natural sources. **Cancer Investigation**, **17**, **2**: 153-163.

CRAVEIRO, A.A.; FERNANDES, A.G.; ANDRADE, C.H.S.; MATOS, F.J.A.; ALENCAR, J.W.; MACHADO, M.I.L. 1981. **Óleos essenciais de plantas do nordeste**. 1. ed. Edições UFC, Fortaleza.

CRAVEIRO, A.A.; MACHADO, M.I.L. 1986. De aromas, insetos e plantas. **Revista Ciência Hoje**, **4**, **23**: 54-63.

CROFT, S.; COOMBS, G. 2003. Leishmaniasis, current chemotherapy and recent advances in the search for novel drugs. **Trends in Parasitology**, **19**: 502-508.

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

CRUVINEL, S.S. **Efeitos da sulfadiazina de prata em feridas cirúrgicas experimentalmente induzidas em camundongos isogênicos BALB/C: aspectos morfológicos, imunológicos e hematológicos**. Uberlândia, 2000. Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia, Programa de Pós-graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicada.

CRUZ, G.L. 1965. **Livro Verde das Plantas Medicinais e Industriais do Brasil**. v. 2. Belo Horizonte.

CUNHA, M.M. Avaliação da atividade citotóxica de frações contendo acetogeninas derivadas de extratos de plantas da família das Annonaceae. 2002, 113 p., Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas – Farmacologia), Belo Horizonte: ICB-UFMG, 2002.

DA LUZ DIAS, F.; TAKAHASHI, C.S.; SAKAMOTO-HOJO, E.T.; VICHNEWSKI, W.; SARTI, S.J. 1995. Genotoxicity of the natural cercaricides 'Sucupira' oil and eremanthine in mammalian cells in vitro and in vivo. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, **26**: 338-344.

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

DELITALA, L.F.; GESSA, C.; SOLINAS, V. 1986. Stress idrico e flessibilità del metabolismo fenolico in *Thymus capitatus*. **Fitoterapia**, **57**, **6**: 401-408.

DEMUNER, A.J.; BARBOSA, L.C.A.; PILÓ-VELOSO, D.; HOWARTH, O.W. 1998. Synthesis and Plant Growth Regulatory Activity Of 6a, 7b-Di-Hydroxyvouacapan-17b-oic Acid Derivatives. **Australian Journal of Chemistry**, **51**, **1**: 61-66.

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

DERAEDT, R.; JOUGNEY, S.; DELEVALCEE, F.; FALHOUT, M. 1980. Release of prostaglandin E and F in an allogenic reaction and its inhibition. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, **51**: 17-24.

DESAI, J.K.; GOYAL, R.K. PARMAR, N.S. 1996. Dopamine receptor subtypes in gastric and duodenal ulceration. **Indian Journal of Pharmacology**, **28**: 129-142.

DESMOLIERE, A.; REDARD, M.; DARBY, I.; GABBIANI, G. 1995. Apoptosis mediates the decrease in cellularity during the transition between granulation tissue and scar. **American Journal of Pathology** **146**, **1**: 56-66.

DIAS, B.F.S. 1993. **Conservação da natureza do cerrado**. In: PINTO, M.N. Cerrado, caracterização, ocupação e perspectivas. 2. ed. Editora da Universidade de Brasília e Sematec, Brasília.

DICKENSON, A.; BESSON, J.M. **The Pharmacology of Pain**. Berlin: Springer, 1997.

DICKSON, M.; REDWOOD, H. 1998. Pharmaceutical reference prices. How do they work in practice? **Pharmacoeconomics**, **14**: 471-479.

DIMAS, K.; DEMETZOS, C.; MARSELLOS, M.; SOTIRIADOU, R.; MALAMAS, M.; KOKKINOPOULOS, D. 1998. Cytotoxic activity of labdane type diterpenes against human leukemic cell lines in vitro. **Planta Medica**, **64**: 208-211.

DI ROSA, M.; WILLOUGHBY, D.A. 1971. Screens for anti-inflammatory drugs. **Journal of Pharmacy and Pharmacology** **23**: 297–298.

DI ROSA, M.; LALENTI, A.; IANARO, A.; SAUTENBIN, I. 1996. Interaction between nitric oxide and cyclooxygenase pathway. **Prostaglandins, Leukotrienes, and Essential Fatty Acids** **54**: 229–238.

DI STASI, L.C. 1995. **Plantas Mediciniais: Arte e Ciência**. Editora UNESP, São Paulo.

DOLLABELA, M.F. Triagem *in vitro* para atividade antitumoral e anti-*Trypanosoma cruzi* de extratos vegetais, produtos naturais e substâncias sintéticas. 1997, 130 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas – Farmacologia) Belo Horizonte: ICB-UFMG, 1997.

DOWNEY, D.; ELBORN, J.S. 2000. Nitric oxide, iNOS, and inflammation in cystic fibrosis. **Journal of Pathology**, **190**: 115–116.

DUARTE, I.D.G.; FERREIRA-ALVES, D.L.; NAKAMURA-CRAIG, M. 1992. Possible participation of endogenous opioid peptides on the mechanism involved in analgesia induced by vouacapan. **Life Science**, **50**: 891-897.

DUARTE, I.D.G.; FERREIRA-ALVES, D.L.; PILÓ-VELOSO, D.; NAKAMURA-CRAIG, M. 1996. Evidence of the involvement of biogenic amines in the antinociceptive effect of a vouacapan extracted from *Pterodon polygalaeflorus* Benth. **Journal of Ethnopharmacology**, **55**: 13-18.

DUBUISSON, D.; DENNIS, S.G. 1977. The formalin test: a quantitative study of the analgesic effects of morphine, meperidine, and brain stem stimulation in rats and cats. **Pain**, **4**: 161-174.

DUKE, S.O.; ABBAS, H.K. 1995. Natural products with potential use as herbicides. ALLELOPATHY - Organisms, processes and applications. **Journal of American Chemistry Society Simpos**, **582**: 350-362.

DUKE, S.O.; LYDON, J. 1987. Herbicides from natural compounds. **Weed Technology**, **1**: 122-128.

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

DURIGAN, G.; BAITELLO, J.B.; FRANCO, G.A.D.C.; SIQUIERA, M.F. 2004. **Plantas do Cerrado Paulista: Imagens de uma paisagem ameaçada**. 1. ed. Páginas & Letras Editora e Gráfica, São Paulo.

DWYER, J.D. 1951. The Central American, West Indian and South American species of *Copaifera*. **Britton**, **7**, **3**: 143-172.

EDDY, N.B.; LEIMBACK, D. 1953. Synthetic analgesics II. Dithienylbutenyl and dithienylbutylamines. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, **107**: 385-393.

EITEN, G. 1990. **Vegetação do cerrado**. In: PINTO, M.N. Cerrado, caracterização, ocupação e perspectivas. 2. ed. Editora da Universidade de Brasília e Sematec, Brasília.

EL-AGAMEY, A.; LOWE, G.M.; MCGARVEY, D.J.; MORTENSEN, A.; PHILLIP, D.M.; TRUSCOTT, T.M.; YOUNG, A.J. 2004. Carotenoid radical chemistry and antioxidant/pro-oxidant properties. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, **430**: 37-48.

ELAKOVICH, S.D. 1988. **American Chemical Society**. In: Terpenoids as model for new agrochemicals. Ed H. G. Cutler, Washington.

ELISABETSKY, E. 1999. **Etnofarmacologia como ferramenta na busca de substâncias ativas**. 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.

ELISABETSKY, E.; WANNMACHER, L. 1993. The status of ethnopharmacology in Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, **38**: 137-143.

FALKENBERG, M.; BAUMGARTEN, D.; SIMIONATO, C. 1999. Screening of some Brazilian medicinal plants with the brine shrimp assay. **Acta Horticulturae**, **502**: 401-404.

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. Editora UFRGS, Porto Alegre, Editora UFSC, Florianópolis.

FARRIAS, M.R. 2003. **Avaliação da qualidade de matérias-primas vegetais.** In: SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, L.A.; PETROVICK, P.R. Farmacognosia: da planta ao medicamento. Editora UFRGS, Porto Alegre, Editora UFSC, Florianópolis.

FARSAM, H.; AMANLOU, M.; DEHPOUR, A. R.; JAHANIANI, F. 2000. Anti-inflammatory and analgesic activity of *Biebersteinia multifida* DC. Root extract. **Journal of Ethnopharmacology**, **71**: 443-447.

FASCIO, M.; MORS, W. B.; GILBERT, B.; NISHIDA, T. 1970. Two new diterpenes from *Pterodon pubescens*. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, **42**: 97-101.

FASCIO, M.; MORS, W.B.; GILBERT, B.; MAHJAN, J.R.; MONTEIRO, M.B.; DOS SANTOS FILHO, D.; VICHNEWSKI, W. 1976. Diterpenoid Furans from *Pterodon* species. **Phytochemistry**, **15**: 201-203.

FELDMANN, M. 2002. Development of anti-TNF therapy for rheumatoid arthritis. **Nature Reviews Immunology** **2**: 364–371.

FELLENIEUS, E.; BERGLINDH, T.; SACHS, G.; OLBE, L.; ELANDER, B.; SJOSTRAND, S. E.; WALLMARK, B. 1981. Substituted benzimidazoles inhibit gastric acid secretion by blocking (H⁺-K⁺)ATPase. **Nature**, **290**: 159-161.

FELLOWS, L.E. 1995. **Pharmaceuticals from traditional medicinal plants and others: Future prospects.** In: Coombes, JD, ed. New drugs from natural sources. London, IBC Technical Services.

FERNANDES, E.S.; PASSOS, G.F.; MEDEIROS, R.; CUNHA, F.M.; FERREIRA, J.; CAMPOS, M.M.; PIANOWSKI, L.F.; CALIXTO, J.B. 2007. Anti-inflammatory effects of compounds alpha-humulene and (-)-*trans*-caryophyllene isolated from the essential oil of *Cordia verbenacea*. **European Journal of Pharmacology** **569**: 228–236

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.

FERRI, M.G. 1980. **Vegetação Brasileira. Belo Horizonte.** Editora Itatiaia, Editora da Universidade de São Paulo, São Paulo.

FILGUEIRAS, T.; PEREIRA, B.A. 1990. **Flora do Distrito Federal.** In: NOVAES, M. P. Cerrado: caracterização, ocupação e perspectivas. 2. ed. Editora da Universidade de Brasília e Sematec, Brasília.

FINKEL, T.; HOLBROOK, N.J. 2000. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. **Nature**, **408**: 239-247.

FIGLIORE, G.; NENCINI, C.; CARVALLO, 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, N.H.; WILLIAMSON, G.B.; WEIDENHAMER, J.D.; RICHARDSON, D.R. 1994. In search of allelopathy in the Florida scrub: the role of terpenoids. **Journal of Chemistry Ecology**, **20**, **6**: 1355-1380.

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

FOURNET, A.; FERREIRA, M.E.; ROJAS, A.A.; TORRES, O.S.; FUENTES, S.; NAKAYAMA, H.; SCHININI, A. 1996. *In vitro* efficacy of oral and intralesional administration of 2-substituted quinolines in experimental treatment of new world cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania amazonensis*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, **40**: 2447-2451.

FOWLER, B.A.; KLEINOW, K.M.; SQUIBB, K.S.; LUCIER, G.W.; HAYES, W. 1994. **Organelles as tools in toxicology.** In: Hayes, A.W. (Ed.), Principles and Methods of Toxicology, 3rd edition. Raven Press, New York, pp. 1201-1230.

FRANÇA, F.; CUBA, C.A.; MOREIRA, E.A.; ALMEIDA, M.; VIRGENS, M.L.; MARSDEN, P.D. 1993. Avaliação do efeito do extrato de casca de cajueiro-branco (*Anacardium occidentale*) sobre a infecção por *Leishmania (Viannia) braziliensis*. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, **26**: 151-155.

FRANZ, C. 1983. Nutrient and water management of medicinal and aromatic plants. **Acta Horticulturae**, **132**: 203-215.

FRANZOTTI, E.M.; FRANZOTTI, E.M.; SANTOS, C.V.; RODRIGUES, H.M.; MOURÃO, R.H.; ANDRADE, M.R.; ANTONIOLLI, A.R. 2000. Inti-inflammatory,

analgesic activity and acute toxicity of *Sida cordifolia* L. (Malva-branca). **Journal of Ethnopharmacology**, **72**: 273–277.

FREITAS, C. S.; BAGGIO, C. H.; DA SILVA-SANTOS, J. E.; RIECK, L.; DE MORAES SANTOS, C. A.; CORRÊA JR., C.; MING, L. C.; CORTEZ, D. A. G.; MARQUES, M. C. A. 2004. Involvement of nitric oxide in the gastroprotective effects of an aqueous extract of *Pfaffia glomerata* (Spreng) Pedersen, Amaranthaceae, in rats. **Life Sciences**, **74**: 1167-1179.

FREITAS, P.C.D. 1999. **Atividade antioxidante de espécies medicinais da família Piperaceae: Pothomorphe umbellata (L) Miq e Piper regnellii (Miq) CDC**. São Paulo, 1999. 115p. Tese de Doutorado. Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo.

FRÖDE, T.S.; MEDEIROS, Y.S. 2001. Myeloperoxidase and adenosine-deaminase levels in the pleural fluid leakage induced by carrageenan in the mouse model of pleurisy. **Mediators Inflammation** **10**: 223–227.

FUNARI, C.S.; FERRO, V.O. 2005. Uso ético da biodiversidade brasileira: necessidade e oportunidade. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, **15**: 178-182.

FURST, S. 1999. Transmitters involved in antinociception in the spinal cord. **Brain Research Bulletin**, **48**: 129-141.

GARCIA, F.C.P. **Relações sistemáticas e fitogeografia do gênero Ingá Miller (Leguminosae, Mimosoideae, Ingae) nas florestas da costa sul e sudeste do Brasil**. 1998. 220f. Tese (Tese de Doutorado). Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, São Paulo, 1998.

GASPARRI, S. Estudo das atividades antioxidante e mutagênica/antimutagênica induzidas pelo extrato vegetal da *Costus spicatus*. 2005, 79p., Dissertação (Mestrado em Diagnóstico Genético e Molecular), Universidade Luterana do Brasil, Canoas, 2005.

GEISSMAN, T.A.; CROUT, D.H.G. 1969. **Organic chemistry of secondary plant metabolism**. Freeman/Cooper, San Francisco.

GLAVIN, G.B.; SZABO, S. 1992. Experimental gastric mucosal injury, laboratory models reveal mechanism of pathogenesis and new therapeutic strategies. **FASEB Journal**, **6**: 825–831.

GOTTLIEB, O.R. 1987. **Evolução química vegetal**. Revista de *Ciências e Cultura*, 39, 4: 357-360.

GOYAL, R.K.; SAIRAM, K. 2002. Antiulcer drugs from indigenous sources with emphasis on *Musa sapientum*, *Tamrabhasma*, *Asparagus racemosus* and *Zingiber officinale*. **Indian Journal of Pharmacology**, 34: 100–110.

GRADI, T.; SIQUEIRA, D. 1982. **Flora medicinal de Belo Horizonte**. v. 8. Oréades, Belo Horizonte.

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

GROOTEMAN, M.P.; VAN TELLINGEN, A.; VAN HOUTE, A.J.; BOS, J.C.; SCHOORL, M.; VAN LIMBEEK, J.; NUBE, M.J. 2000. Hemodialysis-induced degranulation of polymorphonuclear cells: no correlation between membrane markers and degranulation products. **Nephron** 85: 267–274.

GUPTA, M.; MAZUMDER, U.K.; MANIKANDAN, L.; BHATTACHARYA, S.; SENTHILKUMAR, G.P.; SURESH, R. 2005. Antiulcer activity of ethanol extract of *Terminalia pallida* Brandis. in Swiss albino rats. **Journal of Ethnopharmacology**, 97: 405-408.

GUYNTON, A. C.; HALL, J. E. 2002. **Tratado de Fisiologia Médica**. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro.

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

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

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? **PNAS**, 98: 10469–10474.

HARBORNE, J. B. 1993. **Ecological biochemistry**. 4. ed. Academic, London.

HARBORNE, J. B. 1997. Recent advances in chemical ecology. **Natural Product Reports Articles**, 14: 83-98.

HARWIG, J.; SCOTT, P. 1971. Brine shrimp (*Artemia salina*) larvae as a screening system for fungal toxins. **Applied and Environmental Microbiology**, **21**: 1011-1016.

HASLAM, E. 1996. Natural polyphenols (vegetable tannins) as drugs and medicines: possible mode of action. **Journal of Natural Products**, **59**: 205-215.

HATTORI, M.; KUSUMOTO, L.T.; NAMBA, T.; ISHIGAMI, T.; HARA, Y. 1990. Effect of tea polyphenols on glucan synthesis by glucosyl transferase from *Streptococcus mutans*. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, **38**: 717-720.

HAYASHI, K.; HAYASHI, T.; MORITA, N. 1992. Cytotoxic and antitumour activity of scopadulcic acid from *Scoporia dulcis* L. **Phytotherapy Research**, **6**: 6-9.

HEAP, T.M. 1997. The occurrence of herbicide resistant weeds worldwide. **Pesticide Science**, **51**: 235-43.

HEAPY, C.G.; JAMIESON, A.; RUSSEL, N.J.W. 1987. Afferent C-fibre and A delta activity in models of inflammation. **British Journal of Pharmacology**, **90**: 164-170.

HEO, M.Y.; SOHN, S.J. 2001. Anti-genotoxicity of galangin as a cancer chemopreventive agent candidate. **Mutation Research**, **488**: 135-150.

HERMANN, F.J. 1953. A synopsis of the genus *Arachis*. U. S. **Department of Agriculture Monograph**, **19**: 1-26.

HOEHENE, F.C. 1940. Leguminosas Papilionadas (*Arachis*). **Fascículo da Flora Brasileira**, **25**, **2**: 1-20.

HOOGERWERF, W.A.; PASRICHA, P.J. 2003. Agentes usados para o controle da acidez gástrica e no tratamento de úlceras pépticas e da doença do refluxo gastroesofágico. In: HARDMAN, J. G. e LIMBIRD, L. E. **Goodman & Gilman as bases farmacológicas da terapêutica**. 10. ed. McGraw-Hill, Rio de Janeiro.

HUNSKAAR, S.; HOLE, K. 1987. The formalin test in mice: dissociation between inflammatory and non-inflammatory pain. **Pain**, **30**: 103-114.

HUNSKAAR, S.; FASMER, O.B.; HOLE, K. 1985. Formalin test in mice, a useful technique for evaluating mild analgesia. **Journal of Neuroscience Methods**, **14**: 69-76.

HUNT, T.K. 1981. **Cicatrização de feridas**. In: DUMPHY, J.E e WAY, L.W. Diagnóstico e tratamento de feridas. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro.

HWANG, A.S.; WILCOX, G.L. 1987. Analgesic properties of intrathecally administered heterocyclic antidepressants. **Pain**, **28**: 343-355.

IKAN, R. 1991. **Natural products: a laboratory guide**. 2. ed. Academic Press, New York.

INIGUEZ, M.A.; PABLOS, J.L.; CARREIRA, P.E.; CABRE, F.; GOMEZ-REINO, J.J. 1998. Detection of COX-1 and COX-2 isoforms in synovial fluid cells from inflammatory joint diseases. **British Journal of Rheumatology**, **37**: 773-778.

ITHARAT, A.; HOUGHTON, A.; AMOOQUAYE, E.; BURKE, P.J.; SAMPSON, J.; RAMAN, A. 2004. In vitro cytotoxic activity of Thai medicinal plants used traditionally to treat cancer. **Journal of Ethnopharmacology**, **90**: 33-39.

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

JANSSEN, P.A.J.; NIEMEGERES, C.J.E.; DONY, J.G.H. 1963. The inhibitory effect of fentanyl and other morphine like analgesics on the warm water-induced tail withdrawal reflex in rats. **Arzneim Forsch Drug Research**, **13**: 502-509.

JASIENIUK, M.; BRÛLÉ-BABEL, A.L.; MORRISON, I.N. 1996. The evolution and genetics of herbicide resistance in weeds. **Weed Science**, **44**: 176-93.

JAWETZ, E.; MELNICK, J.L.; ADELBERG, E.A.; BROOKS, G.F.; BUTEL, J.S.; ORNSTON, L. N. **Microbiologia médica**. 21. ed. Editora Guanabara Koogan, Rio de Janeiro.

