

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

JOSIANE MELLO DA SILVA

***Lacistema pubescens* MART.:**
PERFIL FITOQUÍMICO E ATIVIDADES BIOLÓGICAS

Juiz de Fora
2011

JOSIANE MELLO DA SILVA

***Lacistema pubescens* MART.:
PERFIL FITOQUÍMICO E ATIVIDADES BIOLÓGICAS**

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

Orientadora: Prof^a Dr^a. Elita Scio Fontes

Juiz de Fora
2011

JOSIANE MELLO DA SILVA

***Lacistema pubescens* MART.:**
PERFIL FITOQUÍMICO E ATIVIDADES BIOLÓGICAS

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

BANCA EXAMINADORA

Prof^a Dr^a. Elita Scio Fontes

(Orientadora – Departamento de Bioquímica – UFJF)

Prof^a Dr^a. Antônia Ribeiro

(Departamento de Bioquímica – UFJF)

Prof^a Dr^a. Elisabeth Neumann

(Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG)

**Dedico este trabalho aos meus pais, João Batista e Genilda Mello, os alicerces de minha formação e o verdadeiros responsáveis pela minha força, coragem e determinação. Sem vocês não seria quem sou, não teria o que tenho, não estaria onde estou. Sem vocês eu não seria, apenas estaria...
Amo muito vocês!**

AGRADECIMENTOS

Agradeço imensamente a Deus por permitir a realização e concretização deste trabalho, por sempre ter iluminado meu caminho e me dado forças para continuar e não desistir.

À minha orientadora Prof^a Dr^a Elita Scio Fontes, primeiramente pela confiança depositada em mim. Também, meu eterno agradecimento pela oportunidade, pelo crescimento científico e profissional, orientação, exigências e amizade oferecidas durante todo este período.

Ao Eleusis, meu grande amor, sempre me apoiando, incentivando e me inspirando. O meu amor, a minha admiração e meu orgulho por você aumentam a cada dia que passamos juntos.

Aos meus avós, que não estão de corpo presente ao meu lado, mas com certeza de onde estiver, me guiam, protegem e acompanham.

À minha querida amiga-irmã Luiza, pelas duas décadas de companheirismo e amizade singular.

Às amigas Andresa, Alexandra, Tatiane e Joana pela amizade e torcida por meu sucesso.

Aos meus queridos amigos Isabel, Paula, Erick, Renata e Danielle pela ajuda e atenção na realização dos experimentos e pelos conhecimentos compartilhados. Essa minha conquista deve-se muito a vocês!

À todos os colegas do laboratório pela agradável convivência e presteza em ajudar, sempre que precisei.

À Prof^a Dr^a Ana Cláudia Rodrigues por ter me proporcionado a grande chance de sentir na tutoria o quanto é maravilhoso participar da formação do conhecimento, tornando-me mais apaixonada pela profissão.

À todos os técnicos e docentes do Departamento de Bioquímica pelo apoio técnico e ensinamentos.

Aos colegas da Secretaria do ICB pelo suporte e gentileza toda vez em que recorria a eles.

À Prof^a Dr^a Elaine Coimbra do Departamento de Parasitologia do ICB da UFJF, pela realização da atividade leishmanicida.

À Prof^a Dr^a Elaine Fagundes do Departamento de Fisiologia e Biofísica do ICB da UFMG, pela realização da atividade antitumoral.

Ao Centro de Biologia da Reprodução (CBR) da UFJF, pelo fornecimento dos animais.

Às professoras Dra. Antônia Ribeiro e Dra. Elisabeth Neumann que aceitaram participar da banca examinadora.

Ao programa de Pós Graduação em Ciências Biológicas pelo apoio prestado.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de Mestrado.

À todos aqueles, que direta ou indiretamente, contribuíram para a realização dessa dissertação, meus sinceros agradecimentos.

**“Agradeço todas as dificuldades que enfrentei;
não fosse por elas, eu não teria saído do lugar.
As facilidades nos impedem de caminhar.
Mesmo as críticas, nos auxiliam muito”
Chico Xavier**

RESUMO

Lacistema pubescens Mart. (Lacistemataceae), espécie arbórea e nativa, apresenta-se distribuída em vários estados brasileiros e é conhecida popularmente, conforme a região em que se encontra como espeto-vermelho, canela-vermelha, sabonete e cafezinho. Esse trabalho descreve o estudo fitoquímico e atividade antioxidante, antimicrobiana, leishmanicida, antitumoral, antinociceptiva e anti-inflamatória das folhas de *L. pubescens*. A atividade antioxidante foi analisada por quatro métodos diferentes e realizada com o extrato bruto metanólico (EBM) e partições em hexano (PHEX), em diclorometano (PDCM), em acetato de etila (PAcOEt) e hidrometanólica (PHM). Pelo método do DPPH, todas as amostras foram efetivas em inibir o radical, particularmente a PHM (CI₅₀ 1,8 µg/mL); pelo sistema β-caroteno / ácido linoleico a melhor resposta foi para a PHEX (CI₅₀ 22,71 µg/mL); no método do TBA, a amostra que melhor conseguiu inibir a lipoperoxidação foi a PHM e no método para avaliar o poder redutor das amostras, nenhuma amostra foi efetiva. A atividade antimicrobiana com determinação da CIM foi realizada com o EBM e partições diante das cepas *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Shigella dysenteriae*, *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli*, *Enterobacter cloacae* e *Enterococcus faecali*. A melhor resposta foi para as partições com valores de CIM de 125 µg/mL, a saber: PDCM para *Enterococcus faecalis*; PAcOEt bem como PHM para *Enterobacter cloacae*. A atividade leishmanicida foi verificada em formas promastigotas de *Leishmania amazonensis*, *L. major*, *L. braziliensis* e *L. chagasi*. A PHEX foi a amostra que apresentou a CI₅₀ mais significativa em comparação ao controle em três das quatro espécies testadas. Para a atividade antitumoral verificada pelo método do MTT, PHEX e PAcOEt foram ativas diante da linhagem HL60 e PDCM, diante da linhagem MCF-7, contudo todas os extratos mostraram-se resistentes para Jurkat. O potencial anti-inflamatório e antinociceptivo de *L. pubescens* foi investigado *in vivo*. Três modelos para dor, com mecanismos de modulação distintos, foram utilizados. No teste de contorções abdominais, EBM e todas as partições foram efetivas em suprimir a dor. No teste da formalina, na dor de origem central, PHEX e PDCM foram ativos e na dor inflamatória, mostraram-se ativos os EBM, PHEX e PDCM. No teste da retirada da cauda, as amostras analisadas não alteraram o período de latência. Para avaliar o potencial anti-inflamatório foi utilizado o modelo do edema de orelha. EBM e PHEX administrados oralmente, não foram capazes de diminuir a inflamação, contudo a PHEX administrada topicamente suprimiu o edema em 88%. Triterpenos, flavonoides e esteroides encontrados nas amostras parecem ser os responsáveis pelas atividades encontradas.

Palavras - chave: *Lacistema pubescens*, inflamação, dor, antitumoral, leishmanicida, antioxidante, antimicrobiano.

ABSTRACT

Lacistema pubescens Mart. (Lacistemataceae), an arborea native species, is distributed in several Brazilian states and known popularly as “espeto-vermelho, canela – vermelha, sabonete e cafezinho”. This work describes the phytochemical profile and the antioxidant, antimicrobial, anti-leishmanial, antitumor, anti-inflammatory and antinociceptive activities of the leaves of *L. pubescens*. The antioxidant activity was evaluated by four different methods and performed with the crude methanol extract (EBM) and the hexane (PHEX), dichloromethane (PDCM), ethyl acetate (PACOEt) and hydromethanolic (PHM) partitions. By the DPPH method, all samples were effective in inhibiting the radical, particularly PHM (IC₅₀ 1.8 µg /ml), by the β-carotene/linoleic acid system, the best answer was shown for PHEX (IC₅₀ 22.71 µg/ml), by the TBA method, the sample that best managed to inhibit lipid peroxidation was the PHM and when evaluated for the reducing power, the samples showed no activity. The antimicrobial activity, used to determine the MIC was performed with the EBM and partitions on the strains *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Shigella dysenteriae*, *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli*, *Enterobacter cloacae* and *Enterococcus faecalis*. The best response was for the partitions with MIC values of 125 µg/mL, as follows: PDCM for *Enterococcus faecalis*; PACoEt for PHM and *Enterobacter cloacae*. The leishmanicidal activity was observed in promastigotes of *Leishmania amazonensis*, *L. major*, *L. braziliensis* and *L. chagasi*. PHEX was the sample that showed the most significant IC₅₀ among the four species tested. For the antitumor activity observed by MTT method, PHEX and PACOEt were active for HL60 and PDCM for MCF-7 tumor cell lines. On the other hand, all extracts were resistant to Jurkat. The antinociceptive and anti-inflammatory potential of *L. pubescens* were investigated *in vivo*. Three models for pain, with different modulation mechanisms were used. In the writhing test, EBM and all partitions were effective in suppressing pain. In the formalin test, on central origin pain, PHEX and PDCM were active and on inflammatory pain, EBM, PHEX and PDCM were active. In the tail flick test, the samples did not alter the latency period. To assess the anti-inflammatory activity, the ear edema model was used. EBM and PHEX when administered orally were not capable to reduce inflammation, but PHEX, administered topically, suppressed the edema by 88%. Major compounds like triterpenes, flavonoids and sterols found in the samples could be responsible for the activities found for *L. pubescens*.

Kew-Words: *Lacistema pubescens*, inflammation, pain, antitumor, leishmanicidal, antioxidant, antimicrobial.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Substâncias bioativas extraídas de plantas _____	17
Figura 2 Biossíntese dos metabólitos secundários _____	19
Figura 3 <i>Lutzomyia longipalpis</i> , ou mosquito-palha: agente transmissor da leishmaniose visceral _____	29
Figura 4 <i>Leishmania sp.</i> (A) promastigotas e (B) amastigotas _____	29
Figura 5 Ciclo de vida da <i>Leishmania sp</i> _____	30
Figura 6 Distribuição da família Lacistemataceae _____	43
Figura 7 Família Lacistemataceae representada pelos gêneros <i>Lozania</i> e <i>Lacistema</i> _____	43
Figura 8 Fluxograma da extração e partição das folhas de <i>L. pubescens</i> _____	47
Figura 9 Cromatograma da PHEX de <i>L. pubescens</i> por CG _____	66
Figura 10 Efeito antioxidante do EBM e partições e BHT na peroxidação lipídica em homogenato de carne moída _____	69
Figura 11 Atividade antitumoral do EBM e partições, DMSO e Vincristina frente à linhagem HL60 _____	73
Figura 12 Atividade antitumoral do EBM e partições, DMSO e Vincristina frente à linhagem Jurkat _____	74
Figura 13 Atividade antitumoral do EBM e partições, DMSO e Etoposideo frente à linhagem MCF-7 _____	74
Figura 14 Efeito de <i>L. pubescens</i> e indometacina via oral, sobre as contorções abdominais induzidas por ácido acético em camundongos _____	75
Figura 15 Efeito de <i>L. pubescens</i> e indometacina via oral e morfina via intraperitoneal, sobre o tempo de lambadura de pata na 1ª fase e 2ª fase do teste da formalina sobre camundongos _____	77
Figura 16 Efeito de <i>L. pubescens</i> via oral e morfina via intraperitoneal sobre o tempo de reação no teste de retirada da cauda _____	78
Figura 17 Efeito de <i>L. pubescens</i> via oral sobre o estímulo inflamatório induzido pelo óleo de cróton em camundongos _____	79
Figura 18 Efeito de <i>L. pubescens</i> via tópica sobre o estímulo inflamatório induzido pelo óleo de cróton em camundongos _____	80

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 <i>Leishmania</i> spp. responsáveis por leishmaniose cutânea, mucocutânea e visceral	28
Tabela 2 Resultados da triagem fitoquímica de <i>L. pubescens</i>	64
Tabela 3 Resultados do teor de fenóis totais e flavonoides do EBM e partições	65
Tabela 4 Composição química da PHEX	67
Tabela 5 Resultados da atividade antioxidante do EBM e partições	68
Tabela 6 Resultados da atividade citotóxica do EBM e partições de <i>L. pubescens</i> frente a <i>Artemia salina</i>	70
Tabela 7 Resultados da atividade antimicrobiana do EBM e partições	71
Tabela 8 Resultados da atividade leishmanicida do EBM e partições	72

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E SIGLAS

μl - microlitro

nm – nanômetro

μm - micrômetro

MeOH - metanol

BHT – antioxidante butilidroxitolueno

DPPH - radical livre 2,2-difenil-1-picrilidrazina

TBARS – Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico

EBM - extrato bruto metanólico

PHEX – partição em hexano

PDCM – partição em diclorometano

PAcOEt - partição em acetato de etila

PHM – partição hidrometanólica

UV – ultravioleta

CG - EM - Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massa

MTT - brometo de 3-(4,5-dimethylthiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazólio

DMSO – dimetilsulfóxido

ATCC – “American Type Culture Collection” – Coleção Americana de Culturas tipo

CIM – Concentração inibitória mínima

CI₅₀ – Concentração inibitória média

CL₅₀ – Concentração letal média

HL60 – Leucemia promielocítica humana

Jurkat – Linhagem humana imortalizada de linfócitos T

MCF-7 – Linhagem de adenocarcinoma de mama humano

SUMARIO

1 INTRODUÇÃO	15
1.1 REVISÃO DE LITERATURA	18
1.1.1 Origem e importância dos metabólitos secundários	18
1.1.2 Radicais livres e sua relação com o dano oxidativo	19
1.1.3 Resistência bacteriana e o uso de plantas medicinais	26
1.1.4 <i>Leishmania</i> e leishmanioses	27
1.1.5 Câncer	32
1.1.6 Inflamação e Dor	35
1.1.7 O gênero <i>Lacistema</i>	41
2 OBJETIVOS	44
2.1 Geral	44
2.2 Específicos	44
3 MATERIAL E MÉTODOS	46
3.1 Material Vegetal	46
3.2 Preparo do extrato bruto metanólico (EBM) e partições	46
3.3 Caracterização fitoquímica do EBM e partições de <i>L. pubescens</i>	47
3.4 Determinação do conteúdo de fenólicos totais	50
3.5 Determinação do conteúdo de flavonoides	51
3.6 Análise da PHEX por Cromatografia Gasosa (CG)	51
3.7 Atividades biológicas <i>in vitro</i>	52
3.7.1 Atividade antioxidante	52
3.7.2 Avaliação citotóxica em <i>Artemia salina</i>	55
3.7.3 Atividade antimicrobiana	56
3.7.4 Atividade leishmanicida	56
3.7.5 Atividade antitumoral	58
3.8 Atividades biológicas <i>in vivo</i>	59
3.8.1 Animais	59

3.8.2 Atividade antinociceptiva	59
3.8.3 Atividade anti-inflamatória	62
3.9 Análise estatística	63
4 RESULTADOS	64
4.1 Triagem fitoquímica	64
4.2 Teor de fenóis e flavonoides	65
4.3 Caracterização química da PHEX por CG-EM	65
4.4 Atividades biológicas <i>in vitro</i>	68
4.4.1 Atividade antioxidante	68
4.4.2 Atividade citotóxica em <i>Artemia salina</i>	70
4.4.3 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)	71
4.4.4 Atividade leishmanicida	72
4.4.5 Atividade antitumoral	73
4.5 Atividades biológicas <i>in vivo</i>	75
4.5.1 Atividade antinociceptiva	75
4.5.2 Atividade anti-inflamatória	79
5 DISCUSSÃO	81
5.1 Análise fitoquímica	81
5.2 Fenóis totais e atividade antioxidante	81
5.3 Atividade citotóxica contra <i>Artemia salina</i> e leishmanicida	84
5.4 Atividade antimicrobiana	85
5.5 Atividade antitumoral	86
5.6 Atividade antinociceptiva	88
5.7 Atividade anti-inflamatória	91
6 CONCLUSÃO	95
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	96

1 INTRODUÇÃO

Desde os tempos mais remotos os vegetais fazem parte da vida do homem, seja como fonte de alimentos, material para vestuário, habitação, utilidades domésticas, produção de meios de transporte, utensílios para manifestações artísticas, culturais e religiosas bem como para a prevenção e combate a moléstias (SCHENKEL, GOSMANN e PETROVICK, 2007). Fósseis indicam que há 60.000 anos os vegetais já eram utilizados com fins medicinais. Em décadas recentes, constata-se um grande avanço científico envolvendo plantas medicinais visando obter novas substâncias com propriedades terapêuticas. Tal avanço pode ser evidenciado pelo aumento de trabalhos publicados nesta área, tanto em congressos como em periódicos nacionais e internacionais, além do surgimento de periódicos específicos sobre produtos naturais ativos, como *Phytomedicine*, *Phytochemical Analysis*, *Natural Product Letter*, dentre outros (FILHO e YUNES, 1998).

Apesar do avanço da síntese orgânica e dos processos biotecnológicos, cerca de 25% dos medicamentos prescritos nos países industrializados são originários de plantas (HOSTETTMANN, QUEIROZ e VIEIRA, 2003). No Brasil, o crescimento do mercado de medicamentos fitoterápicos é da ordem de 15% ao ano, enquanto o crescimento anual do mercado de medicamentos sintéticos gira em torno de 3 a 4% (ABIFITO, 2007). Por outro lado, o panorama nacional indica que 84% de todos os fármacos são importados e que 78% da produção brasileira são realizadas por empresas multinacionais (BERMUDEZ, 1995).

O objetivo primordial na indicação do uso de fitoterápicos na medicina humana não é substituir medicamentos registrados e já comercializados, mas sim aumentar a opção terapêutica dos profissionais de saúde ofertando medicamentos equivalentes, registrados, mais baratos, com espectros de ação mais adequados e, talvez, com indicações terapêuticas complementares às medicações existentes. Outros objetivos são a valorização das tradições populares e o fornecimento de substrato autóctone para o desenvolvimento da indústria farmacêutica local (LAPA et al., 2007).

O Brasil, notável por sua biodiversidade, apresenta mais de 200 mil espécies já registradas em seus biomas (Amazônia, Caatinga, Cerrado, Mata Atlântica, Pantanal e Pampa) e na Zona Costeira e Marinha estimando-se que este número

possa chegar a mais de 1 milhão e oitocentas mil espécies. Apresenta também a mais diversa flora do mundo, número superior a 55 mil espécies descritas (22% do total mundial) (MMA, 2010). Apesar dessa enorme biodiversidade vegetal, apenas 8% das espécies da flora brasileira foram estudadas em busca de substâncias bioativas (BRASIL, 2006). Destas, mais de 400 plantas foram registradas no Ministério da Saúde para comercialização (ANVISA, 2007).

Dois aspectos distinguem os produtos de origem natural dos sintéticos, ao se considerar a perspectiva de obtenção de novos fármacos: a diversidade molecular e a função biológica. A diversidade molecular dos produtos naturais é muito superior àquela derivada dos processos de síntese, que apesar dos consideráveis avanços, ainda é limitada. Esse fato possibilita que as substâncias químicas presentes nas plantas possam vir a se tornar fármacos em potencial para as mais diversas enfermidades (NISBET e MOORE, 1997).

Uma breve análise histórica permite observar que a descoberta e o desenvolvimento de vários medicamentos estão intimamente relacionados às plantas. Antigamente, quando os métodos de extração, purificação e identificação ainda não haviam sido desenvolvidos, empregavam-se diretamente sucos e extratos do vegetal. Com o advento tecnológico, algumas plantas passaram a ser empregadas como fonte para a extração direta dos princípios ativos. Ainda, estes princípios ativos serviam como material de partida para a síntese de derivados químicos ou mesmo como modelo para a síntese total de fármacos. Certamente, o exemplo mais clássico do emprego de plantas medicinais na terapia moderna é o ácido acetilsalicílico (AAS), um ácido orgânico com propriedades analgésicas e anti-inflamatórias reconhecidas, cujos precursores salicina e saligenina são extraídos das cascas de *Salix alba* e *Filipendula ulmaria* (CORDELL, 2000; Mc CURDY e SCULLY, 2005). Nesta perspectiva, alcaloides como a morfina e quinina são outros exemplos a serem citados (Figura 1). Mais recentemente, entre as décadas de 1980 e 1990, a química de produtos naturais tornou-se a principal linha de pesquisa para a descoberta de novos agentes antitumorais (CRAGG, NEWMAN e SNADER, 1997), onde mais de 1000 plantas apresentaram propriedades antiproliferativas significantes (MUKHERJEE et al., 2001). Dentre alguns exemplos de medicamentos antitumorais destacam-se os alcaloides antileucêmicos vincristina e vimblastina (Figura 1) (e o derivado sintético vinorelbina) isolados de *Catharanthus roseus* (CRAGG e NEWMAN, 2005), os diterpenos taxol (Figura 1) e docetaxel de *Taxus*

brevifolia e os alcaloides camptotecina, topotecan e irinotecan de *Camptotheca acuminata* (HUIZING et al., 1995).

Desta forma, com o propósito de corroborar na caracterização e utilização de moléculas bioativas, o grupo de pesquisa do Laboratório de Produtos Naturais Bioativos do Departamento de Bioquímica da Universidade Federal de Juiz de Fora, vem atuando desde 2002 no desenvolvimento de pesquisas relacionadas à prospecção de novas drogas, bem como a avaliação de relevantes atividades biológicas, investigando-as com enfoque químico e farmacológico. Neste período, várias espécies de vegetais da flora da Zona da Mata Mineira foram coletadas e seus constituintes químicos e atividades biológicas estudadas, sendo que algumas delas apresentaram satisfatórios resultados frente aos modelos biológicos testados. Neste contexto, diante de uma triagem biológica com a espécie *Lacistema pubescens* Mart., constatou-se que a mesma apresentou-se promissora para estudos mais aprofundados.

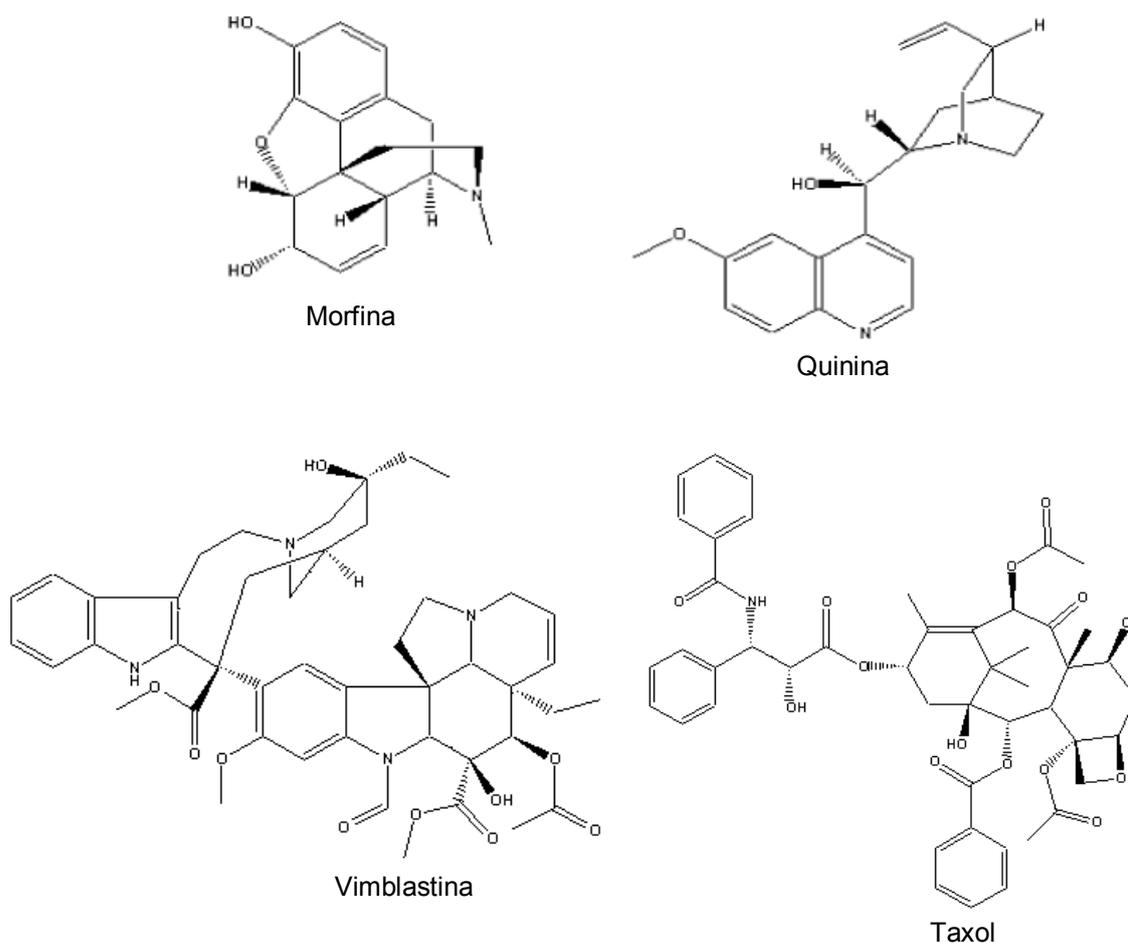


Figura 1 - Substâncias bioativas extraídas de plantas

1.1 REVISÃO DE LITERATURA

1.1.1 Origem e importância dos metabólitos secundários

Dá-se o nome de metabolismo ao conjunto de reações que continuamente estão ocorrendo na célula. Portanto, as substâncias químicas formadas, degradadas, ou simplesmente transformadas são chamadas metabólitos.

De acordo com a teoria evolucionista, todos os seres vivos derivam de um precursor comum. Isso explica porque as principais macromoléculas (carboidratos, lipídeos, proteínas e ácidos nucleicos) são essencialmente as mesmas, quer num organismo vegetal, quer num animal. Por serem considerados processos essenciais à vida e comum aos seres vivos, têm sido definidos como integrantes do metabolismo primário. Ou seja, o metabolismo primário compreende as várias reações químicas envolvidas na transformação de moléculas de nutrientes em unidades constitutivas essenciais da célula (SANTOS, 2007).

Vegetais, microrganismos e, em menor escala, animais apresentam um arsenal metabólico (enzimas, coenzimas e organelas) capaz de produzir, transformar e acumular outras substâncias, não necessariamente relacionadas de forma direta à manutenção da vida do organismo produtor. Nesse grupo, encontram-se substâncias cuja produção e acumulação estão restritas a um número limitado de organismos, sendo a bioquímica e o metabolismo específicos e únicos, caracterizando-se como elementos de diferenciação e especialização. A todo este conjunto metabólico costuma-se definir como metabolismo secundário, cujos produtos, embora não necessariamente essenciais para o organismo produtor, garantem vantagens para sua sobrevivência e para perpetuação da espécie, em seu ecossistema. Diversas funções são atribuídas a esta classe de metabólitos como a defesa contra herbívoros e infecção por microrganismos, proteção contra raios ultravioleta, efeitos alelopáticos, atração de animais polinizadores e dispersores de sementes, entre outras (TAIZ e ZEIGER, 2004; SANTOS, 2007).

Os metabólitos secundários são derivados biossinteticamente de intermediários do metabolismo primário, cujas rotas possuem estreita relação. Como

pode ser visualizada na Figura 2, a origem destes metabólitos pode ser resumida a partir do metabolismo da glicose, via dois intermediários principais, o ácido chiquímico e o acetato (SANTOS, 2007). Os compostos secundários são divididos em três grupos distintos quimicamente: terpenos, compostos fenólicos e substâncias nitrogenadas. A produção dessas substâncias resulta dos processos de biossíntese, transporte, degradação e armazenamento, que são afetados pelo genótipo, estágio ontogenético e por fatores ambientais (TAIZ e ZEIGER, 2004).

Aproximadamente 100 mil substâncias provenientes do metabolismo secundário já foram descobertas, entretanto somente um pequeno número destas é conhecido sob o ponto de vista biológico e farmacológico (OKSMAN-CALDENTY e INZÉ, 2004). Pelo elevado número e grande diversidade destes metabólitos vegetais, eles têm despertado interesse de pesquisadores de vários campos da ciência que vêem neles uma promissora fonte de novas moléculas potencialmente úteis ao homem (SANTOS, 2007).

