

Universidade Federal de Juiz de Fora  
Faculdade de Farmácia  
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas  
Mestrado em Ciências Farmacêuticas

Carlos Cerqueira Magalhães

**CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA E ATIVIDADES  
FARMACOLÓGICAS DE *Hortia brasiliiana* Vand. ex DC.**

Juiz de Fora

2012

**CARLOS CERQUEIRA MAGALHÃES**

**CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA E ATIVIDADES  
FARMACOLÓGICAS DE *Hortia brasiliiana* Vand. ex DC.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Juiz de Fora como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas. Área de Concentração: Produtos Naturais Bioativos.

Orientador: Prof. Dr. Orlando Vieira de Sousa  
Co-Orientadores: Prof. Dr. Daniel Sales Pimenta  
Profa. Dra. Luciana Moreira Chedier

Juiz de Fora  
2012

**CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA E ATIVIDADES FARMACOLÓGICAS**  
**DE *Hortia brasiliiana* Vand. ex DC.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Juiz de Fora como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas. Área de Concentração: Produtos Naturais Bioativos.

Banca Examinadora:

---

Profa. Dra. Sílvia Ribeiro de Souza  
Faculdade de Ciências da Saúde – Universidade de Brasília

---

Profa. Dra. Rozângela Magalhães Manfrini  
Faculdade de Farmácia – Universidade Federal de Juiz de Fora

---

Prof. Dr. Orlando Vieira de Sousa – Orientador  
Faculdade de Farmácia – Universidade Federal de Juiz de Fora

Juiz de Fora (MG), 13 de julho de 2012

**Dedico:**

À família - minha mãe, verdadeira sacerdotisa e exemplo de dedicação; meu pai, incansável pesquisador; meus irmãos e companheiros de estudo: Ricardo Augusto, artista e colega farmacêutico; Marcelo, apoiador inicial do meu mestrado.

À minha querida vó Maria (*in memoriam*) que não pôde realizar o sonho de ver o neto se formando.

À todos aqueles que se dedicam ao uso das plantas medicinais para a melhoria da saúde da humanidade.

## AGRADECIMENTOS

À Misericórdia Divina, generoso auxílio na caminhada da vida...

Aos orientadores, sem os quais não seria possível o desenvolvimento deste trabalho:

Prof. Dr. Orlando Vieira de Sousa, por ter aceitado me orientar, pela dedicação e conselhos.

Prof. Dr. Daniel Sales Pimenta, por ter me avisado deste programa de mestrado, pelo comprometimento e constante estímulo.

Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup> Luciana Moreira Chedier, pela simpatia e humildade, nunca se negando a esclarecer uma dúvida.

À Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Juiz de Fora pela oportunidade da realização do mestrado.

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

Ao pessoal do Laboratório de Botânica, em especial, à amiga de mestrado, Cristiane, com sua sensibilidade, ao mestrando Arthur, atencioso e experiente usuário dos equipamentos, e aos graduandos Luiz Fernando e Ana Patrícia, que auxiliaram nos experimentos.

À técnica do laboratório, Msc Flávia Ferrari, pela gentileza e presteza em ajudar.

A todo o pessoal do departamento de Botânica, sempre receptivos.

Ao pessoal do Laboratório de Farmacologia dos Produtos Naturais, em especial, Carolina, pelo apoio nos testes.

Aos colegas de mestrado, em especial, ao amigo Nicolás, a quem devo importantes esclarecimentos, juntamente com Lidiane e Érika compartilhando dificuldades e boas conversas.

À todos os professores, entre eles à Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup> Silvana, pela arte em “dar puxões de orelha” e Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup> Antônia, pelas explicações extras.

À doutoranda Ana Cristina, pelo interesse e montagem das fotomicroscopias.

Ao pessoal do Herbário CESJ, em especial Prof. Dr. Fabrício Dittrich, que me orientou nas exsiccatas, identificação botânica e fotografias; e Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup> Fátima Salimena, que me passou o artigo botânico mais completo da espécie trabalhada.