JIMÉNEZ, G.; HASEGAWA, M.; RODRÍGUEZ, M.; ESTRADA, O.; MÉNDEZ, J.; CASTILLO, A.; GONZALES-MUJICA, F.; VÁZQUEZ, J.; ROMERO-VECCHIONE, E. 2001. Biological screening of plants of the venezuelan amazons. **Journal of Ethnopharmacology**, **77**: 77-83.

JOHANSSON, A.K.; KUUSISTO, P.H.; LAAKSO, P.H.; DEROME, K.K.; SEPPONEN, P.J.; KATAJISTO, J.K.; KALLIO, H.P. 1997. Geographical variations in seed oils from *Rubus chamaemorus* and *Empetrum nigrum*. **Phytochemistry**, **44**, **8**: 1421-1427.

JULIUS, D.; BASBAUM, A.I. 2001. Molecular mechanisms of nociception. **Nature**, **413**: 203-210.

KAILEH, M.; BERGHE, W.V.; BOONE, E.; ESSAWI, T.; HAEGEMAN, G. 2007. Screening of indigenous Palestinian medicinal plants for potential anti-inflammatory and cytotoxic activity. Journal of Ethnopharmacology, **14** [Epub ahead of print].

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

KAYSER, O.; KIDERLEN, A.F.; LAATSCH, H.; CROFT, S.L. 2000. *In vitro* leishmanicidal activity of monomeric and dimeric naphthoquinones. **Acta Tropica**, **77**: 307-314.

KING-DÍAZ, B.; PÉREZ-REYES, A.; DOS SANTOS, F.J.L.; FERREIRA-ALVES, D. L.; PILÓ-VELOSO, D.; CARVAJAL, S.U.; LOTINA-HENNSEN, B. 2006. Natural diterpene β -lactone derivative as photosystem II inhibitor on spinach chloroplasts. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, **84**: 109-115.

KING, L.G. 1985. What does epidermal growth factor do and how does it do it? **Investigation Dermatology** **84**, **3**: 165-167.

KNOBLOCH, K.; CHAUDHURI, S.K.; KUBO, Y.; SANCHES, Y.; OGURA, T.; SAITO, T.; ISHIKAWA, H.; HARAGUCHI, H. 1986. **Action of terpenoids on energy metabolism**. In: BRUNKE, E. Gruyter, Berlin.

KNOTT, C.; STERN, G.; WILKIN, G.P. 2000. Inflammatory regulators in Parkinson's disease: iNOS, lipocortin-1, and cyclooxygenases-1 and -2. **Molecular Cellular Neuroscience**, **16**: 724-739.

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

KOSTER, R.; ANDERSON, M.; BEER, E.J. 1959. Acetic acid for analgesic screening. **Federation Proceedings**, **18**: 412-416.

KRAPOVICKAS, A.; GREGORY, W.C. 1964. Taxonomía del género *Arachis* (Leguminosae). **Bonplandia**, **8**: 1-186.

KOROLKOVAS, A.; BURCKHALTER, J.H. 1988. **Química farmacêutica**. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro.

*KUBO, I.; CHAUDHURI, S.K.; KUBO, Y.; SANCHEZ, Y.; OGURA, T.; SAITO, T.; ISHIKAWA, H.; HARAGUCHI, H. 1996. Cytotoxic and antioxidative sesquiterpenoids from Heterotheca inuloides. **Planta Medica**, **62**: 427-430.*

LAKSHMI, V.M.; NAUSEEF, W.M.; ZENSER, T.V. 2005. Myeloperoxidase potentiates nitric oxide-mediated nitrosation. **Journal of Biological Chemistry** **280**: 1746–1753.

LANGMEAD, L.; RAMPTON, D. S. Review article: herbal treatment in gastrointestinal and liver disease – benefits and dangers. **Alimentary Pharmacology & Therapeutics**, v. 15, p. 1239-1252, 2001.

LAPA, A.J.; SOUCCAR, C.; LIMA-LANDMAN, M.T.R.; GODINHO, R.O.; LIMA, T. C.M. 2000. **Farmacologia e toxicologia de produtos naturais**. In: SIMÕES, C.M.O.; CHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. Farmacognosia: da planta ao medicamento. Editora UFRGS, Porto Alegre, Editora UFSC, Florianópolis.

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

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

LEE, I.K.; KIM, C.J.; SONG, K.S.; KIM, H.M.; KOSHINO, H.; URAMOTO, M.; YOO, I.D. 1996. Cytotoxic benzyl dihydroflavonols from *Cudrania tricuspidata*. **Phytochemistry**, **40**: 129-134.

LEITÃO-FILHO, H.F. 1974. Contribuição ao estudo taxonômico do gênero *Phaseolus* L. no Brasil. **Bragantia**, **33**, **6**: 55-63.

LEITÃO, S.G.; KAPLAN, M.A.C.; MONACHE, F.D.; NYANDAT, E.; RWEKIKI, E.F. 1997. Antifeedant activity of two phenylpropanoid glucosides from *Aegiphila obducta* against *Chilo partellus* larvae. **Insect Science and its Application**, **16**: 375-378.

LEITE DE ALMEIDA, M.E.; GOTTLIEB, O.R. 1975. The chemistry of Brazilian Leguminosae, further Isoflavones from *Pterodon apparicia*. **Phytochemistry**, **14**, **12**: 2716-2720.

LETCHAMO, W.; GOSSELIN, A. 1996. Transpiration, essential oil glands, epicuticular wax and morphology of *Thymus vulgaris* are influenced by light intensity and water supply. **Journal of the American Society Horticultural Science**, **71**, **1**: 123-134.

LIN, C.C.; NG, L.T.; HSU, F.F.; SHIEH, D.E.; CHIANG, L.C. 2004. Cytotoxic effects of *Coptis chinensis* and *Epimedium sagittatum* extracts and their major constituents (berberine, coptisine and icariin) on hepatoma and leukaemia cell growth. **Clinical and Experimental Pharmacology & Physiology**, **31**: 65-69.

LINDEN, P.; PALADINO, J.A. 1998. The economic impact of bacteremia due to vancomycin-resistant *Enterococcus faecium*: a case-control study. 38th **Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. CA, San Diego.

LITCHFIELD, J. T.; WILCOXON, F. 1949. A simplified method of evaluating dose-effect experiments. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, **96**, **1**: 99-113.

LOIZZO, M.R.; TUNDIS, R.; STATTI, G.A.; MENICHINI, F. 2007. *Jacaranone: a cytotoxic constituent from Senecio ambiguus subsp. ambiguus (biv.) DC. against renal adenocarcinoma ACHN and prostate carcinoma LNCaP cells. Archives of Pharmacology Research*, **30**, **6**: 701-707.

LORENZI, H. 1998. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. 2. ed. Ed. Plantarum, Nova Odessa.

LORENZI, H.; MATOS, F.J.A. 2000. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas cultivadas**. Nova Odessa: Ed. Plantarum.

LUSTER, A.D. 1998. Chemokines chemotactic cytokines that mediate inflammation. **The New England Journal of Medicine** **338**, 7: 436-444.

MABBERLEY, D.J. 1997. **The plant book. A portable dictionary of the vascular plants**. 2. ed. Cambridge University Press, Cambridge.

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

MACEDO, M.; FERREIRA, A.R. 2004. Plantas hipoglicemiantes utilizadas por comunidades tradicionais na Bacia do Alto Paraguai e Vale do Guaporé, Mato Grosso – Brasil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, **14**: 45-46.

MACFARLENE, B.V.; WRIGHT, A.; O'CALLAGHAN, J.; BENSON, H.A. 1997. Chronic neuropathic pain and its control by drugs. **Pharmacology & Therapeutics**, **75**: 1-19.

MACIEL, M.A.M.; PINTO, A.C.; VEIGA JÚNIOR, V.F. 2002. Plantas Medicinais: a necessidade de estudos interdisciplinares. **Química Nova**, **25**: 429-438.

MAHIOU, V.; ROBLLOT, F.; HOCQUEMILLER, R.; CAVE, A.; ROJAS DE ARIAS, A.; INCHAUSTI, A.; YALUFF, G.; FOURNET, A. 1994. Aporphine alkaloids from *Guatteria foliosa*. **Journal of Natural Products**, **57**: 890- 895.

MAHADY, G.B. 2001. Global harmonization of herbal health claims. **Journal of Nutrition**, **131**: 1120-1123.

MAHJAN, J.R.; MONTEIRO, M.B. 1970. New diterpenoids from *Pterodon emarginatus*. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, **42**: 103-107.

MAILARAJAN, P.; GOPALAKRISHNAN, G.; NARASIMHAN, S.; VENI K.J.K.; KAVIMANI, S. 2007. Anti-ulcer activity of crude alcoholic extract of *Toona ciliata* Roemer (heart wood). **Journal of Ethnopharmacology**, **110**: 348-351.

MALE, D. 1998. **Cellular migration and inflammation**. In: ROITT, J.; BROSTOFF, J.; MALE, D. Immunology. Mosby, London.

MANN, J. 1987. **Secondary metabolism**. 2. ed. Clarendon Press, Oxford..

MANN, J. 2002. Natural products in cancer chemotherapy: past, present and future. **Nature Reviews (Cancer) 2**: 143-148.

MARQUES, D.D.; MACHADO, M.I.L.; CARVALHO, M.G.; MELEIRA, L.A.C.; BRAZ-FILHO, R. AUGHLIN J.L. 1998. Isoflavonoids and triterpenoids isolated from *Pterodon polygalaeflorus*. **Journal of the Brazilian Chemistry Society, 9**: 295-301.

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.

MARSTON, A.; HOSTETTMANN, K. 1985. Plant molluscicides. **Phytochemistry, 24**: 639-652.

MARTINEZ, M.; DEL RAMO, J.; TORREBLANCA, A.; D'IAZ-MAYANS, J. 1999. Effect of cadmium exposure on zinc levels in the brine shrimp *Artemia partenogenetics*. **Aquaculture, 172**: 315-325.

MARTIN, M.J.; MOTILVA, V.; ALARCON DE LA LASTRA, C. 1993. Quercetin and naringenin: Effects on ulcer formation and gastric secretion in rats. **Phytotherapy Research 7**: 150-153.

MATHIAS, L.A.; EMILY, A. 1993. Tapping and Amazonian plethora: four medicinal plants of Marajó Island, Pará - Brazil. **Journal of Ethnopharmacology, 40**: 53-75.

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

MCGARVEY, D.J.; CROTEAU, R. 1995. Terpenoid metabolism. **The Plant Cell, 7**: 1015-1026.

MCINTOSH, J.H.; BYTH, K.; PIPER, D.W. 1991. Causes of death amongst a population of gastric ulcer patients in New SouthWales, Australia. **Scandinavian Journal of Gastroenterology, 26**: 806-811.

MCLAUGHLIN, J.L. 1991. **Crown gall tumours on potato discs and brine shrimp lethality: two simple bioassays for higher plant screening and fractions.** In: DEY, P.M.; HARBONE, J.B. (ed). *Methods in Plant Biochemistry*. Academic Press, New York, p. 1-32.

MEDEIROS, C.A.; DANTAS FILHO, A.M.; ROCHA, K.F.B.; AZEVEDO, I.M.; MACEDO, F.Y.B. 2005. Ação do fator de crescimento de fibroblasto básico na cicatrização da aponeurose abdominal de ratos. **Acta Cirúrgica Brasileira** **18**, **1**: 5-9.

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.

MEYER, A.R.; CAMPBELL, J.N.; RAJA, S.N. 1985. **Peripheral neural mechanisms of cutaneous hyperalgesia.** In: FIELDS, H.L.; CERVERO, F.; DUBNER, R. *Advances in Pain Research and Therapy*. Raven Press, New York.

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

MILLAN, M. J. 2002. Descending Control of Pain. **Progress in Neurobiology**, **57**: 355-474.

MILLAN, M. J. 1999. The induction of Pain: An Integrative review. **Progress in Neurobiology**, **57**: 1-164, 1999.

MINGHETTI, L. 2004. Cyclooxygenase-2 (COX-2) in inflammatory and degenerative brain diseases. **Journal of Neuropathology Experimental Neurology**, **63**: 901-910.

MINISTÉRIO DA SAÚDE (FUNASA) 2000. **Manual de Controle da Leishmaniose Tegumentar Americana.** Brasília: Centro Nacional de Epidemiologia, FUNASA, MS.

MISLIVEC, P.B.; BEUCHAT, L.R.; CAUSIN, M.A. 1992. **Yeast and molds.** In: *Compendium of methods for the microbiological examination of food*. 3. ed. Vanderzant, C., Splittstoesser, D.F. (eds). American Public Health Association, Washington.

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.

MITTAL, N.; GUPTA, N.; SAKSENA, S.; GOYAL, N.; ROY, U.; RASTOGI, A. K. 1998. Protective effect of picrolive from *Pichrorhiza kurroa* against *Leishmania donovani* infections in *Mesocricetus auratus*. **Life Sciences**, **63**: 1823-1834.

MONKS, A.; SCUDIERO, D.; SKEHAN, P.; SHOEMAKER, R.; PAULL, K.; VISTICA, D.; HOSE, C.; LANGLEY, J.; CRONISE, P.; VAIGRO-WOLFF, A.; GRAY-GOODRICH, M.; CAMPBELL, H.; MAYO, J.; BOYD, M. 1991. Feasibility of a High-Flux Anticancer Drug Screen Using a Diverse Panel of Cultured Human Tumor Cell Lines. **Journal of the National Cancer Institute**, **83**: 757-766.

MONTEIRO, R.R.; GIBBS, P.E. 1986. A taxonomic revision of the unifoliolate species of *Lupinus* (Leguminosae) in Brazil. **Notes Royal Botanic Garden Edinburg**, **44**, **1**: 71-104.

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

MOREL, I.; LESCOAT, G.; COGREL, P.; SERGENT, O.; PASDEULOP, N.; BRISSOT, P.; CILLARD, P.; CILLAR, J. 1993. Antioxidant and iron-chelating activities of the flavonoids catechin, quercetin and diosmetin on iron-loaded rat hepatocyte cultures. **Biochemical Pharmacology** **45**: 13-14.

MORS, W.B.; SANTOS FILHO, M.F.; MONTEIRO, H.J.; GILBERT, B.; PELEGRINO, J. 1967. Chemoprophylactic agent in schistosomiasis: 14, 15-epoxigeranygeraniol. **Science**, **157**: 950-951.

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

MOSMANN, T.R.; COFFMAN, R.L. 1989. Heterogeneity of cytokine secretion patterns and functions of helper T cells. **Advanced Immunology** **46**: 111-147.

MOTHES, K. 1980. **Historical introduction**. In: BELL, E.A.; CHARLWOOD, B.V. Secondary plant products. Springer, Berlin.

NAKAMURA, C.V.; SANTOS, A.O.; VENDRAMETTO, M.C.; LUIZE, O.S.; DIAS FILHO, B.P.; CORTEZ, D.A.G.; UEDA-NAKAMURA, T. 2006. Atividade antileishmania do extrato hidroalcoólico e de frações obtidas de folhas de *Piper*

regnellii (Miq.) C. DC. var. *pallescens* (C. DC.) Yunck. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, **16**: 61-66.

NAVARRO, C.; ZARZUELO, A.; JIMENEZ, J.; DUARTE, J. 1989. Composition and pharmacological activity of the essential oil of *Satureja obovata* collected in four different localities. **Fitoterapia**, **60**, **3**: 277-281.

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.

NEMIROVSKY, A.; CHEN, L.; ZELMAN, V. B.; JURNA, I. 2000. Interaction of combined administration of intrathecal morphine with subcutaneous morphine or buprenorphine. **Acta Pharmacologica Sinica**, **21**, **8**: 685-689.

NOGUEIRA, R.M.B.; KITAMURA, E.A.; AGUIAR, O.M. 2005. Estudo clínico da reparação tecidual de feridas cutâneas de cães tratados com papaína e colagenase. **Nosso Clínico** **8**, **43**: 25-28.

NUNAN, E.A.; CARVALHO, M.G.; PILO-VELOSO, D.; TURCHETTI-MAIA, R.M. M.; FERREIRA, M.P. 2001. **Dicionário Brasileiro de Plantas Medicinais**. 2. ed. Editora Abril, São Paulo.

NUNEZ-GUILLEN, M.E.; SILVA-EMIMI, J.A.; SOUCCAR, C.; LAMDALA, A.J. 1997. Analgesic and anti-inflammatory activities of the aqueous extract of *Plantago major* L. **International Journal of Pharmacognosia**, **35**: 99-104.

OGA, Z. 2003. **Fundamentos de toxicologia**. Editora Atheneu, São Paulo.

OKEKE, I.N.; LAMIKANRA, A.; EDELMAN, R. 1999. Socioeconomic and behavioral factors leading to acquired bacterial resistance to antibiotics in developing countries. **Emerging Infectious Diseases**, **5**: 18-27.

OKUDA, T.; YOSHIDA, T.; HATANO, T. 1989. Ellagitannins as active constituents of medicinal plants. **Planta Medica**, **55**: 117-122.

OKUDA, T.; YOSHIDA, T.; HATANO, T. 1993. Classification of oligomeric hydrolysable tannins and specificity of their occurrence in plants. **Phytochemistry**, **32**: 507-521.

OLIVEIRA, D.M.T.; PAIVA, E.A.S. 2005. Anatomy and ontogeny of *Pterodon emarginatus* (Fabaceae: Faboideae) seed. **Brazilian Journal of Biology**, **65**, **3**: 483-494.

OLIVEIRA, J.E.Z. Variabilidade isoenzimática e do teor de óleo essencial em acessos de *Bidens pilosa* L. 1997. 72 f. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento) – Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Viçosa, 1997.

OLIVEIRA, R.A.G.; LIMA, E.O.; VIEIRA, W.L.; FREIRE, K.R.L.; TRAJANO, V.N.; LIMA, I.O.; SOUZA, E.L.; TOLEDO, M.S.; SILVA-FILHO, R.N. 2006. Estudo da interferência de óleos essenciais sobre a atividade de alguns antibióticos usados na clínica. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, **16**: 77-82.

OLIVEIRA, F.P.; LIMA, E.O.; SIQUEIRA JÚNIOR, J.P.; SOUZA, E.L.; SANTOS, B.H.C.; BARRETO, H.M. 2006. Effectiveness of *Lippia sidoides* Cham. (Verbenaceae) essential oil in inhibiting the growth of *Staphylococcus aureus* strains isolated from clinical material. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, **16**: 510-516.

PASSOS, G.F.; FERNANDES, E.S.; CUNHA, F.M.; FERREIRA, J., PIANOWSKI, L.F.; CAMPOS, M.M.; CALIXTO, J.B. 2007. Anti-inflammatory and anti-allergic properties of the essential oil and active compounds from *Cordia verbenacea*. **Journal of Ethnopharmacology**, **2**: 323-333.

PAULA, C.D.R.; SAMPAIO, J.H.D.; CARDOSO, D.R.C.; SAMPAIO, R.N.R. 2003. Estudo comparativo da eficácia de isotionato de pentamidina administrada em três doses durante uma semana e de *N*-metil-glucamina 20mgSbV/Kg/dia durante 20 dias para o tratamento da forma cutânea da leishmaniose tegumentar americana. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, **36**: 365-371.

PELKA, M.; DANZL, C.; DISTLER, W.; PETSCHERT, A. 2000. A new screening test for toxicity testing of dental materials. **Journal of Dentistry**, **28**: 341-345.

PEREIRA, B.A. 1992. **Flora nativa**. Funatura, Brasília.

PERROT, S.; GUILBAUD, G.; KAYSER, V. 2001. Differential behavioural effects of peripheral and systemic morphine and naloxone in a rat model of repeated acute inflammation. **Anesthesiology**, **94**: 870-875.

PHELPS, C.E. 1989. Bug/drug resistance: sometimes less is more. **Medical Care**, **27**: 194-203.

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.

PIDDOCK, L.J.V.; RICCI, V., MCLAREN, I., GRIGGS, D.J. 1998. Role of mutation in the *gyrA* and *parC* genes of nalidixic-acidresistant *Salmonella* serotypes isolated from animals in United Kingdom. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, **41**: 635-641.

PIETTA, P. 2000. Flavonoids as antioxidant. **Journal of Natural Products**, **63**: 1035- 1042.

PICHETTE, A.; LAROUCHE, P.L.; LEBRUN, M.; LEGAULT, J. 2006. Composition and antibacterial activity of *Abies balsamea* an essential oil. **Phytotherapy Research**, **20**: 371-373.

PICMAN, A.K.; PICMAN, J. 1984. Effect of selected pseudoguaianolides on survival of the flour beetle, *Tribolium confusum*. **Biochemical Systematics and Ecology**, **12**, **1**: 89-93.