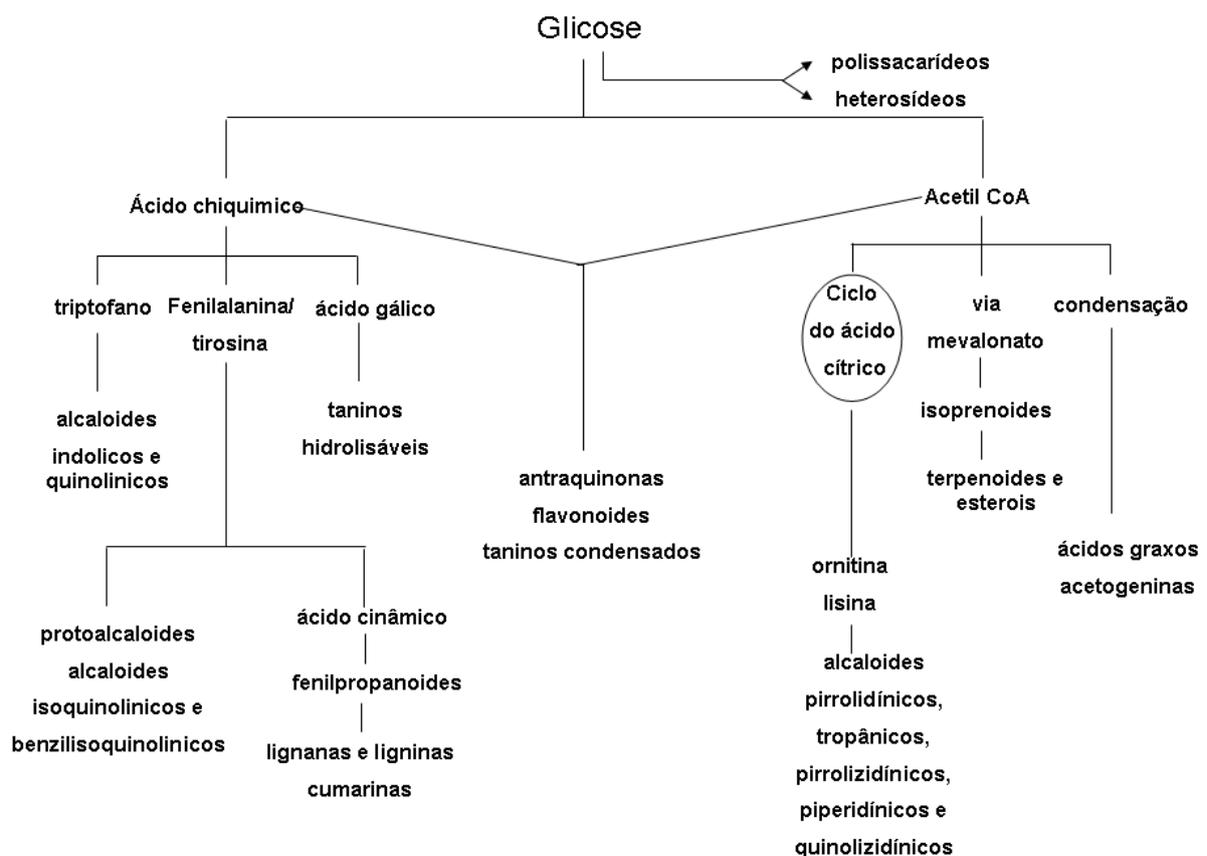


Figura 2 - Biossíntese dos metabólitos secundários (adaptado de SANTOS, 2007)

1.1.2 Radicais livres e sua relação com o dano oxidativo

A respiração é um fenômeno intimamente relacionado com a vida; produz, entretanto, diversas “espécies reativas de oxigênio” (EROs) como os radicais livres [ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$), o radical hidroxila (OH^{\cdot}) e o óxido nítrico (NO^{\cdot})], bem como as espécies não radicalares [peróxido de hidrogênio (H_2O_2), oxigênio singlete (1O_2) e ozônio (O_3)]. O termo radical livre é frequentemente usado para designar qualquer espécie química, como um átomo (hidrogênio ou cloro) ou uma molécula contendo um ou mais elétrons não pareados nos orbitais externos, transformando as estruturas em substâncias altamente reativas. Esses são capazes de reagir com qualquer composto situado próximo à sua órbita externa, passando a ter função oxidante ou redutora (DROGE, 2002).

A reatividade química dos radicais livres é determinada pela molécula que apresenta o elétron não pareado, podendo apresentar grande variedade nos diferentes tipos de radicais. A forma que expressa e compara a reatividade química é determinada pelo tempo de meia vida ($t_{1/2}$) da espécie química, ou seja, um curto tempo de meia vida indica uma alta reatividade (HALLIWELL, 1999).

Entre as principais formas reativas de oxigênio, o $O_2^{\cdot-}$ apresenta uma baixa capacidade de oxidação e o OH^{\cdot} mostra uma pequena capacidade de difusão sendo o mais reativo na indução de lesões nas moléculas celulares. O peróxido de hidrogênio (H_2O_2) não é considerado um radical livre verdadeiro, porém é capaz de atravessar a membrana nuclear e induzir danos na molécula de DNA por meio de reações enzimáticas (ANDERSON, 1996).

A geração de radicais livres constitui uma ação contínua e fisiológica, cumprindo funções biológicas essenciais. São formados em um cenário de reações de óxido-redução, provocando essas reações ou delas resultando. Podem ceder o elétron desemparelhado e serem oxidados ou podem receber outro elétron e serem reduzidos (OKEZIE, 1998). No organismo, encontram-se envolvidos na produção de energia, fagocitose, regulação do crescimento celular, sinalização intercelular e síntese de substâncias biológicas importantes. No entanto, seu excesso apresenta efeitos prejudiciais, tais como peroxidação dos lipídeos de membrana e agressão às proteínas dos tecidos e das membranas, às enzimas, carboidratos e moléculas de DNA. Dessa forma, encontram-se relacionados a várias patologias, tais como artrite,

choque hemorrágico, doenças do coração, catarata, disfunções cognitivas, câncer e AIDS, podendo ser a causa ou o fator agravante do quadro geral (HUSAIN, CILLARD e CILLARD 1987; BARREIROS et al., 2006).

As espécies radicalares são altamente reativas e provocam reações em cadeia, como a oxidação lipídica. Quando a geração de radicais livres é maior que a sua degradação pelas defesas antioxidantes, produz-se um desequilíbrio no organismo, denominado estresse oxidativo, que pode levar a danos, dependendo da extensão, da duração e do tipo de oxidante implicado (SIES, STAHL e SELAVANIAN, 2005).

Antioxidantes no combate aos radicais livres

A produção contínua de radicais livres durante os processos metabólicos levou ao desenvolvimento de muitos mecanismos de defesa antioxidante para limitar os níveis intracelulares e impedir a indução de danos (SIES, 1993). Desta forma, uma ampla definição de antioxidante é “qualquer substância que, presente em baixas concentrações quando comparada a do substrato oxidável, atrasa ou inibe a oxidação deste substrato de maneira eficaz” (SIES e STAHL, 1995).

Esses agentes que protegem as células contra os efeitos dos radicais livres podem ser classificados em antioxidantes enzimáticos ou não-enzimáticos. Dentre os não-enzimáticos estão: o α -tocoferol (vitamina E), curcumina, β -caroteno, ácido ascórbico (vitamina C), flavonoides, proteínas do plasma, selênio, glutathione, clorofilina e L-cisteína. Os enzimáticos incluem: superóxido dismutase, catalase, NADPH-quinona oxidoreductase, glutathione peroxidase e enzimas de reparo (SIES, 1993).

Outra classificação divide os antioxidantes em sintéticos e naturais. Os sintéticos são comumente usados na indústria alimentícia para aumentar a vida de prateleira de alimentos lipídicos ou que contenham lipídeos em sua composição. Como o consumo dessas substâncias tem sido associado ao desenvolvimento de alguns tipos de câncer, como os de mama, próstata e estômago em ratos, a indústria de alimentos tem sido conduzida a reduzir ou substituir seu uso, por antioxidantes

naturais. O butilidroxitolueno (BHT), o butilidroxianisol (BHA), o propilgalato (PG) e o terciobutilhidroxinona (TBHQ) são exemplos de antioxidantes sintéticos (SVILAAS et al., 2004). Inúmeras pesquisas recentes mostram que vários extratos de plantas exercem ação antioxidante, portanto os antioxidantes naturais são indicados para atenuar os efeitos deletérios do estresse oxidativo celular. A partir da perspectiva do valor potencial dos antioxidantes, as pesquisas buscam extratos e substâncias naturais com potente atividade antioxidante e baixa citotoxicidade (ANDRADE et al., 2007; ROCHA et al., 2007; BALESTRIN et al., 2008; RODRÍGUEZ et al., 2008).

Compostos fenólicos antioxidantes

Os compostos fenólicos compõem a grande classe dos fitoquímicos alimentares. Sua fórmula química contém pelo menos um anel aromático, ao qual está unida uma (ou mais) hidroxila (s). Existe uma grande variedade de substâncias fenólicas, classificadas em dois grandes grupos: flavonoides e não flavonoides (HARTMAN e SHANKEL, 1990).

Os flavonoides são formados por dois anéis aromáticos unidos por um heterociclo oxigenado. Dependendo do grau de hidrogenação e da substituição do heterociclo, diferenciam-se em flavanois, flavonas, flavonois, flavanonas, antocianidinas e isoflavonoides, onde geralmente estão ligados a açúcares, formando glicosídeos. Dentre os flavonoides mais investigados estão a quercetina, a miricetina, a rutina e a naringenina (HARTMAN e SHANKEL, 1990). Os não flavonoides são compostos benzoicos e cinâmicos, chamados comumente de ácidos fenólicos. Os mesmos contêm um anel aromático com pelo menos um grupo hidroxila e com diferentes grupos funcionais, como aldeídos, alcoóis ou ácidos podendo formar ésteres com os ácidos orgânicos ou unir-se a açúcares. Outras substâncias de natureza fenólica são os estilbenos, lignanos e de forma polimerizada, os taninos e ligninas (MANACH et al., 2004).

Os compostos fenólicos podem atuar como antioxidantes de várias formas: combatendo os radicais livres, pela doação de um átomo de hidrogênio de um grupo hidroxila (OH) da sua estrutura aromática; quelando metais de transição, como o

Fe^{2+} e Cu^+ ; interrompendo a reação de propagação dos radicais livres na oxidação lipídica; modificando o potencial redox do meio e reparando a lesão a moléculas atacadas por radicais livres (PODSEDEK, 2007; KYUNGMI e EBELER, 2008). Podem também bloquear a ação de enzimas específicas que causam inflamação; modificar as rotas metabólicas das prostaglandinas (VALKO et al., 2006) e inibir a aglomeração plaquetária e ativação de carcinógenos (LIU, 2005). Em outros estudos, tem-se visto que atuam contra alergias; inflamações; hepatotoxinas, alguns vírus, úlceras e tumores; aumentam a resistência dos vasos sanguíneos e bloqueiam as enzimas que produzem estrógeno (MILES et al., 2005; PUKASKAS et al., 2005).

Devido às várias funções biológicas atribuídas às substâncias fenólicas, inúmeros trabalhos têm sido conduzidos com o objetivo de identificar e purificar tais substâncias a partir de fontes naturais, restringindo o uso de antioxidantes sintéticos (MELO e GUERRA, 2002; SVILAAS et al., 2004).

1.1.2.1 Métodos utilizados na determinação da atividade antioxidante

Nos últimos anos, foram registrados vários trabalhos na literatura objetivando avaliar a eficácia antioxidante de substâncias químicas ou extratos vegetais. Segundo Anderson e Phillips (1999), a utilização de métodos *in vitro* para avaliar o potencial benéfico dos antioxidantes apresenta inúmeras dificuldades e desafios. As reações envolvidas na oxidação e redução são extremamente sensíveis ao meio no qual elas ocorrem, particularmente, à concentração de oxigênio, à presença de íons metálicos em transição e às numerosas substâncias com potencial de oxirredução. Desta forma, não é rara a obtenção de resultados contraditórios na avaliação de um único antioxidante, utilizando-se diferentes sistemas *in vitro*. Soma-se a isto, o fato de existirem diversos componentes antioxidantes em tecidos animais e vegetais, o que torna relativamente difícil mensurar a ação de cada componente antioxidante separadamente, bem como a possibilidade da atividade antioxidante ser devido a um sinergismo entre as diferentes substâncias antioxidantes presentes na amostra. Neste caso, o isolamento de um composto não refletirá exatamente o seu

poder antioxidante (MELO e MANCINI-FILHO, 1989; BRAND-WILLIAMS, CUVELIER e BERSET, 1995).

Vários métodos analíticos têm sido propostos para determinar a atividade antioxidante total de extratos biológicos.

Método do radical DPPH

Consiste em determinar a capacidade de captura do radical livre 2,2-difenil-1-picrilhidrazina (DPPH) pelas substâncias antioxidantes. É um método colorimétrico, realizado em comprimento de onda de 515 nm. Após a adição do antioxidante, produz-se uma diminuição da absorbância, no qual ocorre a redução dos antioxidantes devido à habilidade das substâncias em transferirem átomos de hidrogênio para os radicais. A facilidade na aquisição do radical livre, sua estabilidade e a avaliação da atividade antioxidante em um intervalo de tempo relativamente curto, são algumas das vantagens apresentadas por este método (BRAND-WILLIAMS, CUVELIER e BERSET, 1995; DJERIDANE et al., 2006).

Método de co-oxidação do β -caroteno / ácido linoleico

Esse tipo de avaliação da atividade antioxidante é realizado em meio emulsionado, pela técnica de co-oxidação de substratos. É um método colorimétrico, realizado em comprimento de onda de 470 nm, que baseia-se na leitura referente à descoloração da solução preparada com β -caroteno e ácido linoleico, em meio aquoso. A descoloração ocorre em função das estruturas radicalares formadas pela oxidação do ácido linoleico, que atacam as duplas ligações do β -caroteno, perdendo seu cromóforo, resultando na descoloração do pigmento alaranjado, característico da solução (HUANG e WANG, 2004). Este ensaio simula a oxidação dos componentes celulares da membrana lipídica em presença de antioxidantes, assim

como, a capacidade de inibição da formação de radicais peróxidos a partir da oxidação do ácido linoleico (MATA et al., 2007).

Método TBARS (Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico)

As membranas celulares, que contém grande quantidade de ácidos graxos poliinsaturados, podem sofrer danos mediados por radicais livres, acarretando alterações em sua estrutura e permeabilidade (MELLO FILHO, HOFFMAN e MENEHINI, 1983). Consequentemente, ocorrem perda da seletividade na troca iônica, liberação do conteúdo de organelas e formação de produtos citotóxicos (como o malonaldeído), culminando com a morte celular (HERSHKO, 1989). A lipoperoxidação é iniciada por algum radical, que ao reagir com os lipídios insaturados das membranas resulta na formação de hidro ou lipoperóxidos, que são altamente reativos e podem seguir uma cascata oxidativa, liberando no meio, produtos da degradação de ácido graxos, tais como o malonaldeído. A quantificação de tal composto tem sido utilizada para avaliar a extensão do dano oxidativo. Esta quantificação pode ser feita pela reação do malonaldeído com o ácido tiobarbitúrico (TBA), para formar um pigmento rosado, que apresenta um máximo de absorção a 532-535 nm (OHKAWA, OHISHI e YAGI, 1979; GUILLÉN-SANS e GUZMÁN-CHOZAS, 1998; MIGUEL, 2010).

Poder de redução do ferro

A habilidade redutora de uma substância é utilizada como indicativo para a avaliação de sua atividade antioxidante e baseia-se na transformação do $\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}$ (OYAIKU, 1986).

1.1.3 Resistência bacteriana e o uso de plantas medicinais

As doenças infecciosas representam uma importante causa de morbidade e mortalidade, particularmente nos países em desenvolvimento. Assim, as indústrias farmacêuticas têm sido motivadas a desenvolver novas drogas antimicrobianas, especialmente em função da ocorrência de resistência microbiana a tais medicamentos. Em geral, bactérias têm habilidade genética de transmitir e adquirir resistência a drogas usadas como agentes terapêuticos (NASCIMENTO et al. 2000), sendo frequentes os relatos sobre isolamentos de bactérias que eram reconhecidamente sensíveis as drogas de uso na rotina, e que se tornam resistentes a todos, ou a quase todos os fármacos disponíveis no mercado (SAKAGAMI e KAJAMURA, 2006).

Entre os processos que contribuem para o acúmulo da resistência, podemos citar que espécies com resistência intrínseca são favorecidas, mutantes resistentes de linhagens previamente sensíveis são selecionados, genes de resistência transferíveis disseminam entre os isolados bacterianos, carreados por plasmídeos, transposons e integrons e por último, algumas linhagens resistentes propagam-se de modo epidêmico entre pacientes, hospitais e países. A importância destes processos varia com o patógeno e o local (LUIZ, 2006).

Tendo em vista que bactérias resistentes a múltiplos antimicrobianos representam um desafio no tratamento de infecções, é notória a necessidade de encontrar novas substâncias com propriedades antimicrobianas para serem utilizadas no combate a esses microrganismos (PEREIRA, 2004).

Gonçalves et al. (2005), avaliaram a atividade antimicrobiana de extratos hidroalcoólicos obtidos de 17 espécies de árvores nativas do Brasil. Dos 170 testes realizados, 25% mostraram alta atividade, destacando-se extratos de *Bixa orellana*, *Psidium guajava* e *Anacardium occidentale*. Lima et al. (2006) analisaram a atividade antibiótica de extratos etanólicos de 16 espécies de plantas usadas na medicina popular brasileira. Entre os 32 extratos testados, aqueles derivados de *Lafoensia pacari* e *Pterodon polygalaeflorus* mostraram atividade contra as cepas bacterianas estudadas. Estudos semelhantes também têm sido desenvolvidos por vários pesquisadores (CELOTTO et al., 2003; CUNICO et al., 2004; ABEYSINGHE, 2010).

Desta forma, a pesquisa para a obtenção de substâncias de origem vegetal com propriedades antimicrobianas com efeitos adversos menos graves que os atuais fármacos constituem uma fonte de pesquisa intensa (BRESOLIN e FILHO, 2003).

1.1.4 *Leishmania* e leishmanioses

Leishmanioses são doenças infecto-parasitárias causadas por protozoários pertencentes ao gênero *Leishmania* e descritas primeiramente em 1903 por Leishman e Donovan (RATH et al., 2003). Interferências do homem sobre o meio ambiente e ecossistema (AMATO et al., 2000), levaram a uma alteração no ciclo de parasitos da espécie *Leishmania* sp, resultando nas leishmanioses, doenças tropicais, consideradas pela OMS como a segunda protozoose mais importante em saúde pública.

Atualmente, as leishmanioses ameaçam cerca de 350 milhões de pessoas em 88 países. Estima-se que existam 12 milhões de casos no mundo, com 1,5-2 milhões de novos casos ocorrendo anualmente (WHO, 2010). No Brasil, as leishmanioses estão presentes em todas as unidades federativas, sendo que mais de 90% dos casos humanos da doença concentram-se na região Nordeste, havendo ainda focos importantes nas regiões Centro-Oeste, Norte e Sudeste (MONTEIRO, LACERDA e ARIAS, 1994; MAIA-ELKHOURY et al., 2008). O aumento da incidência tem como causas principais a devastação das florestas e aumento da população, falta de saneamento e higiene, bem como imunossupressão e desnutrição, que implicam na maior suscetibilidade do hospedeiro (ASHFORD, 2000).

As manifestações clínicas e a severidade da doença são variáveis, dependendo da virulência da espécie infectante, susceptibilidade do hospedeiro e co-infecções (CUNNINGHAM, 2002; ROGERS et al., 2002). A infecção pode ser assintomática ou apresentar um espectro que varia desde lesões cutâneas localizadas ou disseminadas, forma cutânea-difusa, até graves lesões mucocutâneas ou viscerais (GRIMALDI e TESH, 1993).

Cerca de 20 espécies de *Leishmania* podem infectar o homem, as quais podem ser subdivididas nos subgêneros *L. (Leishmania)* spp. e *L. (Viannia)* spp.

(MELBY, 2002), encontradas tanto no Velho Mundo quanto no Novo Mundo (Tabela 1). No Brasil, várias espécies estão associadas às formas cutâneas e/ou cutâneo-mucosa, enquanto a *L. chagasi* é a principal espécie associada à manifestação visceral (LAINSON e SHAW, 1987; GRAMICCIA e GRADONI, 2005).

Neste trabalho, foram utilizadas espécies encontradas tanto no Velho Mundo (*L. major*), quanto no Novo Mundo (*L. amazonensis*, *L. chagasi*, *L. braziliensis*).

Tabela 1 - Leishmania spp. responsáveis por LC, LMC, LV^a (adaptada de Sakthianandeswaren, Foote e Handman, 2009)

PATOLOGIA	LEISHMANIA SPP.	REGIÃO
LC	<i>L. major</i> <i>L. tropica</i> <i>L. aethiopica</i> <i>L. venezuelensis</i> <i>L. mexicana</i> <i>L. amazonensis</i> <i>L. braziliensis</i> <i>L. panamensis</i> <i>L. peruviana</i> <i>L. guyanensis</i> <i>L. donovani</i> <i>L. infantum</i>	Velho Mundo Velho Mundo Velho Mundo Novo Mundo Novo Mundo Novo Mundo Novo Mundo Novo Mundo Novo Mundo Novo Mundo Mar Cáspio e Mediterrâneo Mar Cáspio e Mediterrâneo
LMC	<i>L. braziliensis</i> <i>L. panamensis</i> <i>L. guyanensis</i> <i>L. amazonensis</i> <i>L. mexicana</i>	Novo Mundo Novo Mundo Novo Mundo Novo Mundo Novo Mundo
LV	<i>L. donovani</i> <i>L. chagasi</i> <i>L. infantum</i> <i>L. archibaldi</i> <i>L. tropicac</i> <i>L. amazonensis</i>	Velho Mundo Novo Mundo Velho Mundo Velho Mundo Velho Mundo Novo Mundo

^a Abreviações: LC, Leishmaniose cutânea; LMC, Leishmaniose mucocutânea; LV, Leishmaniose visceral

Os parasitos deste gênero se apresentam como formas promastigotas (Figura 4A) flagelados no inseto vetor (Figura 3) (gênero *Phlebotomus* no Velho Mundo e *Lutzomyia* no Novo Mundo) e como amastigotas, as quais possuem um pequeno flagelo interiorizado na bolsa flagelar, (Figura 4B) no interior de fagócitos mononucleares do hospedeiro vertebrado, principalmente os macrófagos (ALEXANDER, SATOSKAR e RUSSELL, 1999; ROGERS et al., 2002). Uma questão importante na biologia da *Leishmania*, e que leva a diversas pesquisas na área, é a característica notável que o parasito tem de sobreviver e prosperar dentro do ambiente hidrolítico do macrófago (ZHANG et al., 2001). Durante o processo de invasão, deficiências no processo de ativação dos macrófagos contribuem para

estabelecimento bem sucedido da *Leishmania* no hospedeiro mamífero (REINER et al., 1994).



Figura 3- *Lutzomyia longipalpis*, ou mosquito-palha: agente transmissor da leishmaniose visceral

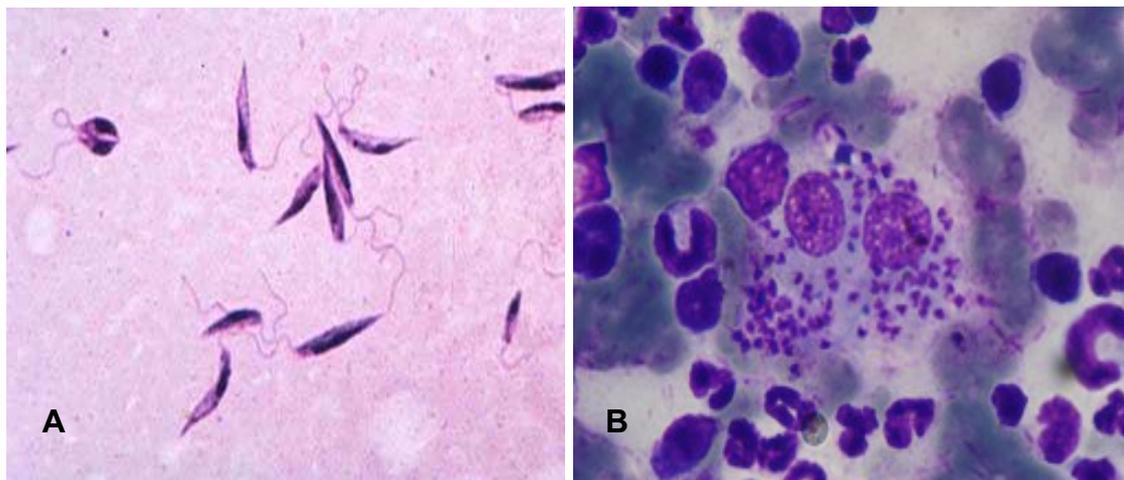


Figura 4 - *Leishmania* sp. (A) promastigotas e (B) amastigotas (FONTE: www.ufmt.br/hovet/lab_leishmaniose.htm)

No modo de transmissão habitual da doença (Figura 5), o parasito é transmitido ao hospedeiro vertebrado pela picada de fêmeas do inseto vetor infectadas que injetam um pequeno número de promastigotas metacíclicos (formas infecciosas) na pele. No interior dos fagolisossomos, os promastigotas se diferenciam em amastigotas que proliferam, eventualmente rompendo o macrófago infectado, e são liberados para infectar macrófagos vizinhos. Macrófagos infectados podem ser ingeridos pelo inseto vetor durante o repasto sanguíneo e são lisados no intestino médio deste, liberando parasitas que se diferenciam em promastigotas procíclicos (formas não-infecciosas que se replicam rapidamente). Essas formas passam por um processo de adesão à parede do intestino, liberação e migração

anterior que é acompanhado por sua diferenciação em promastigotas metacíclicos não-replicativos que podem ser transmitidos quando o vetor fizer um novo repasto sanguíneo (CUNNINGHAM, 2002; SACKS e NOBEN-TRAUTH, 2002; DOMINGUEZ et al., 2003).

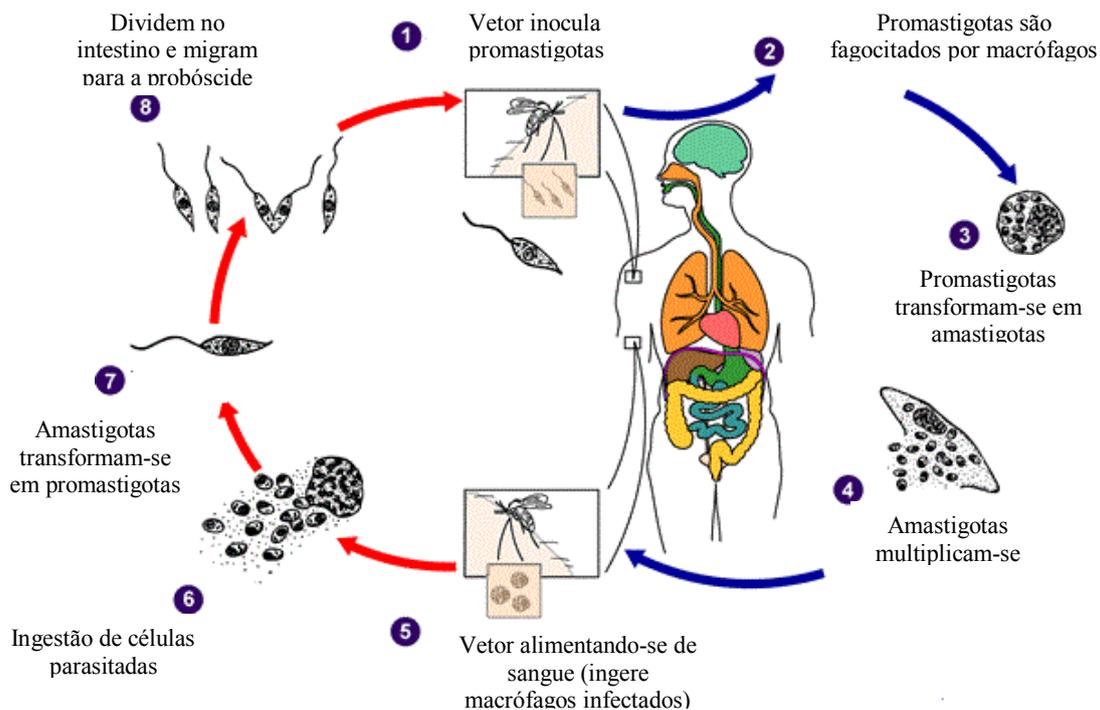


Figura 5 - Ciclo de vida da *Leishmania* sp (Adaptado de CDC, 2003).

O tratamento atual de escolha para todas as formas de manifestação clínica das leishmanioses é feito à base de antimoniais pentavalentes. Como medicamentos de segunda escolha, incluem a anfotericina B e pentamidinas. Entretanto, todos são tóxicos, de custo elevado, difícil administração e já existe comprovada resistência do parasito (RATH et al., 2003; CROFT e COOMBS 2003). Novas drogas como miltefosine, um hexadecil-fosfolina, têm demonstrado efetividade para o tratamento de leishmaniose visceral, muito embora apresentem também alta toxicidade (SINDERMANN et al., 2004). A internação prolongada e os efeitos adversos como alterações cardíacas, renais, pancreáticas e hepáticas dificultam a adesão ao tratamento.

A demanda por novos fármacos leishmanicidas tem se intensificado com o aumento da resistência aos antimoniais pentavalentes, bem como a fármacos de segunda geração. Outrossim, o número de quimioterápicos disponíveis, principalmente para tratamento de doenças crônicas, está muito abaixo do satisfatório (VOULDOUKIS et al., 2006). Neste contexto, várias substâncias foram relatadas, porém nenhuma testada ou mesmo em uso apresentou eficácia e segurança adequadas (FRANCK et al., 2004; RAYCHAUDHURY et al., 2005). Desta forma, considerando as dificuldades de tratamento e a ausência de vacinas, há urgência na busca de novas drogas terapêuticas dentre as quais se incluem os fitoterápicos (NAKAMURA et al., 2006).

Uso de produtos naturais no combate às leishmanioses

A busca de novas drogas leishmanicidas tem levado a um grande interesse no estudo de protótipos para o desenvolvimento de novas substâncias quimioterápicas com melhor atividade e menos efeitos colaterais (ARAÚJO, ALEGRIO e LEON, 1998). De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), as espécies vegetais são a melhor e maior fonte de fármacos para humanidade. Estudos etnobotânicos têm demonstrado o uso popular de plantas no tratamento das leishmanioses tanto por via oral, como na aplicação tópica sobre as lesões cutâneas (SILVA et al., 1995; FRANÇA, LAGO e MARSDEN, 1996; MOREIRA et al., 2002).