À equipe de Farmanguinhos (FIOCRUZ), pelas análises realizadas.

Ao Prof. Dr. Milton Groppo, pela identificação botânica da espécie trabalhada.

À Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Tânia Toledo, que forneceu importante material bibliográfico.

Ao Prof. Petrilo, pelas aulas gratuitas de inglês.

À doutoranda Mariza Abreu, pelo carinho e atenção.

Ao amigo farmacêutico Prof. Dr. Camilo Amaro, pelo incentivo.

Ao Gleudson, amigo de graduação, que desde lá preveu o caminho que eu seguiria, me presenteando com o livro Farmacognosia: da planta ao medicamento.

Aos amigos Graça, Clóvis e Nágela, que me ajudaram a tomar conta das minhas obrigações enquanto estive fora de casa.

À Mônica Mara, pelo incentivo inicial.

À todos meus amigos das terapias naturais, em especial, Aristides, Pedro, o casal João e Graça, Lenildo, Giani, à equipe da Farmácia Natural Saúde e Vida Plena, na pessoa do coordenador Drauzio Vieira, à equipe do Centro Alternativo de Formação Popular Rosa Fortini, representado pelas diretoras Eusa e Euza, ao grupo Entre-Folhas da UFV, na pessoa do Prof. Dr. Vicente Casali e Alessandra Aziz.

Aos meus familiares em geral e à todos meus amigos, representados pelo Domênico, Fábio e Luiz Cláudio.

Aos amigos adquiridos em Juiz de Fora: no grupo antroposófico, em especial Mathias; na Nova Acrópole, na pessoa do Marcus; na república, Mateus; no Aikidô, representado pelos comprometidos senseis Alfredo e Sven; à Iraceli, que certa vez me disse que, com nossos iguais nos fortalecemos, mas é com nossos diferentes que crescemos.

*A mais bela e profunda experiência é a sensação do mistério. Ela é semeadora de toda verdadeira ciência.*

Albert Einstein

*Que é mais importante: descobrir a finalidade da vida ou libertar a mente de seu próprio condicionamento, para depois investigar? Talvez, quando a mente estiver livre de condicionamento, essa liberdade, em si, seja a finalidade.*

Jiddu Krishnamurti

MAGALHÃES, C.C. **Caracterização química e atividades farmacológicas de *Hortia brasiliiana* Vand. ex DC.** 2012. 129f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas). Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, Minas Gerais.

## RESUMO

*Hortia brasiliiana* Vand. Ex DC (Rutaceae), conhecida como "para-tudo" ou "casca-d'anta", tem sido usada na medicina popular como depurativa do sangue, para problemas estomacais, controle da diabetes, para combater febre, diarreia, vômito, doenças do fígado, cólicas renais e possui atividades anti-inflamatória, antimicrobiana e hipotensora. O presente trabalho teve como objetivo realizar uma caracterização química e avaliar as atividades antinociceptiva e anti-inflamatória dos extratos de *H. brasiliiana*. Folhas, cascas do ramo lateral e cascas do tronco foram coletadas em Muriaé e Juiz de Fora, MG, para obtenção de óleos essenciais e extratos hexânicos, metanólicos e aquosos. Uma amostra de folhas foi utilizada para análise morfo-anatômica. A caracterização química dos extratos foi feita por CG-EM, CLAE-UV e CCD. A atividade antinociceptiva foi avaliada pelos testes de contorções abdominais, formalina e placa quente, enquanto a atividade anti-inflamatória pelos métodos de edema de pata e pleurisia. Os dados foram demonstrados como média  $\pm$  erro padrão e análise de variância seguida do teste de Newman-Keuls para medir o grau de significância ( $p < 0,05$ ). A avaliação morfo-anatômica foliar demonstrou a presença de cavidades secretoras em vários tamanhos e estruturas com afluência. Entre os componentes dos óleos essenciais destacaram-se: *Epi*- $\alpha$ -cadinol, zingibereno, *Z*- $\alpha$ -trans-bergamotol, *E*- $\beta$ -guaieno,  $\alpha$ -bisabolol, *E*-hidrato de sesquibabineno,  $\beta$ -sesquifelandreno, oplopanona,  $\alpha$ -curcumeno, guaiol e óxido de cariofileno ainda não relatados na espécie. Os espectros de UV indicaram a presença de derivados do ácido cinâmico e flavonoides. Terpenoides, ácidos graxos, esteroides, ácidos fenólicos e cumarinas foram detectados por CCD. Os extratos hexânicos apresentaram atividades antinociceptiva e anti-inflamatória pelos métodos empregados. Os resultados obtidos sugerem que *H. brasiliiana* é uma fonte de substâncias bioativas com atividades antinociceptiva e anti-inflamatória, o que pode justificar o uso popular para algumas disfunções orgânicas.