PINHEIRO, R.M.; CALIXTO, J.B. 2002. Effect of the selective COX-2 inhibitors, celecoxib and rofecoxib in rat acute models of inflammation. **Inflammation Research** **51**: 603–610.

PIO CORREA, M. 1984. **Dicionário de plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas**. v. 3. Ministério da Agricultura. Instituto Brasileiro de Desenvolvimento Florestal, Rio de Janeiro.

PIPER, D.W. 1995. A comparative overview of the adverse effects of antiulcer drugs. **Drug Safety**, **12**: 120–138.

PITTET, D. 2002. Promotion of hand hygiene: magic, hype, or scientific challenge? **Infection Control and Hospital Epidemiology**, **23**: 118-119.

PITT, J.I.; HOCKING, A.D. 2006. Mycotoxins in Australia: biocontrol of aflatoxin in peanuts. **Mycopath**, **162**: 233-243.

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.

PROBST, W.C. 1998. **Cicatrização de feridas e regeneração de tecidos específicos**. In: SLATTER, D. Manual de cirurgia de pequenos animais. Manole, São Paulo.

QUEIROZ, E.F.; ROBLOT, F.; CAVE, A. 1996. Pesseoine and spinosine, two catecholic berberines from *Annona spinescens*. **Journal of Natural Products**, **59**: 438-440.

QUEIROZ, E.F.; ROBLOT, F.; LAPRÉVOTE, O.; SERANI, L.; CAVÉ, A.; HOCQUEMILLER, R. 1999. A new monothetrahydrofuran acetogenin from the roots of *Annona spinescens*. **Natural Products Letters**, **13**: 21-26.

RAJI, Y.; OGUNWANDE, I.A.; OSADEBE, C.A.; JOHN, G. 2004. Effects of *Azadirachta indica* extract on gastric ulceration and acid secretion in rats. **Journal of Ethnopharmacology**, **90**: 167-170.

RANG, H. P.; DALE, M. M.; RITTER, J. M. 2001. **Farmacologia**. 4. ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro.

RAO, T.S.; CURRIE, J.L.; SHAFFER, A.F.; ISAKSON, P.C. 1993. Comparative evaluation of arachidonic acid (aa)- and tetradecanoylphorbol acetate (tpa)-induced dermal inflammation. **Inflammation** **17**: 723-741.

RATH, S.; TRIVELIN, L.A.; IMBRUNITO, T.R.; TOMAZELA, D.M.; JESUS, M.N.; MARZAL, P.C.; ANDRADE JÚNIOR, H.F.; TEMPONE, A.G. 2003. Antimoniais empregados no tratamento da leishmaniose: estado da arte. **Química Nova**, **26**: 550-553.

RATTAN, A.; KALIA, A.; AHMAD, N. 1998. Multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*: Molecular perspectives. **Emerging Infectious Diseases**, **4**: 195-209.

RATTER, J.A. 1980. **Notes of the vegetation of fazenda Água Limpa** (Brasília, DF, Brasil). Royal Botanic Garden, Edinburg, Scotland.

RATTER, J. A., BRIDGEWATER, S.; RIBEIRO, J.F. 1996. Analysis of the floristics composition of the Brazilian cerrado vegetation In: Comparison of the woody

vegetation of 98 areas. **Journal of Botanic Garden**, **53**, **2**: 153-180.

RATTER, J.A.; RIBEIRO, J. F.L.; BRIDGEWATER, S. 1997. Brazilian cerrado vegetation and threats to its biodiversity. **Annals of Botany**, **80**: 223-230.

RATH, S.; TRIVELIN, L.A.; IMBRUNITO, T.R.; TOMAZELA, D.M.; JESUS, M.N.; MARZAL, P.C.; ANDRADE JÚNIOR, H.F.; TEMPONE, A.G. 2003. Antimoniais empregados no tratamento da leishmaniose: estado da arte. **Química Nova**, **26**: 550- 553.

REPETTO, M. G.; LLESUY, S. F. 2002. Antioxidant properties of natural compounds used in popular medicine for gastric ulcers. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, **35**: 523-534.

RIBEIRO, J. F. 1983. Os principais tipos fitofisionômicos da região dos cerrados. **Boletim de Pesquisa. EMBRAPA/CPAC**, **2**: 1-28

RIBEIRO, J. F.; WALTER, B.M.T. 1997. **Fitofisionomias do Bioma Cerrado**. In: SANO, S.M.; ALMEIDA, S.P.(eds). Cerrado: ambiente e flora. Planaltina, EMBRAPA: 89-168.

RIBEIRO, R. A.; VALE, M. L.; THOMAZZI, S. M.; PACHOALATO, A. B.; POOLE, S.; FERREIRA, S. H., CUNHA, F. Q. 2000. Involvement of resident macrophages and mast cells in the writhing nociceptive response induced by zymosan and acetic acid in mice. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, **387**: 111-118.

RICE-EVANS, C.A.; MILLER, N.J.; PAGANGA, G. 1997. Antioxidant properties of phenolic compounds. **Trends in Plant Science**, **2**: 152-159.

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

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

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. **Anal Brasileiro de Dermatologia**, **81**, **2**: 150-156.

RODRIGUES, E.; TOWERS, G.H.N.; MITCHELL, J.C. 1976. Biological activities of sesquiterpenes lactones. **Phytochemistry**, **15**: 1573-1580.

ROSLAND, J.H. 1991. The formalin test in mice: the influence of ambient temperature. **Pain**, **45**: 211-216.

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.

ROYO, V.A.; SANTOS, F.F.; SOUZA, V.A.; PEREIRA, A.C.; DA SILVA, R.; VINHÓLIS, A.H.C.; DONATE, P.M.; SILVA, M.L.A.; ALBUQUERQUE, S.; BASTOS, J.K. 2003. Biological activity evaluation of dibenzilbutirolactones lignans derivatives against *Leishmania braziliensis*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, **13**: 18-21.

ROWINSKY, E.K.; GILBERT, M.; MCGUERE, W.P.; NOE, D.A.; GROCHOW, L.B.; FORASTIERE, A.A.; ETTINGER, D.S.; LUBEJKO, B.G.; CLARK, B.; SARTORIUS, S.E.; CORNBLATH, D.R.; HENDRICKS, C.B.; DONEHOWER, R.C. 1995. Sequences of taxol and cisplatin: a phase I and pharmacologic study. **Journal of Clinical Oncology**, **9**: 1692-1703.

RUBINGER, M.M.M.; CASTELO-BRANCO, P.A.; GUILARDI, S.; SOUZA, E.M.R.; GAMBARDELLA, M.T.P.; BORGES, E.E.L.; FERREIRA-ALVES, D.L.; PILO-VELOSO, D. 2004. Preparation, X-ray Structural Studies and Plant Growth Regulatory Activity of Methyl 6a,7b-thiocarbonyldioxyvouacapan-17b-oate. **Journal of the Brazilian Chemistry Society**, **15**, 2: 219-223.

RUBINSTEIN, L.V.; SHOEMAKER, R.H.; PAULL, K.D.; SIMON, R.M.; TOSINI, S.; SKEHAN, P.; SCUDIERO, D.A.; MONKS, A.; BOYD, M.R. 1990. Comparison of in vitro anticancer-drug-screening data generated with a tetrazolium assay versus a protein assay against a diverse panel of human tumor cell lines. **Journal of National Cancer Institute**, **82**: 1113-1118.

RUIZ, A.L.T.G.; MAGALHÃES, E.G.; MAGALHÃES, A.F.; FARIA, A.D.; AMARAL, M.C.E.; SERRANO, D.R.; ZANOTTI-MAGALHÃES, E.M.; MAGALHÃES, L.A. 2005. Avaliação da atividade tóxica em *Artemia salina* e *Biomphalaria glabrata* de extratos de quatro espécies do gênero *Eleocharis* (Cyperaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, **15**: 98-102.

SABINO, K.C.C.; OLIVEIRA, A.M., COELHO, M.G.P., FREITAS, C.S., DALMAU, S.R. 1996. CD4 and CD8 labeling for the evaluation of early apoptosis in human blood lymphocytes. **Journal of Medical Sciences Research**, **24**: 487-489.

SABINO, K.C.C.; CASTRO, F.A.; OLIVEIRA, J.C.R.; DALMAU, S.R.A.; COELHO, M.G.P. 1999a. Successful treatment of collagen-induced arthritis in mice with a hydroalcoholic extract of seeds of *Pterodon pubescens*. **Phytotherapy Research**, **13**: 613-615.

SAFAIHY, H.; SAILER, E.R. 1997. Anti-inflammatory actions of pentacyclic triterpenes. **Planta Medica** **63**: 487–493.

SAKAGAMI, Y., KAJAMURA, K. 2006. Bactericidal activities of disinfectants against vancomycin-resistant Enterococci. **Journal of Hospital Infection**, **56**: 140-144.

SAROGLOU, V.; DORIZAS, N.; KYPRIOTAKIS, Z.; SKALTSA, H.D. 2006. Analysis of the essential oil composition of eight *Anthemis* species from Greece. **Journal of Chromatography**, **1104**: 313-322.

SALEH, T.S.F.; CALIXTO, J.B.; MEDEIROS, Y.S. 1996. Anti-inflammatory effects of theophylline, cromolyn and salbutamol in a murine model of pleurisy. **British Journal of Pharmacology** **118**: 811–819.

SALEH, T.S.F.; CALIXTO, J.B.; MEDEIROS, Y.S. 1999. Effects of anti-inflammatory drugs upon nitrate and myeloperoxidase levels in the mouse pleurisy induced by carrageenan. **Peptides** **20**: 949–956.

SALYERS, A.A.; AMÁBILE-CUEVAS, C.F. 1997. Why are antibiotic genes so resistant to elimination? **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, **41**: 2321-2325.

SANTOS, A.R.S.; CALIXTO, J.B. 1997a. Further evidence for the involvement of tachykinin receptor subtypes in formalin and capsaicin models of pain in mice. **Neuropeptides**, **31**: 381-389.

SANTOS, S.C.; MELLO, J.C.P. 2000. **Taninos**. 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.

SAUVAIN, M.; KUNESCH, N.; POISSON, J.; GANTIER, J.C.; GAYRAL, P.; DEDET, J.P. 1996. Isolation of leishmanicidal triterpenes and lignans from Amazonian liana *Dolioscarpus dentatus* (Dellineaceae) **Phytotherapy Research**, **10**: 1-4.

SCALBERT, A. 1991. Antimicrobial properties of tannins. **Phytochemistry**, **30**: 3875-3883.

SCHENKEL, E.P.; SIMÕES, C.M.O.; MENGUE, S.S.; MENTZ, L.A.; IRGANG, B.E.; STEHMANN, J.R. 1985. O espaço das plantas medicinais e suas formas derivadas na medicina científica. **Caderno de Farmácia** **1**: 65-72.

SEDGWICK, J.C.; RIMINTON, D.S.; CYSTER, J. C.; KORNER, H. 2000. Tumor necrosis factor: a master-regulator of leukocyte movement. **Immunology Today** **21**: 110-112.

SEGUIN, L.; MAROUILLE-GIRARDON, L.; MILLAN, M. J. 1995. Antinociceptive profiles of non-peptidergic neurokinin-1 and neurokinin-2 receptor antagonist, a comparison to other classes of antinociceptive agent. **Pain**, **61**: 325-343.

SHANNON, H. E.; LUTZ, E. A. 2002. Comparison of the peripheral and central effects of the opioid agonists loperamide and morphine in the formalin test in rats. **Neuropharmacology**, **42**: 253-26.

SHIOMORI, T.; MIYAMOTO, H.; MAKASHIMA, K.; YOSHIDA, M.; FUJIYOSHI, T.; UDAKA, T.; INABA, T.; HIRAKI, N. 2002. Evaluation of bedmaking-related airborne and surface methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* contamination. **Journal of Hospital Infection**, **50**: 30-35.

SIEGMUND, E.A.; CADMUS, R.A.; LU, G. 1957a. A method for evaluating both non-narcotic and narcotic analgesics. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, **95**: 729-731.

SIEGMUND, E.A.; CADMUS, R.A.; LU, G. 1957b. Screening analgesics, including aspirin-type compound, based upon the antagonism of the chemically induced "writhing" in mice. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, **119**: 184-193.

SIEGMUND, S. 2003. Animal models in gastrointestinal alcohol research-a short appraisal of the different models and their results. **Best Practice & Research Clinical Gastroenterology**, **17**, **4**: 519-542.

SILVA, J.M.C.; FELFINI, J.M.A. 1992. **Florestas Nativas**. In: Alternativas de desenvolvimento dos cerrados: manejo e conservação dos recursos naturais renováveis. Funatura, Brasília.

SILVA, G.L.; CHAI, H.; GUPTA, M.P.; FARNSWORTH, N.R.; CORDELL, G.A.; PEZZUTO, J.M.; BEECHER C.W.W.; KINGHORN, D. 1995. Cytotoxic biflavonoids from *Selaginella willdenowii*. **Phytochemistry**, **40**: 129-134.

SILVA, M.C.C.; GAYER, C.R.M.; LOPES, C.S.; CALIXTO, N.O.; REIS, P.A.; PASSAES, C.P.B.; PAES, M.C.; DALMAU, S.R.; SABINO, K.C.C.; TEDESCHINI, A.R.; COELHO, M.G.P. 2004. Acute and topic anti-edematogenic fractions isolated from the seeds of *Pterodon pubescens*. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, **55**: 135-141.

SILVA, S.A.G.; DA COSTA, S.S.; MENDONÇA, S.C.F.; SILVA, E.M.; MORAES, V.L.G.; ROSSI-BERGMAN, B. 1995. Therapeutic effect of oral *Kalanchoe pinnata* leaf extract in murine leishmaniasis. **Acta Tropica**, **60**: 201-210.

SIMÕES, C.M.O.; MENTZ, L.A.; SCHENKEL, E.P.; IRGANG, B.E.; STEHMANN, J.R. 1986. **Plantas da medicina popular no Rio Grande do Sul**. Editora da Universidade UFRGS, Porto Alegre.

SIMÕES, C.M.O.; SPITZER, V. 2004. **Óleos voláteis**. 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.

SIMPSON, A.J.G.; CABALLERO, O.L.; DANI, S.U. 1998. **Oncogenes e genes supressores**. In: Brentani, M.N.; Coelho, F.R.G.; Iyeyasu, H.; Kowalski, L.P., ed. – *Bases da Oncologia*. 1a ed., Livraria e Editora Marina, São Paulo, p. 53-70.

SINDERMANN, H.; CROFT, S.L.; ENGEL, K.R.; BOMMER, W.; EIBI, H.J.; UNGER, C.; ENGEL, J. 2004. Miltefosine (Impavido): the first oral treatment against leishmaniasis. **Medical Microbiology and Immunology**, **193**: 173-180.

SINGLETON, V.L.; KRATZER, F.H. 1973. Toxicants occurring naturally in foods. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 309-345.

SIQUEIRA, J.C. 1981. **Utilização popular das plantas do cerrado**. Edições Loyola, São Paulo.

SIQUEIRA, J.M.; BOMM, M.D.; PEREIRA, N.F.G.; GARCEZ, W.S.; BOAVENTURA, M.A.D. 1982. Estudo fitoquímico de *Unonopsis lindmanii* Annonaceae, biomonitorado pelo ensaio de toxicidade sobre *Artemia salina*. **Química Nova**, **21**, **5**: 200-206.

SKEHAN, P.; STORENG, R.; SCUDIERO, D.; MONKS, A.; MCMAHON, J.; VISTICA, D.; WARREN, J.T.; BOKESCH, H.; KENNEY, S.; BOYD, M.R. 1990. New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. **Journal of National Cancer Institute**, **82**: 1107-1118.

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.

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.

SOLIS, P.N.; WRIGHT, C.W.; ANDERSON, M.M.; GUPTA, M.P.; PHILLIPSON, J.D. 1993. A microwell cytotoxicity assay using *Artemia salina*. **Planta Medica**, **59**: 250-252.

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

SONBOLI, A.; BABAKHANI, B.; MEHRABIAN, A.R. 2006. Antimicrobial activity of six constituents of essential oil from *Salvia*. **Verlag der Zeitschrift Fur Naturforschung**, **61**: 160-164.

SONTAG, S.J. 1997. Guilty as charged: bugs and drugs in gastric ulcer. **American Journal of Gastroenterology**, **92**: 1255–1261.

SOUZA-FORMIGONI, M.L.; OLIVEIRA, M.G.; MONTEIRO, M.G.; DA SILVEIRAFILHO, N.G.; BRAZ, S.; CARLINI, E.A. 1991. Antiulcerogenic effects of two *Maytenus* species in laboratory animals. **Journal of Ethnopharmacology**, **34, 1**: 21-27.

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

STADNYK, A.W.; GAULDIE, J. 1991. The acute phase protein response during parasitic infection. **Immunology Today** **12**: 7-12.

STEEL, D.M.; WHITEHEAD, A.S. 1994. The major acute phase reactants: C-reactive protein, serum amyloid P component and serum amyloid A protein. **Immunology Today** **15**: 81-88.

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 Sciences U.S.A.**, **84**: 8917-8921.

SUBHASHINI, J.; MAHIPAL, S.V.K.; REDDANNA, P. 2005. Anti-proliferative and Apoptotic Effects of Celecoxib on Human Chronic Myeloid Leukemia *in vitro*. **Cancer Letters**, **224**: 31-43.

SUSCHEK, C.V.; SCHNORR, O.; KOLB-BACHOFEN, V. 2004. The role of iNOS in chronic inflammatory processes in vivo: is it damage-promoting, protective, or active at all? **Current Molecular Medical**, **4**: 763-775.

SWAIM, S.F.; GILLETE, R.L. 1998. An update on wound medications and dressings. **Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian** **20**, **10**: 1133 -1144.

SWANSON, K.M.J.; BUSTA, F.F.; PETERSON, E.H.; JOHANSON, M.G. 1992. **Colony count methods**. In: compendium of methods for the microbiological examination of food. 3. ed. Vanderzant, C.; Splittstoesser, D.F. (eds). American Public Health Association, Washington.

TABER, R. 1974. **Predictive value of analgesic assays in mice and rats**. In: BRAUDE, M.; HARRIS, L.; MAY, E.; SMITH, H.; VILLARREAL, J. (Eds.), *Advances in Biochemical Psychopharmacology*. Raven Press, New York.

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.

TJOLSEN, A.; HOLE, K. 1997. **Animals models of analgesia**. In: *The pharmacology the pain* (ed. DICKENSON, A.; BESSON, J. M.). Springer, Berlin.

TORRENEGRA, R.; BAUEREIB, P.; ACHENBACH, H. 1989. Homoormosanine-type alkaloids from *Bowdichia virgiloides*. **Phytochemistry**, **28**: 2219-2221.

VALKO, M.; IZAKOVIC, M.; MAZUR, M.; RHODES, C.J.; TELSER, J. 2004. Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence. **Molecular and Cellular Biochemistry**, **266**: 37.

VALLANO, M.L. 1998. Developmental aspects of NMDA receptor function. **Crit. Rev. Neurobiology**, **12**: 177-204.

VAN ACKER, S.A.B.E.; VAN BALEN, G.P.; VAN DEN BERG, D.J.; BAST, A.; VAN DER VIJGH, W.J.F. 1998. Influence of iron chelation on the antioxidant activity of flavonoids. **Biochemistry Pharmacology**, **56**: 935-943.

VAN ASSCHE, G.; RUTGEERTS, P. 2000. Anti-TNF agents in Crohn's disease. **Expert Opinion on Investigational Drugs** **9**: 103–111.

VAUGHN, S.F.; SPENCER, G.F. 1993. Volatile monoterpenes as potential parent structures for new herbicides. **Weed Science**, **41**: 114-19.

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.

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.

VERDI, L.G.; BRIGHENTE, I.M.C.; PIZZOLATTI, M.G. 2005. O gênero *Baccharis* (Asteraceae): Aspectos químicos, econômicos e biológicos. **Química Nova**, **28**: 85-94.

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

VISIOLI, F.; KEANEY JR., J. F.; HALLIWELL, B. 2000. Antioxidants and cardiovascular disease; panaceas or tonics for tired sheep? **Cardiovascular Research**, **47**: 409-418.

VINEGAR, R.; TRUAX, J.F.; SELPH, J.L. 1973. Some quantitative characteristics of carrageenin-induced pleurisy in the rat. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine** **143**: 711–714.

VOLANAKIS, J. E. 1993. **Acute-phase proteins in rheumatic diseases**. In: McCARTY, D.J.; KOOPMAN, W. J. Arthritis and allied conditions. Lea & Febiger, Philadelphia.