Rocha e colaboradores (2005), em um trabalho de revisão, relacionaram 101 plantas, suas famílias, distribuição geográfica, parte utilizada, tipos de extratos e o organismo testado. Também relacionaram 288 substâncias isoladas de plantas superiores, classificados em grupos químicos apropriados e os microrganismos testados. Das substâncias isoladas foi observado um predomínio de alcaloides (68), triterpenos (29), sesquiterpenos (19), lactonas (18), quinoides (16), flavonoides (13), dentre outras classes de substâncias isoladas de plantas superiores.

Ferreira e colaboradores (2002), ao testarem a atividade leishmanicida de *Zanthoxylum chiloperone* var. *angustifolia* (Rutaceae) constataram que o extrato alcaloídico bruto das cascas do caule exibiu atividade *in vitro* contra várias cepas de

Leishmania ssp. a 100 µg/mL. Dois constituintes majoritários também foram isolados e identificados como cantin-6-ona e 5-metoxicantin-6-ona. Em outro ensaio, triterpenoides isolados do extrato metanólico das folhas de *Pourouma guianensis* (Moraceae) foram avaliados quanto à atividade inibitória contra as formas promastigota e amastigota intracelular de *L. amazonensis*. Das onze substâncias isoladas, apenas o ácido ursólico e ácido oleanólico mostraram alta atividade contra amastigota intracelular (CI₅₀ de 27 µg/mL e 11 µg/mL, respectivamente) superior ao da droga controle Glucantime (CI₅₀ de 83 µg/mL) (TORRES-SANTOS et al., 2004).

Mendonça-Filho e colaboradores (2004) analisaram o efeito leishmanicida *in vitro* sobre *L. amazonensis* do extrato rico em polifenóis do mesocarpo fibroso dos frutos de *Cocos nucifera* (Palmae). O referido extrato apresentou concentração inibitória mínima de 10 µg/mL. Igualmente, Paula-Junior e colaboradores (2006) demonstraram o efeito leishmanicida do extrato hidroetanólico das folhas de *Caryocar brasiliense* sobre formas promastigotas de *L. amazonensis*. Além disso, o extrato demonstrou relevante capacidade antioxidante, similar às atividades da vitamina C e da rutina.

Diante do exposto, observa-se que as plantas são uma importante fonte de produtos naturais biologicamente ativos, muitos dos quais podem constituir modelos para obtenção de novos fármacos com atividade frente a várias parasitoses negligenciadas (BEZERRA et al., 2006).

1.1.5 Câncer

O termo câncer ou neoplasia é utilizado genericamente para representar um conjunto de mais de 100 doenças de natureza crônica, caracterizadas pelo crescimento descontrolado de células em virtude do desvio dos mecanismos que controlam a proliferação e diferenciação celular (ALBERTS, 2004).

As causas do desenvolvimento de cânceres normalmente incluem agressão ao genoma celular, com alterações do DNA (mutações) ou expressão anômala de genes normais. Diversos fatores ambientais, como agentes físicos (raios ultravioleta, radiação ionizante), químicos (hidrocarbonetos aromáticos policíclicos,

principalmente os derivados do tabaco e da queima de combustíveis fósseis, nitrosaminas, aflatoxinas, dentre outras), biológicos (vírus), influências culturais (alimentação, estresse, tabagismos), raciais (possivelmente genéticos) e, principalmente, fatores como idade e hereditariedade podem culminar em sucessivas mutações, contribuindo para o aparecimento de diversas neoplasias (COTRAN et al., 2000).

Importante causa de doenças e mortes no Brasil, as neoplasias malignas constituem-se na segunda causa de morte na população, superada apenas pelas doenças cardiovasculares. Tais neoplasias representam quase 17% dos óbitos de causa conhecida, notificados em 2007 no Sistema de Informações sobre Mortalidade (BRASIL, 2009). Ainda, segundo a Agência Internacional para Pesquisa em Câncer (WHO, 2008), o impacto global do câncer mais que dobrou em 30 anos. Estimou-se que, para este mesmo ano, ocorreriam cerca de 12 milhões de novos casos de câncer e 7 milhões de óbitos. O contínuo crescimento populacional, bem como seu envelhecimento, afetará de forma significativa o impacto do câncer no mundo e este recairá principalmente sobre os países de médio e baixo desenvolvimento. No Brasil, estimativas para o ano de 2010, válidas também para o ano de 2011, apontam para a ocorrência de aproximadamente 500 mil casos novos de câncer. Os tipos mais incidentes, à exceção do câncer de pele do tipo não melanoma, serão os cânceres de próstata e de pulmão no sexo masculino e os cânceres de mama e do colo do útero no sexo feminino (BRASIL, 2009).

O principal objetivo do tratamento das neoplasias é obter a completa erradicação das células tumorais. Tal resultado pode ser obtido através de procedimentos como cirurgia, radioterapia e quimioterapia utilizados de forma isolada ou em associação (COTRAN et al., 2000; BRASILEIRO FILHO, 2004).

A cirurgia é o meio simples e seguro para remover tumores sólidos, mas não na maioria dos pacientes que apresentam a doença metastática. A radioterapia pode ser curativa para tumores localizados, preservando a estrutura e funcionamento do órgão ou tecido, mas tem suas limitações no tratamento de tumores volumosos. Já a quimioterapia, um tratamento que envolve o uso de fármacos citotóxicos, deveria erradicar o câncer sem prejudicar os tecidos normais, mas a maioria destas drogas causa significativos efeitos colaterais. Esses fármacos são mais efetivos contra tumores de proliferação rápida do que contra alguns dos tumores de crescimento lento e são mais tóxicos para células de crescimento rápido do que para os tecidos

normais do hospedeiro. Entretanto, tais agentes antiproliferativos podem ter importantes efeitos tóxicos colaterais em tecidos normais que se dividem rapidamente, com a medula óssea, mucosa gastrintestinal e pele (KO, WANG e FERRONE, 2003; BUBENÍK e VONKA, 2003).

O emprego das terapêuticas convencionais, além dos efeitos colaterais e do custo elevado, muita das vezes não permite a total erradicação das neoplasias. A necessidade de agentes antiinvasivos e/ou tumorídeos mais eficientes e menos onerosos tem levado à busca de novas substâncias com ação farmacológica tanto no controle do crescimento das células tumorais como na modulação das moléculas de adesão que permitem as metástases. Neste sentido, o interesse por substâncias ou produtos de origem vegetal na busca de terapias mais eficazes pode ser uma promissora alternativa ou a chave para a cura desta moléstia (JANEWEY, WALPORT e SHLOMCHIK, 2002; NEWMAN, CRAGG e SNADE, 2003).

Plantas com potencial antitumoral

Vários estudos têm corroborado que substâncias bioativas extraídas de plantas contribuem significativamente para o tratamento do câncer. 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 alcaloides vimblastina e vincristina que, atualmente, são de grande utilidade no tratamento de leucemias, linfomas e câncer testicular (FELLOWS, 1991; 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). Estudos clínicos revelaram que essa substância era capaz de regredir o câncer de mama e de ovário, resistentes à terapia tradicional (ROWINSKY, 1995).

Como essa substância teria que ser extraída de espécies que levam décadas para o seu crescimento, a introdução dessa droga na terapêutica teve que esperar pelo desenvolvimento da síntese química, de extrema complexidade, e pela descoberta de precursores obtidos de fontes renováveis. Essas dificuldades adiaram a introdução do paclitaxel e do docetaxel na terapêutica para a década de 90 (MANN, 2002). Atualmente, a droga pode ser usada também para o câncer de pulmão (MARINHO, SEIDL e LONGO, 2008).

Segundo Gottlieb e colaboradores (1987), plantas do gênero *Physalis* são especiais por elaborarem estruturas complexas, variantes de vitanolídeos simples, designadas como fisalinas. Cerca de doze fisalinas já foram isoladas de espécies japonesas e italianas, sendo que algumas delas demonstraram atividade citotóxica *in vitro* contra células tumorais bem como atividade antineoplásica *in vivo* (KAWAI et al., 1992; MAKINO et al., 1995), contra vários tipos de células tumorais incluindo leucemias, melanomas, entre outras (LIN et al., 1992; CHIANG et al., 1992).

1.1.6 Inflamação e Dor

1.1.6.1 Resposta inflamatória

Inflamação é um conjunto de alterações (nos vasos sanguíneos, nos tecidos e nos fluidos internos) provocadas por lesões, infecções, substâncias nocivas ou distúrbios orgânicos e está estreitamente interligada ao processo de reparação (VILCEK e FELDMAN, 2004). Tais alterações podem se manifestar pela presença de rubor (eritema), calor (aumento da temperatura na região inflamada), tumor (edema), dor e perda de função do tecido ou órgão afetado (GUALILLO et al., 2000). Diversos tecidos e células participam deste processo, desde as proteínas plasmáticas, células circundantes (neutrófilos, monócitos, eosinófilos, linfócitos e plaquetas), vasos sanguíneos, como também os componentes celulares (mastócitos, fibroblastos, macrófagos e linfócitos) e extracelulares (colágeno e elastina – proteínas estruturais;

fibronectina, laminina e outras glicoproteínas de adesão; proteoglicanos etc.) (KUMAR et al., 2005).

Desta forma, a reação inflamatória consiste num evento complexo que envolve o reconhecimento do agente/estímulo lesivo, para sua posterior destruição e tentativa de reconstruir o tecido danificado. O reconhecimento desencadeia a ativação e a amplificação do sistema imune, resultando na ativação de células e na liberação dos diversos mediadores responsáveis pela resposta inflamatória. No entanto, se a destruição do agente agressor e o processo de reparo não ocorrerem de maneira eficiente e sincronizada, a resposta inflamatória pode levar a uma lesão tecidual persistente, induzida pelo acúmulo de leucócitos, colágeno entre outras substâncias que podem prejudicar o organismo (NATHAN, 2002).

O processo inflamatório é didaticamente dividido em dois momentos: O primeiro, que é desencadeado logo após a instalação do agente agressor (inflamação aguda), é caracterizado por infiltrado predominantemente neutrofílico, associado ao aumento da permeabilidade vascular com exsudação de plasma e proteínas plasmáticas, edema, dor e necrose. O outro momento, que depende ou não da resolução do processo na fase aguda (inflamação crônica), é caracterizada pela presença de macrófagos e linfócitos, além de angiogênese e proliferação de tecido conjuntivo (BAUHMANN e GAUDIE, 1994).

Alguns eventos principais podem ser identificados durante a instalação de um processo inflamatório, segundo Lapa e colaboradores (2008). Primeiramente, o fluxo sanguíneo para o local aumenta. Microscopicamente, um tecido inflamado aparentará conter um maior número de vasos sanguíneos, devido ao recrutamento de novos leitos capilares. Estes vasos apresentar-se-ão engurgitados, em decorrência da vasodilatação arteriolar. Ocorre também a retração de células endoteliais, causando uma permeabilidade vascular. Este processo faz com que moléculas grandes, normalmente restritas ao interior dos vasos, atinjam o espaço intersticial. Este é um dos mecanismos que permite o acesso ao local dos mediadores solúveis do processo inflamatório. Outro evento que acontece é o extravasamento de macromoléculas plasmáticas, que ao aumentar a pressão oncótica local, se faz acompanhar pela saída de água levando à formação do edema inflamatório. Ao final, leucócitos migram quimiotaxicamente, desde os capilares até a sede do processo inflamatório. Os polimorfonucleares neutrófilos são o tipo celular predominante nos estágios iniciais da resposta. Caso o processo persista, aumenta

a migração de células mononucleares (monócitos e linfócitos) para o local, modificando o padrão do tipo celular prevalente.

Entre as substâncias que podem manter e amplificar os diversos processos inflamatórios pode-se mencionar as seguintes: histamina, serotonina, cininas, prostaglandinas, sistema complemento, citocinas, óxido nítrico e neuropeptídeos.

1.1.6.2 Dor e Nocicepção

A palavra dor representa uma categoria de fenômenos que compreende uma diversidade de experiências diferentes e únicas. Tendo causas diversas, é caracterizada por qualidades distintas, variando de acordo com alguns critérios, a saber: somatosensoriais, viscerais, afetivos, culturais e cognitivos. Pelo fato de ser a dor uma sensação íntima e pessoal, é impossível conhecer com exatidão a dor do outro. Assim, pela diversidade das experiências dolorosas, explica-se porque tem sido muito difícil, até hoje, encontrar uma definição definitiva e satisfatória da dor (LOESER e MELZAC, 1999; RAINVILLE, 2002, ALMEIDA et al., 2004).

Apesar das grandes entidades de estudos tentarem criar conceitos cada vez mais completos, atualmente, o conceito mais aceito segundo a Associação Internacional para Estudos da Dor (IASP) postula que dor pode ser definida como uma experiência sensorial e emocional desagradável, associada a dano tecidual real ou potencial, ou descrita em termo de tal lesão (MELZAC e LOESER, 1999; RAINVILLE, 2002, ALMEIDA et al., 2004). 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, 1999, 2002).

Segundo a Sociedade Brasileira para Estudo da Dor – SBED, esta constitui a principal causa de incapacitação para o trabalho, como também gera nocivas consequências psicossociais e econômicas. A incidência da dor crônica na população mundial está oscilando entre 7 e 40%. Como consequência de tal processo, 50 a 60% dos que sofrem qualquer tipo de dor, ficam parcial ou totalmente incapacitados para exercer suas atividades, de maneira transitória ou permanente,

contribuindo negativamente para sua qualidade de vida. Não existem dados estatísticos oficiais sobre a dor no Brasil, mas a sua ocorrência tem aumentado substancialmente nos últimos anos.

Existe uma diferença entre os termos dor e nocicepção. A dor envolve a percepção de um estímulo aversivo e requer a capacidade de abstração e elaboração do impulso sensorial. O termo nocicepção refere-se a manifestações neurofisiológicas, geradas por estímulos nocivos. (LOESER e MELZACK, 1999; ALMEIDA et al., 2004).

A nocicepção compreende a atividade no nociceptor como também suas vias e processos facilitados pelo estímulo doloroso. Sendo assim, a nocicepção também pode ser definida como o processo que se refere à recepção de sinais no SNC evocados pela ativação de nociceptores, ativação esta proveniente de dano tissular, sendo que nem todos os estímulos nociceptivos podem ser qualificados como dor (JESSEL e KELLY, 1991). Os nociceptores podem responder a estímulos térmicos, mecânicos e químicos. O impulso nervoso gerado por tal (is) estímulo(s) se propaga pela fibra nervosa ascendente até a medula espinhal, desta para o córtex cerebral, onde serão comandadas e geradas as respostas fisiológicas, emocionais e comportamentais (MUIR III, 1998).

O aumento da resposta a um estímulo doloroso é chamado de hiperalgesia. Uma sensibilização local e fisiológica, principalmente relacionada com a presença de mediadores é qualificada como hiperalgesia primária. Outras regiões não envolvidas pelo estímulo nociceptivo inicial podem sofrer pela expansão desta hiperalgesia de modo que o limiar para desencadear a dor nestes novos locais se torna mais baixo, estabelecendo-se uma dor generalizada, caracterizando a hiperalgesia secundária (MARQUES, 2004).

Cabe-se ressaltar que tanto na dor clínica quanto na dor induzida em modelos experimentais não há, a princípio, um mediador ou uma via (ascendente ou descendente) dominante que contribua para a condução e perpetuação do estímulo nociceptivo. Dependendo do local, tipo e duração do estímulo, levando-se em conta componentes afetivos e emocionais, ocorre a ativação de múltiplos canais sensoriais que irão convergir e interagir com estruturas supraespinhais, promovendo a sensação global de dor (MILLAN, 1999).

Os receptores opioides e a analgesia

O termo *opioide* se aplica a qualquer substância endógena ou sintética, a qual produz efeitos semelhantes ao da morfina, que são bloqueados por antagonistas como a naloxona. O termo mais antigo, *opiáceo*, é restrito aos fármacos sintéticos semelhantes à morfina, com estruturas não-peptídicas (HERZ et al., 1993). O ópio é um extrato da seiva da papoula *Papaver somniferum*, que foi usado para fins sociais e médicos, já que é indutor de euforia, analgesia e sono, além de impedir a diarreia.

Três tipos de receptores opioides, chamados de μ , δ e κ , todos acoplados com a proteína G, medeiam os principais efeitos farmacológicos dos opiáceos. Em relação à atuação nos receptores opioides, podemos classificar os fármacos como sendo (RANG et al., 2003), Agonistas puros (representam a maioria dos fármacos tipicamente semelhantes à morfina. Possuem alta afinidade para os receptores μ , e afinidade mais baixa para os receptores δ e κ); Agonistas mistos (podem produzir diferentes respostas em diferentes receptores opioides, como por exemplo, a pentazocina, que é agonista nos receptores μ , mas apenas agonistas parciais nos receptores δ e κ) e Antagonistas (não produzem efeito quando administrados sozinhos, mas bloqueiam os efeitos do opiáceos. O principal antagonista é a naloxona).

Os receptores opioides são amplamente distribuídos no cérebro. Os fármacos que atuam nestes receptores, quando administrados por via intratecal em doses pequenas, apresentam uma eficácia considerável. Esta evidência sugere que uma ação central possa ser responsável por seu efeito analgésico. Em nível espinhal, a morfina inibe a transmissão dos impulsos nociceptivos através do corno dorsal, suprime os reflexos nociceptivos espinhais, como também inibe a liberação de substância P dos neurônios do corno dorsal *in vitro* e *in vivo* (RANG et al., 2003).

A morfina é eficaz em muitos tipos de dor aguda e crônica. Os opiáceos são mais úteis para combater processos dolorosos originados por lesão tecidual, inflamação ou crescimento tumoral do que em processos de dor neuropática. A morfina também é capaz de reduzir o componente afetivo da dor, refletindo uma

atividade supra-espinhal, possivelmente ao nível de sistema límbico, que está provavelmente envolvido no efeito produtor de euforia (RANG et al., 2003).

Atividade anti-inflamatória e antinociceptiva de plantas

Inúmeros trabalhos têm demonstrado o potencial dos metabólitos secundários de plantas em suprimir inflamações e/ou dor. Um estudo realizado por Souza e colaboradores (2004), envolvendo o óleo essencial de *Duguetia lanceolata*, demonstrou que o mesmo possui atividade anti-inflamatória e antinociceptiva. Boller (2007) também constatou a atividade anti-inflamatória tópica do extrato e substâncias isolados da *Baccharis illinita* em camundongos. Naike e Judge (2009), ao comprovarem a atividade anti-inflamatória do extrato etanólico e aquoso de *Caralluma adscendens*, atribuíram tal resposta aos flavonoides presentes na planta. De acordo com os autores, os flavonoides são conhecidos por possuir atividade anti-inflamatória por inibir as cicloxigenases responsáveis pela síntese de prostaglandinas inflamatórias.

Vários modelos “*in vivo*” e “*in vitro*” são utilizados na pesquisa de extratos e substâncias de plantas com atividade analgésica e/ou anti-inflamatória. Em geral, a estereotipia da gênese dos sinais e sintomas da inflamação serve de base para o ensaio dessas drogas. Dentre os parâmetros avaliados normalmente estão o edema, alterações de permeabilidade vascular, migração leucocitária e nocicepção. Apesar de, na maioria das vezes, não se chegar ao mecanismo de ação definitivo da substância ou extrato da planta em estudo, esses modelos experimentais são de grande importância e representam o ponto de partida para a caracterização farmacológica de novas substâncias capazes de interferir com o curso da inflamação (LAPA et al., 2008).

1.1.7 O gênero *Lacistema*

As plantas pertencentes à ordem Malpighiales Mart., de distribuição principalmente tropical, estão agrupadas em cerca de 28 a 37 famílias, com 725 gêneros e 16.000 a 17.000 espécies. As famílias desta ordem incluem inúmeras plantas ornamentais, bem como espécies com um importante valor econômico e medicinal. As “flores da paixão” ou o maracujá (Passifloraceae), a erva-de-São-João (Hypericaceae ou Clusiaceae), poinsétia (Euphorbiaceae) e pansies e violetas (Violaceae) são exemplos de plantas ornamentais. Já os “Chorões” (Salicaceae) são utilizados como matéria-prima para os fabricantes de cestas, na silvicultura, e estão sendo exploradas como uma fonte de energia alternativa. A ordem Malpighiales também é notável pelo considerável número de plantas medicinais, as quais possuem importantes substâncias bioativas. Nesta, destaca-se a coca (*Erythroxylum coca* - Erythroxylaceae), anestésico local e estimulante do sistema nervoso central, plantas do gênero *Hydnocarpus* (Achariaceae *sensu*, tradicionalmente usada no tratamento da lepra), e o anti-inflamatório salicilina, extraída do salgueiro-branco (*Salix Alba* - Salicaceae) e atualmente sintetizada como aspirina (ácido acetilsalicílico) (HOFFMANN, 2005).

A família Lacistemataceae, de distribuição neotropical (Figura 6), é representada pelos gêneros *Lacistema* e *Lozania* (Figura 7) com cerca de 11 e 4 espécies, respectivamente (YOUNG, 2008). No Brasil podemos encontrar 10 espécies, a maioria ocorrendo na região Sudeste ou na Amazônia. O nome do gênero *Lacistema* deriva do grego *lakis* = “trapo, pedaço, farrapo”, e *stemon* = “estame”, referindo-se ao estame bifurcado. Como resultado de uma extensa pesquisa realizada por Di Stasi e Hiruma-Lima (2002), os quais descreveram 135 espécies medicinais utilizadas por moradores da Amazônia e habitantes rurais e urbanos da Mata Atlântica, *Lacistema sp* foi citada por grande parte dos entrevistados (principalmente índios tenharins) na Amazônia, os quais utilizam as folhas sobre a cabeça como febrífugo. Barbosa e Pinto (2003), em um trabalho sobre a documentação e valorização da fitoterapia tradicional Kayapó nas aldeias A'Ukre e Pykanu no sudeste do Pará, constataram que este gênero é indicado pelos pajés para combater reumatismo, vômito (emese), dores no corpo e disenteria. Trabalho semelhante (ROUMY et al., 2007), listando plantas amazônicas do Peru

utilizadas com fins medicinais pela população indígena local, menciona *Lacistema sp* como antipirética e também contra reumatismo, corroborando o seu uso pela população indígena brasileira. Há registros também do uso do caule como combustível (SOBRINHO, 2007). Trabalhos experimentais têm demonstrado potenciais propriedades farmacológicas de algumas espécies pertencentes a este gênero. Roumy e colaboradores (2007) constataram uma significativa atividade antiplasmódica e baixa citotoxicidade do extrato diclorometânico preparado a partir das cascas de *Lacistema agregatum* e Wall e colaboradores (1988) detectaram que a mesma também apresenta propriedades antimutagênicas. Em adição, ensaios de bioautografia demonstram que o extrato bruto das folhas de *Lacistema lucidum* apresenta atividade antifúngica frente a *Cladosporium cladosporioides* (AGRIPINO et al., 2004) e *Lacistema hasslerianum*, exibe uma potente atividade antiviral (SIMONI et al., 2007). Da mesma forma, *Lozania pittieri* demonstra possuir substâncias bioativas, uma vez que foi capaz de inibir seletivamente a atividade da cicloxigenase bem como a transcriptase reversa do HIV-1 (CALDERON, 2000). Quimicamente, as espécies citadas não foram investigadas.

A espécie Lacistema pubescens Mart.

Originária do Brasil, a espécie arbórea *Lacistema pubescens* Mart., apresenta-se distribuída nos estados do Mato Grosso do Sul, Mato Grosso, Bahia, Maranhão, Minas Gerais, Rio de Janeiro, São Paulo, Amazonas, Amapá, Pará, Rondônia, Paraná e Distrito Federal, além dos países como a Bolívia, Guiana Francesa e Venezuela (HOFFMANN, 2005). No Brasil, assume diferentes denominações populares conforme a região em que se encontra: espeto-vermelho e canela – vermelha - MG (SILVA, 2002; SILVA et al., 2004), sabonete - RJ (SOBRINHO, 2007) e cafezinho - PA (TRINDADE, 2007). Após extensa pesquisa bibliográfica em diversos bancos de dados, não foram encontrados estudos sobre as propriedades químicas e/ou farmacológicas referentes a esta espécie.



Figura 6 - Distribuição da família Lacistemataceae (FONTE:www.mobot.org/MOBOT)

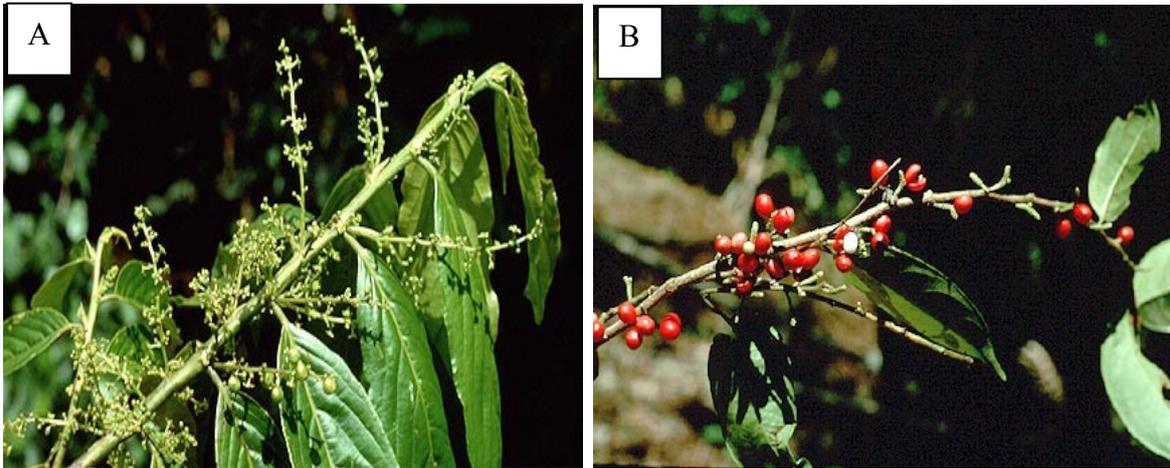


Figura 7 - Família Lacistemataceae representada pelos gêneros (A) *Lozania* e (B) *Lacistema* (FONTE: www.mobot.org/MOBOT)

2 OBJETIVOS

Considerando a possibilidade de contribuir para ampliar o conhecimento da química e das propriedades farmacológicas desta espécie, bem como ratificar o uso popular do gênero, os objetivos deste trabalho foram:

2.1 Geral

Caracterizar os constituintes químicos e investigar o potencial farmacológico de *Lacistema pubescens* Mart.

2.2 Específicos

- ❖ Caracterizar as principais classes de metabólitos secundários presentes em diferentes extratos das folhas de *L. pubescens*;
- ❖ Determinar o teor de fenóis totais e flavonoides nos extratos;

Determinar as atividades *in vitro*:

- ❖ Antioxidante pelo método do DPPH, Poder de Redução, Sistema β -caroteno / ácido linoleico e método TBARS;
- ❖ Antimicrobiana pela Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) sobre as cepas *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Shigella dysenteriae*, *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli*, *Enterobacter cloacae* e *Enterococcus faecalis*;
- ❖ Citotóxica frente a *Artemia salina*;

- ❖ Leishmanicida pelo método do MTT diante de *Leishmania amazonensis*, *L. braziliensis*; *L. chagasi* e *L. major*;
- ❖ Antitumoral pelo método do MTT diante das linhagens HL60, Jurkat e MCF-7;

Avaliar o potencial *in vivo*:

- ❖ Antinociceptivo pelos métodos das Contorções Abdominais, Formalina e Retirada da Cauda;
- ❖ Anti-inflamatório pelo método do Edema de Orelha;

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Material Vegetal

As folhas de *L. pubescens* foram coletadas em Matias Barbosa, Minas Gerais, Brasil, uma única vez em época de frutificação (dezembro de 2008) no período da manhã. Uma exsicata de *L. pubescens* foi depositada no herbário Leopoldo Krieger CESJ da UFJF sob o número 49751 e identificada pela Dr^a Fátima Regina Gonçalves Salimena, do Departamento de Botânica do Instituto de Ciências Biológicas da UFJF.

3.2 Preparo do extrato bruto metanólico (EBM) e partições

As folhas coletadas foram secas à sombra, em local ventilado e em temperatura ambiente (25°C), durante quinze dias. Depois de seco, o material (375 g) foi moído e submetido à extração por maceração com metanol (MeOH), à temperatura ambiente, até a exaustão. Em seguida, o extrato foi concentrado à pressão reduzida utilizando-se evaporador rotatório para obtenção do extrato bruto metanólico (EBM) (74 g), um resíduo de coloração verde escura. Desta forma, o rendimento do extrato foi de 20%.

Sessenta e cinco gramas do EBM, após completa remoção do solvente, foram ressuspensos em MeOH:H₂O (8:2) e, em seguida, particionados com solventes em ordem crescente de polaridade: hexano, diclorometano (CH₂Cl₂) e acetato de etila (AcOEt). Os solventes foram evaporados utilizando-se evaporador rotatório e as partições hexânica (PHEX – 16 g), diclorometânica (PDCM – 8 g) e em acetato de etila (PAcOEt - 7 g) pesadas e mantidas sob refrigeração. A partição hidrometanólica remanescente, após retirada do metanol por destilação fracionada foi liofilizada e forneceu 5 g. Os rendimentos para as PHEX, PDCM, PAcOEt e PHM

foram 25; 12; 11 e 8% respectivamente. O fluxograma da extração está apresentado na Figura 8.