**Palavras-chave:** *Hortia brasiliiana*. Rutaceae. Caracterização morfo-anatômica. Caracterização química. Atividades farmacológicas.

MAGALHÃES, C.C. **Chemical characterization and pharmacological activities of *Hortia brasiliiana* Vand. ex DC.** 2012. 129f. Dissertation (Master of Pharmaceutical Sciences). Graduate Program in Pharmaceutical Sciences. Faculty of Pharmacy, Federal University of Juiz de Fora, Juiz de Fora, Minas Gerais.

## ABSTRACT

*Hortia brasiliiana* Vand. Ex DC (Rutaceae), known as "para-tudo" or "casca-d'anta" has been used in folk medicine as blood depurative, for stomach disorders, diabetes control, to combat fevers, diarrhea, vomiting, liver disease, renal colic and has anti-inflammatory, antimicrobial and hypotensive activities. The present work aims to perform a chemical characterization and evaluate the pharmacological activities of the extracts of *H. brasiliiana*. Leaves, lateral branch barks and trunk barks were collected in Muriaé and Juiz de Fora, MG, to obtain essential oils and hexane, methanolic and aqueous extracts. A sample of leaves was used to analyze morphological and anatomical. The chemical characterization of the extracts was performed by GC-MS, HPLC-UV and TLC. The antinociceptive activity was evaluated by writhing, formalin and hot plate tests, while the anti-inflammatory activity by paw edema and pleurisy methods. The data are expressed as mean  $\pm$  standard error and analysis of variance followed by Newman-Keuls test to measure the degree of significance ( $p < 0.05$ ). The assessment of morphological and anatomical leaf showed the presence of secretory cavities in various sizes and glands with outcrop. Among the components of essential oils were identified: *Epi*- $\alpha$ -cadinol, zingiberene, *Z*- $\alpha$ -trans-bergamotol, *E*- $\beta$ -guaiene,  $\alpha$ -bisabolol, *E*-hidrato de sesquisabinene,  $\beta$ -sesquiphellandrene, oplopanone,  $\alpha$ -curcumene, guaiol and caryophyllene oxide, not yet reported in this species. UV spectra indicated the presence of cinnamic acid derivatives and flavonoid. Terpenoids, fatty acids, steroids, coumarins and phenolic acids were detected by TLC. The hexane extracts showed antinociceptive and anti-inflammatory for the employed methods. The results suggest that *H. brasiliiana* is a source of bioactive compounds with antinociceptive and anti-inflammatory activities, which may justify the popular use in some organ dysfunctions.

**Keywords:** *Hortia brasiliiana*. Rutaceae. Morpho-anatomical characterization. Chemical characterization. Pharmacological activities.