WANI, M.C.; TAYLOR, H.L.; WALL, M.E.; COGOON, P.; MCPHAIL, A.T. 1971. Plant antitumor agent.VI.The isolation and struture of taxol, a novel antileukemic and antitumor agent from *Taxus brevifolia*. **Journal of the American Chemical Society**, **93**: 2325-2327.

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

WHITTLE, B.A. 1964. Realese of a kinin by intraperitoneal onjections of chemical agents in mice. **International Journal of Neuropharmacology**, **3**: 369-378.

WONG, D.; PRAMEYA, R.; DOROVINI-ZIS, K.; VINCENT, S.R. 2004. Nitric oxide regulates interactions of PMN with human brain microvessel endothelial cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications** **323**: 142–148.

WOOLFE, G.; MACDONALD, A.D. 1944. The evaluating of the analgesic action of pethidine hydrochloride (Demerol). **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, **80**: 300-307.

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

XU, B.J.; CHANG, S.K.C. 2007. A comparative study on phenolic profiles and antioxidant activities of Legumes as affected by extraction solvents. **Journal of Food Science**, **72, (2)**: 159-166.

YESILADA, E.; TAKAISHI, Y.; FUJITA, T.; SEZIK, E. 2000. Anti-ulcerogenic effects of *Spartium junceum* flowers on in vivo test models in rats. **Journal of Ethnopharmacology**, **70**: 219-226.

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.

ZANGERL, A.R.; GREEN, E.S.; LAMPMAN, R.I.; BEREMBAUM, M.R. 1997. Phenological changes in primary and secondary chemistry of reproductive parts in wild parsnip. **Phytochemistry**, **44, 5**: 825-831.

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 – 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 subcutâneo. Analgésico: Dipirona.

1º dia

Queimadura

Com barra de ferro (5 cm²) 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 B – Artigo aceito para publicação

1. International Journal Molecular Science

Quantification of phenolic constituents and antioxidant activity of *Pterodon emarginatus* Vogel seeds.

Rafael Cypriano Dutra¹, Magda Narciso Leite², Nádia Rezende Barbosa^{1*}

¹Departamento de Alimentos e Toxicologia, Faculdade de Farmácia e Bioquímica, Universidade Federal de Juiz de Fora, Martelos, CEP 36036-330, Juiz de Fora, MG, Brazil; e-mail: rafaelcdutra@gmail.com

²Departamento Farmacêutico, Faculdade de Farmácia e Bioquímica, Universidade Federal de Juiz de Fora, Martelos, CEP 36036-330, Juiz de Fora, MG, Brazil; e-mail: mnleite@fbio.ufjf.br

* Author to whom correspondence should be addressed; E-mail: nadiafox@gmail.com

Abstract: *The seeds of Pterodon emarginatus, typical of the Brazilian cerrado ecoregion, were studied concerning total phenolic contents, using Folin-Dennis assay; level of flavonoids through the reaction with aluminum chloride and antioxidant activity using 2,2- diphenyl-2-picrylhydrazyl hydrate (DPPH) assay. So as to quantify the phenolic and flavonoid constituents several samples were used: essential oil (EO) using Clevenger; hexanic (HF), ethyl acetate (EAF), buthanolic (BF) and methanolic (MF) fractions using Soxhlet, and extracts (1 g/extract) obtained from four different methods of extraction: reflux 80°C during 30 min, ultrasound for 30 min, static maceration during 48 h and heating plate 100°C for 45 min. These extracts were prepared using: A (water), B [30:70, v/v ethanol/water], C*

[50:50, v/v ethanol/water] and D [70:30, v/v ethanol/water]. Antioxidant activity was tested only in the fractions obtained from Soxhlet. The extract obtained from reflux using ethanol/water (70:30, v/v) showed the highest phenolic constituents level. In the heating plate method flavonoids level was the lowest amongst the tested methods. The EAF, BF and MF showed DPPH scavenging activities with IC_{50} values of 163.22, 18.89 and 10.15 $\mu\text{g/ml}$, respectively. A positive correlation was established between the level of flavonoids and the antioxidant activity of the tested fractions.

Keywords: *Pterodon emarginatus*, Leguminosae, phenolic constituents, DPPH.

Introduction

Oxidation is a basic part of the aerobic life and of our metabolism. Thus radicals are produced either naturally or by some biological dysfunction. Unpaired electrons which are centered in atoms of oxygen or nitrogen are called reactive oxygen species (ROS) or reactive nitrogen species (RNS) [1-4] and its excess has a harmful effect, such as the peroxidation of the membrane lipids, aggression to tissue proteins and membranes, on damage to DNA and enzymes [5]. Therefore, they can be related to some pathologies, such as arthritis, hemorrhagic shock and coronary diseases, cataract, cancer, AIDS as well as age-related degenerative brain disorders [6].

Currently, there is a great interest in the study of antioxidant substances mainly due to the findings of the free radicals' effects in the organism. The phenolic constituents found in vegetables have attracted considerable attention for being the main components of antioxidant activity, in spite of not being the only ones. The antioxidant activity of phenolics is mainly due to their redox properties, which allow them to act as reducing agents, hydrogen donors, and singlet oxygen quenchers. In addition, they have a metal chelation potential. The antioxidant activity of phenolics play an important role in the adsorption or neutralization of free radicals [7].

The genus *Pterodon* (Leguminosae) comprises five species native to Brazil: *Pterodon abruptus* Benth., *Pterodon apparicioi* Pedersoli, *Pterodon polygalaeflorus* Benth., *Pterodon pubescens* Benth. and *Pterodon emarginatus* Vogel. *Pterodon emarginatus* Vog., known in Brazil as sucupira-branca or faveiro. It is a native aromatic tree reaching 5-10 m in height distributed throughout the central region of Brazil (Goiás, Minas Gerais and São Paulo) [8]. Hydroalcoholic infusions of seeds are used in folk medicine for their anti-rheumatic, analgesic and anti-inflammatory properties [9-11].

Chemical studies on *Pterodon* have shown the presence of alkaloid compounds in the bark [12], isoflavone and some triterpenes in the wood [13], and diterpenes [14-15] and isoflavones in the seed oil [16]. The diterpene 14,15-epoxygeranylgeraniol and some derivatives isolated from *P. pubescens* have been associated with protective activity against the penetration of cercarias of *Schistosoma mansoni*, a typical tropical disease [17]. The furan-diterpene 6 α , 7 β -dihydroxyvouacapan-17 sodium-oate, isolated from the *P. polygalaeflorus* Benth's fruit oil, showed anti-inflammatory activity in the paw edema produced by carrageenin [11, 18-19].

Jantová *et al.* (2000) found that the plants possess significant cytotoxic and antibacterial activities [20-21], but the chemical composition of the extracts were not elucidated. Only a limited number of papers have described the various flavonoid, amino-containing, triterpene, steroid, megastigmane, saccharide, organic and fatty acid compounds found therein [22]. Due to these

findings, we have focused on establishing a relationship between the total phenolic content and antioxidant activity of seeds of *P. emarginatus*.

Results and discussion

The total phenolic content of *P. emarginatus* seeds is shown in Table 1. The results demonstrated that the reflux and heating plate were more efficient for polyphenols extraction showing the efficiency of heat in the extraction of these compounds. However, comparing the heating plate with reflux, using ethanol/water (70:30, v/v) as solvent, a smaller concentration of phenolic constituents was obtained in heating plate method, suggesting that this procedure is involved in the degradation of some polyphenolic constituents.

The temperature during the drying and heating process affects compound stability due to chemical and enzymatic decomposition, losses by volatilization or thermal decomposition; these latter have been suggested to be the main mechanisms causing the reduction of polyphenol contents. However, the total polyphenols in extracts obtained of *P. emarginatus* increased from 781.60 (plate heating) to 852.60 mg/100g (reflux), this is most likely attributed to the formation of phenolic substances under milder heating temperature whereas polyphenols are degraded at elevated heating temperatures, such as plate heating. The formation of phenolic compounds during the heating process might be due to the availability of phenolic molecules' precursors, by non-enzymatic interconversion amongst phenolic molecules subjected to the effects of external factors, such as temperature [23]. Thus, the plant composition and the degree of heating could be important factors contributing to high total polyphenol content. However, further investigation is needed to truly explain this phenomenon.

Solvent extraction is frequently used for isolation of antioxidants and both extraction yield and antioxidant activity of extracts are strongly dependent on the solvent, due to the different antioxidant potentials of compounds with different polarity [24-25]. In this work, the extraction made under reflux using ethanol/water (70:30, v/v) presented the highest polyphenol level, and was considered the ideal method for the extraction of such constituent. It leads to the conclusion that the increase in the amount of ethanol in the solvent contributes to the extraction of tannins of higher molecular weight [26].

It was not possible to detect the phenolic constituent in essential oil (EO) and hexanic (HF), ethyl acetate (EAF), buthanolic (BF) and methanolic (MF) fractions of *P. emarginatus* seeds.

Table 1. Phenolic constituents of *P. emarginatus* seeds submitted the different processes of extraction[#].

Extraction procedures	Phenolic constituent (mg/100g)			
	Water	Ethanol/water (30:70, v/v) ¹	Ethanol/water (50:50, v/v)	Ethanol/water (70:30, v/v) ²
Reflux ^a	ND	5.20 ± 0.25	600.30 ± 2.51	852.60 ± 2.51
Maceration	ND	ND	ND	501.00 ± 1.73
Ultrasound	ND	ND	ND	603.00 ± 2.08
Plate of heating ^b	113.00 ± 1.00	332.60 ± 2.51	536.30 ± 1.52	781.60 ± 1.52

[#] Data are expressed as the mean ± standard deviation (n=3). Statistical significance was calculated by ANOVA followed by Tukey test. Letters indicate statistical differences between lines. Numbers indicate statistical differences between columns. ^{a, b, 1, 2} all methods show statistical differences.

The level of flavonoids are shown in Table 2. In the heating plate methods the level of flavonoids was the smallest amongst the tested methods, what leads to the conclusion that under such conditions the flavonic constituents in this sample may be degraded.

Water is a polar extractor, so it will extract polar constituents, such as heterosides. In this work, when water was used as liquid extractor, the level of flavonoids was higher, suggesting that these flavonic constituents might be in the heteroside form since previous studies showed that flavonoids can be found in nature in the free state or in the form of glycosides [27-29].

The fractions obtained by Soxhlet from *P. emarginatus* seeds, presented flavonoids: 2.92 mg/100 mg, 3.16 mg/100 mg and 3.01 mg/100 mg, respectively EAF, BF and MF fractions. It EO and HF was not possible to determine flavonic constituents.

Table 2. Flavonoids levels of *P. emarginatus* seeds submitted to the different processes of extraction[#].

Extraction Method	Flavonoids (mg/100g)			
	Water ⁶	Ethanol/water (30:70, v/v) ¹	Ethanol/water (50:50, v/v)	Ethanol/water (70:30, v/v)
Reflux	132.00 ± 1.00	122.00 ± 2.00 ^a	106.06 ± 3.05 ^{b, 2}	120.30 ± 1.53 ^{a, 4}
Maceration	110.00 ± 1.00 ^d	103.30 ± 2.3 ^c	110.60 ± 1.15 ^{d, 2}	123.00 ± 1.73 ⁴
Ultrasound	101.70 ± 1.53 ^f	92.60 ± 2.5 ^e	96.30 ± 1.53 ^e	131.30 ± 1.53
Plate of heating	68.00 ± 1.00	67.00 ± 1.00	73.70 ± 1.15 ^{9, 3}	68.00 ± 1.00 ⁵

[#] Data are expressed as mean ± standard deviation (n=3). Statistical significance was calculated by

ANOVA followed by Tukey test. Letters indicate statistical differences between lines. Numbers indicate statistical differences between columns.

^a p<0.05 compared to water and ethanol/water (50:50, v/v); ^b p<0.05 compared to water; ^c p<0.05 compared to water, ethanol/water (50:50, v/v) and ethanol/water (70:30, v/v); ^d p<0.05 compared to ethanol/water (30: 70, v/v) and ethanol/water (70:30, v/v); ^e p<0.05 compared to water and ethanol/water (70:30, v/v); ^f p<0.05 compared to ethanol/water (70:30, v/v); ^g p<0.05 compared to water, ethanol/water (30:70, v/v) and ethanol/water (70:30, v/v); ^{1, 6} all methods show statistical differences; ² p<0.05 compared to ultrasound and plate of heating; ³ p<0.05 compared to ultrasound, maceration and reflux; ⁴ p<0.05 compared to ultrasound and plate of heating; ⁵ p<0.05 compared to ultrasound, maceration and reflux.

The antioxidant activity of *P. emarginatus* was evaluated in the EO and fractions obtained from Soxhlet by their ability to scavenge DPPH free radicals. The radical scavenging activity of the compounds can be measured as a decolorizing effect following the trapping of the unpaired electrons of DPPH. A lower value of IC₅₀ indicates a higher antioxidant activity. The BF and MF demonstrated scavenging activity of DPPH radicals with IC₅₀ values of 18.89 µg/ml and 10.15 µg/ml, respectively. The EAF showed a smaller antioxidant activity (IC₅₀ = 163.22 µg/ml). However, the EO and HF did not demonstrate antioxidant activity at all tested concentrations. Ascorbic acid and butylated hydroxytoluene (BHT) produced IC₅₀ values of 2.50 µg/ml and 7.58 µg/ml, respectively.

Based on previous data, it is possible that the powerful antioxidant activity of polar extracts is given by the presence of the substance with hydroxyls [30-31]. In this context, flavonoids possess an ideal structure for the scavenging of free radicals since they present a number of hydroxyls acting as hydrogen-donators which makes it an important antioxidant agent [7, 32].

The key role of phenolic compounds as scavengers of free radical is emphasized in two important reports [33-34]. Antioxidative properties of essential oils and various extracts from many plants are of great interest in both academia and the food industry since their possible use as natural additives emerged from a growing tendency to replace synthetic antioxidants by natural ones. In this respect, studying the medicinal species may be of interest since their bioactive properties could be lost forever without being tapped. The results of this work indicate that the EAF, BF and MF obtained from *P. emarginatus* seeds showed capacity to donate hydrogen, therefore they present scavenging activity of DPPH. This activity might be due to the presence of flavonic constituents detected in the samples.

Conclusions

This study reports for the first time the antioxidant activity and total phenolic content in *P. emarginatus* seeds. Buthanolic (BF) and methanolic (MF) fractions exhibited a marked scavenging effect on DPPH radical. Chemical elucidation of the extracts' contents and fractions of *P. emarginatus*,

should be the main objective of further investigations. This should lead to the structural identification of the active metabolites and the determination of their antioxidant profile in pure form.

Acknowledgments

This work was supported by Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoa de Nível Superior (CAPES).

Experimental

General

Plant material (seeds) of the specie *Pterodon emarginatus* was collected in September 2006 at the city of Três Marias (Minas Gerais, Brazil) and authenticated by Dra. Fátima Regina Gonçalves Salimena from the Department de Botany, UFJF, Brazil. A voucher specimen (Nº 48.077) has been deposited at the CESJ Herbarium of the Federal University of Juiz de Fora (Minas Gerais, Brazil).

The seeds of *Pterodon emarginatus* were triturated (30 g) and hydrodistilled in a Clevenger-type apparatus. After 2 h distillation, the essential oil (EO) was collected as a film floating on the surface of the water. The samples were sealed and kept in dark glass vials in the refrigerator at 4°C for further analysis.

Thirty grams of seeds were triturated with the aid of pruning shears and submitted to extraction using a Soxhlet extraction device with hexane, ethyl acetate, buthanol and methanol until reaching the exhaustion of the drug. The fractions were subjected to rotary evaporation, until complete elimination of the solvent, four fractions of different polarities were obtained: hexanic (HF), ethyl acetate (EAF), buthanolic (BF) and methanolic (MF).

For the quantification of the phenolic and flavonoid constituents were used fractions obtained by Soxhlet (described above) and several extracts (1 g/extract) obtained by four different methods of extraction: reflux 80°C during 30 min, ultrasound for 30 min, static maceration during 48 h and heating plate 100°C for 45 min. These extracts were prepared using 30, 50 and 70% ethanol and distilled water as solvent. These extracts were prepared using: A (water), B [30:70, v/v ethanol/water], C [50:50, v/v ethanol/water] and D [70:30, v/v ethanol/water] as extraction media.

A spectrophotometric method explained AOAC [35] was adapted for the phenolic content assay. Extracts or fractions thereof (described above), were dissolved in methanol to obtain a concentration of 0.5 mg/ml. Folin–Dennis reagent (100 µl) was added to a test tube containing the extracts or fractions (10 µl). Contents were mixed and a saturated sodium carbonate solution (200 µl) was added to the tube. Volume was adjusted to 2 ml by the addition of 1.69 ml of distilled water and the contents were mixed vigorously. Tubes were allowed to stand at room temperature for 25 min and then centrifuged for 5 min at 4000 $\times g$. Absorbance of the supernatant was read at 760 nm. Blank samples of each extract or fraction were used for background subtraction. Tannic acid was used as standard for the construction of the calibration curve (2-10 µg/ml). The assay was carried out in triplicate.

The procedure used for the quantification of flavonoids is based on the reaction between the flavonoids and aluminum chloride forming a complex with a yellow color that can be measured in a spectrophotometer at a wavelength of 420 nm [36]. Rutin was used as standard for the construction of the calibration curve (2-30 µg/ml). For the quantification of the flavonoids content in the extracts or fractions thereof, aliquots of 4 ml of chloroform and 6 ml of distilled water were added to 10 ml of the previously obtained samples. The resulting solutions were mixed and centrifuged for 3 min at 2435 x g. Two milliliters of the aqueous phase was diluted to 25 ml with 10 ml of the reagent (pyridine, distilled water and aluminum chloride solution 17:80:3, v/v), 12.4 ml of a solution composed of water and dimethyl sulfoxid (1:2, v/v) and 0.6 ml of glacial acetic acid and, soon after vortexing the reaction mixture, the tubes were placed in the dark for 15 min and the absorbance was measured at a wavelength 420 nm against the reagent blank. The construction of the calibration curve and the preparation of the sample solutions of the hydroalcoholic extracts for reading were done in triplicate.

The radical scavenging activity were determined by the 2,2- diphenyl-2-picrylhydrazyl hydrate (DPPH) (Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, Germany) method [37]. The molecule DPPH characterized as stable-free radical by virtue of the delocalization of the spare electron over the molecule; this delocalization produces a deep violet color, characterized by an absorption band in ethanol or methanol solution centered at about 517 nm. When a solution of DPPH is mixed with that of a substance, that can donate a hydrogen atom, this gives rise to the reduced form (diphenylpicrylhydrazine), with the loss of violet color.

An aliquot (0.5 ml) of ethanol solution containing different amounts of the essential oil (OE) and fractions (HF, EAH, BF and MF) obtained from seeds of *Pterodon emarginatus* (0.97-250 µg/ml) was added to 1.5 ml of daily prepared ethanol DPPH solution (0.05 mM). The optical density change at 517 nm was measured 30 min later by a spectrophotometer. A blank was used to remove the influence of the color of the samples. An ethanolic solution of DPPH was used as negative control. Ascorbic acid and butylated hydroxytoluene (BHT) were used as reference drugs, at the same concentrations (0.97-250 µg/ml) as were used for the samples. Results were expressed as mean inhibiting concentration (IC₅₀). IC₅₀ parameter is defined as the concentration (µg/ml) of substrate that causes 50% loss of DPPH activity (color) and it was calculated by using the following equation: IC₅₀ (%) = 100 x (A₀ - A_s)/A₀, where A₀ and A_s are the values for the absorbance of the negative control and the absorbance of the sample, respectively. Tests were carried out in triplicate.

References

1. Finkel, T.; Holbrook, N.J. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature* **2000**, *408*, 239-247.
2. Halliwell, B. The antioxidant paradox. *The Lancet* **2000**, *355*, 1179- 1180.
3. Pietta, P. Flavonoids as antioxidant. *J. Nat. Prod.* **2000**, *63*, 1035- 1042.
4. Visioli, F.; Keaney Jr, J.F.; Halliwell, B. Antioxidants and cardiovascular disease; panaceas or tonics for tired sheep? *Cardiovasc. Res.* **2000**, *47*, 409-418.
5. Husain, S.R.; Cillard, J.; Cillard, P. Hydroxyl radical scavenging activity of flavonoids. *Phytochemistry* **1987**, *26*, 2489-2497.