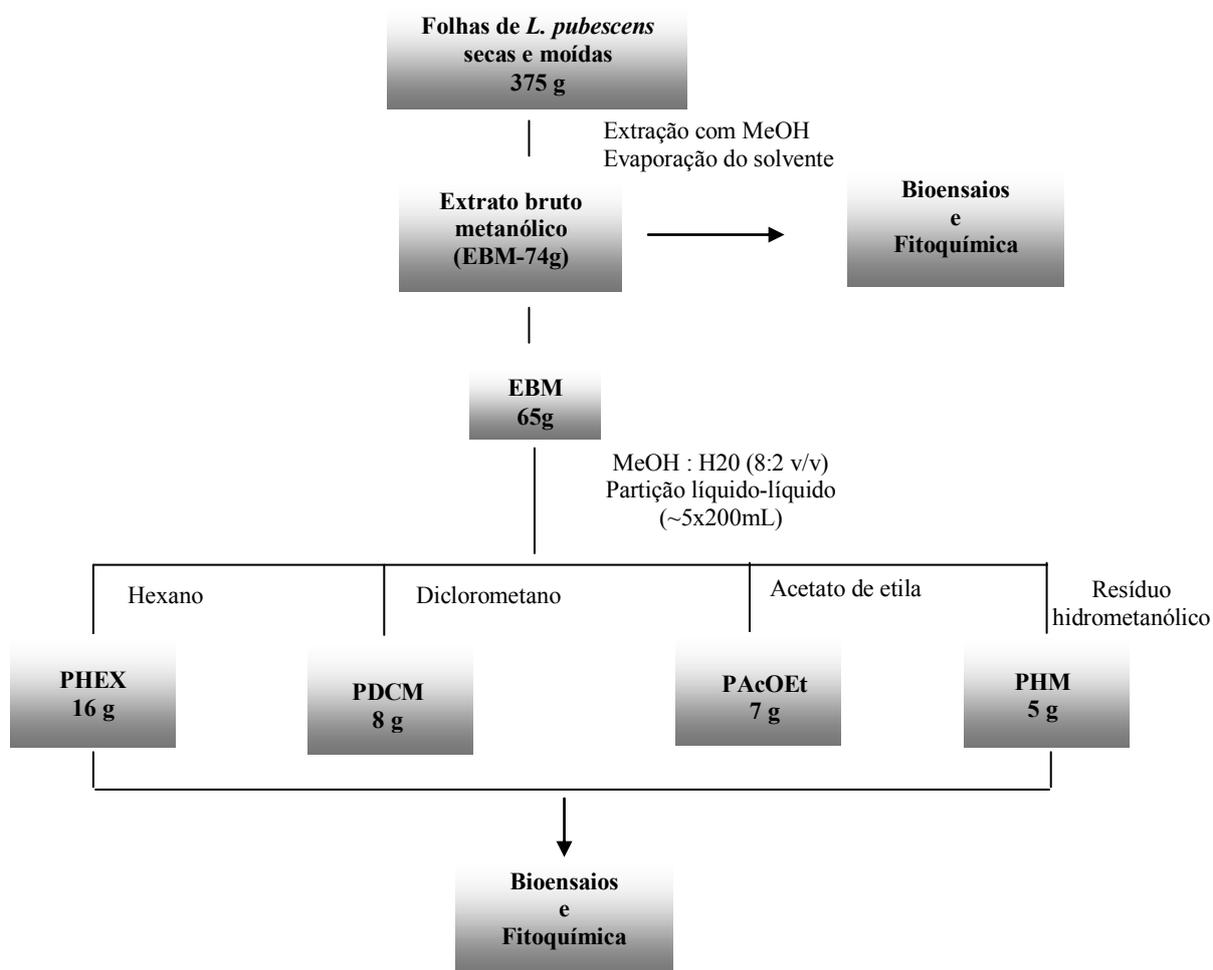


Figura 8 - Fluxograma da extração e partição das folhas de *L. pubescens*

3.3 Caracterização fitoquímica do EBM e partições de *L. pubescens*

O EBM e partições foram submetidos às análises fitoquímicas preliminares, para determinação das principais classes químicas de metabólitos secundários, de acordo protocolo descrito por Matos (1997), com algumas modificações.

3.3.1 Preparo das amostras para as análises fitoquímicas

Aproximadamente 100 mg de cada amostra foram solubilizadas em MeOH e utilizados para a identificação dos metabólitos especiais, como se segue:

3.3.1.1 Alcaloides

Em uma placa de ELISA, 150 μ l da amostra foram colocados em três poços diferentes e 50 μ l de diferentes reagentes utilizados para identificação de alcaloides (reativos de Hager, Mayer e Dragendorff) foram adicionados em cada poço. O aparecimento de precipitação ou turvação branca com os reativos de Hager e Mayer e de cor alaranjada com o reativo de Dragendorff indica a presença de alcaloides.

3.3.1.2 Triterpenoides e Esteroides

Em uma placa de ELISA, 150 μ l da amostra foram colocados em um poço. Em seguida foram acrescentados 1 gota de anidrido acético e 1 a 2 gotas de ácido sulfúrico concentrado. O aparecimento de cor azul-esverdeada indica a presença de esteroides e de cor vermelha, a presença de triterpenoides. Para confirmação foi realizada Cromatografia em camada delgada (CCD) utilizando como revelador o reativo de Liebermann Bourchar.

3.3.1.3 Saponinas

Em um tubo de ensaio foi colocado 1 mL da amostra e aproximadamente 2 mL de água destilada. O tubo foi agitado vigorosamente e colocado em repouso por

20 min. A presença de espuma persistente com aproximadamente 1 cm de altura indica a presença de saponinas.

3.3.1.4 Cumarinas

A amostra foi gotejada em um pedaço de papel de filtro. Em seguida, 1 gota da solução de KOH 10% foi adicionada à amostra. O aparecimento de fluorescência de cor azulada sob luz UV 365 nm indica a presença de cumarinas.

3.3.1.5 Substâncias fenólicas

Em uma tira de papel de filtro a amostra foi gotejada seguida de uma solução de FeCl_3 2%. O aparecimento de uma mancha azul escura indica a presença de substâncias fenólicas.

3.3.1.6 Taninos

Em um tubo de ensaio foi colocado 1 mL da amostra e gota a gota, foi acrescentada uma solução de gelatina 2,5%. O aparecimento de precipitado branco indica a presença de taninos.

3.3.1.7 Flavonoides

Em uma tira de papel de filtro a amostra foi gotejada seguida da adição de uma solução de AlCl_3 5%. O aparecimento de fluorescência de cor amarela sob luz UV 365 nm indica a presença de flavonoides.

3.3.1.8 Antraquinonas

Em uma placa de ELISA, 150 μl da amostra foi colocada em um poço. Em seguida foram adicionados 50 μl de NaOH 0,5 M. O aparecimento de coloração vermelha indica a presença de antraquinonas.

3.4 Determinação do conteúdo de fenólicos totais

O conteúdo de compostos fenólicos totais nas amostras foi determinado pelo método de Folin-Denis (DUH e YEN, 1997). Uma solução estoque em MeOH de cada amostra (0,25 ou 0,5 mg/mL) foi preparada e 1,0 mL da mesma foi misturado com 1,0 mL do reagente de Folin-Denis e 8,0 mL de Na_2CO_3 2% em tampão NaOH 0,1 N. A mistura foi agitada e após 60 minutos de incubação em banho-maria a 30°C, foi centrifugada a 3000 rpm por 5 minutos. A absorbância do sobrenadante foi mensurada a 730 nm em espectrofotômetro. O branco foi preparado com 1,0 mL de metanol, 1,0 mL do reagente de Folin-Denis e 8,0 mL de Na_2CO_3 2% em tampão NaOH 0,1 N. Para a preparação da curva de calibração foram misturados 0,07; 0,10; 0,20; 0,30; 0,40 e 0,50 mL de solução de ácido tânico (1,0 g/L), substância de referência, com qsp 1,0 mL de etanol P.A. Em seguida, foi realizado o mesmo procedimento descrito para as amostras e a curva de calibração foi construída. O

conteúdo de compostos fenólicos foi expresso em mg/g de amostra vegetal, em equivalentes de ácido tânico (EAT).

3.5 Determinação do conteúdo de flavonoides

O conteúdo de flavonoides foi determinado pelo método descrito por Miliauskas, Venskutonis e Van-Beeck (2004), com modificações. Uma solução estoque em MeOH de cada amostra (0,5 mg/mL) foi preparada e 1,0 mL da mesma foi misturado com 1,0 mL de $AlCl_3$ 2% em etanol e 1 gota de ácido acético P.A. O volume foi completado com etanol para 25 mL. Após incubação por 40 min a 20°C e ao abrigo da luz, a absorbância foi mensurada a 415 nm. A curva de calibração foi preparada misturando-se 0,1; 0,25; 0,5; 1,0 e 2,0 mL de uma solução etanólica de rutina (0,5 mg/mL), substância de referência, com 1,0 mL de $AlCl_3$ 2% em etanol mais qsp 25 mL de etanol P.A. Em seguida, foi realizado o mesmo procedimento descrito para as amostras e a curva de calibração foi construída. O branco foi preparado com 1,0 mL da amostra e 1,0 mL de $AlCl_3$ 2% em etanol mais qsp 25 mL de etanol P.A. Todas as determinações foram realizadas em triplicata. O conteúdo total de flavonoides foi expresso em mg/g de amostra vegetal, em equivalentes de rutina (ER).

3.6 Análise da PHEX por Cromatografia Gasosa (CG) e espectrometria de massas - CG-EM

Visando identificar as substâncias da PHEX, a mesma foi analisada por Cromatografia Gasosa (CG) realizada num cromatógrafo Hewlett Packard 6890 Series acoplado a um detector seletivo de massas Hewlett-Packard 5972 e equipado com uma coluna capilar DB-5MS (30 m x 0,25 mm, 0,25 μ m); hélio como gás de arraste com razão de fluxo de 2.0 ml/min; temperatura programada de 70°C a 290°C (2°C/min); injetor com temperatura de 270°C e detector com temperatura de 300°C e

energia de ionização de 70eV. Os constituintes da amostra foram identificados por comparação de seus espectros de massas com aqueles da biblioteca Wiley 275.1 e NIST e por fragmentação de massas (Adams, 1995).

3.7 Atividades biológicas *in vitro*

3.7.1 Atividade antioxidante

A atividade antioxidante do EBM e partições de *L. pubescens* foi verificada pelos seguintes métodos:

3.7.1.1 Método DPPH

A atividade antioxidante de radicais DPPH foi determinada pela sua capacidade sequestrante de acordo com o método de Brand-Williams (GOVINDARAJAN et al., 2003). As amostras foram solubilizados em MeOH (1 mg/mL) e as soluções diluídas em soluções metanólicas do radical DPPH (50 µmol/mL) nas concentrações de 250; 125; 62,5; 31,25; 15,63; 7,81; 3,91 e 1,95 µg/mL. Esta reação transcorreu à temperatura ambiente e após 30 min, foi feita a leitura da absorbância das amostras e do branco em espectrofotômetro utilizando comprimento de onda (λ) de 515 nm. O branco foi utilizado em cada concentração, a fim de retirar a interferência da cor do extrato, o qual continha apenas MeOH e o DPPH. Os testes foram realizados em triplicata. A partir dos valores foram calculadas as % de inibição de oxidação das amostras. Ácido ascórbico foi utilizado como controle positivo, nas mesmas concentrações da amostra.

$$\% \text{ inibição} = \frac{\text{Abs}_{\text{branco}} - \text{Abs}_{\text{amostra}}}{\text{Abs}_{\text{branco}}} \times 100$$

A CI_{50} , que é a concentração da amostra necessária para reduzir em 50% a concentração inicial do DPPH, foi calculada no programa estatístico Grafit5 (Erithacus Software)

3.7.1.2 Poder de redução

O poder de redução das amostras foi determinado pelo método descrito por Oyaizu (1986). Um mg de cada amostra em 1 mL de água destilada foram misturados com 2,5 mL de tampão fosfato de potássio 200 μ M, pH 6,6 e 2,5 mL de ferrocianeto de potássio a 1% [$K_3Fe(CN)_6$]. A mistura foi incubada a 50°C por 20 min. Uma alíquota de 2,5 mL de ácido tricloroacético 10% foi adicionada à mistura, que foi então centrifugada a 3000 g por min. A camada superior foi retirada e misturada com 2,5 mL de água destilada e 0,5 mL de $FeCl_3$ 0,1% e a absorbância foi medida a 700 nm em espectrofotômetro. A CI_{50} foi calculada a partir de cinco concentrações, a saber: 53,64; 26,82; 13,41; 6,7 e 3,35 μ g/mL e este valor determina a concentração efetiva na qual a absorbância foi de 0,5 para o poder de redução. Os testes foram realizados em triplicata e o ácido ascórbico foi usado como referência. A CI_{50} foi determinada a partir de regressão linear do MS Excel Software.

3.7.1.3 Sistema β -caroteno / ácido linoleico

A determinação da atividade antioxidante pelo sistema β -caroteno/ácido linoleico foi realizada de acordo com a metodologia proposta por Marco (1968) e modificado por Miller (1971) (RUFINO et al., 2006; BORGUINI, 2006). Para o preparo da emulsão, foram adicionados em um balão volumétrico protegido da luz os seguintes reagentes: 20 μ L de ácido linoleico, 265 μ L de tween 40, 50 μ L da solução β -caroteno (10 mg/mL) e 1 mL de clorofórmio. Posteriormente, a mistura foi submetida à evaporação a 50°C em rotavapor até evaporar totalmente o clorofórmio. A esta mistura isenta de clorofórmio, adicionou-se aproximadamente 50 mL de água

previamente saturada com oxigênio. A mistura reativa, assim preparada, apresentou-se límpida com absorvância entre 0,6 e 0,7 em 470 nm. Para determinar as absorvâncias, utilizou-se microplacas com 96 cavidades, com leitura a 45°C, no comprimento de onda de 470 nm. Esta leitura foi realizada durante 120 min e com intervalo de 15 minutos entre as leituras no aparelho de ELISA. Em cada cavidade da microplaca foram adicionados 250 µL da emulsão e 10 µL das amostras nas devidas concentrações (38,46; 19,23; 9,61; 4,80; 2,40; 1,20 µg/mL). Como controle, foi adicionado o mesmo volume da emulsão e do metanol para determinar 100% de oxidação. Todas as análises foram realizadas em triplicata e como substância de referência foi utilizada quercetina. A porcentagem de inibição da oxidação (% I) foi calculada de acordo com a fórmula descrita abaixo, uma vez que a queda da absorvância das amostras (Am) está correlacionada com a queda do controle (emulsão + metanol). A partir das porcentagens de inibição, a CI₅₀ pôde ser calculada no programa estatístico Probit Software.

$$Ac = \text{Abs inicial} - \text{Abs final}$$

$$Aam = \text{Abs inicial} - \text{Abs final}$$

$$\% I = \frac{Ac - Aam}{Ac} \times 100$$

3.7.1.4 Peroxidação lipídica utilizando o ácido tiobarbitúrico (TBA)

Este ensaio foi realizado pelo método proposto por Wong e colaboradores (1995) com algumas modificações. Para a preparação das amostras utilizou-se carne moída. Três amostras foram preparadas com 25 g de carne moída, 17 mL de água e 7,5; 15 e 30 mg de extrato, respectivamente. Como controle positivo foi utilizado BHT nas mesmas concentrações e como controle negativo, 25 g de carne moída e 17 mL de água destilada. Todos estes preparados foram misturados com auxílio de liquidificador e levados ao aquecimento até aparecimento da coloração marrom da carne. Após o cozimento da carne, adicionou-se água destilada aos

preparados até completar o volume de 100 mL e, por mais uma vez, foram misturados com o mixer até formarem um homogenato. As amostras foram transferidas para frascos âmbar e armazenadas sob refrigeração. No dia do preparo das amostras e nos quatro dias consecutivos, 0,5 g de cada homogenato foram colocados em tubos de ensaio juntamente com 50 µL de solução etanólica de 2,6-Di-tert-butil-4-metilfenol (BHT) 4% (p/v), 2,5 mL de ácido fosfórico 1% (v/v) e 1,25 mL de ácido tiobarbitúrico 1% (p/v; em NaOH 0,05 M). Estas soluções foram aquecidas em banho fervente por 15 minutos e em seguida resfriadas em banho de gelo por 10 min. Depois de resfriadas, foram adicionados 3 mL de butanol em cada tubo de ensaio para que o complexo ácido tiobarbitúrico – malonaldeído (TBA-MDA) (indicativo de oxidação da carne) passasse para a fase orgânica, após leve agitação por inversão. A fase contendo butanol foi separada por centrifugação a 4000 g por 5 min e 200 µL do sobrenadante de cada amostra foram coletados e suas absorbâncias lidas no aparelho ELISA em 535 nm. A concentração do complexo TBA-MDA foi calculada a partir da curva padrão de MDA. Os resultados foram analisados através da análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste de Bonferroni utilizado como post-hoc.

3.7.2 Avaliação citotóxica em *Artemia salina* (“Brine Shrimp Test”)

O ensaio de toxicidade aguda em *Artemia salina* foi realizado conforme metodologia proposta por Meyer e colaboradores (1982), com o EBM e partições. A eclosão das larvas de *Artemia salina* (náuplios) foi realizada em aquário com uma solução de água marinha artificial por 48 h e aeração constante. Foram transferidas 10 larvas de náuplios para tubos de ensaio, em triplicata, contendo diferentes concentrações (15,6 -1000 µg/mL) das amostras, bem como a solução salina. Os tubos foram mantidos sob iluminação direta e após 24 h de exposição às substâncias-teste, as larvas sobreviventes foram contadas. Como controles positivos e negativos foram usados respectivamente, timol (Vetec) e água do mar artificial com DMSO 3%. A concentração letal em 50% da população de náuplios (CL₅₀) foi calculada pelo programa estatístico Grafit5.

3.7.3 Atividade antimicrobiana - Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

A atividade antimicrobiana foi avaliada com o EBM e partições sobre linhagens das bactérias *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Shigella dysenteriae* ATCC 13313, *Salmonella typhimurium* ATCC 13311, *Escherichia coli* ATCC 10536, *Enterobacter cloacae* ATCC 23355 e *Enterococcus faecalis* ATCC 29212. Foi realizado o ensaio de susceptibilidade em microdiluição em caldo, usando o método descrito pelo National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS, 2002). Linhagens de bactérias foram cultivadas “overnight” a 37°C por 24 h em ágar BHI (Brain Heart Infusion). Soluções estoque dos extratos foram diluídas de 1000 a 7,8 µg/mL e 80 µL dessas foram transferidas para microplacas de 96 poços, que já continham 100 µL de caldo Mueller-Hinton. Em cada poço, foi adicionado ainda 20 µL do inóculo diluído em solução salina 0,9% (10^8 UFC/mL de acordo com a escala turbidimétrica padrão de McFarland). Posteriormente, as placas foram incubadas a 37°C por 24 h. Como controles foram utilizados caldo Mueller-Hinton + microrganismo; caldo Mueller-Hinton + amostra; e como controle positivo, Cloranfenicol (Feniclor®) nas concentrações de 100 a 0,78 µg/mL. A Concentração Inibitória Mínima (CIM) foi calculada como a menor concentração que apresenta completa inibição da linhagem testada. Todos os testes foram realizados em duplicata.

3.7.4 Atividade leishmanicida

A avaliação da atividade leishmanicida foi realizada no Laboratório de Parasitologia no Instituto de Ciências Biológicas da UFJF. O ensaio foi realizado com o EBM e partições utilizando o método colorimétrico do brometo de 3-(4,5-dimethyltiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazólio (MTT) (MOSSMAN, 1983).

As cepas de referência utilizadas foram *L. major* (MRHO/SU/59/P), *L. braziliensis* (MHOM/BR/M2903), *L. chagasi* (MHOM/BR/PP75) e *L. amazonensis*

(IFLA/BR/67/PH8). As formas promastigotas de *L. amazonensis* foram cultivadas em meio Warren (Infusão de coração e cérebro - BHI, acrescentado de hemina e ácido fólico) (WARREN, 1960); *L. major* e *L. braziliensis* foram cultivadas em meio BHI (Infusão de coração e cérebro, suplementado com L-glutamina) (RODRIGUES et al., 2006); *L. chagasi* em meio 199, suplementados com 10% de soro bovino fetal (SBF) e mantidas à 26°C através de repiques realizados em intervalo de quatro dias, sendo coletadas em fase logarítmica de crescimento.

As formas promastigotas de *L. major*, *L. braziliensis*, *L. chagasi* e *L. amazonensis* obtidas a partir da fase logarítmica de crescimento foram contadas em câmara de Neubauer e lançadas à razão de 2×10^6 células/mL (*L. amazonensis*) e 3×10^6 células/mL (*L. major*, *L. braziliensis*, *L. chagasi*) em placa de 96 poços e incubados a 26°C. Os compostos testados foram adicionados em diferentes concentrações (100 a 6,25 µg/mL), após diluição em água ou DMSO (dimetilsulfóxido), sendo que a maior concentração utilizada de DMSO foi de 0,8% (v/v), que não é citotóxica para os parasitos. Em alguns poços não houve adição de substâncias, os quais foram utilizados como controle. Os testes foram realizados em três experimentos independentes, e cada concentração foi testada em duplicata. A concentração máxima utilizada foi de 111 µg/mL. Após 72 horas de incubação em estufa a 26°C, adicionou-se 10µL de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2-5 difenil tetrazólico (MTT) à 5 mg/mL em cada poço e a placa permaneceu incubada por mais quatro horas sob as mesmas condições. A reação foi interrompida pela adição de 100µL de 2-propanol/ácido clorídrico (solução de 2-propanol/HCl a 0,4%) e o material dissolvido foi lido em espectrofotômetro à 570 nm. Os resultados foram expressos em porcentagem de inibição em relação ao controle. A partir do teste de viabilidade celular foi determinada a concentração inibitória (CI₅₀) para cada composto que representa a concentração molecular que inibe 50% do crescimento parasitário. Os valores de CI₅₀ foram estimados a partir dos valores médios de três experimentos independentes, realizados em duplicata, por interpolação gráfica utilizando o programa estatístico Grafit5. Anfotericina B foi utilizada como fármaco de referência.

3.7.5 Atividade antitumoral

A determinação da atividade citotóxica, realizada com EBM e partições sobre linhagens de células tumorais, foi avaliada pela inibição da viabilidade celular através da metabolização do MTT (MOSSMAN, 1983). O ensaio foi realizado no Departamento de Fisiologia e Biofísica do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG.

Foram utilizadas as seguintes linhagens: células Jurkat (linhagem humana imortalizada de linfócitos T, células HL60 (leucemia promielocítica humana) e MCF-7 (células de adenocarcinoma de mama humano). Estas linhagens foram mantidas na fase logarítmica de crescimento em meio RPMI 1640 suplementado com 100 U/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina, sem fungizon, enriquecido com 2 mM de L-glutamina e 10% de soro bovino fetal (SFB). Todas as culturas foram mantidas a 37°C em uma incubadora umidificada com 5% CO₂ e 95% de ar. As suspensões celulares foram semeadas em microplacas de 96 poços contendo 5 X 10⁴ células / poço. As placas foram pré-incubadas por 24 h a 37°C para permitir a adaptação das células antes da adição das amostras. Posteriormente, foram adicionadas as amostras nas concentrações de 100 µg/mL para células MCF-7 e 20 µg/mL para células HL60 e Jurkat. As placas foram incubadas por 48 h a 37°C em uma atmosfera de 5% de CO₂ e 100% de umidade relativa e a viabilidade celular foi determinada pelo método MTT. Após período de incubação com os compostos, 20 µL de solução de MTT (5 mg/mL em tampão fosfato) foram adicionados a cada poço e incubados por 4 h. Ao final deste período, o sobrenadante foi removido e 200 µL de 0,04 M de HCl em álcool isopropílico foram adicionados para dissolver os cristais formazan. Os grupos controle incluíram o tratamento com 0,1% de DMSO (controle negativo), etoposídeo (controle positivo) e um controle de células (CC) em que há apenas meio e células, sem DMSO. Todas as amostras foram dissolvidas em dimetilsulfóxido (DMSO), antes da diluição. Para comparação, a citotoxicidade do etoposídeo foi avaliada sob as mesmas condições experimentais. Todos os experimentos foram realizados em triplicata e expressos como a média de três experimentos independentes. A densidade óptica (DO) foi avaliada em espectrofotômetro a 590 nm. Os resultados foram expressos como porcentagem de

proliferação celular, em comparação com 0,1% de DMSO. Os dados foram analisados usando o programa Prism 5.0 (GraphPad Software).

3.8 Atividades biológicas *in vivo*

3.8.1 Animais

Foram utilizados camundongos albinos machos Swiss pesando entre 25 e 30 g. Os animais, provenientes do Centro de Biologia da Reprodução (CBR) da UFJF, permaneceram no laboratório por um período mínimo de adaptação de 48 h antes da realização dos experimentos. Os camundongos ficaram alojados em gaiolas e mantidos sob condições controladas de temperatura (22°C) e iluminação (ciclo de claro/escuro de 12 h) com livre acesso à água e ração Nuvilab CR₁. Antes da realização de cada teste, os animais foram deixados em jejum por um período de 12 horas e com livre acesso à água. Os grupos foram constituídos de 6-8 animais. Todos os protocolos experimentais e procedimentos estão de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foram aprovados pela Comissão de Ética na Experimentação Animal (protocolo número 009/2009 da CEEA) da Pró-Reitoria de Pesquisa/UFJF.

3.8.2 Atividade antinociceptiva

3.8.2.1 Teste de contorções abdominais induzida por ácido acético

Este modelo consiste na indução da resposta nociceptiva de mediação periférica através da administração intraperitoneal de ácido acético (0,6%) diluído em

solução salina. A administração de ácido acético por via intraperitoneal provoca irritação da membrana serosa, o que ocasiona movimentos estereotipados, os quais são caracterizados por contração da musculatura abdominal (contorções abdominais), juntamente com a extensão de uma das patas posteriores (KOSTER et al., 1959).

Para o ensaio, foram utilizados 6 grupos e os animais foram previamente tratados por via oral (v.o) :

- Grupo 1 (Controle Negativo): DMSO a 2 % em salina (v/v) – 0,1 mL/10 g;
 - Grupo 2 (Controle Positivo): Indometacina (10 mg/kg) diluída em Tris-HCl – 0,1 mL/10 g;
 - Grupo 3: EBM (300 mg/kg) solubilizado em DMSO a 2 % em salina (v/v) – 0,1 mL/10 g.
 - Grupo 4: PHEX (300 mg/kg)
 - Grupo 5: PDCM (300 mg/kg)
 - Grupo 6: PAcOEt (300 mg/kg)
- } Mesmas condições do
EBM

Após 60 min foi administrada por via intraperitoneal uma solução de ácido acético a 0,6% em salina (v/v) – 0,1mL/10 g. Durante 30 minutos o número total de contorções abdominais (movimentos repetidos e característicos de contração da parede abdominal, rotação do corpo e extensão das patas traseiras) foi observado e a intensidade da nocicepção foi quantificada pelo número total de contorções abdominais durante o período observado. Os resultados foram expressos como média do número acumulado de contorções.

3.8.2.2 Teste da formalina

O procedimento usado para a indução de dor de mediação central e periférica foi uma adaptação do método de Hunskaar e colaboradores (1985). Para o ensaio, foram utilizados 7 grupos e os animais foram previamente tratados por via oral (v.o) ou intraperitoneal (i.p):

- Grupo 1 (Veículo): DMSO a 2 % em salina (v/v) – 0,1 mL/10 g;
 - Grupo 2 (Controle Positivo): Indometacina (10 mg/kg; v.o 60 min antes da formalina) diluída em Tris-HCl – 0,1 mL/10 g;
 - Grupo 3 (Controle Positivo): Morfina (7,5 mg/kg; i.p 45 minutos antes da formalina) diluída em salina;
 - Grupo 4: EBM (300 mg/kg) solubilizado em DMSO a 2 % em salina (v/v) – 0,1 mL/10 g; v.o.
 - Grupo 5: PHEX (300 mg/kg)
 - Grupo 6: PDCM (300 mg/kg)
 - Grupo 7: PAcOEt (300 mg/kg)
- } Mesmas condições do
EBM

Durante 45 ou 60 minutos após os tratamentos, foram aplicados 20 µL de uma injeção subcutânea sub-plantar (s.pl.) de formalina (solução de formol a 2% em salina estéril) na pata posterior direita do animal. Após a injeção da formalina, os animais foram colocados individualmente dentro de um funil de vidro invertido, com o auxílio de um espelho para facilitar a observação, e em seguida, o tempo de lambida da pata direita foi cronometrado durante 30 minutos. Os 5 min iniciais, após a administração de formalina, correspondem à dor de origem neurogênica da nocicepção (1° fase) desencadeada por este agente nociceptivo. A segunda fase, que ocorre entre 15 a 30 min após a administração de formalina, representa a resposta tônica à nocicepção (2° fase), acompanhada de uma resposta inflamatória relacionada à liberação de mediadores inflamatórios. O tempo em que o animal permaneceu lambendo ou mordendo a pata injetada com formalina (“lincking-time”) foi quantificado cumulativamente em segundos como índice de nocicepção.

3.8.2.3 Teste da retirada da cauda (*Tail-Flick*)

A atividade antinociceptiva foi também analisada no teste da retirada da cauda, conhecido por *tail-flick*. Foi descrito previamente por D`Amour e Smith, 1941.