## Lista de Figuras

	P.
Figura 1. Exemplo de alcaloide derivado do ácido antranílico: dictamina.....	8
Figura 2. Novos tipos de limonoides em <i>H. brasiliiana</i> .....	10
Figura 3. Derivados de ácidos diidrocinâmicos e alcaloide, isolados de <i>H. brasiliiana</i> Vand. ex DC. e <i>Hortia oredica</i> Groppo, Kallunki & Pirani.	11
Figura 4. Substâncias isoladas de <i>Hortia longifolia</i> .....	12
Figura 5. Aspecto geral da morfologia externa da copa de <i>Hortia brasiliiana</i> Vand. ex DC., São Fernando, distrito de Muriaé-MG.....	13
Figura 6. Inflorescências de <i>Hortia brasiliiana</i> Vand. ex DC., Juiz de Fora-MG.....	14
Figura 7. Fruto de <i>Hortia brasiliiana</i> Vand. ex DC., Juiz de Fora-MG.....	15
Figura 8. Sesquiterpenos inéditos em <i>H. brasiliiana</i> .....	17
Figura 9. Derivados do ácido cinâmico de <i>H. brasiliiana</i> .....	18
Figura 10. Biossíntese resumida das cumarinas.....	18
Figura 11. Cumarinas encontradas em <i>H. brasiliiana</i> .....	19
Figura 12. Diversificação de arilpropanoides baseada na via geral desta classe.....	21
Figura 13. Via biossintética dos isoprenoides na célula vegetal.....	23
Figura 14. Representantes de monoterpenoides: a) acíclico b) monocíclico e c) bicíclico.....	24
Figura 15. Representantes dos sesquiterpenoides: a) acíclico b) monocíclico e c) bicíclico.....	24
Figura 16. Formação de subgrupos de sequiterpenoides.....	25
Figura 17. Esquema ilustrativo da migração de leucócitos através do endotélio vascular.....	28
Figura 18. Esquema simplificado da biossíntese de prostaglandinas.....	29
Figura 19. Cortes transversais de lâmina foliar de <i>Hortia brasiliiana</i> Vand. ex DC.....	45
Figura 20. Comparação da quantidade de estruturas secretoras presentes nas folhas de <i>Hortia brasiliiana</i> .....	46
Figura 21. Espectro de massas do <i>Epi-<math>\alpha</math>-cadinol</i> , constituinte majoritário do	

	óleo essencial da Amostra 2 de <i>H. brasiliiana</i> .....	49
Figura 22.	Espectro de massas do zingibereno, 2º constituinte majoritário em todas as coletas e horários da Amostra 2 de <i>H. brasiliiana</i> .....	49
Figura 23.	Espectro de massas do <i>Z-α</i> -trans-bergamotol, 1º majoritário em todas as coletas da Amostra 3 e 3º majoritário nas coletas HM1, HT1 e HT3 da Amostra 2 de <i>H. brasiliiana</i> .....	50
Figura 24.	Espectro de massas do <i>E-β</i> -guaiano, 1º majoritário na coleta HM1 e 3º em HM2, da Amostra 2 de <i>H. brasiliiana</i> .....	50
Figura 25.	Espectro de massas do <i>α</i> -bisabolol, 3º majoritário na coleta HM3 e HN1 da Amostra 2 de <i>H. brasiliiana</i> .....	51
Figura 26.	Espectro de massas do <i>E</i> -hidrato de sesquisabineno, 3º majoritário na coleta HT2 e HN2 da Amostra 2 de <i>H. brasiliiana</i> .....	51
Figura 27.	Espectro de massas do <i>β</i> -sesquifelandreno, 3º majoritário na coleta HN3 da Amostra 2 e de FG da Amostra 3 de <i>H. brasiliiana</i> ....	52
Figura 28.	Comparação das classes A, B e C por área dos constituintes do óleo essencial das folhas de <i>H. brasiliiana</i> , na média das repetições dos três turnos de coleta (Amostra 2).....	52
Figura 29.	Espectro de massas do oplopanona, 2º majoritário na coleta FN da Amostra 3 de <i>H. brasiliiana</i> .....	55
Figura 30.	Espectro de massas do <i>α</i> -curcumeno, 2º majoritário na coleta FG e 3º na coleta FM da Amostra 3 de <i>H. brasiliiana</i> .....	55
Figura 31.	Comparação das classes A, B e C, por área dos constituintes do óleo essencial da folha madura (FM) e folha nova (FN) de <i>H. brasiliiana</i> (Amostra 3).....	56
Figura 32.	Comparação das classes A, B e C, por área dos constituintes do óleo essencial de <i>H. brasiliiana</i> : folha madura (FM), folha nova (FN), folha de indivíduo em estágio de frutificação (FG), HM1, 2 e 3 (coleta matutina), HT 1, 2 e 3 (coleta vespertina), HN1, 2 e 3 (coleta noturna).....	57
Figura 33.	Efeitos dos extratos hexânicos de <i>H. brasiliiana</i> sobre as contorções induzidas por ácido acético 0,6% em camundongos.....	69