6. Parr, A.; Bolwell, G. P. Phenols in the plant and in man: The potential for possible nutritional enhancement of the diet by modifying the phenols content or profile. *J. Sci. Food Agric.* **2000**, *80*, 985–1012.
7. Basile, A.; Ferrara, L.; Del Pozzo, M.; Mele, G.; Sorbo, S.; Bassi, P.; Montesano, D. Antibacterial and antioxidant activities of ethanol extract from *Paullinia cupana* Mart. *J. Ethnopharmacol.* **2005**, *102*, 32-36.
8. Lorenzi, H.; Matos, F.J.A. *Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas*. Instituto Plantarum: São Paulo, **2002**, p. 544.
9. Coelho, L.P.; Reis, P.A.; Castro, F.L.; Gayer, C.R.M.; Lopes, C.S.; Silva, M.C.C.; Sabino, K.C.C.; Todeschini, A.R.; Coelho, M.G.P. Antinociceptive properties of ethanolic extract and fractions of *Pterodon pubescens* Benth. seeds. *J. Ethnopharmacol.* **2005**, *98*, 109-119.
10. Brito, A.R.M.S.; Brito, A.A.S. Forty years of Brazilian medicinal plant research. *J. Ethnopharmacol.* **1993**, *39*, 53-67.
11. Duarte, I.D.G.; Ferreira-Alves, D.L.; Veloso, D.P.; Nakamura-Craig, M. Evidence of the involvement of biogenic amines in the antinociceptive effect of a vouacapan extracted from *Pterodon polygalaeflorus* Benth. *J. Ethnopharmacol.* **1996**, *55*, 13-18.
12. Torrenegra, R.; Bauereib, P.; Achenbach, H. Homoomosanine-type alkaloids from *Bowdichia virgiloides*. *Phytochemistry* **1989**, *28*, 2219-2221.
13. Marques, D.D.; Machado, M.I.L.; Carvalho, M.G.; Meleira, L.A.C.; Braz-Filho, R.; Aughlin J.L. Isoflavonoids and triterpenoids isolated from *Pterodon polygalaeflorus*. *J. Braz. Chem. Soc.* **1998**, *9*, 295-301.
14. Fascio, M.; Mors, W.B.; Gilbert, B.; Mahajan, J.R.; Monteiro, M.B.; Dos Santos Filho, D.; Vichnewski, W. Diterpenoid Furans from *Pterodon* species. *Phytochemistry* **1976**, *15*, 1, 201-203.
15. Arriaga, A.M.C.; Castro, M.A.B.; Silveira, E.R.; Braz-Filho, R. Further diterpenoids isolated from *Pterodon polygalaeflorus*. *J. Braz. Chem. Soc.* **2000**, *11*, 187-190.
16. Braz Filho, R.; Gottlieb, O.R.; Assumpção, R.M.V. The isoflavones of *Pterodon pubescens*. *Phytochemistry* **1971**, *10*, 2835-2836.
17. Dos Santos Filho, D.; Vichnewski, W.; Baker, P.M.; Gilbert, B. Prophylaxis of Schistosomiasis diterpenes from *Pterodon pubescens*. *An. Acad. Bras. Ciênc.* **1972**, *44*, 45-49.
18. Demuner, A.J.; Barbosa, L.C.A.; Veloso, D.P.; Ferreira-Alves, D.L.; Howarth, O.W. Structure and plant growth regulatory activity of new diterpenes from *Pterodon polygalaeflorus*. *J. Nat. Prod.* **1996**, *59*, 110-112.
19. Silva, M.C.C.; Gayer, C.R.M.; Lopes, C.S.; Calixto, N.O.; Reis, P.A.; Passaes, C.P.B.; Paes, M.C.; Dalmau, S.R.; Sabino, K.C. C.; Todeschini, A.R.; Coelho, M.G.P. Acute and topic anti-edematogenic fractions isolated from the seeds of *Pterodon pubescens*. *J. of Pharm. and Pharmacol.* **2004**, *55*, 135-141.
20. Jantova S.; Nagy M.; Ruzekova L.; Grancai D. Antibacterial activity of plant extracts from the families Fabaceae, Oleaceae, Philadelphaceae, Rosaceae and Staphyleaceae. *Phytother. Res.* **2000**, *14*, 601-603.

21. Jantova S.; Nagy M.; Ruzekova L.; Grancai D. Cytotoxic effects of plant extracts from the families Fabaceae, Oleaceae, Philadelphaceae, Rosaceae and Staphyleaceae. *Phytother. Res.* **2001**, *15*, 22-25.
22. Lacikova L.; Masterova I.; Grancai D. Constituents of the genus *Staphylea* L. *Acta Fac. Pharm.Univ. Comen.* **2006**, *53*, 22-30.
23. Soong, Y.Y.; Barlow, P.J. Antioxidant activity and phenolic content of selected fruit seeds. *Food Chem.* **2004**, *88*, 411-417.
24. Julkunen-Tiito, R. Phenolic constituents in the leaves of northern willows, methods for the analysis of certain phenolics. *J. Agric. Food Chem.* **1985**, *33*, 213-217.
25. Marinova, E. M., Yanishlieva, N. Antioxidative activity of extracts from selected species of the family Lamiaceae in sunflower oil. *Food Chem.* **1997**, *58*, 245–248.
26. Xu, B.J.; Chang, S.K.C. A comparative study on phenolic profiles and antioxidant activities of Legumes as affected by extraction solvents. *J. Food. Sci.* **2007**, *72* (2), 159-166.
27. Bruneton, J. *Elementos de fitoquímica e de farmacognosia*. 1.ed. Editorial Acribia S.A.: Zaragoza, **1991**, p.134.
28. Robbers, J.E.; Speedie, M.K.; Tyler, V.E. *Pharmacognosy and pharmabiotecnology*. Editora International Williams & Wilkins: Baltimore, **1996**, p.128.
29. Zuanazzi, J.A.S. *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, **2000**, pp.576-614.
30. Harborne J.B.; Williams C.A. Anthocyanins and other flavonoids. *Nat. Prod. Rep.* **2001**, *18*, 310-333
31. Mensor L.L.; Menezes F.S.; Leitão G.G.; Reis A.S.; Santos T.C.; Coube C.S. Screening of Brazilian plant extracts for antioxidant activity by the use of DPPH free radical method. *Phytother. Res.* **2001**, *15*, 27-30.
32. Cao, G.; Sofic, E.; Prior, R.L. Antioxidant and prooxidant behavior of flavonoids: structure-activity relationships. *Free Rad. Biol. Med.* **1997**, *22*, 749-760.
33. Madsen, H.L.; Nielsen, B.R.; Bertelsen, G.; Skibsted, L.H. Screening of antioxidative activity of spices. A comparison between assays based on ESR spins trapping and electrochemical measurement of oxygen consumption. *Food Chem.* **1996**, *57*, 331–337.
34. Moller, J.K.S.; Madsen, H.L.; Altonen, T.; Skibsted, L.H. Dittany (*Origanum dictamnus*) as a source of water-extractable antioxidants. *Food Chem.* **1999**, *64*, 215–219.
35. Association of Official Analytical Chemists. *Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists*. 9.ed. Washington: Board, **1960**, p. 275.
36. Vennat, B.; Gross, D.; Pourrat, H. *Hamamelis virginiana*: identification and assay of proanthocyanidins, phenolic acids and flavonoids in leaf extracts. *Pharm. Acta Helv.* **1992**, *67*, 11-14.
37. Sreejavan, N.; Rao, M.N. A. Free radical scavenging activity of curcuminoids. *Drug Res.* **1997**, *46*, 169-171.

ANEXO C – Artigos submetidos para publicação

1. Journal of Ethnopharmacology

Antinociceptive activity of the essential oil and fractions of seeds of *Pterodon emarginatus* Vogel

Rafael Cypriano Dutra^a, Raphael Trevizani^a, Nádia Rezende Barbosa^a

^a Núcleo de Identificação e Quantificação Analítica-FFB/Universidade Federal de Juiz de Fora, MG, Brasil

* Corresponding author at

Prof. Dr. Nádia Rezende Barbosa

Faculdade de Farmácia e Bioquímica, Universidade Federal de Juiz de Fora

Campus Universitário - Martelos

CEP 36036-330 - Juiz de Fora – Minas Gerais – Brazil

Tel: +55 32 3229 3809

fax: +55 32 3229 3801

E-mail: nadiafox@gmail.com

Abstract

Pterodon emarginatus Vog. (Leguminosae), popularly known in Brazil as “sucupira branca”, is widely used by domestic medicine as an analgesic and anti-inflammatory. From these observations, essential oil (EO), hexanic (HF), buthanolic (BF) and methanolic (MF) fractions of the seeds were obtained and submitted for assessment of antinociceptive activity, administered by the oral route using peripheral (acetic acid-induced abdominal writhing and formalin) and supra-spinal (hot plate) models. The EO and HF demonstrate central activity and effect on supra-spinal regions of the CNS in the hot plate model, but the BF and MF demonstrate only a central activity effect. Our results indicate that EO and HF of the seeds of *Pterodon emarginatus* demonstrate peripheral and central antinociceptive effects. This proven effect may be useful in the treatment of analgesic disorders.

Keywords: Pterodon emarginatus; Leguminosae; Antinociceptive activity; Medicinal plant.

1. Introduction

The ‘sucupira branca’, vulgar denomination for the specie *Pterodon emarginatus* Vog. (Leguminosae) is a native aromatic tree reaching 5-10 m in height (Lorenzi and Matos, 2002) easily found all over central Brazil. It is used in popular medicine for the treatment of rheumatism, sore

throats, respiratory dysfunctions (bronchitis and amigdalytis), in addition to anti-inflammatory, analgesic, depurative and tonic activities. Their seeds are commercially available at the medicinal flora market, being used largely for their pharmacological properties (Leite de Almeida and Gottlieb, 1975; Arriaga et al., 2000). In the popular medicine, the seeds of *P. emarginatus* are prepared in hydroalcoholic solution using 50 g of seeds crushed in 250 ml of diluents (concentration of 200 mg/ml) of (ethanol or alcoholic drink, such as conhaque), under maceration static for 24-48 hours/Room temperature. After preparation, the extract is orally consumed 40 ml/day, divided into 2 doses daily for 7 days.

The genus *Pterodon* comprises five Brazilian native species: *P. abruptus* Benth, *P. apparicioni* Pedersoli, *P. emarginatus* Vogel, *P. pubescens* Benth and *P. polygalaeflorus* Benth. Chemical investigation of these species was first promoted by the discovery that the fruit oil of *P. pubescens* inhibited the penetration of the skin by schistosome cercaria, a property that was traced to 14,15-epoxygeranylgeraniol and later to the accompanying linear diterpenoid 14,15-dihydroxy-14,15-dihydrogeranylgeraniol. Geranylgeraniol itself also occurs in *P. pubescens* and as the characteristic floral odour of this diterpene and similar biological activity is observed in the fruit oils by *P. emarginatus*, *P. polygalaeflorus* and *P. apparicioni*, the presence of the same or related linear diterpenoids seems probable (Mors et al., 1967; Mahjan and Monteiro, 1973).

Chemical studies on *Pterodon* have shown the presence of alkaloid compounds in the bark (Torrenegra et al., 1989), isoflavone and some triterpenes in the wood (Marques et al., 1998) and diterpenes (Fascio et al., 1976; Arriaga et al., 2000) and isoflavones in seed oil (Braz-Filho and Gottlieb, 1971).

Fourteen furan diterpenes were described and isolated from the fruit of the *Pterodon* gender, among other substances, from which four belong to the *P. polygalaeflorus* Benth species (Fascio et al., 1975). The furan-diterpene 6 α , 7 β -dihydroxyvouacapan- 17 sodium-oate, isolated from the *P. polygalaeflorus* Benth's fruit oil, demonstrated an anti-inflammatory activity in the paw edema produced by carrageenin (Demuner et al., 1996; Duarte et al., 1996) and analgesic effects in the writhing test in mice (Nunan et al., 1982).

The antinociceptive mechanisms are greatly affected by changes in brain and spinal monoamine levels. Akil and Liebeskind (1975), using tail-flick and rats, showed that periaqueductal gray electrical stimulation-induced analgesia was markedly depressed by tetrabenazine, which depletes the three main brain monoamines. The catecholaminergic descending pathway seems to have an important role on the modulation of nociceptive transmission at the spinal cord level. Thus, noradrenaline given iontophoretically into dorsal horn, selectively reduces the nociceptive responses of neurons (Headley et al., 1978) and given intrathecally induces potent analgesia (Reddy et al., 1980), in this case, noradrenaline analgesia appears to be α - and not β -receptor mediated (Reddy et al., 1980). Additionally, the systemic administration of α_2 -adrenergic agonists causes analgesia as well (Schmitt et al., 1974; Bentley et al., 1977; Nakamura and Ferreira, 1988).

In this work, the antinociceptive activity of the essential oil and fractions of seeds of *Pterodon emarginatus* Vogel was demonstrated based on several animal models, in which the action is possibly similar to non-steroidal and opioid antinociceptive drugs effects.

2. Material and methods

2.1. Plant material

The seeds of *Pterodon emarginatus* were collected in September 2006 at the city of Três Marias (Minas Gerais, Brazil) and authenticated by Dr. Fátima Regina Gonçalves Salimena from the Departamento de Botânica, UFJF, Brazil. A voucher specimen (Nº 48.077) has been deposited at Herbarium CESJ of the Universidade Federal de Juiz de Fora (Minas Gerais, Brazil).

2.2. Isolation of the essential oils

The seeds of *Pterodon emarginatus* were triturated (30 g) and hydrodistilled in a Clevenger-type apparatus. After 2 h distillation, the essential oil (EO) was collected as a film floating on the surface of water. The samples were sealed and kept in dark glass vials in the refrigerator at 4°C for further analysis.

2.3. Preparation of the fractions

Thirty grams of seeds were triturated with aid of pruning shears and submitted to extraction using a Soxhlet extraction with hexane, buthanol and methanol until reaching the exhaustion of the drug. The fractions obtained were evaporated, until completed elimination of the solvent. Three fractions of different polarities were obtained: hexanic (HF), buthanolic (BF) and methanolic (MF) fractions. These were used for the evaluation of the antinociceptive activity in three animal models.

2.4. Animals

Male Swiss mice (*Mus musculus*) weighing between 25 and 30 g, from the Reproduction Biology Center of the Federal University de Juiz de Fora (Minas Gerais, Brazil) were used in the experiments for the assessment of the antinociceptive activity. The animals were housed in groups of five in standard cages at room temperature (25±3°C) in 12 h dark/12 h light control, with both food and water *ad libitum*. Twelve hours before the each experiment animals received only water, in order to avoid food interference with substances absorption. This study was conducted in accordance with guidelines set forth by the Brazilian Association for Laboratory Animal Science (COBEA) and has been approved by the Research Commission for Ethics and Animal Experimentation of UFJF (protocol number 59-64/2006). For all tests described below the EO and the fractions obtained from the seeds of *Pterodon emarginatus* were dissolved in 300 µl of solution of DMSO: Tween 80 (1:2, v/v) to 5 ml of saline.

2.5. Antinociceptive activity

2.5.1. Acetic acid-induced abdominal writhing

Writhing activity in mice was evaluated according to Matheus et al. (2005) with a few modifications. The animals (n=8/group) were pre-treated orally (p.o.) with EO or fractions (100-500 mg/kg) or saline 60 min before 0.3 ml of 0.6% acetic acid injection (i.p.). A writhe is defined as a sequence beginning with arching of the back, contraction of the abdomen, twisting of the trunk and/or pelvis and usually ending with extension of the hind limbs. After the challenge (acetic acid), mice were placed in a clear plastic box and the number of writhes/mice was counted during 20 min, starting 10 min after the administration of the acetic acid injection. The positive control group received the reference drug indomethacin (5 mg/kg, p.o.).

2.5.2. Formalin test

The procedure was similar to the method described by Hunskaar and Hole (1987). Animals received the injection of 20 μ l of 2.5% formalin, resuspended in saline, into the dorsal surface of the left hind paw, after which, the animals were immediately individualized in an observation chamber. The amount of time the animal spent licking the injected paw was measured during the first 5 min (phase 1: neurogenic) and 15–30 min after formalin injection (phase 2: inflammatory). The animals (n=8/group) were pre-treated with an oral dose of EO or fractions (100-500 mg/kg) or morphine (5 mg/kg, s.c.) or saline 60 min before administration of formalin.

2.5.3. Hot plate test

The hot plate test was performed according to Franzotti et al., (2000), with few modifications. Animals were placed on a hot-plate set at $55\pm 0.5^{\circ}\text{C}$. Reaction time was recorded when the animals licked their fore and hind paws or jumped at different times (30, 60, 90 and 120 min) after oral administration of EO or fractions (100-500 mg/kg) or morphine (5 mg/kg, s.c.) or saline. Animals which did not react after 30 s were taken off the plate to avoid damage to the tissues, which could jeopardize further evaluations. A baseline was obtained immediately before the drug administration and was defined as a normal reaction of the animal to temperature. Animals which did not jump or lick their paws after 15 s at the baseline determination were taken off the plate.

2.6. Statistical analysis

The results are shown as the mean \pm standard error of mean (S.E.M.). Statistical significance between groups was performed by the application of analysis of variance ANOVA followed by Bonferroni's test. *P* values less than 0.05 were used as the significance level.

3. Results

The extraction procedures accomplished for EO and fractions resulted in a yield of 3.9%, 7.26%, 3.52% and 4.83% (w/w), respectively for essential oil, hexanic, buthanolic and methanolic fractions.

3.1. Acetic acid-induced abdominal writhing

Intraperitoneal injection of acetic acid (0.6%) induced 36.2 ± 4.6 writhings, on pre-treated group with saline. When mice were pre-treated with increasing doses (100-500 mg/kg) of EO and HF from seeds of *Pterodon emarginatus* a significant inhibition of total writhing was observed (Fig. 1). There was no difference between 300 and 500 mg/kg doses of EO or HF, indicating that it is at maximal effect. The indomethacin caused inhibition of 70.8% in the number the abdominals writhings, verifying its efficacy as an analgesic agent. The BF demonstrated activity only at 500 mg/kg dose and the MF did not demonstrate antinociceptive activity in the abdominal writhing model in the concentrations tested (Fig.1).

3.2. Formalin test

When EO and fractions of seeds of *Pterodon emarginatus* were tested on the formalin test, it was observed that both EO and MF demonstrate biphasic licking response. On the other hand, the HF and BF only presented antinociceptive activity in the first phase, corresponding to acute neurogenic pain. A group of mice was injected with morphine in order to compare the antinociceptive potency of EO and fractions. This opioid significantly inhibited the total licking of both phases after formalin injection (Fig. 2).

3.2. Hot plate test

In view of the fact that EO and fractions of seeds of *Pterodon emarginatus* demonstrated such a good antinociceptive activity on acetic acid-induced writhing and formalin models, we decided to test its action on supra spinal model of pain, the hot plate model. The Table 1 shows that EO and HF at tested doses developed supra-spinal activity. The maximal effect induced by EO was at the time of 30 min, decreasing thereafter in all doses. Whereas, the HF induced an increase at the times of 60 min, 90 min and 120 min, in the 100 and 300 mg/kg doses. Administration of morphine resulted in an 80% increase in baseline between 30 and 120 min. BF and MF did not demonstrate antinociceptive activity in this model in the concentrations tested (Table 1).

4. Discussion and conclusion

The oral treatment of animals with EO and fractions of seeds of *Pterodon emarginatus* induced antinociception when assessed by the acetic acid induced contortions, a useful method to screen both peripherally and/or centrally acting analgesic activities.

The mouse writhing model involves different nociceptive mechanisms, such as sympathetic system (biogenic amines release), cyclooxygenases (COX) and their metabolites (Duarte et al., 1988) and opioid mechanisms (Collier et al., 1968). Acetic acid acts indirectly by inducing the release of endogenous mediators, which stimulated the nociceptive neurons sensitive to non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) and/or opioids (Collier et al., 1968). Thus, EO and fractions of these seeds could be inducing antinociception by mechanisms similar to NSAIDs and/or opioids, maybe blocking the receptor or the release of endogenous substances that excite pain nerve endings (Hunskar and Hole, 1987) or reducing the liberation of those inflammatory mediators. NSAIDs, such as indomethacin, inhibit COX in peripheral tissues, reducing therefore prostaglandin E₂ (PGE₂) synthesis and interfering with the mechanism of transduction in primary afferent nociceptors (Dionne et al., 2001). Another possibility could be the blockage in the eicosanoid system. In this situation, chemical constituents of *Pterodon emarginatus* could act inhibiting phospholipase A₂ or directly blocking cyclooxygenases (COX-1 and/or COX-2).