Neste teste o camundongo foi imobilizado no interior de um pequeno cilindro de plástico rígido e com ventilação, de tal forma que a cauda permaneceu para o lado de fora do tubo. O terço medial da cauda foi imerso num banho-maria (55°C ±1)

e verificou-se o tempo de permanência da cauda na água, que não deve ser superior a 15 segundos para minimizar os danos tissulares. Posterior à obtenção de dois valores basais (com intervalos de 20 min.) os camundongos foram tratados com as amostras. Após os tempos necessários depois de administrar as drogas, a resposta foi novamente avaliada 20, 40, 60, 80, 100 e 120 min. Para o ensaio, foram utilizados 4 grupos e os animais foram previamente tratados por via oral (v.o) ou intraperitoneal (i.p.):

- Grupo 1 (Controle Negativo): DMSO a 2 % em salina (v/v) – 0,1 mL/10 g;
- Grupo 2 (Controle Positivo): Morfina i.p. (7,5 mg/kg, 30 min antes do estímulo térmico) diluída em salina;
- Grupo 3: EBM v.o. (300 mg/kg, 60 min antes do estímulo térmico) solubilizado em DMSO a 2 % em salina (v/v) – 0,1 mL/10 g;
- Grupo 4: PHEX v.o. (300 mg/kg, 60 min antes do estímulo térmico) solubilizado em DMSO a 2 % em salina (v/v) – 0,1 mL/10 g;

3.8.3 Atividade anti-inflamatória

3.8.3.1- Edema de orelha induzido por óleo de cróton

A atividade anti-inflamatória foi avaliada pelo método do edema de orelha descrito por Schiantarelli e colaboradores (1982). Para o ensaio, foram utilizados 7 grupos e os animais foram previamente tratados por via oral (v.o) ou via tópica (v. t):

- Grupo 1 (Veículo): DMSO a 2 % em salina (v/v) – 0,1 mL/10 g; v.o.
- Grupo 2 (Controle Positivo): Indometacina (10 mg/kg) diluída em Tris-HCl – 0,1 mL/10 g; v.o.
- Grupo 3: EBM (300 mg/kg) solubilizado em DMSO a 2 % em salina (v/v) – 0,1 mL/10 g; v.o.
- Grupo 4: PHEX (300 mg/kg) solubilizada em DMSO a 2% em salina (v/v) – 0,1 mL/10 g;v.o.
- Grupo 5 (Veículo): Acetona; v.t.
- Grupo 6 (Controle Positivo): Dexametasona (0,10 mg/20 μ L) diluída em acetona; v.t.

- Grupo 7: PHEX (1mg/20 μ L) diluída em 4% de DMSO, 20% de etanol e 76% de acetona; v.t.

Uma hora após os tratamentos por via oral, foram aplicados, topicamente, 20 μ L de uma solução fresca de óleo de cróton (2,5 % em acetona – v/v) no pavilhão auricular direito e o mesmo volume de acetona no pavilhão auricular esquerdo de cada animal. Os outros grupos de animais foram tratados por via tópica imediatamente após o tratamento com o óleo de cróton. Quatro horas após as aplicações, os animais foram eutanasiados por deslocamento cervical e discos idênticos de 6 mm, com auxílio do *punch*, foram obtidos de ambas as orelhas. Os discos foram pesados em balança analítica e a diferença de peso entre eles indicou a intensidade do edema. Os resultados foram representados como média \pm e.p.m das diferenças de peso dentro de cada grupo.

3.9 Análise estatística

Os ensaios biológicos *in vitro* realizados em triplicata ou quadruplicata tiveram os resultados expressos como média \pm erro padrão (EP).

Para os ensaios farmacológicos, foram realizadas análises de variância (ANOVA) e comparações múltiplas de Newman-Keuls, Teste t de Student ou Bonferroni a fim de se verificarem quaisquer diferenças significativas. Para estas análises, utilizou-se o programa Prism 5.0. Diferenças entre as médias dos tratamentos no nível de 5% ($P < 0,05$) comparadas ao controle negativo, foram consideradas significativas. Os percentuais de inibição foram calculados através da fórmula:

Porcentagem de inibição (%) = $V_c - V_t / V_c \times 100$, onde V_t e V_c representam a média do edema da orelha, o escore das contorções, o escore do tempo de lambida da pata ou o escore de permanência da cauda na água, dos grupos tratados e controle, respectivamente.

4 RESULTADOS

4.1 Triagem fitoquímica

Os resultados da triagem fitoquímica do EBM e partições estão representados na Tabela 2.

Tabela 2 - Resultados da triagem fitoquímica de *L. pubescens*

Amostras	Classes de constituintes químicos ^a								
	Fen	Fla	Cum	Sap	Tan	Est	Tri	Ant	Alc
EBM	+	+	+	+	+	+	+	-	+
PHEX	+	+	-	+	-	+	+	-	+
PDCM	+	+	+	+	+	+	-	-	+
PACoEt	+	+	+	+	+	-	-	-	-
HM	+	+	-	+	+	-	-	-	-

^a Constituintes químicos: Fen - fenóis; Fla - flavonoides; Cum - cumarinas; Sap - saponinas; Tan - taninos; Est - esteroides; Tri - triterpenos; Ant - antraquinonas; Alc - alcaloides.
+ presença; - ausência

4.2 Teor de fenóis e flavonoides

O teor de fenóis totais e flavonoides das amostras está representado na Tabela 3.

Tabela 3 - Resultados do teor de fenóis totais e flavonoides do EBM e partições

Amostras	Fenóis Totais como equivalentes a ácido tânico (mg/g de extrato)^a	Flavonoides como equivalentes a rutina (mg/g de extrato)^a
EBM	69,38 ± 0,3	27,5 ± 1,7
PHEX	66,53 ± 0,8	32,7 ± 2,8
PDCM	169,38 ± 0,5	12,7 ± 0,3
PACoEt	123,36 ± 0,5	14,68 ± 3,9
PHM	283,61 ± 0,9	16,56 ± 3,9

^a Média dos ensaios em triplicata ± desvio padrão.

4.3 Caracterização química da PHEX por CG-EM

A PHEX analisada por CG-EM (Figura 9), apresentou treze componentes principais que foram identificados, ao comparar seus espectros de massas com os das bibliotecas Wiley 275.1, NIST, com os descritos por Adams (1995) bem como pelo padrão de fragmentação de massas compreendendo 76,21 do total da amostra. A composição química da PHEX, com seus tempos de retenção, fórmula química e sua área correspondente está descrita na Tabela 4.

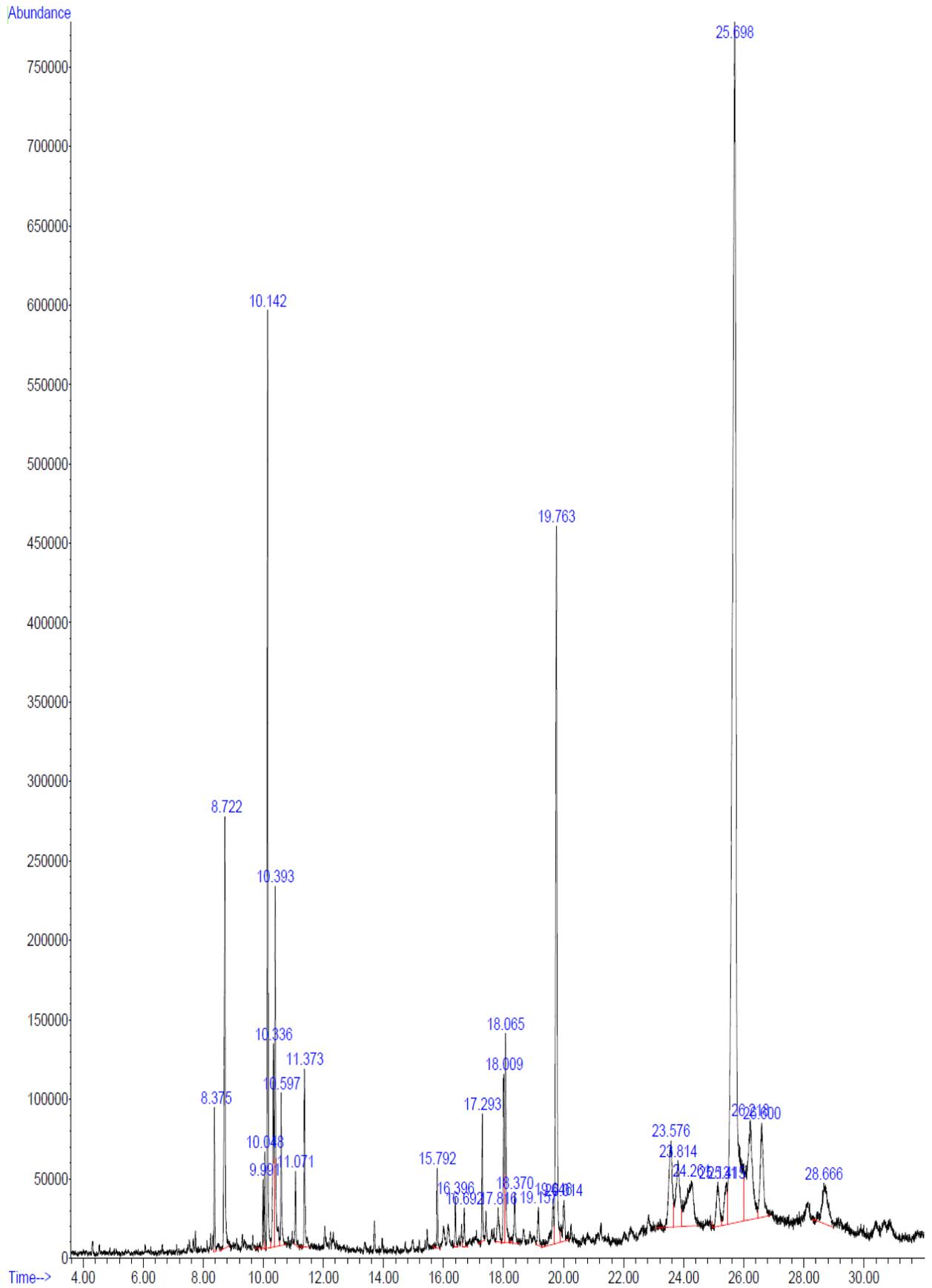


Figura 9 - Cromatograma da PHEX de *L. pubescens* por CG

Tabela 4 - Composição química da PHEX

Substância	T_R (min)^a	Fórmula Química	Área (%)
Ácido palmítico, metil Ester	8,37	C ₁₆ H ₃₄ O ₂	0,93
Ácido palmítico	8,72	C ₁₆ H ₃₂ O ₂	4,21
Fitol	10,14	C ₂₀ H ₄₀ O	5,98
Ácido linoleico	10,33	C ₁₈ H ₃₂ O ₂	2,15
9,12,15- octadecatrienol	10,39	C ₁₈ H ₃₂ O	3,16
Ácido esteárico	10,59	C ₁₈ H ₃₆ O ₂	1,19
Z-8-Metil-9 Ácido tetradecenoico	11,37	C ₁₅ H ₂₈ O ₂	1,35
β-tocoferol	17,29	C ₂₉ H ₅₀ O ₂	0,96
α-tocoferol	18,00	C ₂₉ H ₅₀ O ₂	1,53
Cotarnine	18,06	C ₁₂ H ₁₃ NO ₃	2,00
γ-Sitosterol	19,76	C ₂₉ H ₅₀ O	9,14
Acetato de farnesila	23,57	C ₁₇ H ₂₈ O	2,56
Triterpeno	25,69	-	41,05
Total (%)			76,21

^aT_R – Tempo de retenção

4.4 Atividades biológicas *in vitro*

4.4.1 Atividade antioxidante

4.4.1.1 Método DPPH, Poder de redução e Sistema β -caroteno / ácido linoleico

O potencial antioxidante frente ao radical DPPH, a capacidade seqüestradora de íons Fe^{2+} e atividade antioxidante empregando o sistema β -caroteno / ácido linoleico do extrato bruto e partições estão apresentados na Tabela 5.

Tabela 5 - Resultados da atividade antioxidante do EBM e partições

Amostras	DPPH CI_{50} ($\mu\text{g/ml}$) ^a	Poder de redução CI_{50} ($\mu\text{g/ml}$) ^a	β -caroteno / ácido linoleico CI_{50} ($\mu\text{g/ml}$) ^b
EBM	14,3 \pm 0,9	27 \pm 0,07	> 38
PHEX	24,2 \pm 1,1	> 54	22,7 (17,6-29,38)
PDCM	14,6 \pm 0,4	> 54	> 38
PAcOEt	8,9 \pm 0,1	> 54	> 38
PHM	1,8 \pm 0,8	> 54	> 38
Ácido Ascórbico ^c	1,5 \pm 0,1	5,9 \pm 0,03	
Quercetina			3,34 (2,3-4,9)

^a Média \pm erro padrão

^b 95% intervalo de confiança entre parênteses

^c Controles positivos

4.4.1.2 Peroxidação lipídica através do teste com o ácido tiobarbitúrico (TBA)

O resultado da atividade antioxidante para o EBM e partições, empregando o teste com o ácido tiobarbitúrico (TBA) para avaliação da peroxidação lipídica encontra-se na Figura 10.

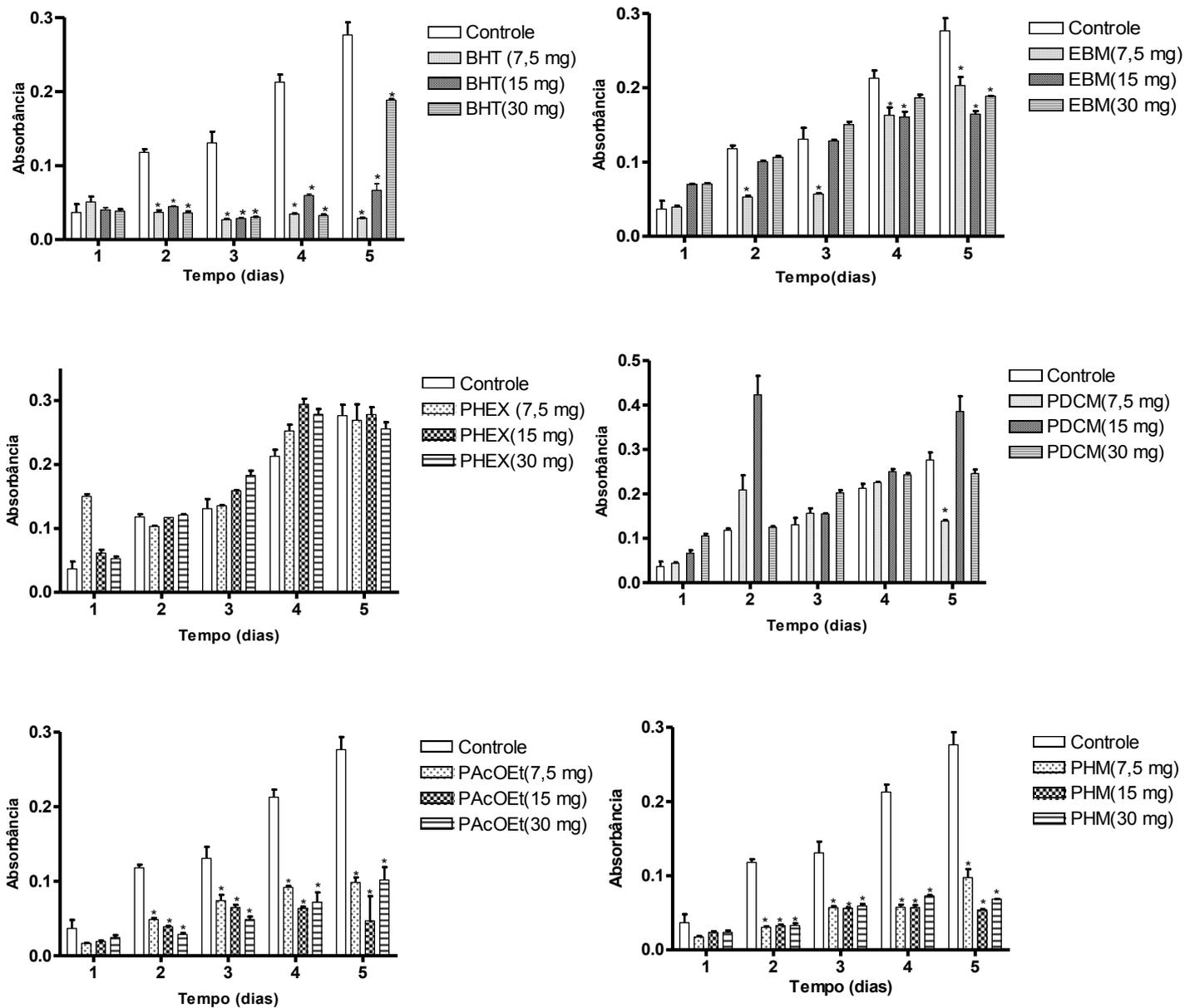


Figura 10 - Efeito antioxidante do EBM e partições de *L. pubescens* e BHT na peroxidação lipídica em homogenato de carne moída. Os ensaios foram realizados em quadruplicata e os valores em cada coluna representam a média \pm e.p.m. das absorbâncias. ANOVA, seguido pelo teste de Bonferroni foram utilizados como teste *post-hoc*. Valores significativos: $P < 0,001$ vs controle;

4.4.2 Atividade citotóxica em *Artemia salina* (“Brine Shrimp Test”)

Os resultados obtidos para o EBM e partições de *L. pubescens* no teste de letalidade contra *A. salina* estão expressos na Tabela 6.

Tabela 6 - Resultados da atividade citotóxica do EBM e partições de *L. pubescens* frente a *A. salina*

Amostras	Atividade citotóxica CL₅₀ (µg/ml)^a <i>Artemia salina</i>
EBM	305 ± 7,6
PHEX	> 1000
PDCM	43,6 ± 2,8
PAcOEt	197 ± 1,28
PHM	> 1000
Timol ^b	2,1 ± 0,3

^a Média dos ensaios em triplicata ± erro padrão

^b Controle positivo

4.4.3 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

Os resultados obtidos para o EBM e partições de *L. pubescens* no ensaio de susceptibilidade em microdiluição em caldo estão apresentados na Tabela 7.

Tabela 7 - Resultados da atividade antimicrobiana do EBM e partições

Amostras	Concentração Inibitória Mínima-CIM (mg/mL)						
	SA	PA	SD	ST	EC	EN	EF
EBM	1	0,5	0,5	0,5	1	0,5	1
PHEX	1	1	0,5	0,5	1	1	-
PDCM	1	0,5	0,5	0,5	0,5	0,250	0,125
PACoEt	1	0,5	0,5	0,5	0,5	0,125	1
PHM	1	0,5	0,250	0,250	0,5	0,125	1
C+	0,02	>0,1	0,05	0,003	0,001	0,003	-

Nota: SA - *Staphylococcus aureus*; PA - *Pseudomonas aeruginosa*; SD - *Shigella dysenteriae*; ST - *Salmonella typhimurium*; EC - *Escherichia coli*; EN - *Enterobacter cloacae*; EF - *Enterococcus faecalis*;

- Não realizado ; C+ controle positivo

4.4.4 Atividade leishmanicida

Os resultados para a atividade leishmanicida nas espécies de *L. amazonensis*, *L. braziliensis*, *L. chagasi* e *L. major* do EBM e partições, encontram-se na Tabela 8.

Tabela 8 - Resultados da atividade leishmanicida do EBM e partições

Amostras	Atividade citotóxica - CI_{50} ($\mu\text{g/mL}$) ^a			
	La ^b	Lb ^b	Lm ^b	Lc ^b
EBM	3,9 ± 0,7	45,6 ± 2,1	>100	>100
PHEX	3,5 ± 0,9	17,0 ± 0,07	4,2 ± 0,8	>100
PDCM	11,1 ± 3,8	30,2 ± 6,9	5,6 ± 2,6	>100
PACoEt	>100	>100	>100	>100
Anfotericina B ^c	0,4 ± 0,05	0,30 ± 0,09	0,3 ± 0,09	1,9 ± 0,25

^a Média dos ensaios em triplicata ± erro padrão

^b Organismos testados: La (*Leishmania amazonensis*); Lb (*L. braziliensis*); Lc (*L. chagasi*); Lm (*L. major*)

^c Controles positivos

4.4.5 Atividade antitumoral

Os resultados obtidos para EBM e partições de *L. pubescens* no ensaio antitumoral frente às células HL60, Jurkat e MCF-7 estão apresentados nas Figuras 11, 12 e 13.

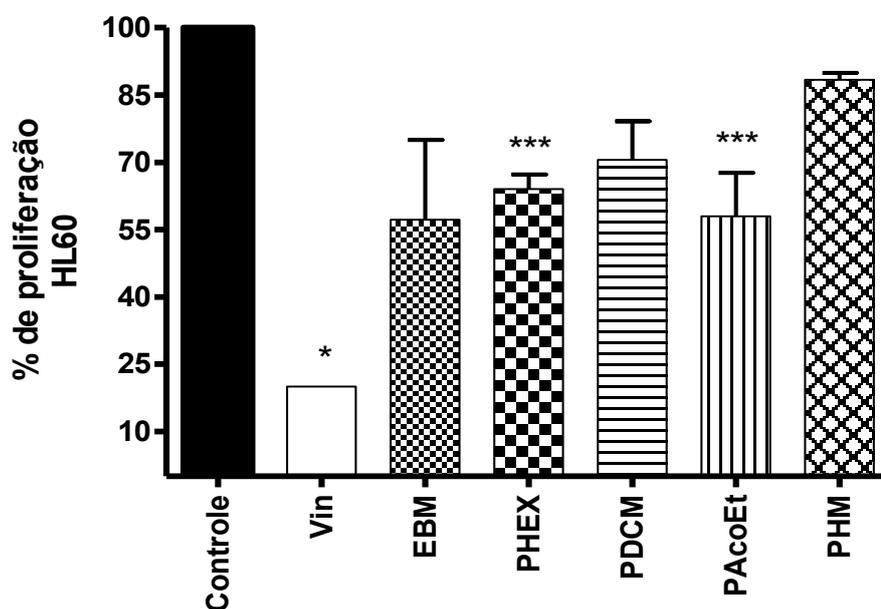


Figura 11 - Atividade antitumoral do EBM e partições de *L. pubescens* a 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$, DMSO (controle negativo) e Vincristina (Vin-controle positivo) frente à linhagem HL60. Os valores em cada coluna representam a média \pm e.p.m. da atividade antitumoral. Teste t – Student não pareado foi utilizado, com valores significativos: $P^* < 0,001$; $P^{***} < 0,005$ vs controle.

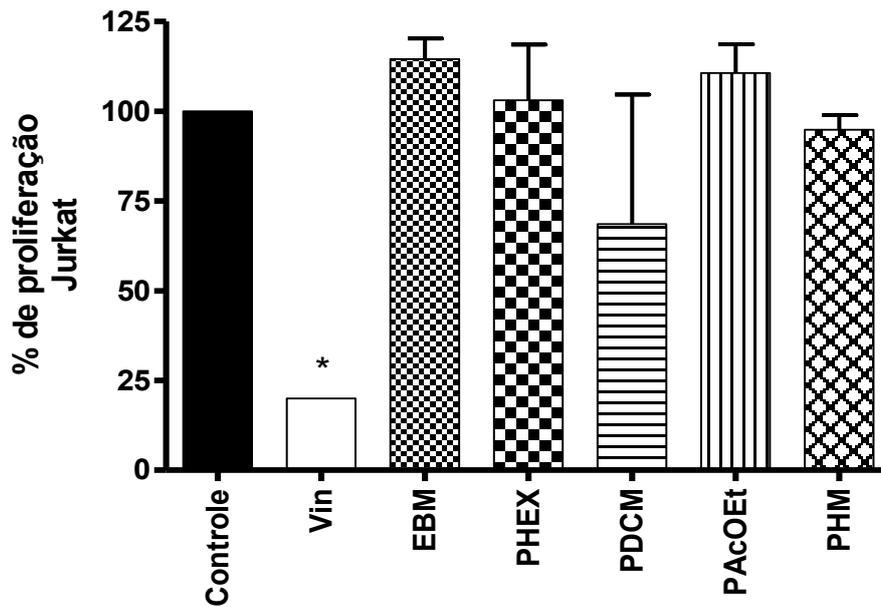


Figura 12 - Atividade antitumoral do EBM e partições de *L. pubescens* a 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$, DMSO (controle negativo) e Vincristina (Vin-controle positivo) frente à linhagem Jurkat. Os valores em cada coluna representam a média \pm e.p.m. da atividade antitumoral. Teste t – Student não pareado foi utilizado, com valores significativos: P * $<0,001$ vs controle.

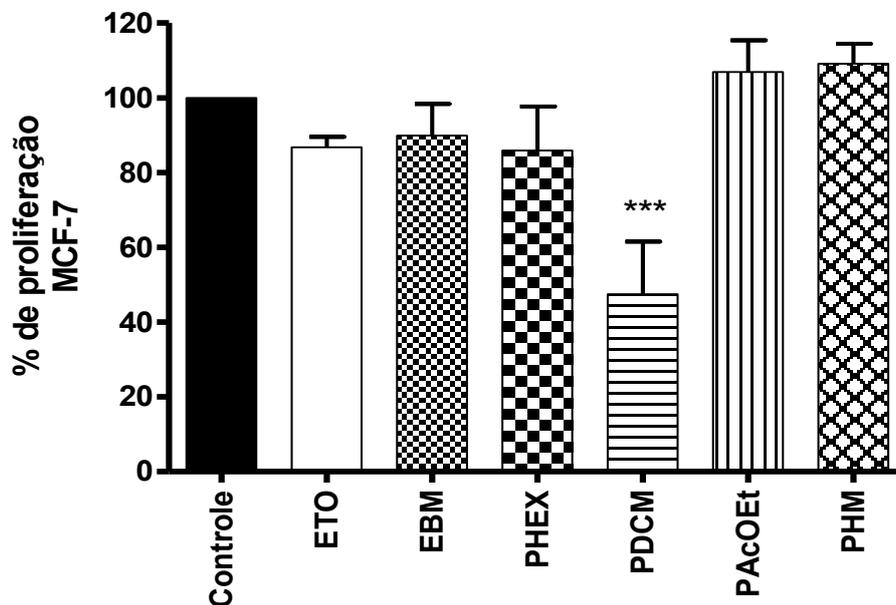


Figura 13 - Atividade antitumoral do EBM e partições de *L. pubescens* a 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$, DMSO (controle negativo) e Etoposídeo (ETO-controle positivo) frente à linhagem MCF-7. Os valores em cada coluna representam a média \pm e.p.m. da atividade antitumoral. Teste t – Student não pareado foi utilizado, com valores significativos: P *** $<0,005$ vs controle.

4.5 Atividades biológicas *in vivo*

4.5.1 Atividade antinociceptiva

4.5.1.1 Teste de contorções abdominais induzida por ácido acético

Os resultados apresentados na Figura 14 mostram que o EBM e partições administrados por via oral causaram inibição das contorções abdominais induzidas pela injeção de ácido acético em camundongos. A indometacina, o EBM, PHEX, PDCM e PAcOEt causaram inibições de 60; 52; 69; 88 e 54%, respectivamente.

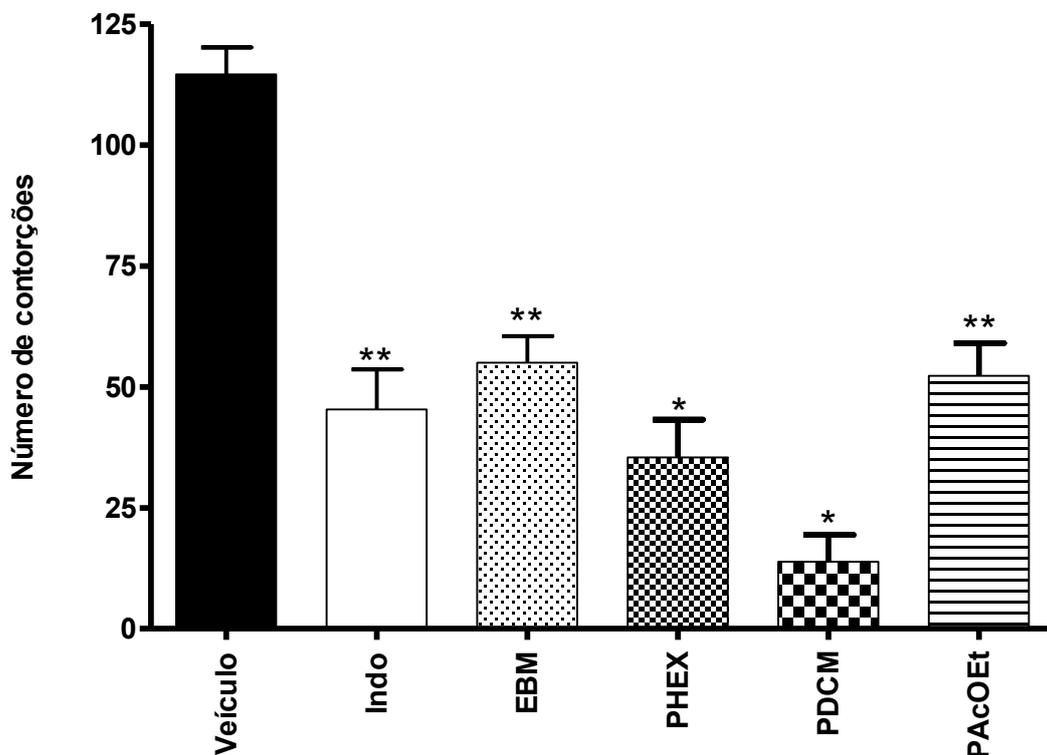


Figura 14 - Efeito de *L. pubescens* e indometacina via oral, sobre as contorções abdominais induzidas por ácido acético em camundongos. Controle (veículo), indometacina (Indo-10mg/kg) e *L. pubescens* (300 mg/kg) foram administrados 60 min antes da injeção intraperitoneal de ácido acético 0,6% e o número de contorções abdominais foi avaliada durante 30 min. Os valores em cada coluna representam a média \pm e.p.m. do número de contorções abdominais. ANOVA, seguido por Student-Newman-keuls foi utilizado como teste post-hoc. Valores significativos: $P^* < 0,001$; $P^{**} < 0,01$ vs controle.