## Lista de Tabelas

		P.
Tabela 1.	Principais constituintes químicos do óleo essencial das folhas de <i>H. brasiliiana</i> (Amostra 2) identificados por CG-EM.....	48
Tabela 2.	Principais constituintes químicos do óleo essencial das folhas de <i>H. brasiliiana</i> (Amostra 3) identificados por CG-EM.....	54
Tabela 3.	Constituintes químicos do extrato hexânico das diferentes partes de <i>H. brasiliiana</i> identificados por CG-EM.....	59
Tabela 4.	Análise por CCD de extratos hexânicos, metanólicos e aquosos de <i>H. brasiliiana</i> .....	62
Tabela 5.	Análise em CLAE-UV da área dos constituintes majoritários do extrato hexânico de <i>H. brasiliiana</i> por tempo de retenção.....	63
Tabela 6.	Análise em CLAE-UV da área dos constituintes majoritários do extrato metanólico de <i>H. brasiliiana</i> por tempo de retenção.....	64
Tabela 7.	Análise em CLAE-UV da área dos constituintes majoritários do extrato aquoso de <i>H. brasiliiana</i> por tempo de retenção.....	65
Tabela 8.	Possíveis constituintes em <i>H. brasiliiana</i> comparados com UVs da literatura.....	68
Tabela 9.	Efeitos dos extratos hexânicos de <i>H. brasiliiana</i> sobre a nocicepção induzida por formalina em camundongos.....	71
Tabela 10.	Efeitos dos extratos hexânicos de <i>H. brasiliiana</i> sobre o tempo de reação (s) de camundongos expostos à placa quente.....	72
Tabela 11.	Efeitos dos extratos hexânicos de <i>H. brasiliiana</i> sobre o edema de pata induzido por carragenina.....	74
Tabela 12.	Efeitos dos extratos hexânicos de <i>H. brasiliiana</i> sobre o volume de exsudato e o número de leucócitos na pleurisia induzida por carragenina.....	75

## Lista de abreviaturas e símbolos

A	extrato aquoso
AA	ácido araquidônico
AINES	anti-inflamatórios não esteroides
AMP	adenosina monofosfato
ArC	substâncias aromáticas com uma cadeia lateral
CAT	catalase
CCD	cromatografia em camada delgada
CG-EM	cromatografia com fase gasosa acoplada à espectrometria de massas
CEEA	Comitê de Ética na Experimentação Animal
CLAE-UV	cromatografia líquida de alta eficiência associada à espectroscopia do ultravioleta
COX	ciclooxigenase
DMAPP	difosfato ou pirofosfato de dimetilalila éster alílico
DRG	Dragendorff
DXP 5	fosfato 1-deoxi- <i>D</i> -xilulose fosfato
DXR 5	fosfato de 1-deoxi- <i>D</i> -xilulose redutoisomerase
DXS 5	fosfato de 1-deoxi- <i>D</i> -xilulose sintase
E	trans
EI	ionização por elétrons
eV	elétron volts
FCab/ad	folha média abaxial/adaxial de <i>Hortia brasiliana</i>
FDab/ad	folha grande abaxial/adaxial de <i>Hortia brasiliana</i>
FG	folha de <i>Hortia brasiliana</i> de indivíduo em estágio de frutificação
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
FM	folha madura de <i>Hortia brasiliana</i>
FN	folha nova de <i>Hortia brasiliana</i>
FN-κB	fator nuclear potencializador de cadeia kappa em células B ativadas
FPab/ad	folha pequena abaxial/adaxial de <i>Hortia brasiliana</i>
FPP	pirofosfato de farnesila
GGPP	difosfato de geranilgeranila