It has been reported that formalin-induced persistent pain in mice paw produces a distinct biphasic nociception. The earlier phase (0-5 min after formalin injection) characterized by intense neurogenic pain, starts immediately after the injection, and seems to be caused predominantly by activation of C-fibers subsequent to peripheral stimulation (direct stimulation of nociceptors). Then there is a 10 min period of reduced nociceptive activity. The late phase of moderate pain (inflammatory pain) starts about 20 min after the formalin injection and lasts about 40 min. This phase seems to be caused by tissues and functional changes in the dorsal horn of the spinal cord and is accompanied by the release of inflammatory mediators (Hunskar and Hole, 1987).

The second phase cannot be interpreted as a consequence of the first one. It also originates from peripheral mechanisms and seems to be mediated by the activation of central sensitized neurons due to peripheral inflammation as well as ongoing activity of primary afferents. Formalin, used as reference drug, activates different mechanisms and for this reason the formalin test is a useful tool to assess the potency of analgesic drugs or extracts and also to elucidate the mechanisms of analgesia, of the early (neurogenic) and late (inflammatory) phases (revised Hunskar and Hole, 1987; Tjolsen et al., 1992). Central analgesic drugs, such as narcotics, inhibit equally both phases, while peripherally acting drugs, such as steroids (hydrocortisone, dexamethasone) and NSAIDs (indomethacin) mainly suppress the later phase (Hunskar and Hole, 1987; Trongsakul et al., 2003).

The inhibition of the early phase of pain in the formalin test by EO and fractions may be the result of a direct effect on nociceptors while inhibition of pain in the late phase may result from the reduction of synthesis and/or release of prostaglandins or other inflammation mediators.

Several studies demonstrated that opioids can produce analgesia through peripheral mechanisms after inflammation of peripheral tissues (Stein et al., 1989, 1996). Essential oil and

fractions of seeds of *Pterodon emarginatus* produce antinociceptive effect in the formalin test in mice after oral administration (300 and 500 mg/kg). These findings are in agreement with Do Monte et al, (2004) who in his study suggested antinociceptive effects through dopamine receptors (D₂). In this work, EO and MF had an inhibitory action on pain in both phases, an effect similar to that of morphine at 10 mg/kg, a central analgesic drug, suggesting an interaction of components found in EO and MF with the opioid system (Fig. 2).

The centrally acting protective effects of EO and MF were corroborated by the first phase of formalin-induced pain and immersion tests results. The later test results indicate acute pain and central mechanisms with spinal nociceptive reflexes. It has been well documented that several inflammatory mediators, such as substance P and bradykinin participate in the manifestation of the first phase response (Shibata et al., 1989) while prostaglandins (Hunskar and Hole, 1987; Shibata et al., 1989), serotonin, histamine (Parada et al., 2001), and kinins are involved in the second phase response in the formalin test (Tjolsen et al., 1992). Although the mechanisms underlying the analgesic effects of EO and fractions of seeds of *Pterodon emarginatus* remain somewhat unknown, we can suggest that their activities can be interfering with the action or release of inflammatory mediators.

The hot plate test is thought to involve the spinal reflex and is regarded as one of the suitable models for determining the involvement of central antinociceptive mechanism (Pini et al., 1997). The exposure of animal paws to thermal stimuli in the hot plate test will lead to the development of non-inflammatory, acute nociceptive response and the ability of the EO (in all tested doses at 30 min) and HF (100 and 300 mg/kg doses in the time of 60, 90 and 120 min) to inhibit the thermal-induced nociceptive response. This indirectly indicates their ability also to inhibit non-inflammatory pain. The fact that the EO and HF inhibit the formalin and hot plate tests suggests that they have a centrally mediated effect like morphine (Hosseinzadeh and Younesi, 2002).

However, other than the well known involvement of the opioidergic and non-opioidergic systems in the central antinociceptive mechanisms, the inhibition of central COX could also be suggested as part of the mechanisms that lead to the observed EO and HF central antinociceptive activity.

The inhibitory effect observed with EO and fractions of seeds of *Pterodon emarginatus* on the models of analgesia could also be due to a direct decrease of the activity evoked by the C-fibers in ascendant axons, or to a decrease in the production of prostaglandins responsible for the C-fiber stimulation (Rossi et al., 1993). The observed activity can be attributed to the overall effects of the EO and fraction constituents or the compounds having action similar to non-steroidal anti-inflammatory or opioid drugs, in a complimentary manner.

The majoritary constituents presented in essential oil of *Pterodon emarginatus* seeds are *trans*-caryophyllene (36%), beta-elemene (15.3%) and alpha-humulene (6.8%). This constituents, mainly, the sesquiterpenes were evaluated for several authors shown antinociceptive and anti-inflammatory activities (Fernandes et al., 2007; Medeiros et al., 2007, Passos et al., 2007), for this reason the activity the EO of *P. emarginatus* showed in this work, can be explained at least in part, by the presence of these constituents, do not excluding the possibility of synergy between others constituents present in the oil.

Duarte *et al.* (1996), showed the first time the acid 6 α -7 β -dihydroxyvouacapan-17-oic in the hexanic fraction obtained of seeds of *P. polygalaeflorus*, through alkaline hydrolysis with sodium salt and purified by technique of crystallography. After their isolation, this compound, showed antinociceptive activity, in the mouse writhing model induced by acetic acid in mice. Then, the authors believe that the antinociceptive activity shown by the hexanic fraction obtained seeds of *P. emarginatus*, in this work, either because of this constituent, since both species are very similar taxonomically. However, further studies more specific are needed for the identification of others pharmacological activities this compound.

The buthanolic and methanolic fractions, could be shown antinociceptive activity due to the concentration of flavonoids present in these samples, since Dutra *et al.* (2007), showed these constituents in the fraction. The flavonoids have been responsible for several pharmacological activities, including analgesic and anti-inflammatory, as proposed by several authors (Torres *et al.*, 1987, Chi *et al.*, 2001, Sanchez de Medina *et al.*, 2002, Camuesco *et al.*, 2004, Ueda *et al.*, 2004, Goulart *et al.*, 2007, Montanher *et al.*, 2007), for this reason, these fractions could be presenting antinociceptive activity due flavonic constituents in these samples.

In spite of the fact that the doses used for EO and fractions from seeds of *Pterodon emarginatus* were higher than morphine and indomethacin, we must take into account that the EO and fractions are not pure drugs and are not synthetic. They have different composition and different concentration of several constituents. Another important observation is that the EO and fractions were all administered orally. Influence of pH from stomach and liposolubility may interfere with their absorption by the gastrointestinal tract limiting the amount that reaches the blood and the tissues. Even so, with all these additional factors, an important antinociceptive activity was observed.

Our results demonstrated that EO and fractions of seeds of *Pterodon emarginatus* develop peripheral and central antinociceptive activities in these models in the concentrations tested. It intends to clarify the mechanism of action of this plant and make possible the design of less expensive therapies with minor adverse effects in treating analgesic processes, reinforcing the importance of *Pterodon emarginatus* as a phytomedicine.

Acknowledgments

This work was supported by Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoa de Nível Superior (CAPES).

References

- Akil, H., Liebeskind, J.C., 1975. Monoaminergic mechanism of stimulation-produced analgesia. *Brain Research* 94, 279-296.
- Arriaga, A.M.C., Castro, M.A.B., Silveira, E.R., Braz-filho, R., 2000. Further diterpenoids isolated from *Pterodon polygalaeflorus*. *Journal of Brazilian Chemical Society* 11, 187-190.

- Bentley, G.A., Copeland, I.W. and Starr, J., 1977. The actions of some α_2 -adrenoceptor agonists and antagonists in an antinociceptive test in mice. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology* 4, 405-419.
- Braz Filho, R., Gottlieb, O.R., Assumpção, R.M.V., 1971. The isoflavones of *Pterodon pubescens*. *Phytochemistry* 10, 2835-2836.
- Camuesco, D., Comalada, M., Rodriguez-Cabezas, M.E., Nieto, A., Lorente, M.D., Concha, A., Zarzuelo, A., Galvez, J., 2004. The intestinal antiinflammatory effect of quercitrin is associated with an inhibition in iNOS expression. *British Journal of Pharmacology* 143, 908-918.
- Chi, Y.S., Jong, H.G., Son, K.H., Chang, H.W., Kang, S.S., Kim, H.P., 2001. Effects of naturally occurring prenylated flavonoids on enzymes metabolizing arachidonic acid: cyclooxygenases and lipoxygenases. *Biochemical Pharmacology* 62, 1185-1191.
- Collier, H.O.J., Dinneen, L.C., Johnson, C.A., Scheneider, C., 1968. The abdominal constriction response and its suppression by analgesic drugs in the mouse. *British Journal of Pharmacology* 32, 295-310.
- Demuner, A.J., Barbosa, L.C.A., Piló-Veloso, D., Ferreira-Alves, D.L., Howarth, O.W., 1996. Structure and plant growth regulatory activity of new diterpenes from *Pterodon polygalaeflorus*. *Journal of Natural Products* 59, 110-112.
- Dionne, R.A., Khan, A.A., Gordon, S.M., 2001. Analgesia and COX-2 inhibition. *Clinical Experimental Rheumatology* 19, 63-70.
- Do Monte, F.H.M., Dos Santos Junior, J.G., Russi, M., Lanziotti, V.M.N.B., Leal, L.K.A.M., Cunha, G.M.A., 2004. Antinociceptive and anti-inflammatory properties of the hydroalcoholic extract of stems from *Equisetum arvense* L. in mice. *Pharmacological Research* 49, 239-243.
- Duarte, I.D.G., Ferreira-Alves, D.L., Veloso, D.P., Nakamura-Craig, M., 1996. Evidence of the involvement of biogenic amines in the antinociceptive effect of a vouacapan extracted from *Pterodon polygalaeflorus* Benth. *Journal of Ethnopharmacology* 55, 13-18.
- Duarte, I.D.G., Nakamura-Craig, M., Ferreira-Alves, D.L., 1988. Participation of the sympathetic system in acetic acid-induced writhing in mice. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 21, 341-343.
- Dutra, R.C., Leite, M.N., Barbosa, N.R. Quantification of Phenolic Constituents and Antioxidant Activity of *Pterodon emarginatus* Vogel Seeds. *International Journal Molecular Science* (in press).
- Fascio, M., Mors, W.B., Gilbert, B., Mahajan, J.R., Monteiro, M.B., Dos Santos Filho, D., Vichenevski, W., 1976. Diterpenoid Furans from *Pterodon* species. *Phytochemistry* 15, 1, 201-203.
- Fernandes, E.S., Passos, G.F., Campos, M.M., Araújo, J.G., Pesquero, J.L., Avellar, M.C., Teixeira, M.M., Calixto, J.B., 2003. Mechanisms underlying the modulatory action of platelet activating factor (PAF) on the upregulation of kinin B1 receptors in the rat paw. *British Journal of Pharmacology* 139, 973-981.
- Franzotti, E.M., Santos, C.V., Rodrigues, H.M., Mourão, R.H., Andrade, M.R., Antonioli, A.R., 2000. Anti-inflammatory, analgesic activity and acute toxicity of *Sida cordifolia* L. (Malva-branca). *Journal of Ethnopharmacology*, 72, 273-277.

- Goulart, S., Moritz, M.I.G., Lang, K.L., Liz, R., Schenkel, E.P., Frode, T.S., 2007. Anti-inflammatory evaluation of *Solidago chilensis* Meyen in a murine model of pleurisy. *Journal of Ethnopharmacology* 113, 346-353.
- Headley, P.M., Duggan, A.W., Griersmith, B.T., 1978. Selective reduction by noradrenaline and 5-hydroxytryptamine of nociceptive responses of cat dorsal horn neurones. *Brain Research* 145, 185-189.
- Hosseinzadeh, H., Younesi, H.M., 2002. Naloxone reversible antinociception by paracetamol in the rat. *BMC Pharmacology* 2, 7.
- Hunskar, S., Hole, K., 1987. The formalin test in mice: dissociation between inflammatory and non-inflammatory pain. *Pain* 30, 103–104.
- Leite de Almeida, M.E., Gottlieb, O.R., 1975. The chemistry of Brazilian Leguminosae, further isoflavones from *Pterodon apparicia*. *Phytochemistry* 14, 12, 2716.
- Lorenzi, H., Matos, F.J.A., 2002. *Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas*. Instituto Plantarum, São Paulo, 544 pp.
- Mahjan, J.R., Monteiro, M.B., 1970. New diterpenoids from *Pterodon emarginatus*. *Anais da Academia Brasileira de Ciências* 42, 103-107.
- Matheus, M.E., Berrondo, L.F., Vieitas, E.C., Menezes, F.S., Fernandes, P.D., 2005. Evaluation of the antinociceptive properties from *Brillantaisia palisotii* Lindau stems extracts. *Journal of Ethnopharmacology* 102, 377-381.
- Marques, D.D., Machado, M.I.L., Carvalho, M.G., Meleira, L.A.C., Braz-Filho, R., 1998. Isoflavonoids and triterpenoids isolated from *Pterodon polygalaeiflorus*. *Journal of the Brazilian Chemical Society* 9, 295-301.
- Medeiros, R., Passos, G.F., Vitor, C.E., Koepp, J., Mazzuco T.L., Pianowski, L.F., Campos, M.M., Calixto, J.B., 2007. Effect of two active compounds obtained from the essential oil of *Cordia verbenacea* on the acute inflammatory responses elicited by LPS in the rat paw. *British Journal of Pharmacology* 151, 618-627.
- Montanher, A.B., Zucolotto, S.M., Schenkel, E.P., Frode, T.S., 2007. Evidence of anti-inflammatory effects of *Passiflora edulis* in an inflammation model. *Journal of Ethnopharmacology* 109, 281-288.
- Mors, W.B., Santos Filho, M.F., Monteiro, H.J., Gilbert, B., Pelegrino, J., 1967. Chemoprophylactic agent in schistosomiasis: 14, 15–epoxygeranygeraniol. *Science* 157, 950-951.
- Nakamura, M., Ferreira, S.H., 1988. Peripheral analgesic action of clonidine: mediation by release of endogenous enkephalin-like substances. *European Journal of Pharmacology* 146, 223-228.
- Nunan, E.A., Carvalho, M.G., Piló-Veloso, D., Turchetti-Maia, R.M.M., Ferreira-Alves, D.L., 1982. Furane diterpenes with anti- and proinflammatory activity. *Revista Brasileira de Pesquisas Médicas e Biológicas* 15, 450.
- Parada, C.A., Tambeli, C.H., Cunha, F.Q., Ferreira, S.H., 2001. The major role of peripheral release of histamine and 5-hydroxytryptamine in formalin-induced nociception. *Neuroscience* 102, 937-944.
- Passos, G.F., Fernandes, E.S., Da Cunha, F.M., Ferreira, J., Pianowski, L.F., Campos, M.M., Calixto, J.B., 2007. Anti-inflammatory and anti-allergic properties of the essential oil and active compounds from *Cordia verbenacea*. *Journal of Ethnopharmacology* 110, 323–333.

- Pini, L.A., Sandrini M., Vitale, G., 1997. The antinociceptive action of paracetamol is associated with changes in the serotonergic system in the rat brain. *European Journal of Pharmacology*, 308, 31-40.
- Reddy, S.V., Maderdrut, J.L. and Yaksh, T.L., 1980. Spinal cord pharmacology of adrenergic agonist-mediated antinociception. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 213, 525-533.
- Rossi, G.C., Pasternak, G.W., Bodnar, R.J., 1993. Synergistic brainstem interactions for morphine analgesia. *Brain Research* 8, 171–180.
- Sanchez de Medina, F., Vera, B., Galvez, J., Zarzuelo, A., 2002. Effect of quercitrin on the early stages of hapten induced colonic inflammation in the rat. *Life Sciences* 70, 3097–3108.
- Schmitt, H., Le Douarec, J.C., Petillot, N., 1974. Antinociceptive effects of some α_2 sympathomimetic agents. *Neuropharmacology* 13, 289-293.
- Shibata, M., Ohkubo, T., Takahashi, H., Inoki, R., 1989. Modified formalin test: characteristic biphasic pain response. *Pain* 38, 347-352.
- Stein, C., Millan, M.J., Shippenberg, T.S., Peter, K., Herz, A., 1989. Peripheral opioid receptors mediating antinociception in inflammation. Evidence for involvement of μ , δ and κ receptors. *Journal of Pharmacology Experimental Therapeutics* 248, 1269–1275.
- Stein, C., Pfluger, M., Yassaouridis, A., Hoelzl, J., Lehrberger, K., Welte, C., 1996. No tolerance to peripheral analgesia in presence of opioid expression in inflamed synovia. *Journal of Clinical Investigation* 98, 793–799.
- Tjolsen, A., Berge, O.G., Hunskaar, S., Rosland, J.H., Hole, K., 1992. The formalin test an evaluation of the method. *Pain* 51, 5-17.
- Torrenegra, R., Bauereib, P., Achenbach, H., 1989. Homoormosanine-type alkaloids from *Bowdichia virgiloides*. *Phytochemistry* 28, 2219-2221.
- Torres, L.M.B., Akisue, M.K., Roque, N.F., 1987. Quercitrin from *Solidago microglossa* DC, a Brazilian substitute for Arnica. *Revista de Farmácia e Bioquímica da Universidade de São Paulo* 23, 33–40.
- Trongsakul, S., Panthong, A., Kanjanapothi, D., Taesotikul, T., 2003. The analgesic, antipyretic and anti-inflammatory activity of *Diospyros variegata* Kruz. *Journal of Ethnopharmacology* 85, 221-225.
- Ueda, H., Yamazaki, C., Yamazaki, M., 2004. A hydroxyl group of flavonoids affects oral anti-inflammatory activity and inhibition of systemic tumor necrosis factor-alpha production. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* 68, 119–125.

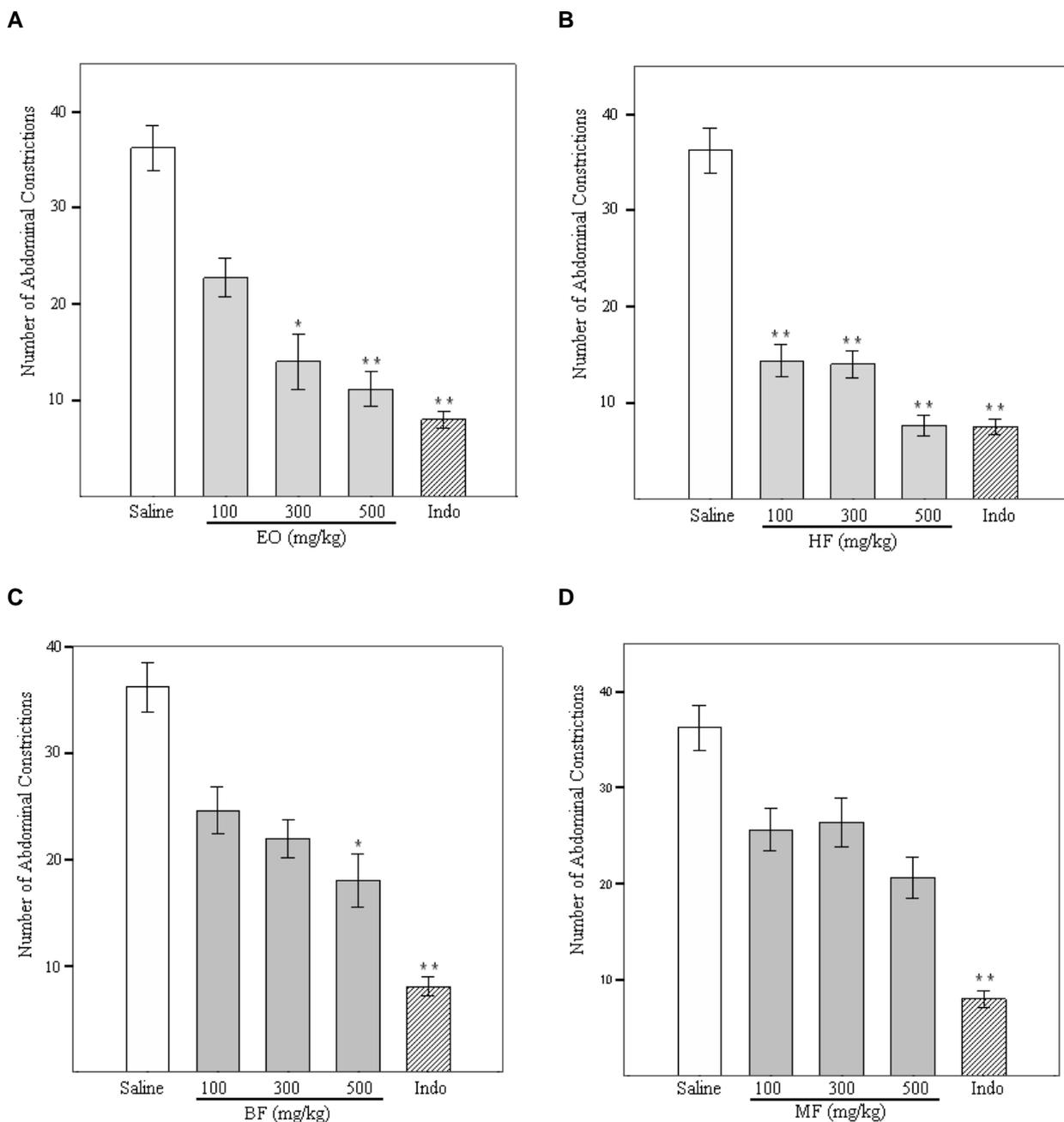


Fig 1. Effect of essential oil (EO: 1A), hexanic fraction (HF: 1B), buthanolic fraction (BF: 1C), and methanolic fraction (MF: 1D) of seeds of *Pterodon emarginatus* on the writhing response induced by acetic acid in mice. Indomethacin (Indo: 5 mg/kg). Data are expressed as means \pm S.E.M. (n=8/group). Statistical significance was calculated by ANOVA followed by Bonferroni's test. * $p < 0.05$ and ** $p < 0.001$ when compared with saline-treated mice.