4.5.1.2 Teste da formalina

A Figura 15 A mostra que o extrato bruto, partição AcOEt e a indometacina, fármaco de referência, não foram capazes de inibir a nocicepção de origem neurogênica (1ª fase da dor). No entanto, a morfina, outro controle positivo, bem como as partições hexânica e diclorometânica apresentaram significativas percentagens de inibição da nocicepção comparadas ao controle, de 71; 47 e 51%, respectivamente. A PAcOEt reduziu parcialmente a nocicepção, apresentando uma percentagem de inibição de 25%. A Figura 15 B demonstra que os fármacos de referência, bem como o EBM, partição PHEX e DCM inibiram significativamente a dor de origem inflamatória (2ª fase da dor). A morfina e indometacina inibiram 75 e 100% a nocicepção e o EBM, partição PHEX e DCM inibiram 38; 68 e 36%, respectivamente.

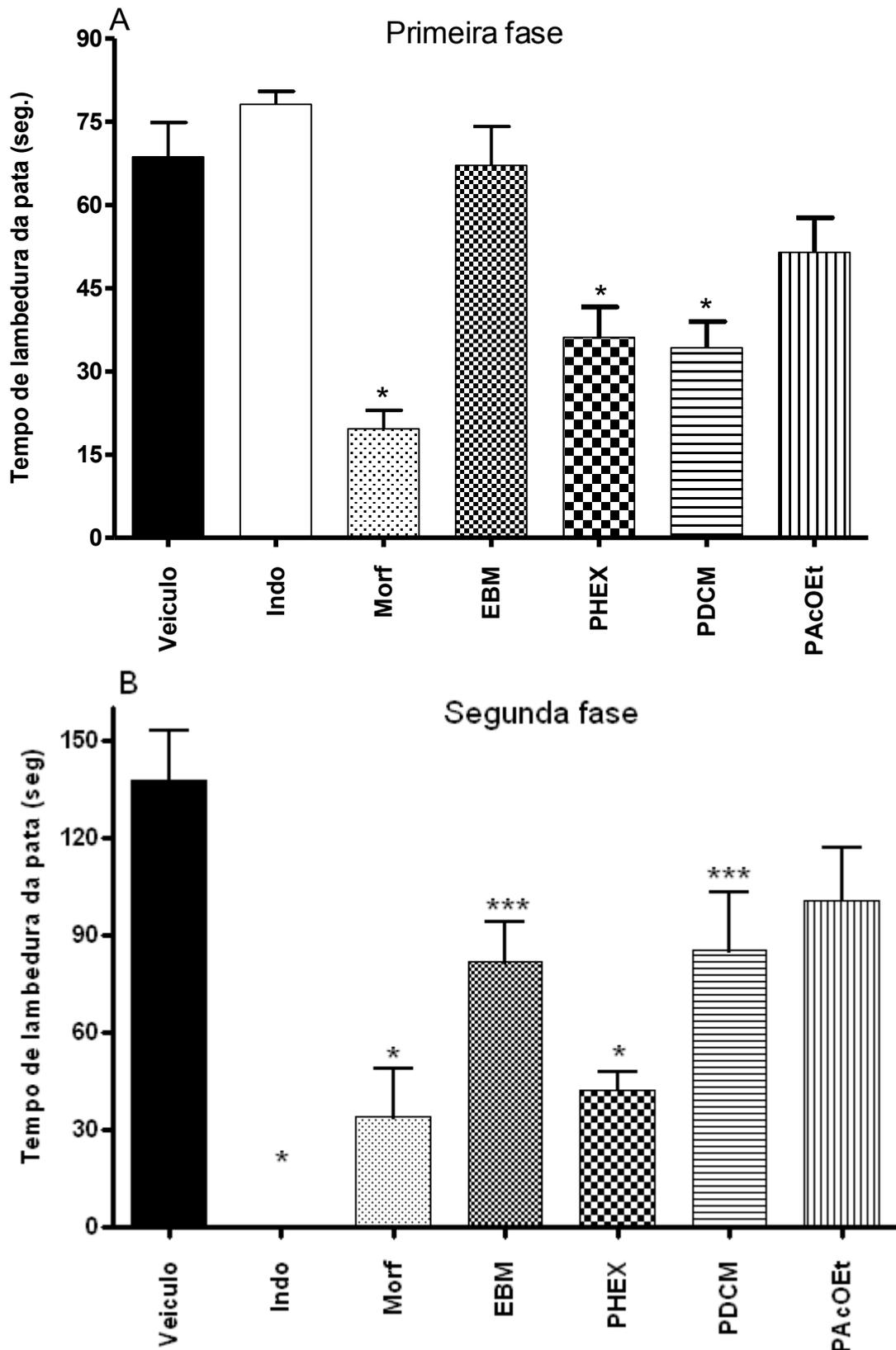


Figura 15 - Efeito de *L. pubescens* e indometacina via oral e morfina via intraperitoneal, sobre o tempo de lambedura de pata (seg.) na 1ª fase (A) e 2ª fase (B) do teste da formalina sobre camundongos. Controle (veiculo), indometacina (Indo-10 mg/kg), morfina (Morf-7,5 mg/kg) e *L. pubescens* (300 mg/kg) foram administrados 45 ou 60 min antes da administração intraplantar de formalina 2,5%. Os valores em cada coluna representam a média \pm e.p.m. do tempo de lambedura da pata (seg.). ANOVA, seguido por Student-Newman-keuls foi utilizado como teste post-hoc. Valores significativos: $P^* < 0,001$; $P^{***} < 0,05$ vs controle.

4.5.1.3 Teste da retirada da cauda (“Tail-Flick”)

O resultado apresentado na Figura 16 mostra que o EBM e PHEX administrados por via oral não foram capazes de alterar o período de latência ao estímulo térmico no teste da retirada da cauda, em nenhum momento. Porém, o tratamento com morfina, dependendo do tempo, aumentou o período de latência de resposta dos animais ao estímulo térmico.

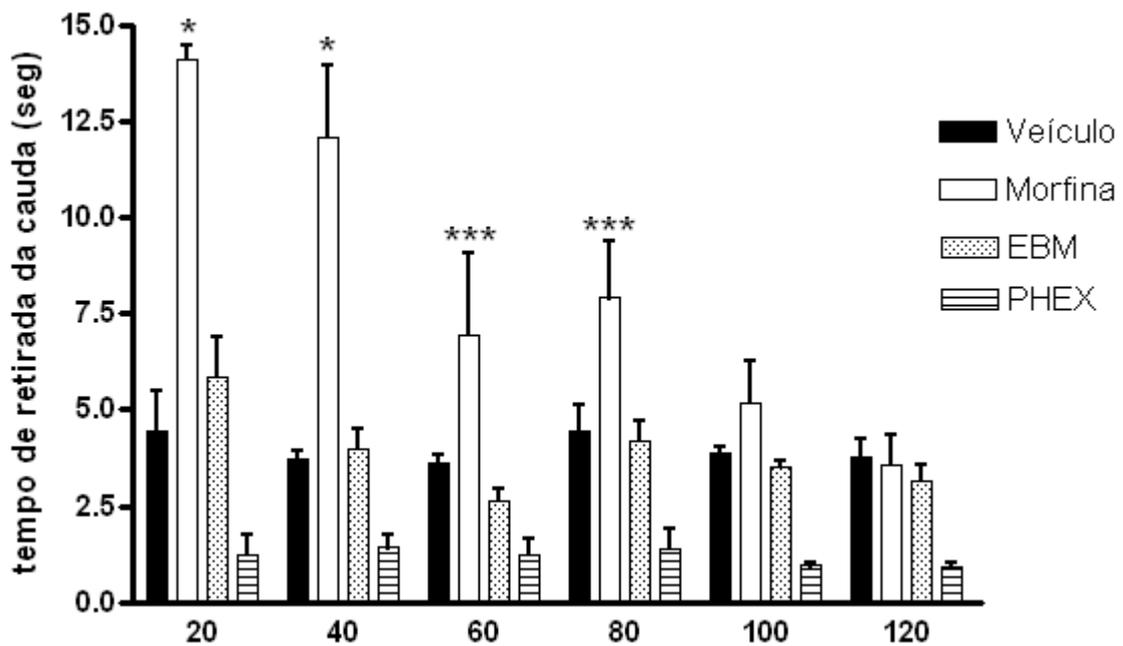


Figura 16 - Efeito de *L. pubescens* via oral e morfina via intraperitoneal sobre o tempo de reação no teste de retirada da cauda. Controle (veículo), morfina (7,5 mg/kg) e *L. pubescens* (300 mg/kg) foram administrados 30 ou 60 min antes do estímulo térmico nocivo à cauda do animal. Os valores em cada coluna representam a média \pm e.p.m. do tempo de retirada da cauda em seg. ANOVA, seguido por Bonferroni foi utilizado como teste post-hoc. Valores significativos: $P^* < 0,001$; $P^{***} < 0,05$ vs controle.

4.5.2 Atividade anti-inflamatória

4.5.2.1 Edema de orelha induzido por óleo de cróton

O efeito anti-inflamatório do EBM e PHEX de *L. pubescens* via oral, sobre o edema de orelha em camundongos foi nulo. Indometacina, o fármaco de referência, apresentou uma percentagem de inibição significativa de 93% (Figura 17). Quando aplicada topicamente, a PHEX inibiu significativamente o edema em 88% (Figura 18).

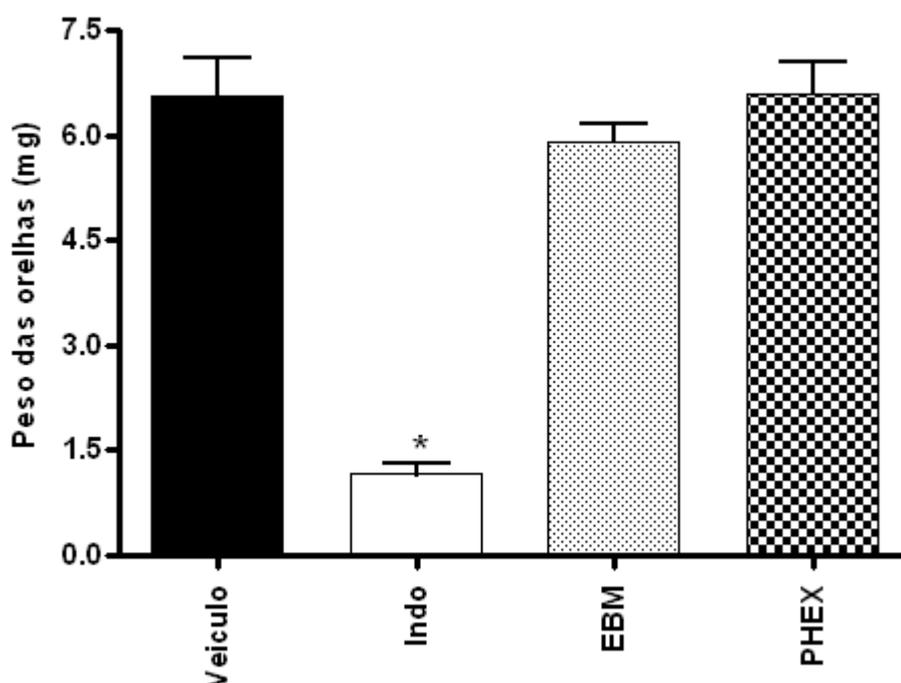


Figura 17 - Efeito de *L. pubescens* via oral sobre o estímulo inflamatório induzido pelo óleo de cróton em camundongos. Controle (veículo), indometacina (Indo-10 mg/kg), EBM e PHEX (300 mg/kg) foram administrados 60 min antes da aplicação tópica de óleo de cróton 2,5%. Os valores em cada coluna representam a média \pm e.p.m. do peso das orelhas (mg). ANOVA, seguido por Student-Newman-keuls foi utilizado como teste post-hoc. Valores significativos: $P < 0,001$ vs controle.

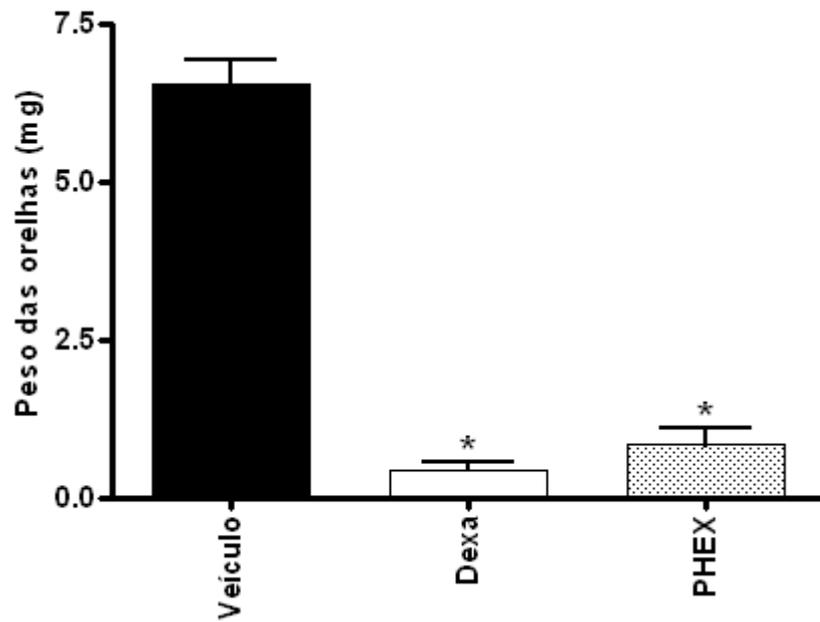


Figura 18 - Efeito de *L. pubescens* via tópica sobre o estímulo inflamatório induzido pelo óleo de cróton em camundongos. Controle (veículo), dexametasona (Dexa-0,10mg/20 μ L) e PHEX (1mg/20 μ L) foram administrados imediatamente após aplicação tópica de óleo de cróton 2,5%. Os valores em cada coluna representam a média \pm e.p.m. do peso das orelhas (mg). ANOVA, seguido por Student-Newman-keuls foi utilizado como teste post-hoc. Valores significativos: $P < 0,001$ vs controle.

5 DISCUSSÃO

5.1 Análise fitoquímica

A análise fitoquímica tem por objetivo conhecer as classes de 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 presentes 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 elucidação estrutural (FALKENBERG, SANTOS e SIMÕES, 2007).

Na triagem fitoquímica de *L. pubescens* (Tabela 2), pôde-se constatar a presença de fenóis, flavonoides, cumarinas, saponinas, taninos, esteroides, triterpenos e alcaloides, porém não foram detectadas antraquinonas. Ainda, na triagem, observou-se que somente o EBM e a PHEX apresentaram triterpenos na sua constituição.

Uma vez que foram observados fenóis e flavonoides em todas as amostras, procedeu-se ao doseamento dos mesmos. A PHM foi a que apresentou o maior teor de fenóis, seguido da PDCM (Tabela 3). Em contrapartida, a PHEX foi a que apresentou a maior quantidade de flavonóides. Flavonoides lipofílicos presentes em plantas geralmente são flavonas ou éteres metílicos de flavonóis, mas flavononas e outras classes de flavonoides podem igualmente estar presentes (GREENHAM et al., 2003).

Como a PHEX mostrou-se bastante promissora diante de algumas atividades biológicas realizadas, procedeu-se à análise por CG-EM, para identificar as possíveis substâncias nela presentes. A Tabela 4 mostra que importantes substâncias foram encontradas, as quais são descritas na literatura por estarem envolvidas no tratamento de várias patologias. Embora PHEX tenha apresentado um triterpeno em considerável proporção, não foi possível identificar a sua estrutura com a metodologia utilizada. Contudo, o mesmo foi classificado como tal, devido aos típicos fragmentos observados no espectro de massas.

5.2 Fenóis totais e atividade antioxidante

As substâncias antioxidantes estão envolvidas na prevenção do desenvolvimento de várias patologias relacionadas ao *stress oxidativo*, dentre elas o câncer e doenças cardiovasculares, além do seu papel em retardar o envelhecimento das células (HO et al., 1994).

No presente estudo, ao avaliar a capacidade de sequestrar o radical DPPH, pôde-se constatar que tanto o EBM, como as partições, tiveram resultados expressivos, comparados à substância de referência, o ácido ascórbico (CI_{50} 1,5 $\mu\text{g/ml}$). Os menores valores de CI_{50} foram para PAcOEt (8,9 $\mu\text{g/ml}$) e PHM (1,8 $\mu\text{g/ml}$), ou seja, substâncias mais polares contribuíram mais para a atividade antioxidante do radical DPPH. Uma relação entre a atividade antioxidante pelo método DPPH e a quantidade de substâncias fenólicas presentes na espécie em questão pôde ser constatada, uma vez que a partição mais polar (PHM) foi a que apresentou os maiores teores de substâncias fenólicas (Tabela 3) e a que melhor conseguiu sequestrar o radical DPPH (Tabela 5). É sabido que antioxidantes fenólicos funcionam como sequestradores de radicais e algumas vezes como quelantes de metais (SHAHIDI et al., 1992).

Em contraste, a atividade antioxidante avaliada pelo sistema β -caroteno / ácido linoleico foi maior para a PHEX (Tabela 5). Como constatado na análise por CG-EM da PHEX (Figura 10), a Vitamina E ou tocoferol está presente nesta amostra, a qual é conhecida por atuar como um excelente antioxidante natural (RAMALHO e JORGE, 2006). A sua maior ação reside na sua eficiente propriedade de suprimir radicais peróxila ($ROO\cdot$) das porções lipídicas de membranas biológicas, interrompendo assim as reações em cadeia da lipoperoxidação (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2000). De forma similar, esta atividade poderia também ser atribuída aos flavonoides lipofílicos que foram encontrados em maior quantidade na PHEX (SIQUEIRA, 2010). Ainda, de acordo com Sultana e colaboradores (2007), o método β -caroteno / ácido linoleico é mais indicado para amostras mais apolares enquanto o método com DPPH já detecta melhor a atividade antioxidante de amostras mais polares. Segundo o autor, a literatura relata que respostas diferentes são determinadas para os mesmos extratos ou substâncias nos dois testes o que é

atribuído às diferenças estruturais dos componentes das amostras, pois cada teste tem um princípio distinto de oxidação.

Os métodos baseados na redução do Fe^{+3} são também utilizados para avaliação da atividade antioxidante. Tais métodos avaliam a capacidade de substâncias bioativas reduzirem o Fe^{+3} , com conseqüente formação de um complexo colorido com Fe^{+2} (OYAIZU, 1986). A partir dos resultados (Tabela 5) verifica-se que o EBM e partições não foram capazes de reduzir o Fe^{+3} , comparado ao ácido ascórbico, potente agente redutor.

O ensaio do TBA foi proposto há mais de 40 anos e é um método usado para se identificar a oxidação lipídica. Este procedimento mede o malonaldeído formado a partir de subproduto de uma lipoperoxidação. O malonaldeído reage com a substância ácido tiobarbitúrico (TBARS) formando um pigmento rosa, medido espectrofotometricamente com o máximo de absorbância entre 532-535 (ANTOLOVICH et al., 2002). A quantificação de tal composto tem sido utilizada para avaliar a extensão do dano oxidativo. Segundo Fasseas e colaboradores (2007) entre todos os ensaios utilizados, o teste TBA é o melhor para descrever oxidações que ocorrem em amostras de carne porque os lipídios parecem ser os mais afetados. Ao utilizar esse método, como demonstra a Figura 14, o EBM, PDCM, PAcOEt e PHM foram efetivos em inibir a oxidação da carne. A PHM foi a que se mostrou mais efetiva, sendo possivelmente as substâncias mais polares responsáveis pela atividade, particularmente as substâncias fenólicas encontradas em maior quantidade. Fenóis interferem na oxidação dos lipídeos e de outras moléculas por uma rápida doação de um átomo de hidrogênio aos radicais livres. Os radicais fenóxidos formados são intermediários estáveis e dificilmente iniciam uma nova reação em cadeia em função da falta de sítios ativos para o ataque do oxigênio molecular. Estes radicais intermediários fenóxidos atuam reagindo com outros radicais livres, culminando com a terminação das reações de propagação (SANCHEZ-MORENO, 2002).

5.3 Atividade citotóxica contra *Artemia salina* (“Brine Shrimp Test”) e leishmanicida

O ensaio em *A. salina* é considerado uma ferramenta útil para o início da investigação de atividades biológicas em plantas. Além da sua utilidade no *screening* para atividade antitumoral, a literatura demonstra também que a toxicidade com *A. salina* apresenta correlação com atividades como antimicótica, antiviral, antimicrobiana (MCRAE et al., 1988) e parasiticida (SAHPAZ e BORIES, 1994). Meyer e colaboradores (1982) estabeleceram que extratos com valores de $CL_{50} < 1000 \mu\text{g/mL}$ neste tipo de modelo experimental eram tóxicos. Assim, atividade citotóxica de *L. pubescens* foi observada para o EBM, PDCM e PAcOEt ($CL_{50} 305 \pm 7,6$; $43,6 \pm 2,8$ e $197 \pm 1,28 \mu\text{g/mL}$, respectivamente). A relação deste ensaio pôde ser constatada em algumas amostras, sobretudo para a PDCM, a qual se apresentou mais tóxica para as larvas de *A. salina* e também elevada toxicidade para parasitos de *Leishmania*, células tumorais e células bacterianas.

O EBM e partições foram testados em promastigotas de diferentes espécies de *Leishmania* responsáveis por variadas manifestações clínicas, que vão desde a simples forma cutânea à grave forma visceral e encontradas tanto no Velho Mundo, quanto no Novo Mundo. O EBM apresentou atividade para promastigotas de *L. amazonensis*, com $CI_{50} = 3,9 \mu\text{g/mL}$, resultado bastante significativo quando comparado à substância de referência, anfotericina B, sendo também ativo para *L. braziliensis* ($CI_{50} 45,6 \mu\text{g/mL}$). Entretanto, parasitos de *L. major* mostraram-se resistentes para essa amostra. Em contrapartida, as partições PHEX e PDCM também foram bastante ativas e em todas as espécies de *Leishmania* analisadas. A PHEX apresentou CI_{50} de 3,5; 17 e $4,2 \mu\text{g/mL}$ para *L. amazonensis*, *L. braziliensis* e *L. major*, respectivamente e a PDCM CI_{50} de 11,1, 30,2 e $5,6 \mu\text{g/mL}$ para *L. amazonensis*, *L. braziliensis* e *L. major*, respectivamente. É interessante observar os resultados encontrados diante dos parasitos de *L. major*, onde o EBM não apresentou atividade significativa, contudo as PHEX e PDCM mostraram-se potencialmente ativas. Esta resposta pode ser atribuída à presença de compostos ou substâncias bioativas de baixa e média polaridade que estavam concentradas nessas partições e em baixas concentrações no EBM. Também, todos os resultados encontrados corroboram com dados obtidos por outros autores, os quais relatam

diferenças intrínsecas de sensibilidade entre diferentes espécies de *Leishmania* frente a várias substâncias (ESCOBAR et al., 2002; CROFT, SEIFERT e YARDLEY, 2006; SERENO et al., 2007).

Na atividade leishmanicida, a PHEX apresentou a melhor resposta para três das quatro espécies de *Leishmania* testadas, ou seja, possivelmente esta atividade está relacionada à atuação das substâncias lipofílicas presentes nessa partição. Ainda, segundo Costa e colaboradores (2008), a lipofilia é uma característica a ser considerada no desenvolvimento de novas substâncias antiparasitárias, pois a cadeia hidrofóbica pode interagir com a membrana lipídica da célula alvo, podendo a substância ser absorvida e desta forma, interferir no metabolismo do parasito.

5.4 Atividade antimicrobiana

A atividade antimicrobiana foi realizada para se determinar a Concentração Inibitória Mínima (CIM), que representa a menor concentração do antimicrobiano capaz de inibir o crescimento bacteriano. Uma classificação para resultados de CIM com extratos vegetais foi proposta por Aligiannis et al. (2001). Valores de CIM até 500 µg/mL apresentam uma forte inibição; valores entre 600 e 1500 µg/mL, uma moderada inibição e CIM acima de 1600 µg/mL, uma fraca inibição do crescimento microbiano. Desta forma, como demonstrado na Tabela 7, tanto o EBM quanto suas partições apresentaram uma forte inibição diante de várias cepas de bactérias, com destaque para as partições com valores de CIM de 125 µg/mL, a saber: PDCM para *Enterococcus faecalis*; PACOEt bem como PHM para *Enterobacter cloacae*.

Enterococcus faecalis é a espécie mais frequente do gênero *Enterococcus*, compreendendo cerca de 80 a 85% das amostras de enterococos isoladas de material clínico. Ganhou grande proeminência nos últimos anos, porque se tornou um dos agentes mais importantes de infecção hospitalar, com o agravante de ter adquirido resistência à maioria dos antibióticos, incluindo vancomicina. Os enterococos são membros da microbiota normal do trato intestinal, sendo encontrados também, mesmo que em menores concentrações, em mucosas de outros tratos. As infecções surgem quando a bactéria é translocada para órgãos ou

locais sensíveis. O trato urinário, feridas (sobretudo as decorrentes de cirurgias) e a corrente circulatória são os locais mais frequentemente infectados (TRABULSI e ALTERTHUM, 2005). Em hospitais, são transmitidos de um paciente a outro primariamente por intermédio das mãos da equipe hospitalar, alguns dos quais podem abrigar os enterococos no trato gastrointestinal. Em certas ocasiões, podem também ser transmitidos através de dispositivos médicos (JAWETZ, MELNICK e ADELBERG, 2009).

Outros agentes que têm sido reconhecidos como importantes patógenos responsáveis pela incidência significativa de infecções hospitalares são aqueles do gênero *Enterobacter*, os quais são resistentes a muitos antimicrobianos e rapidamente desenvolvem resistência a novos agentes. As cepas deste agente são patógenos oportunistas que raramente produzem doença humana primária. Estes microrganismos atingem particularmente pacientes submetidos à antibioticoterapia e a procedimentos invasivos e, principalmente, pacientes diabéticos e neutropênicos. Dentre as espécies de *Enterobacter* que causam a maioria das infecções hospitalares e urinárias, *E. cloacae* tem recebido atenção especial, pois está associado com epidemias importantes de contaminação das vias intravenosas (FERNANDES, FERNANDES e RIBIERO FILHO, 2000; TRABULSI e ALTERTHUM, 2005).

5.5 Atividade antitumoral

As plantas têm representado uma importante fonte de agentes anticancerígenos. Pelo menos 60% desses agentes usados são derivados de fontes naturais, incluindo plantas, organismos marinhos e microrganismos (CRAGG e NEWMAN, 2005).

Neste trabalho, foi avaliado o potencial antiproliferativo do EBM e partições utilizando ensaios de citotoxicidade pelo método MTT, diante de linhagens celulares leucêmicas humanas (Jurkat e HL60) e linhagem de câncer de mama humano (MCF-7). A cultura de células *in vitro* tem sido uma importante ferramenta para o

estudo da atividade citotóxica de substâncias com possível atividade terapêutica (FRESHNEY, 2001).

A técnica do MTT avalia a inibição da viabilidade celular através da metabolização do MTT, um sal de coloração amarela que na presença de desidrogenases mitocondriais transforma-se em formazam de coloração rósea púrpura, sendo solúvel em veículos aquosos. Este sal tem sido usado com sucesso para verificar a capacidade de redução mitocondrial e viabilidade (KIM et al., 2009).

Os resultados demonstraram que apenas as PHEX e PAcOEt foram significativas em inibir o crescimento e morte celular com seletividade para células leucêmicas HL60 quando comparadas ao controle negativo (Figura 15). Em contraste, o EBM e partições mostraram-se resistentes para células Jurkat (Figura 16). Para a linhagem MCF-7 somente a PDCM foi ativa (Figura 17).

A alta proliferação da linhagem celular de câncer mamário MCF-7 utilizando o etoposídeo, reflete sua alta resistência às quimioterapias tradicionais (HORTOBAGYI, 1997; BOVEN et al., 1996). Portanto, o resultado encontrado para a PDCM com esta linhagem, é extremamente importante uma vez que a partição foi sensivelmente mais ativa que o próprio fármaco utilizado como referência.

Uma maior resistência a apoptose da linhagem Jurkat em comparação a HL 60 também foi encontrada no trabalho de Kizawa e colaboradores (2006). Um estudo realizado por Karpinich e colaboradores (2006) demonstrou que a linhagem Jurkat não expressa P53 e Bax, duas proteínas pró-apoptóticas fundamentais para indução de apoptose desencadeada por dano no DNA, o que justifica a maior resistência a fragmentação do DNA mediado por substâncias citotóxicas após período de 24 horas.