GPP	pirofosfato de trans-geranila
GPx	glutathiona peroxidase
H	extrato hexânico
HMG	hidroximetilglutaril
HMGCoA	3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A
HM 1, 2 e 3	folha de <i>Hortia brasiliiana</i> de coletas matutinas
HT 1, 2 e 3	folha de <i>Hortia brasiliiana</i> de coletas vespertinas
HN 1, 2 e 3	folha de <i>Hortia brasiliiana</i> de coletas noturnas
ICAM	moléculas de adesão intercelular
Ig	imunoglobulina
IL	interleucina
iNOX	óxido nítrico sintase induzida
IP	fosfatidilinositol
IPP	pirofosfato de isopentenila
IR-c.	índice de retenção calculado
IR-l.	índice de retenção da literatura
LB	Liebermann-Burchard
M	extrato metanólico
MDA	malondialdeído
NMDA	n-metil D-aspartato
NP/PEG	difenilboriloxietilamina/polietilenoglicol
PAF	fator de agregação plaquetária
PEP	fosfoenolpiruvato
PG	prostaglandinas
PL	fosfolipase
RBC	citrato de ranitidina bismuto
SOD	superóxido dismutase
TFA	ácido trifluoracético
TNF	fator de necrose tumoral <i>p/v</i> peso por volume
TR	tempo de retenção
TX	tromboxanas
VCAM	moléculas de adesão celular-vascular
VS	vanilina sulfúrica
Z	cis

## SUMÁRIO

	P.	
<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>3</b>
2.1	INTERCÂMBIO MEDICINA POPULAR E CIÊNCIA.....	3
2.2	FAMÍLIA RUTACEAE.....	7
2.3	GÊNERO <i>Hortia</i> .....	8
2.4	<i>Hortia brasiliana</i> VAND. EX DC.....	12
2.5	ÓLEOS ESSENCIAIS.....	19
2.6	PROCESSO INFLAMATÓRIO E AÇÃO ANTI-INFLAMATÓRIA.....	26
2.6.1	Substâncias de origem vegetal com atividade anti-inflamatória....	31
2.7	IMPORTÂNCIA DOS MÉTODOS DE ANÁLISES APLICADOS AOS PRODUTOS NATURAIS.....	32
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>36</b>
3.1	OBJETIVO GERAL.....	36
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	36
<b>4</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>37</b>
4.1	COLETA DO MATERIAL VEGETAL.....	37
4.2	CARACTERIZAÇÃO MORFOANATÔMICA DAS FOLHAS.....	38
4.3	PROCESSOS DE EXTRAÇÃO.....	38
4.3.1	Óleo essencial.....	38
4.3.2	Extratos hexânicos e metanólicos.....	39
4.3.3	Extratos aquosos.....	39
4.4	CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA.....	39
4.5	ATIVIDADES ANTINOCICEPTIVA E ANTI-INFLAMATÓRIA.....	41
4.5.1	Animais.....	41
4.5.2	Teste de contorções abdominais.....	41
4.5.3	Teste de formalina.....	42
4.5.4	Teste da placa quente.....	42
4.5.5	Edema de pata induzido por carragenina.....	42
4.5.6	Pleurisia induzida por carragenina.....	43