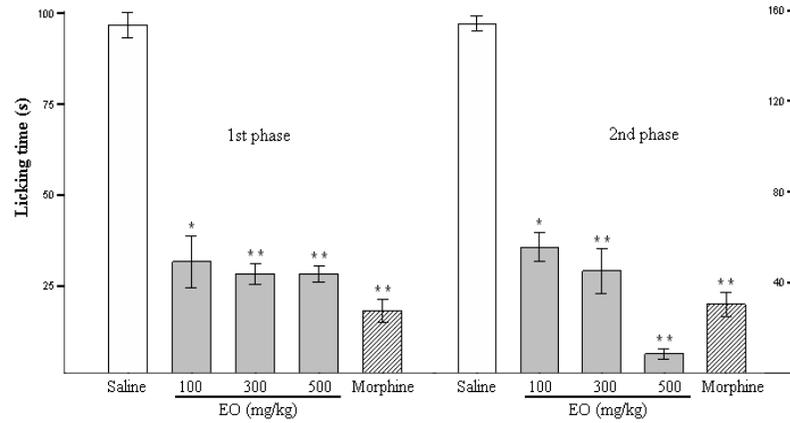
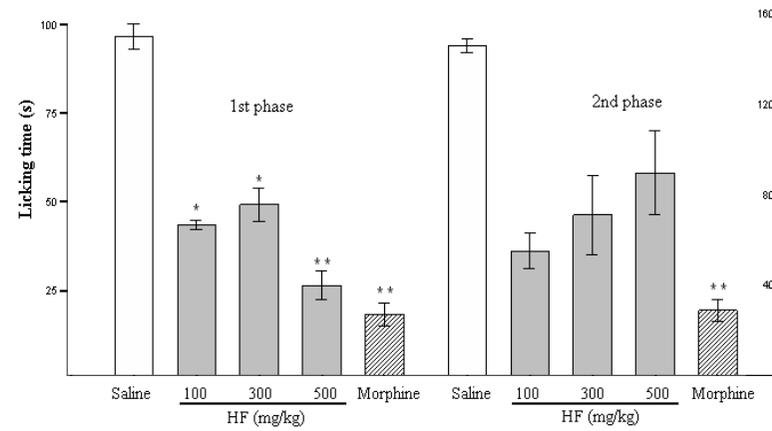
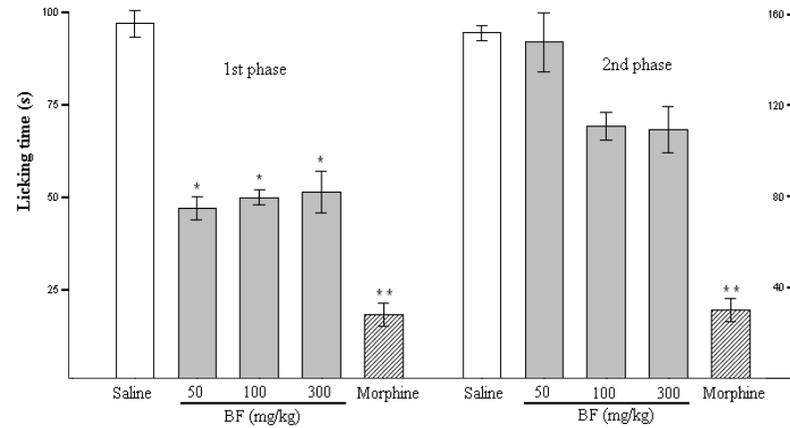
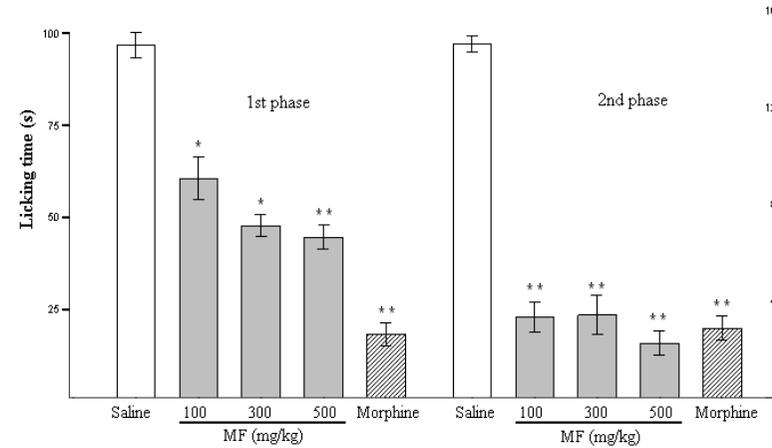
A**B****C****D**

Fig 2. Effect of essential oil (EO: 2A), HF (hexanic fraction: 2B), buthanolic fraction (BF: 2C), and methanolic fraction (MF: 2D) of seeds of *Pterodon emarginatus* on formalin test in mice. Morphine (5 mg/kg). Data are expressed as means \pm S.E.M. (n=8/group). Statistical significance was calculated by ANOVA followed by Bonferroni's test. * $p < 0.05$ and ** $p < 0.001$ when compared with saline-teated mice.

Table 1. Effects of essential oil and fractions of seeds of *Pterodon emarginatus* on the hot-plate test in mice.

Extracts	Dose (mg/kg)	Hind paw lick latency time (s)				
		0	30	60	90	120
Saline	–	9.40 ± 0.77	12.80 ± 1.52	10.40 ± 1.67	9.80 ± 1.06	9.00 ± 0.47
Essential oil	100	11.70 ± 1.21	19.80 ± 2.02*	16.30 ± 1.32	15.80 ± 2.38	14.30 ± 2.06
	300	11.10 ± 0.86	19.30 ± 2.01*	15.70 ± 2.06	16.40 ± 0.52	15.20 ± 1.58
	500	10.90 ± 0.57	21.00 ± 1.84*	16.40 ± 2.04	13.60 ± 1.05	14.10 ± 1.83
Hexanic fraction	100	15.10 ± 1.49	16.60 ± 2.60	20.90 ± 1.94*	20.00 ± 1.96*	16.10 ± 1.67*
	300	10.60 ± 1.43	18.20 ± 2.28	17.60 ± 1.92*	17.60 ± 1.92*	17.10 ± 1.53*
	500	9.50 ± 1.19	16.80 ± 2.01	12.80 ± 1.40	11.80 ± 1.57	11.90 ± 0.91
Buthanolic fraction	100	7.80 ± 1.22	11.90 ± 2.02	11.60 ± 0.68	12.00 ± 1.43	12.30 ± 1.83
	300	10.20 ± 1.11	16.30 ± 1.60	15.20 ± 1.97	14.60 ± 1.61	10.50 ± 1.77
	500	11.50 ± 1.16	17.10 ± 1.87	16.60 ± 2.08	14.40 ± 1.67	14.00 ± 1.64
Methanolic fraction	100	11.70 ± 1.18	12.70 ± 1.16	10.40 ± 1.58	12.10 ± 2.19	11.80 ± 1.03
	300	9.60 ± 0.79	14.50 ± 2.07	13.50 ± 2.16	14.40 ± 2.75	14.20 ± 2.29
	500	7.60 ± 0.54	12.60 ± 1.20	11.20 ± 1.12	12.50 ± 1.95	10.00 ± 0.95
Morphine	5	11.80 ± 0.97	28.70 ± 0.80**	26.80 ± 1.03**	25.20 ± 1.94**	22.00 ± 2.13**

Data are expressed as means ± S.E.M. (n=10/group). Statistical significance was calculated by ANOVA followed by Bonferroni's test. * $p < 0.05$ and

2. Revista Brasileira de Farmacognosia

Atividades antimicrobiana e leishmanicida das sementes de *Pterodon emarginatus* Vogel

Rafael C. Dutra¹, Fernanda G. Braga², Elaine S. Coimbra², Adilson D. Silva³, Nádia R. Barbosa^{1*}

¹Departamento de Alimentos e Toxicologia, Faculdade de Farmácia e Bioquímica, Universidade Federal de Juiz de Fora, Martelos, CEP 36036-330, Juiz de Fora, MG, Brasil.

²Departamento de Parasitologia, Microbiologia e Imunologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Juiz de Fora, Martelos, CEP 36036-330, Juiz de Fora, MG, Brasil.

³Departamento de Química, Instituto de Ciências Exatas, Universidade Federal de Juiz de Fora, Martelos, CEP 36036-330, Juiz de Fora, MG, Brasil.

RESUMO: O presente trabalho investigou as atividades antimicrobiana e leishmanicida das sementes de *Pterodon emarginatus* Vogel. O potencial antimicrobiano do óleo essencial (OE) obtido das sementes foi avaliado através dos testes de difusão em ágar (10, 25 e 50 mg) e determinação da concentração inibitória mínima e utilizou os microorganismos-padrão: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Streptococcus mutans* ATCC 25175, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 90271, *Escherichia coli* ATCC 10530 e *Candida albicans* ATCC 10231. A atividade leishmanicida do OE e frações (6,25 – 100 µg/mL) obtidas das sementes de *P. emarginatus* foram testadas, *in vitro*, sobre formas promastigotas de *L. amazonensis* e *L. chagasi*. O OE das sementes de *P. emarginatus* inibiu o crescimento somente de *S. aureus* (CIM = 2,5 mg/mL). As frações hexânica (IC₅₀ = 50,06 µg/mL) e butanólica (IC₅₀ = 46,65 µg/mL) apresentaram atividade frente às formas promastigotas de *L. amazonensis*, porém não apresentaram atividade frente a *L. chagasi*. Os resultados indicam que as moléculas bioativas presentes nas sementes de *P. emarginatus* podem ser utilizadas como protótipos para o desenvolvimento de fármacos e/ou como fonte de matérias-primas farmacêuticas.

Unitermos: *Pterodon emarginatus*, Leguminosae, atividade antibacteriana, leishmanicida.

ABSTRACT: “Antimicrobial and leishmanicidal activities of seeds of *Pterodon emarginatus*”. The present work investigated the antimicrobial and leishmanicidal activities of seeds of *Pterodon emarginatus*. The tests of diffusion in agar had been carried through (10, 25 and 50 mg) and determination of minimum inhibitory concentration (MIC), using essential oil (EO) obtained of seeds using the standard microorganisms: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Streptococcus mutans* ATCC 25175, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 90271, *Escherichia coli* ATCC 10530 e *Candida albicans* ATCC 10231. Leishmanicidal activity of the EO and fractions (6.25 – 100 µg/ml) obtained of seeds of *P. emarginatus* was evaluated *in vitro* using *L. amazonensis* and *L. chagasi* promastigote forms. The EO inhibited the

growth of *S. aureus* (MIC = 2.5 mg/ml). The hexanic (IC₅₀ = 50.06 µg/ml) and buthanolic (IC₅₀ = 46.65 µg/ml) fractions presented activity against *L. amazonensis promastigote* forms, but not *L. chagasi promastigote* forms. The results indicate that the bioactive molecules presents in the seeds of *P. emarginatus* can be used as prototype for the development of drug and/or as source pharmaceutical material.

Keywords: *Pterodon emarginatus*, Leguminosae, antibacterial activity, leishmanicidal.

INTRODUÇÃO

Um dos maiores problemas de Saúde Pública enfrentados nas últimas décadas foi o agravamento da resistência a antimicrobianos em populações bacterianas, principalmente de origem hospitalar (Oliveira et al., 2006a,b). Atualmente, registra-se um aumento significativo na freqüência do isolamento de bactérias que eram reconhecidamente sensíveis aos fármacos de rotina usados na clínica, mas que se apresentam agora resistentes a quase todos os fármacos disponíveis no mercado, como ocorre com várias bactérias multirresistentes (Shiomori et al., 2002; Sakagami; Kajamura, 2006).

Neste contexto, as plantas representam fontes valiosas de produtos para a manutenção da saúde humana, sendo seu uso mais difundido especialmente nos últimos anos, após numerosos estudos com produtos terapêuticos oriundos de plantas medicinais. Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), as plantas medicinais são as melhores fontes para se obter uma variedade de medicamentos, e cerca de 80% da população mundial usa a medicina tradicional na busca de alívio de alguma sintomatologia dolorosa ou desagradável (Nascimento et al., 2000; Caetano et al., 2002). A seleção de plantas, a partir de informações da medicina tradicional ou popular, pode conduzir a descoberta de moléculas promissoras com ação terapêutica (Agra et al., 2007).

As leishmanioses são doenças endêmicas causadas por protozoários do gênero *Leishmania*, ocorrendo em várias partes do mundo são 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; Lerner, 1996; Herwaldt, 1999). No Brasil, a LTA e a LV ocorrem em todo o território nacional e são endêmicas nas regiões Norte e Nordeste, devido principalmente às características econômicas e culturais dessas populações, predominando nos estados da Bahia, Ceará, Piauí e Maranhão (Ministério da Saúde, 2000; Rath et al., 2003).

O tratamento das leishmanioses é feito à base de antimoniais pentavalentes (Sb⁺⁵), anfotericina B e pentamidinas (isotionato e mesilato), quimioterápicos de elevado custo, usados por via parenteral e por prolongado período de administração, causando efeitos adversos, como: alterações cardíacas, renais, pancreáticas e hepáticas (Croft; Yardley, 2002). Porém, desde a descoberta dos Sb⁺⁵, pouco tem sido feito para a descoberta de novos tipos estruturais para o tratamento dessa patologia. Entretanto, as

dificuldades em relação à terapêutica atual têm conduzido a estudos com o objetivo de avaliar terapias alternativas, buscando, por exemplo, soluções na privilegiada biodiversidade brasileira, através da descoberta e desenvolvimento de novas moléculas com atividade terapêutica, ou no desenvolvimento de fitoterápicos nacionais para o tratamento das leishmanioses (Phillipson; Wright, 1991a,b).

Pterodon emarginatus Vogel (Leguminosae), conhecida popularmente como sucupira branca ou faveiro é uma árvore aromática nativa que mede de 5-10 metros de altura (Lorenzi; Matos, 2002), facilmente encontrada na região do cerrado brasileiro e utilizada na medicina tradicional para o tratamento de reumatismo, dores de garganta, disfunções respiratórias (bronquites e amidalites), além das suas atividades antiinflamatória, analgésica, depurativa e tônica. As sementes são comercializadas em mercados populares por suas propriedades farmacológicas (Leite de Almeida; Gottlieb, 1975; Arriaga et al., 2000).

Estudos fitoquímicos do gênero *Pterodon* têm demonstrado a presença de alcalóides nas cascas das árvores (Torrenegra et al., 1989), isoflavonas e alguns triterpenos (Marques et al., 1998) na madeira, e diterpenos (Fascio et al., 1976; Arriaga et al., 2000) e isoflavonas no óleo das sementes (Braz-Filho; Gottlieb, 1971). O diterpeno 14,15-epoxigeranilgeraniol e alguns derivados, isolados de *P. pubescens* têm sido associado com atividade protetora contra a penetração de cercárias de *S. mansoni*, parasito responsável pela esquistossomose, doença tipicamente tropical (Dos Santos Filho et al., 1972). Alguns destes constituintes químicos estão contidos em várias espécies vegetais com efeitos antibacterianos e leishmanicidas (Mathias; Emily, 1993).

Baseado nos usos populares e nos constituintes químicos presentes nas sementes de *P. emarginatus* que sugerem seu potencial farmacológico, este estudo teve por objetivo avaliar as atividades antimicrobiana e leishmanicida das sementes de *P. emarginatus* Vogel.

MATERIAL E MÉTODOS

Coleta do material vegetal

Sementes da espécie *P. emarginatus* foram coletadas em setembro de 2006, no município de Três Marias/MG-Brasil e identificadas pela Dra. Fátima Regina Gonçalves Salimena do Departamento de Botânica, UFJF, Brasil. Uma exsicata da espécie foi depositada no Herbário CESJ da Universidade Federal de Juiz de Fora/MG-Brasil sob o número 48.077.

Extração do óleo essencial

O óleo essencial foi extraído em aparelho de *Clevenger* pelo método de hidrodestilação durante quatro horas. Foram pesados 30 g de sementes, as quais foram trituradas e adicionadas ao balão contendo 300 mL de água destilada. Após a extração, o óleo foi acondicionado em frasco de vidro âmbar e utilizado imediatamente para a realização das análises.

Preparo das frações

Para o preparo das frações, 30 gramas de sementes foram trituradas e submetidas à extração utilizando aparelho de *Soxhlet*. Após o acondicionamento das sementes ao cartucho e adaptação do balão de fundo redondo, a amostra foi submetida a extrações sucessivas com hexano, butanol e metanol até atingir o esgotamento do solvente. As frações hexânica (FH), butanólica (FB) e metanólica (FM) foram submetidas a rotaevaporação até eliminação completa do solvente. Tais frações foram utilizadas para avaliação da atividade leishmanicida.

Atividade antimicrobiana

A atividade antimicrobiana foi realizada utilizando os microorganismos-padrão: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Streptococcus mutans* ATCC 25175, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 90271, *Escherichia coli* ATCC10530 e *Candida albicans* ATCC 10231, obtidos da *American Type of Culture Collection* (ATCC). Para a realização desta atividade foram empregados o método de difusão em ágar (Mislivec et al., 1992; Swanson et al., 1992) e a determinação da concentração inibitória mínima (CIM) (Candan et al., 2003).

Difusão em ágar

A atividade antimicrobiana foi realizada através do método de difusão em ágar estabelecido por Mislivec et al. (1992) e Swanson et al. (1992). Os microorganismos foram cultivados em meio inclinado anti-1 (*S. aureus*, *S. mutans* e *E. coli*), *Tryptone Soy Agar* (TSA) (*P. aeruginosa*) e *Sabouraud Dextrose Agar* (SDA) (*C. albicans*) por um período mínimo de 24 horas a temperatura de 37°C em estufa bacteriológica. Após este período, uma suspensão microbiana foi padronizada utilizando solução fisiológica estéril (NaCl 9,0 g/L) contendo $10^3 - 10^4$ UFC/mL. A suspensão foi diluída com solução fisiológica estéril até a obtenção de 25% de transmitância. As placas de *Petri* (dimensões: 15 mm de altura e 90 mm de diâmetro) foram preparadas com 22 mL de meio de cultura, resultando em um meio de cultura com 3 mm de profundidade. Cilindros (de aço inoxidável) estéreis (dimensões: 10 mm de altura e 6 mm de diâmetro) contendo 10, 25 e 50 mg do OE das sementes de *P. emarginatus* foram inseridos no meio de cultura. Todas as placas foram incubadas em ambiente aeróbico a temperatura de 37°C por 24 horas (bactérias) e temperatura de 22°C por 48 horas (fungo). A inibição do crescimento foi medida, com auxílio de paquímetro, pela formação de halos, expressos em mm. O ensaio foi realizado em triplicata e os resultados expressos como média \pm desvio padrão. Penicilina (1 UI/mL) e nistatina (20 UI/mL) foram utilizadas como fármacos de referência.