A linhagem HL60 apresenta deleções no cromossomo 17, o qual contém o gene P53, expressando níveis insignificantes desta proteína (KOEFLER et al., 1986), entretanto expressa normalmente a proteína Bax, principal proteína pró-apoptótica da família Bcl-2. Bax transloca o sinal de morte para a mitocôndria, desencadeando a liberação do citocromo C que culmina desta forma, na ativação de caspases (KIM et al., 2001). As caspases pertencem à família das cisteína proteases que têm a capacidade de reconhecer e clivar substratos que possuam resíduos de aspartato. Estas sinalizam para a apoptose e clivam esses substratos levando à condensação e fragmentação nuclear, externalização de fosfolipídios de membrana que irão

sinalizar para estas células serem fagocitadas por macrófagos (GRIVICICH, REGNER e ROCHA, 2007).

Sabe-se que os agentes quimioterápicos destroem as células cancerígenas por vários mecanismos, incluindo a inibição da replicação do DNA, danos ao DNA e/ou membranas celulares ou por geração de radicais livres, alguns deles realizando vários mecanismos diferentes. Embora os principais alvos intracelulares das drogas sejam distintos, tornou-se evidente que a citotoxicidade induzida pelos quimioterápicos converge para um caminho comum causando apoptose. Esta representa um distinto conjunto de irreversíveis mudanças morfológicas e bioquímicas, incluindo condensação da cromatina, fragmentação nuclear devido à ativação de uma endonuclease que cliva o DNA genômico em fragmentos internucleossômicos e empacotamento dos fragmentos nucleares em múltiplas membranas, denominados corpos apoptóticos (SOKOLOVSKAYA et al., 2001).

Dessa forma, os resultados apresentados pelas amostras ativas de *L. pubescens* apontam para uma atividade apoptótica a exemplo da maioria dos quimioterápicos disponíveis. Desta forma, os resultados estimulam dar continuidade aos ensaios com as partições mais ativas que serão obtidas dessas amostras a fim de concentrar e identificar as substâncias bioativas responsáveis pela citotoxicidade, bem como testar sua seletividade em outras linhagens tumorais humanas.

5.6 Atividade antinociceptiva

Um dos modelos para se avaliar a atividade antinociceptiva é o método das contorções abdominais. Este modelo químico em camundongos baseia-se na contagem das contorções da parede abdominal seguidas de torção do tronco e extensão dos membros posteriores (writhing), como resposta reflexa à irritação peritoneal e à peritonite produzidas pela injeção intraperitoneal de ácido acético (WHITTLE, 1964). O ácido acético é um estímulo conveniente para os testes de triagem por produzir uma resposta cuja intensidade depende da interação dos vários eventos, neurotransmissores e neuromoduladores que determinam nocicepção. Assim, este modelo é sensível a substâncias de ação central e/ou periférica dotadas

dos mais variados mecanismos de ação (LAPA et al., 2008). Foi postulado ainda 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.

Os resultados demonstraram que, ao avaliar a nocicepção utilizando o modelo de contorções abdominais, tanto o EBM quanto todas as partições testadas foram significativamente efetivas, quando administrados por via oral (Figura 18).

Para confirmar o efeito antinociceptivo do EBM e partições o teste da formalina foi realizado. A injeção subcutânea de formalina, em camundongos, determina o aparecimento de uma gama de respostas motoras bem caracterizadas, cuja quantificação permite que se avalie a intensidade da resposta nociceptiva (DUBUISSON e DENNIS, 1977).

O teste de formalina talvez seja o modelo de dor clínica mais utilizado, no qual a primeira fase parece ser devido à estimulação química direta dos nociceptores das fibras sensoriais aferentes, principalmente fibras do tipo C, enquanto a segunda fase é dependente da inflamação periférica e modificações no processamento central. Neste modelo, a primeira fase começa imediatamente após a injeção e perdura por cerca de 5 minutos. Esta fase é seguida por um período de quiescência, de cerca de 5-10 minutos, após o qual se desenvolve a 2ª fase da resposta, que se inicia 15-20 minutos após a injeção e atinge o máximo aos 30-45 minutos. As duas fases da resposta à formalina têm mediação química e mecanismos de modulação distintos, apresentando diferenças marcantes quanto a sua sensibilidade a drogas analgésicas. Assim, à primeira fase é atribuída um caráter neurogênico, sendo sensível a analgésicos opioides, como a morfina e a alguns agonistas das vias descendentes, enquanto a segunda fase é mais bem caracterizada como dor de origem inflamatória, sendo sensível a analgésicos anti-inflamatórios não-esteroidais (HUNSKAAR e HOLE, 1987; TJOLSEN et al., 1992).

Os resultados expostos na Figura 18 demonstraram que o EBM, PAcOEt e a indometacina não reduziram de maneira significativa o tempo de lambidas da pata na 1ª fase. No entanto, a morfina e as partições PHEX e PDCM apresentaram significativas percentagens de inibição da nocicepção comparadas ao controle. A Figura 19 demonstra que os fármacos de referência, bem como o EBM e a PHEX inibiram de forma intensa a 2ª fase da resposta hiperálgica à formalina.

O teste de “tail-flick”, ou retirada da cauda, é um exemplo de teste algesimétrico neurogênico, pois se baseia na aplicação térmica de uma fonte radiante de calor, o que determina uma resposta de retirada da cauda, sendo o limiar nociceptivo avaliado pelo tempo de latência de retirada. Considera-se que este teste é causado por uma resposta reflexa nervosa, em nível espinhal, pois apresenta uma curta resposta de latência de retirada após aplicação do estímulo térmico sendo, dessa forma, o controle da resposta de caráter subjetivo e realizado por estruturas supraespinhais (MITCHELL e HELLON, 1977; IRVING, 2005).

A reprodutibilidade e a confiabilidade do teste de “tail flick” podem ser grandemente aumentadas desde que cuidados simples sejam tomados. Por exemplo, sabe-se que o sexo, idade ou o peso do animal, bem como diferenças genéticas, podem influenciar tanto os valores basais de “tail flick” quanto à resposta dos animais às drogas. Recomenda-se também, sempre que possível, usar animais nascidos numa mesma data. A temperatura da pele pode influenciar a resposta, de tal maneira que reduções da temperatura podem ser confundidas com analgesia, ao passo que o aumento pode erroneamente indicar hiperalgesia. A cauda é um importante órgão termorregulatório em ratos e camundongos. Variações na temperatura ambiente causam rápidas variações do fluxo sanguíneo nesta região, regulando a dissipação de calor e a temperatura na superfície da cauda. Desta forma, é importante que a temperatura da sala onde se realiza o teste seja mantida constante (LAPA et al., 2008).

Os resultados apresentados na Figura 20 mostraram que o EBM e PHEX, administrados por via oral, não foram capazes de alterar o período de latência ao estímulo térmico quando analisado no teste “tail-flick”, em nenhum dos tempos avaliados.

A possibilidade do efeito antinociceptivo observado pela administração da PHEX em dois dos três modelos analisados, pode ser decorrente dos triterpenos ou esteroides encontrados nesta partição uma vez que estes têm sido relacionados ao efeito antinociceptivo em vários trabalhos. Em estudo de Cunha et al. (2003), foi verificada a atividade antinociceptiva dos triterpenos alfa e beta-amirina e o esteroide beta-sitosterol na ação antinociceptiva de extrato hexânico de *Miconia ligustroides* quando utilizado o teste algesimétrico de contorção abdominal em camundongos. Beta-sitosterol e estigmasterol também foram isolados de raízes de *Sebastiania schottiana* e demonstraram potente atividade analgésica (GAERTNER et al., 1999).

5.7 Atividade anti-inflamatória

O modelo do edema induzido na orelha de camundongos por agentes irritantes, como o óleo de cróton (*Cróton tiglium* L.), é utilizado na pesquisa da atividade de agentes anti-inflamatórios de uso tópico, mas responde também à administração sistêmica de anti-inflamatórios esteroidais ou não esteroidais (SCHIANTARELLI et al., 1982). A fisiopatogenia do edema induzido pelo TPA (acetato de tetradecanoil-forbol), um dos componentes responsáveis pela ação irritante ao óleo de cróton, parece ser exercida entre outros mediadores, pelos produtos da ciclooxygenase, histamina e serotonina (LAPA et al., 2008). Como esse agente flogístico induz inflamação cutânea e hiperproliferação celular em animais, semelhante a doenças de pele, como psoríase, por exemplo, este teste constitui um importante modelo para a investigação de novos medicamentos para doenças inflamatórias que acometem a pele (GABOR, 2000).

Neste modelo, o EBM e PHEX administrados por via oral não foram ativos quando comparados à indometacina, controle positivo do experimento, a qual apresentou uma percentagem de inibição de 82 %. Entretanto, a PHEX aplicada topicamente, foi significativamente efetiva ao inibir o edema, apresentando uma percentagem de inibição de 88%, semelhante à dexametasona (93%), anti-inflamatório esteroide utilizado como controle. Essas alterações podem estar relacionadas a fatores farmacocinéticos que envolvem mecanismos fisiológicos de absorção e distribuição das substâncias presentes na PHEX e pelo fato de que na aplicação tópica, a concentração dessas no local de interesse ser muito maior (GABOR, 2000). Assim, a escolha da via de administração é de grande importância para o sucesso de um tratamento e, no caso de problemas cutâneos, a via tópica é bastante interessante (SILVA, 2009).

Algumas substâncias identificadas na PHEX por CG (Figura 10) poderiam ser responsáveis pela atividade anti-inflamatória tópica encontrada. O diterpeno fitol é relatado por Shimizu e colaboradores (1994) por possuir atividade anti-inflamatória tópica. A literatura cita que o fitol é considerado um potente inibidor de enzimas, a exemplo da lipoxigenase (BING BING et al., 1993), envolvida em processos inflamatórios. O sitosterol (PRIETO et al., 2006) e o α -tocoferol (Singh e Jialal, 2004)

encontrados nesta amostra também são descritos na literatura por possuir propriedades anti-inflamatórias. Essas substâncias, conjuntamente ou isoladas, poderiam estar inibindo a produção de alguns mediadores químicos da inflamação, como leucotrienos e endoperóxidos (prostaglandinas, prostaciclina e tromboxanos) pela ação inibitória sobre a enzima fosfolipase A2 (CARVALHO e LEMONICA, 1998).

Os resultados obtidos evidenciam que *L. pubescens* possui efeito analgésico central e anti-inflamatório em roedores, confirmando o uso tradicional do gênero no combate a dores e inflamações. Ressalta-se ainda a importância de se realizar outros estudos para melhor caracterização e confirmação destes efeitos.

SINTESE DOS RESULTADOS

1. A triagem fitoquímica revelou a presença de fenóis, flavonoides, cumarinas, saponinas, taninos, esteroides, triterpenos e alcaloides em *L. pubescens*.

2. A PHM apresentou a maior quantidade de fenóis e em contrapartida, a PHEX, o maior teor de flavonoides.

3. Por cromatografia gasosa, treze substâncias foram identificadas na PHEX, sendo um triterpeno a substância majoritária.

4. O EBM e/ou partições apresentaram uma potencial atividade antioxidante para um ou mais modelos utilizados. É importante ressaltar que, em geral, os antioxidantes naturais não são tão eficientes na inibição de radicais livres em testes *in vitro* quanto os sintéticos. Assim, os resultados obtidos são de extrema relevância.

5. O EBM e suas partições apresentaram uma forte inibição diante de várias cepas bacterianas, com destaque para *Enterococcus faecalis* e *Enterobacter cloacae*.

6. O EBM foi significativamente ativo frente aos parasitos *L. amazonensis* e *L. braziliensis* e as partições PHEX e PDCM, frente à *L. major*, *L. amazonensis* e *L. braziliensis*.

7. Na atividade antitumoral, PHEX e PAcOEt mostraram-se ativas para HL60 e a PDCM apresentou atividade diante da linhagem MCF-7.

8. No estudo da atividade antinociceptiva utilizando o teste da formalina, constatou-se que o EBM foi ativo somente na 2ª fase, ou seja, atuou somente na dor de origem inflamatória. Entretanto, a PHEX foi muito ativa nas duas fases. Igualmente, a PDCM foi muito ativa na dor de origem neurogênica, contudo, de forma moderada na dor inflamatória. No método das contorções abdominais, tanto o EBM, quanto as partições, foram significativamente efetivas. No teste de retirada da cauda, o EBM não foi capaz de alterar o período de latência ao estímulo térmico.

9. No estudo da atividade anti-inflamatória utilizando o modelo do edema de orelha, o EBM e PHEX administrados por via oral, não foram efetivos em inibir o

edema. Contudo a PHEX aplicada topicamente efetivamente inibiu a inflamação em 88%.

6 CONCLUSÃO

Os resultados apresentados neste trabalho são inéditos não apenas para a espécie *L. pubescens* como também para o gênero *Lacistema* e corroboram seu uso popular pelas comunidades indígenas indicando que o extrato bruto metanólico e partições merecem atenção especial, sob o ponto de vista farmacológico e químico, no sentido de isolar e identificar as possíveis substâncias bioativas e elucidar seus mecanismos de ação.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABEYSINGHE, P.D.; 2010. Antibacterial Activity of some Medicinal Mangroves against Antibiotic Resistant Pathogenic Bactéria. **Indian Journal of Pharmaceutical Sciences**, **72**: 167–172.

ABIFITO – Associação Brasileira de Indústria de Fitoterápicos. Perspectivas do setor de fitoterápicos. In: IBAMA/CENARGEM. REUNIÃO TÉCNICA SOBRE RECURSOS GENÉTICOS DE PLANTAS MEDICINAIS E AROMÁTICAS – **Estratégias para Conservação e Manejo Sustentável**. 2007, Brasília.

ADAMS, R.P. 1995. **Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectroscopy**, Illinois: Allured Publishing Corporation, 469 p.

AGRIPINO, D.G; LIMA, M.E; SILVA, M.R.; MEDA, C.I.; BOLZANI, V.S.; CORDEIRO, I.; YOUNG, M.C.M.; MORENO, P.R. Screening of Brazilian plants for antimicrobial and DNA damaging activities. i. atlantic rain forest - ecological station Juréia-Itatins. Disponível em: <http://www.biotaneotropica.org.br>. Acesso em: 12 Dez 2009.

ALBERTS, B.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WATSON, J.D. 2004. **Biologia Molecular da célula**. 4^o ed. Porto Alegre: Artmed. 1584 p.

ALEXANDER, J.; SATOSKAR, A.R.; RUSSELL, D.G. 1999. *Leishmania* species: models of intracellular parasitism. **Journal of Cell Science**, **112**:2993-3002.

ALIGIANNIS, N., KALPOTZAKIS, E., MITAKU, S., CHINO, I.B., 2001. Composition and antimicrobial activity of the essential oils of two *Origanum* species. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, **40**:4168–4170.

ALMEIDA, T.F.; ROIZENBLATT, S.; TUFIK, S. 2004. Afferent pain pathways: a neuroanatomical review. **Brain Research**, **1000**:40-56.

AMATO, V.S; PADILHA, A.R.S.; NICODEMO, A.C.; DUARTE, M.I.S.; VALENTINI, M.; UIP, D.E.; BOULOS M.; AMATO V.N. 2000. Use of Itraconazole in the treatment of mucocutaneous Leishmaniasis: A pilot study. **International Journal of Infectious Diseases**, **4**:153-7.

ANDERSON, D. 1996. Antioxidant defences against reactive oxygen species causing genetic and other damage. **Mutation Research**, **350**:103-108.

ANDERSON, D.; PHILLIPS, J.B. 1999. Comparative in vitro and in vivo effects of antioxidants. **Food and Chemical Toxicology**, **37**:1015-1025.

ANDRADE, C.A., COSTA, C.K., BORA, K., MIGUEL, M.D., MIGUEL, O.G., KERBER, VA. 2007. Determinação do conteúdo fenólico e avaliação da atividade antioxidante de *Acácia podalyriifolia* A. Cunn. ex G. Don, Leguminosae-mimosoideae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, **17**:231-235.

ANTOLOVICH, M.; PRENZLER, P.D.; PATSALIDES, E.; MCDONALD, S.; ROBARDS, K. 2002. Methods for testing antioxidant activity. **Analyst**, **127**:183-198.

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Medicamentos fitoterápicos – Registro e políticas**. Brasília, 2007.

ARAUJO, C.A.C.; ALEGRIO, L.V.; LEON, L.L. 1998. Antileishmanial activity of compounds extracted and characterized from *Centrolobium sclerophyllum*. **Phytochemistry**, **49**:751-4.

ASHFORD, R.W. 2000. The leishmaniases as emerging and reemerging zoonoses. **International Journal for Parasitology**, **30**:1269-81.

BALESTRIN L.; DIAS J.F.G.; MIGUEL O.G.; DALL' STELLA D.S.G.; MIGUEL M.D. 2008. Contribuição ao estudo fitoquímico de *Dorstenia multiformis* Miquel (Moraceae) com abordagem em atividade antioxidante. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, **18**:230-235.

BARBOSA, W.L.R.; PINTO, L.N. 2003. Documentação e valorização da fitoterapia tradicional Kayapó nas aldeias A'Ukre e Pykanu - sudeste do Pará, **Revista Brasileira de Farmacognosia**, **13**:47-49

BARREIROS, A.L.B.S.; DAVID, J.M.; DAVID, J.P. 2006. Estresse oxidativo: Relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Química Nova**, **29**:113-126.

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

BERMUDEZ, J.A.Z. 1995. **Indústria farmacêutica, estado e sociedade**. Hucitec, São Paulo, 204 p.

BEZERRA, J.L., COSTA, G.C.; LOPES, T.C.; CARVALHO, I.C.D.S.; PATRICIO, 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.

BING BING, L.; YUN SHAN, L. 1993. Selective inhibition activity on 15-lipoxygenase of trans-phytol isolated from *Oxalis corniculata* L. **Chemistry Express**, **8**:21-4.

BOLLER, S. 2007. Atividade anti-inflamatória tópica do extrato e substâncias isolados da *baccharis illinita* dc, (*asteraceae*) em camundongos. **Dissertação de Mestrado**- Universidade Federal do Paraná.

BORGUINI, R.G. Avaliação da atividade antioxidante e de algumas características físico-químicas do tomate (*Lycopersicon esculentum*) orgânico em comparação ao convencional. 2006. **Tese de Doutorado** – Universidade de São Paulo.

BOVEN E.; JONG, J.; KUIPER, C. M.; BAST, A., VAN DER VIJGH, W. J. 1996. Relationship between the tumour tissue pharmacokinetics and the antiproliferative effects of anthracyclines and their metabolites. **European Journal of Cancer**, **32A**: 1382–1387.

BRAND-WILLIAMNS, W.; CUVELIER, M.E.; BERSET, C. 1995. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **Lebensm-Wiss Technology**, **28**:28-30.

BRASIL. Ministério da Saúde – INCA / Conprev. Estimativa-2010-Incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro, 2009. Disponível em http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/controler_cancer/pub_destaque.php. Acesso em: 03 mar. 2010

BRASIL. Ministério da Saúde – Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos. Brasília, 2006. Disponível em http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/politica_nacional_fitoterapicos.pdf. Acesso em 03 mar. 2010.

BRASILEIRO FILHO, G. 2004. **Patologia geral**. 3.ed. Rio de Janeiro:Guanabara Koogan. 379 p.

BRESOLIN, T.M.B.; FILHO, V.C. 2003. **Contribuição ao desenvolvimento de novos fármacos e medicamentos**. In: Ciências Farmacêuticas, Itajaí/Santa Catarina: Ed. Universidade do Vale do Itajaí, 239 p.

BUBENÍK, J.; VONKA, V. 2003. MHC class I status of tumours and design of immunotherapeutic strategies. **Immunology Letters**, **90**:177-178.

CALDERON, A.I.; ANGERHOFER, C.K; PEZZUTO, J.M.; FARNSWORTH, N.R.; FOSTER, R.; CONDIT, R.; GUP'RA, M.P.; SOEJARTO, D.D. 2000. Forest plot as a tool to demonstrate the pharmaceutical potential of plants in a tropical forest of panama. **Economic Botany**, **54**:278-294.

CARVALHO, W.A.; LEMÔNICA, L. 1998. Mecanismos Celulares e Moleculares da Dor Inflamatória. Modulação Periférica e Avanços Terapêuticos. **Revista Brasileira de Anestesiologia**, **48**:137 – 158.

CELOTTO, A.C.; NAZÁRIO, D.Z.; SPESSOTO, M.A.; MARTINS, C.H.G CUNHA, W.R. 2003. Evaluation of the *in vitro* antimicrobial activity of crude extracts of three *Miconia* species. **Brazilian Journal of Microbiology**, **34**:339-340.

CDC. *Leishmania* Life Cycle Disponível em: <www.dpd.cdc.gov/> Acesso em: 05 jun, 2010.

CHIANG, H.C.; JAW, S.M.; CHEN, C.F.; KAN, W.S. 1992. Antitumor agent, physalin F from *Physalis angulata* L. **Anticancer Research**, **12**:837-43.

COLEGATE, S. M.; MOLYNEUX, R. J. 1993. **Bioactive Natural Products : Detection, Isolation and Structural Determination**; Ed. CRC Press; London, p 441

CORDELL, G.A. 2000. Biodiversity and drug discovery – a symbiotic relationship. **Phytochemistry**, **55(6)**: 463-480.

COSTA, C.F.; COIMBRA, E.S.; BRAGA, F.G. REIS, R.C.N.; SILVA, A.D.; ALMEIDA, M.V. 2008. Preparation and antileishmanial activity of lipophilic N-alkyl diamines. **Biomedicine e Pharmacotherapy**, **63**:40-42.

COTRAN, R.S.; KUMAR, V.; COLLINS, T. ROBBINS. 2000. **Patologia Estrutural e Funcional**. 6.ed. Rio de Janeiro:Guanabara Koogan, p.233-293.

CRAGG, G.C.; NEWMAN, D.J.; SNADER, K.M. 1997. Natural products in drug discovery and development. **Journal of Natural Products**, **60**:52-60.

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

CRAGG, G.C.; NEWMAN, D.J. 2005. Plants as a source of anti-cancer agents. **Journal of Ethnopharmacology**, **100**:72-79.

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.; SEIFERT, K.; YARDLEY, V. 2006. Current scenario of drug development for leishmaniasis. **Indian Journal Medicinal Research**, **123(3)**:399-410.

CUNHA, W. R.; SILVA, M. L.; TURATTI, I. C. C.; FERREIRA, D. S.; BETARELLO, H. L. 2003. Evaluation of the analgesic activity of *Miconia ligustroides* (*Melastomataceae*) using the writhing test in mice. **Revista Brasileira de Farmácia**, **82**:47-49.

CUNNINGHAM, A.C. 2002. Parasitic adaptive mechanisms in infection by *Leishmania*. **Experimental and Molecular Pathology**, **72**:132-141.

CUNICO, M. M.; CARVALHO, J. L. S.; KERBER, V. A.; HIGASKINO, C. E. K.; CRUZ ALMEIDA, S. C.; MIGUEL, M. D.; MIGUEL, O. G. 2004. Atividade antimicrobiana do extrato bruto etanólico de raízes e partes aéreas de *Ottonia martiana* Miq. (*Piperaceae*). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, **14**:97-103.

D'AMOUR, F.E.; SMITH, D.L. 1941. A method for determining loss of pain sensation. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, **72**:74-79.

DI STASI, L.C.; HIRUMA-LIMA, C.A. **Plantas medicinais na Amazônia e na Mata Atlântica**. 2 ed. São Paulo: Editora UNESP, 2002. 592 p.

DJERIDANE, A.; YOUSFI, M.; NADJEMI, B.; BOUTASSOUNA, D.; STOCKER, P.; VIDAL, N. 2006. Antioxidant activity of some algerian medicinal plants extracts containing phenolic compounds. **Food Chemistry**, **97**:654-60.

DOLABELA, M.F. 1997. Triagem *in vitro* para a atividade antitumoral e anti- T.cruzi de extratos vegetais, produtos naturais e substâncias sintéticas. Belo Horizonte. **Dissertação (Mestrado)** – Universidade Federal de Minas Gerais.

DOMINGUEZ, M.; MORENO, I.; AIZPURUA, C.; TORAÑO, A. 2003. Early mechanisms of *Leishmania* infection in human blood. **Microbes and Infection**, **5**:507-513.

DROGE, W. 2002. Free radicals in the physiological control of cell function. **Physiological Reviews**, **82**:47-95.

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

DUH, P.D.; YEN, G.C. 1997. Antioxidative activity of three water extracts. **Food Chemistry**, **60**:639-645.

ESCOBAR, P. MATU, S.; MARQUES, C.; CROFT, S.L. 2002. Sensitivities of *Leishmania* species to hexadecylphosphocoline (Miltefosine), ET-18-OCH₃ (Edelfosine) and Amphotericin B. **Acta Tropica**, **81**:151-157.

FALKENBERG, M.B; SANTOS,R.I.; SIMÕES, C.M.O. 2007 Introdução à análise fitoquímica. In Simões C. et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Florianópolis: Editora da UFSC, **cap.10**: 229-245

FASSEAS, M.K.; MOUNTZOURIS, K.C.; TARANTILIS, P.A.; POLISSIOU, M.; ZERVAS, G. 2007. Antioxidant activity in meat treated with oregano and sage essential oils. **Food Chemistry**, **106**:1188–1194.

FELLOWS, L.E. 1991. Pharmaceuticals from traditional medicinal plants and others: Future prospects. In: Coombes, JD, ed. **New drugs from natural sources**. Technical Services.

FERNANDES, A. T.; FERNANDES, M. O. V.; RIBEIRO FILHO, N. 2000. **"Infecção Hospitalar e suas Interfaces na Área da Saúde"**. São Paulo: Atheneu. 1956 p.

FERREIRA, M.E.; DE ARIAS, R.A.; DE ORTIZ, S.T.; INCHAUSTI, A.; NAKAYAMA, H.C.; THOUVENEL, A.C.; HOCQUEMILLER, R.; FOURNET, A. 2002. Leishmanicidal activity of two canthin-6-one alkaloids, two major constituents of *Zanthoxylum chiloperone* var. *angustifolium*. **Journal of Ethnopharmacology**, **80**:199-202.

FILHO, V.C.; YUNES, R.A. 1998. Estratégias para a obtenção de substâncias farmacologicamente ativas a partir de plantas medicinais. Conceitos sobre modificação estrutural para otimização da atividade. **Química Nova**, **21**:99-105.

FRANÇA, F.; LAGO, E.L.; MARSDEN, P.D. 1996. Plants used in the treatment of leishmanial ulcers due to *Leishmania (Viannia) braziliensis* in the endemic area of Bahia, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, **29**: 229-232.

FRANCK, X.; FOURNET, A.; PRINA, E.; MAHIEUX, R.; HOCQUEMILLER, R.; BRUNO, F. 2004. Biological evaluation of substituted quinolines. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**; **14**:3635-8.

FRESHNEY, I. 2001. Application of Cell Cultures to Toxicology. **Cell Biology and Toxicology**. **17**:213-230.

GABOR, M. **Mouse Ear Inflammation Models and their Pharmacological Applications**. Budapeste: Akadémiai Kiadó, 2000. 336 p.

GAERTNER, M.; MULLER, L.; ROOS, J.; CANI, G.; SANTOS, A. R.; NIERO, R.; CALIXTO, J. R.; YUNES, R. A.; DELLE MONACHE, F.; CECHINEL-FILHO, V. 1999. Analgesic triterpenes from *Sebastiania schottiana* roots. **Phytomedicine**, **(6)**:41-44.

GOTTLIEB, H.E; COJOCARU, M.; SINHÁ, S.C.; SAHU, M.; BAGCHI, A.; ALI, A.; RAY, A.B. 1987. Withaminimin, a withanolide from *Physalis minima*. **Phytochemistry**, **2**:1801.

GONÇALVES, A.L.; FILHO, A.A.; MENEZES, H. 2005. Estudo comparativo da atividade antimicrobiana de extratos de algumas árvores nativas. **Arquivos do Instituto Biológico**, **72**:353-358.

GOVINDARAJAN, R.; RASTOGI, S.; VIJAYAKUMAR, M.; SHIRWAIKAR, A.; RAWAT, A.K.S.; MEHROTRA, S.; PUSHPANGADAN, P. 2003. Studies on the antioxidant activities of *Desmodium gangeticum*, **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, **26**:1424–1427.

GRAMICCIA, M.; GRADONI, L. 2005. The current status of zoonotic leishmaniasis and approaches to disease control. **International Journal for Parasitology**, **35**:1169-1180.

GREENHAM, J., HARBORNE, J.B., WILLIAMS, C.A. 2003. Identification of lipophilic flavones and flavonols by comparative HPLC, TLC and UV spectral analysis. **Phytochemical Analysis**. **14**:100-118.

GRIMALDI, JR, G.; TESH, R.B. 1993. Leishmaniasis of the New World: current concepts and implications for future research. **Journal of Clinical Microbiology**, **6**:230-250.

GRIVICICH, I.; REGNER, A.; ROCHA, A.B. 2007. Morte Celular por Apoptose. **Revista Brasileira de Cancerologia**, **53**: 335-343.

GUALILLO, O.; EIRAS, S.; LAGO, F.; DIÉGUEZ, C.; CASANUEVA, F.F. 2000. Elevated serum leptin concentrations induced by experimental acute inflammation. **Life Sciences**, **67**:2433-2441.

GUILLÉN, SANS R., & GUZMÁN, CHOZAS M. 1998. The thiobarbituric acid (TBA) reaction in foods: a review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, **38**:315–330.

GUYTON, A.C.; HALL, J.E. 2002. **Tratado de Fisiología médica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 1264 p.

HALLIWELL, B. 1999. Antioxidant defence mechanisms: from the beginning to the end (of the beginning). **Free Radicals Research**, **31**: 261-72.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. 2000. **Free Radicals in Biology and Medicine**. 3 ed. Clarendon, Oxford, New York. 254 p.