4.6	ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	43
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	44
5.1	CARACTERIZAÇÃO MORFOANATÔMICA DAS FOLHAS.....	44
5.2	CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DO ÓLEO ESSENCIAL DAS FOLHAS (AMOSTRA 2).....	47
5.3	CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DO ÓLEO ESSENCIAL DAS FOLHAS (AMOSTRA 3).....	53
5.4	CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DOS EXTRATOS HEXÂNICOS.....	58
5.5	COMPARAÇÃO QUÍMICA DOS EXTRATOS HEXÂNICOS, METANÓLICOS E AQUOSOS.....	61
5.5.1	Análise por cromatografia em camada delgada.....	61
5.5.2	Análise por cromatografia líquida de alta eficiência associada à espectroscopia do ultravioleta.....	62
5.6	AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES ANTINOCICEPTIVA E ANTI-INFLAMATÓRIA DOS EXTRATOS HEXÂNICOS.....	69
5.6.1	Efeitos sobre as contorções induzidas por ácido acético 0,6%.....	69
5.6.2	Efeitos sobre a nocicepção induzida por formalina.....	70
5.6.3	Efeitos sobre o tempo de reação de camundongos expostos à placa quente.....	71
5.6.4	Efeitos sobre o edema de pata induzido por carragenina.....	73
5.6.5	Efeitos sobre a pleurisia induzida por carragenina.....	74
6	CONCLUSÕES.....	77
	REFERÊNCIAS.....	79

## 1 INTRODUÇÃO

Atualmente muito se fala sobre fitoterapia, termo criado pelo médico francês, Henri Leclerc (1870-1955), *phyton* = planta e *therapeia* = tratamento (SILVA; BARBOSA; ALBUQUERQUE, 2010), mas a prática é tão antiga quanto o próprio homem, existindo registros em cavernas, de seu uso no sul da Ásia, pelo homem de Neanderthal, há quase 60.000 mil anos (SILVA, 2009).

No Oriente, aproximadamente 3000 a.C surgem os primeiros registros literários, no livro 'Ayurveda', da coletânea dos Vedas, na Índia (ROCHA, 2010) e na China, no '1º Pen T'sao', um estudo, de 365 drogas, realizado pelo imperador Shen Nung, considerado fundador da farmácia chinesa (PARKY, 1966).

No Ocidente, há citações do grego Hipócrates (460 a.C.), considerado o pai da medicina, com a obra '*Corpus Hippocraticum*', e também por outros famosos estudiosos da história, como Galeno (129 – 199, d.C.), Avicena (980 – 1.037, d.C.), e Paracelsus (1.493 – 1.541 d.C). Este último descreveu que a dose pode definir um remédio ou um veneno (BARROS, 2002; CORREA; SIQUEIRA-BATISTA; QUINTAS, 2006).

Este perpétuo vínculo entre o homem e as plantas medicinais influenciou e determinou o rumo da história da humanidade, não só na área da saúde como também na economia, política, social e outras. Com o advento da revolução industrial, o uso terapêutico das plantas foi considerado algo empírico e sem base científica, sendo substituído por fármacos que eram sintetizados em laboratório (YUNES; CALIXTO, 2001). A assistência à saúde passou a seguir a orientação cartesiana e mecanicista, a qual atendia plenamente aos interesses do modo de produção capitalista (ALVIM *et al.*, 2006).

Nos últimos anos, devido ao surgimento e a incapacidade de tratamento de muitas doenças, houve um forte retorno da fitoterapia. Além disso, a necessidade de medicamentos mais baratos e menos agressivos aliados à revalorização da atenção aos componentes psicológicos, emocionais e sociais da doença, e não apenas à patologia de órgãos e sistemas, nortearam o retorno do uso de matéria vegetal no tratamento de enfermidades (AVILA-PIRES, 1995). Neste sentido, o reconhecimento do valor das plantas medicinais vem se concretizando como fator de utilização

clínica, farmacêutica, econômica e comercial, que tem crescido progressivamente no Brasil e no mundo (ZIBETTI, 2007).