Determinação da concentração inibitória mínima (CIM)

Para a determinação da CIM, uma suspensão bacteriana (*S. aureus* ATCC 25923) foi preparada com solução fisiológica estéril (NaCl 9,0 g/L) a 25% de transmitância. A suspensão microbiana padronizada foi submetida à diluição seriada com solução fisiológica estéril e a contagem das unidades formadoras de colônias (UFC) foi realizada utilizando o ágar de contagem (PCA) após um período de 24

horas. O controle positivo foi preparado com 4 mL de caldo caseína inoculado com o *S. aureus* ($10^3 - 10^4$ UFC/mL) e 1 mL de solução fisiológica estéril. Para o controle negativo, foram adicionados 4 mL de caldo caseína estéril e 1 mL de solução fisiológica estéril. O procedimento foi realizado em triplicata. No preparo dos tubos-teste foram acrescentados 4 mL de caldo caseína inoculado e 1 mL de cada concentração da amostra-teste utilizada (0,625 - 10 mg/mL). Os tubos foram incubados em ambiente aeróbico a temperatura de 37°C por 24 horas. A CIM foi determinada através da observação de turvação dos meios de cultura, após o período de incubação (Candan et al., 2003).

Atividade leishmanicida

A atividade leishmanicida foi realizada de acordo com Braga et al. (2007). 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 (BD, 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. O *screening* foi realizado em placas de 96 poços, mantidas a temperatura de 24°C em estufa. Foram adicionados a cada poço da placa 100 µL da suspensão padronizada (*L. amazonensis* – 2 milhões de células/mL e *L. chagasi* – 3 milhões de célula/mL) e as amostras (OE e frações obtidos de *P. emarginatus* nas concentrações de 6,25 – 100 µg/mL) dissolvidas com solução de dimetilsulfóxido 0,08%. O procedimento foi realizado em triplicata. A viabilidade celular de ambas as formas promastigotas foram determinadas, após 24 horas, empregando o método do difenil tetrazólio (MTT) (Mosmann, 1983). Os resultados foram expressos através da determinação da concentração inibitória (CI₅₀) de cada amostra-teste, que representa a concentração molecular que inibe 50 % do crescimento celular. Anfotericina B foi utilizada como droga de referência.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Tabela 1 apresenta os valores das zonas de inibição do crescimento bacteriano (mm) observados para o OE obtido das sementes de *P. emarginatus*, frente aos microorganismos *S. aureus* ATCC 25923, *S. mutans* ATCC 25175, *P. aeruginosa* ATCC 90271, *E. coli* ATCC 10530 e *C. albicans* ATCC 10231. O OE obtido das sementes de *P. emarginatus* causou inibição no crescimento de *S. aureus* (CIM = 2,5 mg/mL), demonstrando atividade bactericida. Este microorganismo é responsável por quadros de piodermite, abscessos, pneumonia, meningite e septicemia (Jawetz et al., 2000). Esta atividade pode ser decorrente da presença dos constituintes *trans*-cariofileno e α -humuleno, uma vez que já foi relatada tal atividade para estes constituintes (Pichette et al., 2006; Sonboli et al., 2006). Embora a medida da zona (halo) de inibição possa ser determinada nos experimentos por difusão em cilindro, geralmente, essa metodologia para extratos vegetais só descreve o aspecto qualitativo da atividade, isto é, se houve

ou não inibição do crescimento bacteriano. Isso se deve a dificuldade de estabelecer comparação da potência entre as amostras (extratos vegetais) e os antibióticos empregados (Rios et al., 1988). O OE não apresentou atividade antimicrobiana contra *S. mutans*, *P. aeruginosa*, *E. coli* e *C. albicans*.

O entusiasmo em relação ao uso de plantas medicinais e seus extratos na assistência à saúde podem ser entendidos pela sua aceitabilidade, derivada da inserção cultural e pela atual disponibilidade desses recursos, ao contrário do que ocorre com outros medicamentos, que na sua maioria são dependentes de matéria-prima e tecnologias externas (Schenkel et al., 1985; Simões et al., 1986). Segundo Verdi et al. (2005), o uso de plantas para o tratamento de diferentes patologias, incluindo as infecciosas, tem sido extensivamente utilizado pelas pessoas, mesmo estas não tendo comprovação científica. Além disso, a grande incidência de infecções, principalmente em indivíduos imunocomprometidos, justifica a realização de estudos científicos para a descoberta de novos compostos terapêuticos oriundos de material vegetal e/ou por via biotecnológica (Carriconde et al., 1996).

A Tabela 2 apresenta os valores da concentração inibitória (CI₅₀) de cada amostra-teste frente às formas promastigotas de *L. amazonensis* e *L. chagasi*, associadas a todas as formas clínicas das leishmanioses e à leishmaniose visceral, respectivamente (Grimaldi; Tesh, 1993). As FH (CI₅₀ = 50,06 µg/mL) e FB (CI₅₀ = 46,65 µg/mL) apresentaram atividade leishmanicida frente às formas promastigotas de *L. amazonensis*, sendo que as mesmas não apresentaram atividade frente a *L. chagasi*. O OE, assim como a FM não apresentaram atividade frente às formas promastigotas de ambas as espécies de *Leishmania* utilizadas. Apesar de a anfotericina B ter sido usada como fármaco de referência, esta não deve servir como base para comparações, uma vez que a mesma é um produto puro, diferente do óleo e frações de *P. emarginatus* usados neste estudo.

Recentes estudos demonstraram a eficácia de algumas plantas medicinais no tratamento de lesões ulceradas da leishmaniose tegumentar e também em modelos *in vitro* (Akendengue et al., 1999; Bezerra et al., 2006; Paula-Junior et al., 2006). Neste contexto, os produtos naturais têm um grande potencial na pesquisa por novos e seletivos agentes para o tratamento de importantes doenças causadas por protozoários (Phillipson; Wright, 1991a,b) envidando esforços na avaliação de nossos recursos naturais, o que é denotado pela grande quantidade de investigações desenvolvidas,

Compostos químicos isolados de diversos extratos vegetais demonstraram comprovada atividade leishmanicida *in vitro* sobre formas promastigotas e/ou amastigotas de *Leishmania*. Dentre eles, podem ser citados os terpenóides (Yang; Liew, 1992; Camacho et al., 2000), aminoglicosteróides e aminosteróides (Kam et al., 1997), naftoquinonas (Fournet et al., 1992a; Kayser et al., 2000), chalconas (Chen et al., 1993), glicosídeos iridóides (Mittal et al., 1998); flavonóides (Araújo et al., 1998), neolignananas (Barata et al., 2000) e os alcalóides (Queiroz et al., 1996; Akendengue et al., 1999). Diversos autores identificaram alguns destes constituintes nas sementes de *P. emarginatus* (Braz-Filho; Gottlieb, 1971; Fascio et al., 1976; Torrenegra et al., 1989; Marques et al., 1998; Arriaga et al., 2000), por esta razão, acredita-se que a atividade leishmanicida demonstrada pelas FH e FB possa estar relacionada à presença destes compostos.

Os resultados do presente trabalho demonstraram que o OE obtido das sementes de *P. emarginatus* inibiu o crescimento de *S. aureus* ATCC 25923 e as FH e FB apresentaram expressiva atividade *in vitro* para *L. amazonensis*. Esses resultados indicam que moléculas bioativas nas sementes de *P. emarginatus* podem ser utilizadas como protótipos para o desenvolvimento de novos fármacos e/ou como fonte de matérias-primas farmacêuticas antimicrobiana e leishmanicida.

REFERÊNCIAS

- Agra MF, França PF, Barbosa-Filho JM 2007. Synopsis of the plants known as medicinal and poisonous in Northeast of Brazil. *Rev Bras Farmacogn* 17: 114-140.
- Akendengue B, Ngou-milama E, Laurens A, Hocquemiller R 1999. Recent advances in the fight against leishmaniasis with natural products. *Parasite* 6: 3-8.
- Araújo CAC, Alegrio LV, Leon LL 1998. Antileishmanial activity of compounds extracted and characterized from *Centrobium sclerophyllum*. *Phytochemistry* 49: 751-754.
- Arriaga AMC, Castro MAB, Silveira ER, Braz-Filho R 2000. Further diterpenoids isolated from *Pterodon polygalaeflorus*. *J Braz Chem Soc* 11: 187-190.
- Barata LES, Santos, LS, Ferri PH, Phillipson JD, Paine A, Croft SL 2000. Anti-leishmanial activity of neolignans from *Virola* species and synthetic analogues. *Phytochemistry* 55: 589-595.
- Bezerra JL, Costa GC, Lopes TC, Carvalho ICDS, Patrício FJ, Sousa SM, Amaral FMM, Rebelo JMM, Guerra RNM, Ribeiro MNS, Nascimento FRF 2006. Avaliação da atividade leishmanicida *in vitro* de plantas medicinais. *Rev Bras Farmacogn* 16(Supl.): 631-637.
- Braga FG, Coimbra ES, Matos MO, Carmo AML, Cancio MD, Da Silva AD 2007. Synthesis and biological evaluation of some 6-substituted purines *Eur J Med Chem* 42: 530-537.
- Braz Filho R, Gottlieb OR, Assumpção RMV 1971. The isoflavones of *Pterodon pubescens*. *Phytochemistry* 10: 2835-2836.
- Caetano N, Saraiva A, Pereira R, Carvalho D, Pimentel MCB, Maia MBS 2002. Determinação de atividades antimicrobiana de extratos de plantas de uso popular como antifl amatório. *Rev Bras Farmacogn* 12(Supl.): 132-135.
- Camacho MR, Phillipson JD, Croft LS, Kirby GC, Warhurst DC, Solis PN 2000. Terpenoids from *Guarea rhopalocarpa*. *Phytochemistry* 56: 203-210.
- 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). *J Ethnopharmacol* 87: 215-220.
- Carriconde C, Mores D, Von Fritschen M, Cardozo-Junior EL 1996. *Plantas medicinais e alimentícias*. Olinda: Centro Nordestino de Medicina Popular; Universidade Federal Rural de Pernambuco. v.1, p.45-47.

- Chen M, Christensen SB, Blom J, Lemmich E, Nadelmann L, Fich K, Theander TG, Kharazmi A 1993. Licochalcone A, a novel antiparasitic agent with potent activity against human pathogenic protozoan species of *Leishmania*. *Antimicrob Agents Chemoth* 37: 2550-2556.
- Croft SL, Yardley V 2002. Chemotherapy of leishmaniasis. *Curr Pharm Design* 8: 319-342.
- Dos Santos Filho D, Vichnewski W, Baker PM, Gilbert B 1972. Prophylaxis of Schistosomiasis diterpenes from *Pterodon pubescens*. *An Acad Bras Cienc* 44: 45-49.
- Fascio M, Mors WB, Gilbert B, Mahajan JR, Monteiro MB, Dos Santos Filho D, Vichnewski W 1976. Diterpenoid Furans from *Pterodon* species. *Phytochemistry* 15: 201-203.
- Fournet A, Barrios AA, Muñoz V, Hocquemiller CA 1992a. Effects of natural naphthoquinones in Balb/c mice infected with *Leishmania amazonensis* and *L. venezuelensis*. *Ann Trop Med Parasit* 43: 219-222.
- Grevelink SA, Lerner EA 1996. Leishmaniasis. *J Am Acad Dermatol* 34: 257-272.
- Grimaldi G Jr, Tesh RB 1993. Leishmaniasis of New World: Current concepts and implication for future research. *Clin Microbiol Rev* 6: 230-250.
- Herwaldt BL 1999. Leishmaniasis. *Lancet* 354: 1191-1199.
- Jawetz E, Melnick JL, Adelberg, EA, Brooks GF, Butel JS, Ornston LN 2000. *Microbiologia médica*, 21th edn. São Paulo: Editora Guanabara Koogan.
- Kam TS, Sim KM, Koyana T, Toyoshima M, Hayash M, Komiyama K 1997. Citotoxic and Leishmanicidal aminoglycosides and aminosteroids from *Holarrhena curtisii*. *J Nat Prod* 61: 1332-1336.
- Kayser O, Kiderlen AF, Laatsch H, Croft SL 2000. *In vitro* leishmanicidal activity of monomeric and dimeric naphthoquinones. *Acta Tropica* 77: 307-314.
- Leite de Almeida ME, Gottlieb OR 1975. The chemistry of Brazilian Leguminosae, further isoflavones from *Pterodon apparicia*. *Phytochemistry* 14: 12, 2716.
- Lorenzi H, Matos FJA 2002. *Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas*. São Paulo: Instituto Plantarum.
- Marques DD, Machado MIL, Carvalho MG, Meleira LAC, Braz-Filho R 1998. Isoflavonoids and triterpenoids isolated from *Pterodon polygalaeiflorus*. *J Braz Chem Soc* 9: 295-301.
- Matthias LA, Emily A 1993. Tapping and Amazonian plethora: four medicinal plants of Marajó Island, Pará-Brazil. *J Ethnopharmacol* 40: 53-75.
- Ministério da Saúde (FUNASA) 2000. *Manual de Controle da Leishmaniose Tegumentar Americana*. Brasília: Centro Nacional de Epidemiologia, FUNASA, MS.
- Mislivec PB, Beuchat LR, Causin MA 1992. Yeast and molds. In *Compendium of methods for the microbiological examination of food*, 3rd edn. American Public Health Association: Washington, 239-249.
- Mittal N, Gupta N, Saksena S, Goyal N, Roy U, Rastogi AK 1998. Protective effect of picrolive from *Pichrorhiza kurroa* against *Leishmania donovani* infections in *Mesocricetus auratus*. *Life Sci* 63: 1823-1834.
- Mosmann T 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 16: 55-63.

- Nascimento GGF, Locatelli J, Freitas PC, Silva GL 2000. Antibacterial activity of plant extracts and phytochemicals on antibiotic-resistant bacteria. *Braz J Microbiol* 31: 247-256.
- Oliveira FP, Lima EO, Siqueira Júnior JP, Souza EL, Santos BHC, Barreto HM 2006. Effectiveness of *Lippia sidoides* Cham. (Verbenaceae) essential oil in inhibiting the growth of *Staphylococcus aureus* strains isolated from clinical material. *Rev Bras Farmacogn* 16: 510-516.
- Oliveira RAG, Lima EO, Vieira WL, Freire KRL, Trajano VN, Lima, IO, Souza EL, Toledo MS, Silva-Filho RN 2006. Estudo da interferência de óleos essenciais sobre a atividade de alguns antibióticos usados na clínica. *Rev Bras Farmacogn* 16: 77-82.
- Paula-Junior W, Rocha FH, Donatti L, Fadel-Picheth CMT, Weffort-Santos AM 2006. Leishmanicidal, antibacterial, and antioxidant activities of *Caryocar brasiliense* Cambess leaves hydroethanolic extract. *Rev Bras Farmacogn* 16(Supl.): 625-630.
- Phillipson JD, Wright CW 1991a. Medicinal plants in tropical medicine: Medicinal plants against protozoal diseases. *Trans Royal Soc Trop Med Hyg* 85: 18-21.
- Phillipson JD, Wright CW 1991b. Antiprotozoal agents from plant sources. *Planta Med* 57: 53-59.
- Pichette A, Larouche PL, Lebrun M, Legault J 2006. Composition and antibacterial activity of *Abies balsamea* an essential oil. *Phytother Res* 20: 371-373.
- Queiroz EF, Roblot F, Cave A, Paulo MD, Fournet A 1996. Pessoin and spinosine, two catecholic berbines from *Annona spinescens*. *J Nat Prod* 59: 438-440.
- Rath S, Trivelin LA, Imbrunite TR, Tomazela DM, Jesus MN, Marzal PC, Andrade Júnior HF, Tempone AG 2003. Antimoniais empregados no tratamento da leishmaniose: estado da arte. *Quim Nova* 26: 550-553.
- Rios JL, Recio MC, Villar A 1988. Screening methods for natural products with antimicrobial activity: a review of the literature. *J Ethnopharmacol* 23: 127-149.
- Sakagami Y, Kajamura K 2006. Bactericidal activities of disinfectants against vancomycin-resistant Enterococci. *J Hosp Infect* 56: 140-144.
- Schenkel EP, Simões CMO, Mengue SS, Mentz LA, Irgang BE, Stehmann JR 1985. O espaço das plantas medicinais e suas formas derivadas na medicina científica. *Caderno de Farmácia* 1: 65-72.
- Shiomori T, Miyamoto H, Makashima K, Yoshida M, Fujiyoshi T, Udaka T, Inaba T, Hiraki N 2002. Evaluation of bedmaking-related airborne and surface methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* contamination. *J Hosp Infect* 50: 30-35.
- Simões CMO, Mentz LA, Schenkel EP, Irgang BE, Stehmann JR 1986. *Plantas da medicina popular no Rio Grande do Sul*. Porto Alegre: Editora da Universidade UFRGS.
- Sonboli A, Babakhani B, Mehrabian AR 2006. Antimicrobial activity of six constituents of essential oil from *Salvia*. *J Biosciences* 61: 160-164.
- Swanson KMJ, Busta FF, Peterson EH, Johanson MG 1992. Colony count methods. In *Compendium of methods for the microbiological examination of food*, 3rd edn., Vanderzant, C.; Splittstoesser, D.F. (eds). American Public Health Association: Washington, 239-249.

Torrenegra R, Bauereib P, Achenbach H 1989. Homoomosanine-type alkaloids from *Bowdichia virgiloides*. *Phytochemistry* 28: 2219-2221.

Verdi LG, Brighente IMC, Pizzolatti MG 2005. O gênero *Baccharis* (Asteraceae): Aspectos químicos, econômicos e biológicos. *Quim Nova* 28: 85-94.

Yang DM, Liew FY 1992. Effects of quinghaosu (artemisin) and its derivatives on experimental cutaneous leishmaniasis. *Parasitology* 106: 7-11.

Tabela 1 – Atividade antimicrobiana do óleo essencial obtido das sementes de *P. emarginatus* contra microorganismos-padrão.

Microorganismos	Zonas de inibição (mm) ^a			Penicilina (1 UI/mL)	Nistatina (20 UI/mL)	CIM (mg/mL)
	OE					
	10 mg	25 mg	50 mg			
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	10,60 ± 0,57	10,30 ± 0,57	10,16 ± 0,28	15,33 ± 0,57	NT	2,5
<i>Streptococcus mutans</i> ATCC 25175	–	–	–	9,50 ± 0,57	NT	NT
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 90271	–	–	–	8,66 ± 0,57	NT	NT
<i>Escherichia coli</i> ATCC 10530	–	–	–	9,26 ± 0,25	NT	NT
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	–	–	–	NT	8,75 ± 0,26	NT

OE: óleo essencial; ND: não testado. ^a Os resultados são expressos como média ± desvio-padrão (n = 3).

Tabela 2 – Determinação da CI_{50} ($\mu\text{g/mL}$) do óleo essencial e frações obtidas das sementes de *Pterodon emarginatus*, frente às formas promastigotas de *L. amazonensis* e *L. chagasi*.

Amostras	CI_{50} ($\mu\text{g/mL}$)	
	<i>L. amazonensis</i>	<i>L. chagasi</i>
Óleo Essencial	> 100	> 100
Fração Hexânica	$50,06 \pm 1,16$	> 100
Fração Butanólica	$46,65 \pm 3,04$	> 100
Fração Metanólica	> 100	> 100
Anfotericina B	$0,90 \pm 0,05$	$1,90 \pm 0,12$

Os resultados são expressos como média \pm desvio-padrão (n = 3).

ANEXO D – Artigos em preparação para publicação

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

Rafael C. Dutra¹, Frederico Pittella¹, Dalton Dittz Junior³, Daniel S. Pimenta², Ana Cláudia F. Amaral⁴, Miriam Tereza P. Lopes³, Nádia R. Barbosa^{1*}

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

² Instituto de Ciências Biológicas (ICB) - Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF) - Brazil

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

⁴ Laboratório de Plantas Medicinais e Derivados – FIOCRUZ - Rio de Janeiro - Brazil

2. Atividade cicatrizante de cremes preparados à base de óleo essencial e fração hexânica obtidos das sementes de *Pterodon emarginatus* Vogel

Rafael C. Dutra¹, Frederico Pittella¹, Priscila Larcher¹, Rogério Estevam Farias², Nádia R. Barbosa^{1*}

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

² *Instituto de Ciências Biológicas (ICB) - Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF) - Brazil*

3. Antiulcerogenic and anti-inflammatory activities of the essential oil from *Pterodon emarginatus* Vogel seeds

Rafael Cypriano Dutra^a, Marcelo Bissiatti Fava^a, Juliana^b, Michele^b, Ana Paula Ferreira^b, Nádia Rezende Barbosa^{a,*}

^a Núcleo de Identificação e Quantificação Analítica-FFB/Universidade Federal de Juiz de Fora, MG, Brasil

^b Laboratório de Imunologia, Instituto de Ciências Biológicas/Universidade Federal de Juiz de Fora, MG, Brasil