HARTMAN, P.E., SHANKEL, D.M. 1990. Antimutagens and anticarcinogens: a survey of putative interceptor molecules. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, **15**:145-182.

HERSHKO, C. 1989. Mechanism of iron toxicity and its possible role in red cell membrane damage. **Seminars in Hematology**, **26**:277-85.

HERZ, A. 1993. Handbook of experimental pharmacology, 104: Opioids. Springer-Verlag, Berlin. SOUZA, V.C.; LORENZI, H. 2005. **Botânica Sistemática**. Nova Odessa, SP: Instituto Plantarium.

HOFFMANN, P. 2005. Malpighiales: An Introduction. Disponível em: <http://www.kew.org/>. Acesso em: 06 Out 2009.

HORTOBAGYI, G. N. 1997. Anthracyclines in the treatment of cancer. An overview, **Drugs**, **54**:1-7.

HOSTETTMANN, K.; QUEIROZ, E. F.; VIEIRA, P. C. 2003. **Princípios ativos de plantas superiores**: EdUFSCar, 152 p.

HO, C.T.; FERRARO, T.; CHEN, Q.; HOSEN, R.T.; HUANG, M.T. 1994. Phytochemicals in Teas and Rosemary and their Cancer-Preventive Properties in: Food Phytochemicals for Cancer Prevention II. Ho, C.T.; Osawa, T.; Huang, M.T.; Hosen, R.T. **American Chemical Society, Cap 1**:2-19.

HUANG, L.H.; WANG, B.G. 2004. Antioxidant capacity and lipophilic content of seaweeds collected from the Qingdao coastline. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, **58**:4993-4997.

HUIZING, M.T.; MISSER, V.H.S.; PIETERS, R.C., HUININK, W.W.T., VEENHOF, C.H.N.; VERMORKEN, J.B., PINEDO, H.M.; BEIJNEN, J.H. 1995. Taxanes: A New Class of Antitumor Agents. **Cancer Investigation**. **13**:381-404.

HUNSKAAR, S.; FASMER, O.B.; HOLE, K. 1985. The formalin test in mice, a useful technique for evaluating mild analgesia. **Journal of Neuroscience Methods**, **14**: 69076-69083.

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

HUSAIN, S.R.; CILLARD, J.; CILLARD, P. 1987. Hydroxyl radical scavenging activity of Flavonoids. **Phytochemistry**, **26**:2489-2491.

IRVING, G. A. 2005. Contemporary assessment and management of neuropathic pain. **Neurology**, **64**:21- 27.

JANEWAY, C.A.; WALPORT, P.T.M.; SHLOMCHIK, M. 2002. **Imunologia: o sistema imune na saúde e na doença**. 5.ed. Porto Alegre:Artmed, p.767.

JAWETZ, MELNICK e ADELBERG: **Microbiologia médica**. In: BROOKS, G.F.; CARROLL, K.C.; BUTEL, J.S.; MORSE, S.A. 2009. 24^a e.d. Rio de Janeiro. 830 p.

JESSEL, T.M.; KELLY, D.D. 1991. **Pain and analgesia**. In: Kandel ER, Schwartz JH, Jessel TM. Principles of neural science. New York: Elsevier, p. 385-399.

KARPINICH, N.O.; TAFANI, M.; SCHNEIDER, T.; RUSSO, M.A.; FARBER, J.L. 2006. The Course of Etoposide-Induced Apoptosis in Jurkat Cells Lacking p53 and Bax. **Journal of Cellular Physiology**, **208**:55–63.

KAWAI, M.; OGURA, T.; MAKINO, B.; MATSUMOTO, A.; YAMAMURA, H.; BUTSUGAN, Y.; HAYASHI, M. 1992. Physalins N and O from *Physalis alkekengi*. **Phytochemistry**, **31**: 4299.

KIM, H.; YONN, S.C.; LEE, T.Y.; JEONG, D. 2009. Discriminative cytotoxicity assement based on various cellular damages. **Toxicologt Letters**, **184**:13-17.

KIM, H.J.; MUN, J.Y.; CHUN, Y.J.; , CHOI, K.H.; KIM, M.Y. 2001. Bax-dependent apoptosis induced by ceramide in HL-60 cells. **FEBS Letters**, **505**:264-268.

KIZAWA, Y.; FURUYA, M.; SAITO, K.; MASUKO, T.; KUSAMA, T. 2006. Effects of Dexamethasone and Aminophylline on Survival of Jurkat and HL-60 Cells. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, **29**:281-285.

KO, E.C.; WANG, X.; FERRONE, S. 2003. Immunotheray of malignant diseases. Challenges and strategies. **International Archives of Allergy and Applied Immunology**, **132**:294-309.

KOEFLER, H.P.; MILLER, C.; NICOLSONT, M.A.; RANYARD, J.; BOSSELMANT, R.A. 1986. Increased expression of p53 protein in human leukemia cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, **83**:4035-4039.

KOSTER, R.; ANDERSON. M.; DE DEBEER, E.J. 1959. Acetic acid for analgesic screening. **Federation Proceedings**, **18**: 412-418.

KUMAR, V.; ABBAS, A.K.; FAUSTO, N. 2005. **Patologia – bases patológicas das doenças**. Rio de Janeiro: Elsevier. 1504 p.

KYUNGMI, M.S.; EBELER, E. 2008. Flavonoid effects on DNA oxidation at low concentrations relevant to physiological levels. **Food and Chemical Toxicology**,**46**:96-104.

LAINSON, R.; SHAW, J.J. 1987. Evolution, classification and geographical distribution. In: Peters WJ, Killick- Kendrick (Eds). **The leishmaniasis in Biology and Medicine**. Academic Press, 1-120.

LAPA, A.J.; SOUCCAR, C.; LIMA-LANDMAN, M.T.R.; GODINHO, R.O.; LIMA, T.C.M. 2007. Farmacologia e toxicologia de produtos naturais. In: SIMOES, C.M.O. et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6.ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFRGS, **cap.11**: 247-262.

LAPA, A.J.; SOUCCAR, C.; LIMA-LANDMAN, M.T.R.; CASTRO, M.S.A.; LIMA, T.C.M. 2008. **Métodos de avaliação da atividade farmacológica de plantas medicinais**. Setor de Produtos Naturais, Departamento de Farmacologia, UNIFESP/EPM, São Paulo. 142 p.

LIMA, M.R.F.; XIMENES, E.A.; LUNA, J.S.; SANT'ANA, A.E.G. 2006. The antibiotic activity of some Brazilian medicinal plants. **Revista Brasileira de farmacognosia**, **16**:300-306.

LIN, Y. S.; CHIANG, H. C.; KAN, W. S.; HONE, E.; SHIH, S. J.; WON, M. H. 1992. Immunomodulatory activity of various fractions derived from *Physalis angulata* L. extract. **American Journal of Chinese Medicin**, **20**: 233-43.

LOESER, J.D.; MELZACK, R.; 1999. Pain: an overview. **Pain**, **353**: 1607-1699.

LUIZ, S.O. 2006. Caracterização da resistência de amostras de *Acinetobacter baumannii* isoladas no hospital das clínicas de Curitiba. **Dissertação - Mestrado** Universidade Federal do Paraná.

LIU, F. 2005. Antioxidant activity of garlic acid from rose flowers in senescence accelerated mice. **Life Sciences**, **77**:230-240.

MAIA-ELKHOURY, A.N.S.; ALVES, W.A.; SOUSA-GOMES, M.L.; SENA, J.M.; LUNA, E.A. 2008. Visceral leishmaniasis in Brazil: trends and challenges/ Leishmaniose visceral no Brasil: evolução e desafios. **Cadernos de Saúde Pública**, **24**:2941-7.

MAKINO, B.; KAWAI, M.; OGURA, T.; NAKANISHI, M.; YAMAMURA, H.; BUTSUGAN, Y. 1995. Structural Revision of Physalin H Isolated from *Physalis angulata*. **Journal of Natural Products**, **58**:1668.

MANACH, C.; SCALBERT, A.; MORAND, C.; REMESY, C.; JIMENEZ L. 2004. Polyphenols: food source and bioavailability. **American Journal of Clinical Nutrition**, **79**:727-747.

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

MARINHO, V.M.C.; SEIDL, P.R.; LONGO, W.P. 2008. O papel governamental como ator essencial para a P&D de medicamentos – um estudo de caso. **Química Nova**, **31**:1912-1917.

MARQUES, J.O. 2004. Dor: diagnóstico e tratamento. **Bases de Anatomia e Fisiopatologia**. São Paulo: Âmbito Editora, **1**:0-10.

MATA, A.T.; PROENÇA, C.; FERREIRA, A.R.; SERRALHEIRO, M.L.M.; NOGUEIRA, J.M.F.; ARAÚJO, M.E.M. 2007. Antioxidant and antiacetylcholinesterase activities of five plants used as Portuguese food spices. **Food Chemistry**, **103**:778-86.

MATOS, F.J.A. 1997. **Introdução à Fitoquímica Experimental**, EUFC, Fortaleza, Brazil.

MC CURDY, C.R.; SCULLY, S.S. 2005. Analgesic substances derived from natural products. **Life Sciences**, **78**: 476-484.

MCRAE W.D.; HUDSON, J.B.; TOWERS, G.H.N. 1988. Studies on the pharmacological activity of Amazoniam Euphorbiaceae. **Journal of Ethnopharmacology**, **22**:143-172.

MCLAUGHLIN, J.L.; ROGERS, L.L.; ANDERSON, J.E. 1998. The use of biological assays to evaluate botanicals. **Drug Information Journal**, **32**:513-524.

MELBY, P. C.; Recent developments in leishmaniasis. 2002. **Current Opinion in Infectious Diseases**, **15**:485-90.

MELO, E.A.; GUERRA, N.B. 2002. Ação antioxidante de substâncias fenólicas naturalmente presentes em alimentos. **Boletim Informativo da Sociedade Brasileira de Ciências e Tecnologia de Alimentos**, **36**:1-11.

MELO, M.S.O.M.; MANCINI-FILHO, J. 1989. Antioxidantes naturais do fruto do dendezeiro. **Revista de Farmácia e Bioquímica da Universidade de São Paulo**, **25**:147-157.

MELLO FILHO, A.C.; HOFFMAN, M.E.; MENEGHINI R. 1983. Cell killing and DNA damage by hydrogen peroxide are mediated by intracellular iron. **Biochemical Journal**, **218**: 273-5.

MENDONÇA-FILHO, R.R.; RODRIGUES, I.A.; ALVIANO, D.S.; SANTOS, A.L.S.; SOARES, R.M.A.; ALVIANO, C.S.; LOPES, A.H.C.S.; ROSA, M.S.S. 2004. Leishmanicidal activity of polyphenolic rich extract from Husk Fiber of *Cocos nucifera* Linn. (Palmae). **Research in Microbiology**, **155**:136-43.

MEYER, B. N.; FERRIGNI, N. R.; PUTNAM, J. E.; JACOBSEN, L. B., NICHOLS, B.; MCLAUGHLIN, J. L. 1982. Brine shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents. **Journal of Medicinal Plants Research**, **45**: 31-34.

MIGUEL, M.G. 2010. Antioxidant activity of medicinal and aromatic plants. **Flavour and Fragrance Journal**, **25**:291-312.

MILES, E.A.; ZOUBOULI, P.; CALDER, P.C.; PHIL, D. 2005. Differential anti-inflammatory effects of phenolic compounds from extra virgin olive oil identified in human whole blood cultures. **Nutrition**, **21**:389-394.

MILIAUSKAS, G.; VENSKUTONIS, P.R.; VAN-BEEK, T.A. 2004. Screening of radical scavenging effect of picrolive from *Pichrorhiza kurroa* against *Leishmania donovani* infections in *Mesocricetus auratus*. **Life Sciences**, **63**:1823-1834.

MILLAN, M. J. 1999. The induction of pain: an integrative review. **Progress in Neurobiology**, **57**:1-164.

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

MMA – Ministério do Meio Ambiente. Conselho de Gestão do Patrimônio Genético. Brasília, 2010. Disponível em: <http://www.mma.gov.br/sitio/index.php?ido=conteudo.monta&idEstrutura=150&idconteudo=8277>. Acesso em: 5 mai. 2010.

MITCHELL, D.; HELLON, R. F. 1977. Neuronal and behavioral responses in rats during noxious stimulation of the tail. **Proceedings of the Royal Society Biological Science**, **197**:169–194.

MONTEIRO, P.S.; LACERDA, M.M.; ARIAS, J.R. 1994. Controle da Leishmaniose no Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, **27**:67-72.

MOREIRA, R.C.R.; REBELO, 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. **Cadernos em Saúde Pública** **18**:187-195.

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

MUIR III, W.W. 1998. Anaesthesia and pain management in horses. **Equine Veterinary Education**, **10**:335-340.

MUKHERJEE, A. K.; BASU, S.; SARKAR, N.; GHOSH, A. C. 2001. Advances in cancer therapy with plant based natural products. **Current Medicinal Chemistry**, **8**:1467-1486.

NAIKE, J.B.; JUDGE, D.R. 2009. Antiinflammatory Activity of Ethanolic and Aqueous Extracts of *Caralluma adscendens*. **Journal of Pharmacy Research** **27**:1228-1229.

NASCIMENTO, G.G.F., LOCATELLI, J., FREITAS, P.C., SILVA, G.L. Antibacterial activity of plant extracts and phytochemicals on antibiotic-resistant bacteria. 2000. **Brazilian Journal of Microbiology**, **31**:247-256.

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.

NATHAN, C. 2002. Points of control in inflammation. **Nature**, **420**:846-852.

NCCLS – National Committee for Clinical Laboratory Standards, **Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility testing**; Twelfth informational supplement M100-512, vol. 22, nº 01, 2002.

NEWMANN, D.J.; CRAGG, G.M.; SNADE, K.M. 2003. Natural products as source of new drugs over the period 1991-2002. **Journal of Natural Products**, **66**:1022-1037.

NISBET, L.J.; MOORE, M. 1997. Will natural products remain an important source of drug research for the future? **Current Opinion in Biotechnology**, **8**: 708-712.

OHKAWA, H.; OHISHI, N.; YAGI, K. 1979. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. **Analytical Biochemistry**, **95**:351-358. SANS

OKEZIE, I.A. 1998. Free radicals, oxidative stress and antioxidants in human health and disease. **Journal of the American Oil Chemist's Society**, **75**:199-212.

OKSMAN-CALDENTEY, K.; INZÉ, D. 2004. Plant cell factories in the post-genomic era: new ways to products designer secondary metabolites. **Trend in Plant Science**, **9**:433-440

OYAIZU, M. 1986. Studies on product of browning reaction prepared from glucose amine. **Japanese Journal of Nutrition**, **44**: 307-315.

PARRA, L.A.; YHEBRA, R.S.; SARDINAS, I.G.; BUELA, L.I. 2001. Comparative study of the assay of *Artemia salina* Leach and estimate of the medium lethal dose (LD50 value) in mice, to determine oral acute toxicity of plant extracts. **Phytomedicine**, **8**: 395-400.

PAULA-JUNIOR, W.; ROCHA, F.H.; DONATTI, L.; FADEL-PICHETH, C.M.T.; WEFFORT-SANTOS, A.M. 2006. Leishmanicidal, antibacterial, and antioxidant activities of *Caryocar brasiliensis* leaves hydroethanolic extract. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, **16**:625-30.

PEREIRA, R.S.; SUMITA, T.C.; FURLAN, M.R.; JORGE, A.O.C.; UENO, M. 2004. Atividade antibacteriana de óleos essenciais em cepas isoladas de infecção urinária. **Revista de Saúde Pública**, **38**:68-73.

PODSEDEK, A. 2007. Natural antioxidants capacity of brassica vegetables: a review. **LWT: Journal of Food Composition and Analysis**, **40**:1-11.

PRIETO, J.M.; RECIO, M.C.; GINER, M.R. 2006. Actividad antiinflamatoria del p-sitosterol en un modelo de hipersensibilidad retardada inducida por oxazolona. **Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas**, **5**:57-62.

PUKASKAS, A.; VAN BEEK, T.A.; DE WAARD, P. 2005. Development of a triple hyphenated HPLC-radical scavenging detection-DAD-SPE_NMR system for the rapid identification of antioxidant in complex plant extracts. **Journal of Chromatography A**, **1074**: 81-88.

RAMALHO, V.C; JORGE, N. 2006. Atividade antioxidante do α -tocoferol e do extrato de alecrim em óleo de soja purificado. **Revista- Instituto Adolfo Lutz**, **65**:15-20.

RANG, H. P.; DALE, M. M.; RITTER, J. M.; MOORE, P. K. 2003. **Farmacologia**, 5. ed. Rio de Janeiro: Elsevier. 920 p.

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.

RAINVILLE, P. 2002. Brain mechanisms of pain affect and pain modulation. **Current Opinion in Neurobiology**,**12**:195-204.

RAYCHAUDHURY, B.; BANERJEE. S.; GUPTA, S.; SINGH, R.V.; DATTA, S.C. 2005. Antiparasitic activity of a triphenyl tin complex against *Leishmania donovani*. **Acta Tropica**, **95**:1-8.

REINER, S. L.; ZHENG, S.; WANG, Z. E.; STOWRING, L.; LOCKSLEY, R. M. 1994. *Leishmania* promastigotes evade interleukin 12 (IL-12) induction by macrophages and stimulate a broad range of cytokines from CD4 t cells during initiation of infection. **Journal Experimental of Medicine**, **179**:447-456.

ROCHA, F.D.; PEREIRA, R.C.; KAPLAN, M.A.C.; TEIXEIRA, V.L. 2007. Produtos naturais de algas marinhas e seu potencial antioxidante. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, **17**: 631-639.

ROCHA, L.G.; ALMEIDA, J.R.G.S.; MACEDO, R.O.; BARBOSA-FILHO, J.M. 2005. Review of natural products with antileishmanial activity. **Phytomedicine**, **12**:514-35.

RODRÍGUEZ, M., HASEGAWA, M., GONZÁLEZ-MÚJICA, F., MOTTA, N., CASTILLO, A., CASTILLO, J., ZEA, E., MORA, K., SOUSA, L., GONZÁLEZ, A., CAMEJO, D. 2008. Antidiabetic and antiradical activities of plants from Venezuelan Amazon. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, **18**: 331-338.

RODRIGUES, F. H.; AFONSO-CARDOSO, S. R.; GOMES, M. A. B.; BELETTI, M. E.; ROCHA, A.; GUIMARÃES, A. H. B.; CANDELORO, I.; DE SOUZA, M. A. 2006. Effect of imidocarb and levamisole on the experimental infection of BALB/c mice by *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. **Veterinary Parasitology**, **139**:37-46.

ROGERS, K.A.; DeKREY, G.K.; MBOW, M.L.; GILLESPIE, R.D.; BRODSKYN, C.I.; TITUS, R.G. 2002. Type 1 and type 2 responses to *Leishmania major*. **FEMS Microbiology Letters**, **209**:1-7.

ROUMY, V.; GARCIA-PIZANGO, G.; GUTIERREZ-CHOQUEVILCA, A.L.; RUIZ, L.; JULLIAN, V.; WINTERTON, P.; FABRE, N.; MOULIS, C.; VALENTIN, A. 2007. Amazonian plants from Peru used by Quechua and Mestizo to treat malaria with evaluation of their activity. **Journal of Ethnopharmacology**, **112**:482-489.

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.

RUFINO, M. S. M.; ALVES, R. E.; BRITO, E. S.; MANCINI FILHO, J. ; MOREIRA, A. V.B. 2006. Metodologia Científica: Determinação da Atividade Antioxidante Total em Frutas no Sistema β -caroteno/Ácido Linoléico. Fortaleza, **Comunicado técnico on line**.

SACKS, D.; NOBEN-TRAUTH, N. 2002. The immunology of susceptibility and resistance to *Leishmania major* in mice. **Nature Reviews Immunology**, **2**:845-858.

SANCHEZ-MORENO, C. 2002. Compuestos polifenolicos:efectos fisiologicos. Actividad antioxidante. **Alimentaria**, **329**:29-40.

SAHPAZ, S.C.; BORIES, S.C. 1994. Cytotoxic and antiparasitic activity from *Annona senegalensis* seeds. **Planta Medica**, **60**:538-540.

SAKAGAMI, Y., KAJAMURA, K. Bactericidal activities of desinfectants against vancomycin –resistant *Enterococci*. 2002. **Journal of Hospital Infection**, **50**:140-144.

SANTOS, R.I. 2007. Metabolismo Básico e origem dos metabólitos secundários. In: SIMÕES C. et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6.ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora UFRGS, **cap.16**:403-434.

SBED – Sociedade Brasileira para o Estudo da Dor. Disponível em: <http://www.dor.org.br/publico/impactos.asp>. Acesso em 04/02/2010.

SCHIANTARELL, P.; CADEL, S.; ACERBI, D.; PAVESI, L. 1982. Antiinflammatory activity and Bioavailability of percutaneous piroxican. **Arzneim.- Forsch./Drug Research**, **32**:230-235.

SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; PETROVICK, P.R. 2007. Produtos de origem vegetal e o desenvolvimento de medicamentos. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6. ed. – Porto Alegre: UFRS; Florianópolis: UFSC, **cap. 15**: 371-400.

SERENO, D.; SILVA, C.; MATHIEU-DAUDE, F.; QUAISSI, A. 2007. Advances and perspectives in *Leishmania* cell based drug-screening procedures. **Parasitology International**, **56**:3-7.

SHIMIZU, M.; TOMOO, T. 1994. Anti-inflammatory constituents of topically applied crude drugs. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, **17**: 665-667.

SHAHIDI, F., JANITHA, P.K., WANASUNDARA, P.D. 1992. Phenolic antioxidants. **CRC Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, **32**:67-103.

SIES, H. 1993. Strategies of antioxidant defence. Review. **European Journal of Biochemistry**, **215**: 213-219.

SIES, H., STAHL, W. 1995. Vitamins E and C, β -carotene, and other carotenoids as antioxidants. **American Journal of Clinical Nutrition**, **62**: 1315-1321.

SIES, H.; STAHL, W.; SEVANIAN, A. 2005. Nutrition, dietary and postprandial oxidative stress. **Journal of Nutrition**, **135**:969-972.

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.

SILVA, C.T.; REIS, G.G.; REIS, M.G.F.; ELIAS SILVA, E.; CHAVES, R.A. 2004. Avaliação temporal da florística arbórea de uma floresta secundária no município de Viçosa, Minas Gerais. **Revista Árvore**, **28**:429-441.

SILVA, N.R.S. 2002. Florística e estrutura horizontal de uma floresta estacional semidecidual montana – Mata do Juquinha de Paula, Viçosa, MG. **Dissertação de Mestrado**-Universidade Federal de Viçosa.

SILVA, C.D. 2009. *Combretum leprosum* Mart. (Combretaceae) – Avaliação da atividade anti-inflamatória tópica em modelos de inflamação de pele aguda e crônica em camundongos. **Dissertação de Mestrado** – Universidade Federal do Paraná.

SIMONI, I.C.; MANHA, A.P.S.; SCIESSERE, L.; HOE, V.M.H.; TAKINAMI, V.H.; FERNANDES, M.J.B. 2007. Evaluation of the antiviral activity of Brazilian cerrado plants against animal viruses. **Virus Reviews & Research**, **12**:1-17.

SINDERMANN, H.; CROFT, S.L.; ENGEL, K.R.; BOMMER, W.; EIBL, H.J.; UNGER, C.; ENGEL, J. 2004. Miltefosine (Impavidio): the first oral treatment against leishmaniasis. **Medical Microbiology and Immunology**, **193**: 173-180.

SINGH, U.; JIALAL, L. 2004. Anti-inflammatory effects of alpha-tocopherol. **Annals of the New York Academy of Sciences**, **1031**:195-203.

SIQUEIRA, J.M.; BOMM, M.D.; PEREIRA, N.F.G.; GARCEZ, W.S.; BOAVENTURA, M.A.D. 1998. Estudo fitoquímico de *Unonopsis lindmanii* – Annonaceae, biomonitorado pelo ensaio de toxicidade sobre a *Artemia salina* Leach. **Química Nova**, **21**:557-559.

SIQUEIRA, S. 2010. Atividades biológicas de extratos de *Solanum paludosum* Moric. obtidos por maceração e extração supercrítica. **Dissertação de mestrado** – Universidade de São Paulo.

SOBRINHO, F.A.P. 2007. Conhecimento etnobotânico de mateiros residentes no entorno de Unidades de Conservação no estado do Rio de Janeiro. **Dissertação de Mestrado** - Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro.

SOKOLOVSKAYA, A.A.; ZABOTINA, T.N.; BLOKHIN, D.YU.; KADAGIDZE, Z.G.; BARYSHNIKOV, A.YU. 2001. Comparative analysis of apoptosis induced by various anticancer drugs in jurkat cells. **Experimental Oncology**, **23**:46-50.

SOUZA, O.V.; SOARES JÚNIOR, D.T.; DEL-VECHIO, G.; MATTOSINHOS, R.G.; GATTASS, C.R.; KAPLAN, M. A. 2004. Atividades antinociceptiva e anti-inflamatória do óleo essencial de cascas de *Duguetia lanceolata* St. Hil., Annonaceae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, **14**:11-14.

SULTANA, B.; ANWAR, F.; PRZYBYLSKI, R. 2007. Antioxidant activity of phenolic components present in barks of *Azadirachta indica*, *Terminalia arjuna*, *Acacia nilotica*, and *Eugenia jambolana* Lam. trees. **Food Chemistry**, **104**:1106-14.

SVILAAS, A.; SAKHI, A.K.; ANDERSEN, L.F.; SVILAAS, T.; STROM, E.C., JACOBS, JR., D.R.; OSE, L.; BLOMHOFF, R. 2004. Intakes of antioxidants in coffee, and vegetables are correlated with plasma carotenoid in humans. **Journal of Nutrition**, **3**: 562-567.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. 2004. **Fisiologia Vegetal**, 3. Ed. Porto Alegre: Artmed. p.310-334.

TJOLSEN, A.; BERGE, O.; HUNSKAAR, S.; ROSLAND, J.H.; HOLE, K. 1992. The formalin test: an evaluation of the method. **Pain**, **51**: 5-17.

TORRES-SANTOS, E.C.; LOPES, D.; OLIVEIRA, R.R.; CARAUTA, J.P.P.; FALCÃO, C.A.B.; KAPLAN, M.A.C.; ROSSI-BERGMANN, B. 2004. Antileishmanial activity of isolated triterpenoids from *Pourouma guianensis*. **Phytomed**, **11**:114-20.

TRABULSI, L.R. ; Alterthum, F. 2005. **Microbiologia**. Atheneu 5 a ed., São Paulo. 780 p.

TRINDADE, E.F.S. 2007. Atributos físico-hídricos e matéria orgânica do solo em função de sistemas de uso e manejo da vegetação secundária. **Dissertação de Mestrado** – Universidade Federal Rural da Amazônia.

VALKO, M.; LEIBFRITZ, D.; MONCOL, J.; CRONIC, M.T.D.; MILAN, M.; TELSER, J. 2006. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, **32**:3-41.

VILCEK, J.; FELDMAN, M.; 2004. Historical review: cytokines as therapeutic and targets of therapeutics. **Trends Pharmacologic sciences**, **25**:201-209.

VOULDOUKIS, I.; ROUGIER, S.; DUGAS, B.; PINO, P.; MAZIER, D.; WOEHRLE, F. 2006. Canine visceral leishmaniasis: comparison of *in vitro* leishmanicidal activity of marbofl oxacin, meglumine antimoniate and sodium stibogluconate. **Veterinary Parasitology**, **135**:137-46.

WALL, M.E.; WANI, M.C.; HUGHES, T.S.; TAYLOR, H. 1988. Plant antimutagenic agents, 1. General bioassay and isolation procedures. **Journal of Products Natural**, **51**: 866-873.

WANI, M.C.; TAYLOR, H.L.; WALL, M.E.; COGOON, P., MCPHAIL, A.T. 1971. Plant antitumor agent. VI. The isolation and structure of taxol, a novel antileukemic and antitumor agent from *Taxus brevifolia*. **Journal of the American Chemical Society**, **93**:2325-2327.

WARREN, LG. 1960. Metabolism of *Schizotrypanum cruzi* Chagas. I. Effect of culture age and substrate concentration on respiratory rate. **Journal of Parasitology**, **46**:529-539.

WHITTLE, B.A. 1964. Release of a kinin by intraperitoneal injection of chemical agents in mice. **Jornal of Neuropharmacology**, **3**:369-378.

WHO – World Health Organization. Disponível em <
http://www.who.int/leishmaniasis/disease_epidemiology/en/index.html >.
Acesso em 05 mai. 2010.

WHO - World Health Organization. **World Cancer Report, 2008**. International Agency for Research on Cancer, 2009.

WONG ,J.W.; HASHIMOTO, K.; SHIBAMOTO, T. 1995. Antioxidant Activities of Rosemary and Sage Extracts and Vitamin E in a Model Meat System. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, **43**:2707-2712.

YOUNG, F.E. 2008. Lacistemataceae Holistic Database. Disponível em: **www.lacistemataceae.org**. Acesso em 02 Mar 2009.

ZHANG, T.; MAEKAWA, Y.; SAKAI, T.; NAKANO, Y.; ISHII, K.; HISAEDA, H.; DAINCHI,T.; ASAO, T.; KATUNUMA,N.; HIMENO, K. 2001. Treatment with cathepsin L inhibitor potentiates T_h2-type immune response in *Leishmania major* infected BALB/c mice. **International Immunology**, **13**:975-982.