Segundo estimativa da ABIFISA - Associação Brasileira das Empresas do Setor Fitoterápico, Suplemento Alimentar e de Promoção da Saúde - o setor fitoterápico brasileiro movimentava anualmente R\$ 1 bilhão em toda sua cadeia produtiva, conta com 200 empresas e emprega mais de 100 mil pessoas (TORRES; SOUZA, 2010). Esses números referem-se apenas ao mercado formal, e segundo Lapa (2010), grande parte deste movimento no Brasil se dá de modo informal. Baseado neste relato é possível considerar que os fitoterápicos representam cerca de 10% do mercado de medicamentos (ASSAD, 2010).

De acordo com dados do Ministério da Saúde, de 2004 até 2008, houve um aumento de 300% na quantidade de municípios que inseriram a fitoterapia em hospitais e postos de saúde, aumento este que foi intensificado com a criação da portaria Nº 971, de 03 de maio de 2006, e com a divulgação de 71 espécies vegetais viáveis ao consumo humano para tratamento de doenças (BRASIL, 2011).

Paralelamente a esse crescimento surgiu a necessidade da conscientização da utilização racional e sustentável das plantas medicinais (TOLEDO *et al.*, 2003), incluindo um maior controle da qualidade dos produtos por ela gerados, o que vem acontecendo com o auxílio de técnicas cromatográficas (SIMÕES *et al.*, 2004).

A família Rutaceae é constituída por vegetais que são conhecidos por suas propriedades medicinais. Atividades antibacteriana (NOVAIS *et al.*, 2003), tripanomicida (BIAVATTI *et al.*, 2002; AMBROZIN *et al.*, 2004), leishmanicida (NAPOLITANO *et al.*, 2004), antinociceptiva e anti-inflamatória (VILLALBA *et al.*, 2007) de extratos e substâncias isoladas têm sido atribuídas a espécies dessa família. Considerando as propriedades terapêuticas de plantas da família Rutaceae e com intuito de estabelecer evidências científicas que comprovem o uso popular, garantir uma melhor segurança ao usuário e valorizar o aspecto da sustentabilidade ecológica, esta proposta tem como objetivo investigar o potencial químico e farmacológico de *Hortia brasiliiana* Vand. ex DC. (Rutaceae).

## **2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

O emprego de plantas medicinais na recuperação da saúde evoluiu desde as formas mais simples, provavelmente utilizado pelo homem das cavernas, até as formas sofisticadas, utilizada pelo homem moderno. Entretanto, apesar das diferenças nas maneiras de uso no decorrer da história, há um fato comum entre elas: o homem percebeu de alguma forma, a presença de algo nas plantas com propriedades capazes de provocar alterações no organismo e torná-lo saudável. Essas são decorrentes de substâncias presentes nas plantas denominadas, normalmente, de princípios ativos (LORENZI; MATOS, 2008).

Substâncias naturais bioativas têm sido utilizadas na terapêutica e como protótipos para obtenção de novos fármacos (VIEGAS JR; BOLZANI; BARREIRO, 2006). Embora não estejam isentas de efeitos adversos, as substâncias ativas das plantas têm a probabilidade de interagirem entre si promovendo um equilíbrio fisiológico (SCHOCKEN, 2007).

### **2.1 INTERCÂMBIO MEDICINA POPULAR E CIÊNCIA**

A grande procura por substâncias bioativas de origem vegetal levou a um aumento significativo dos estudos relacionados às plantas usadas na medicina popular nas últimas décadas (CORREIA; COSTA; FERREIRA, 2002; ROCHA; ROCHA, 2006). Dessa forma, a partir do uso popular, foram descobertos medicamentos muito utilizados na medicina convencional, entre eles, salicilatos e digitálicos (BOTSARIS; MACHADO, 1999). Portanto, as plantas medicinais continuam sendo o ponto de partida para o isolamento, a identificação e a síntese de novas substâncias bioativas (CORREIA; COSTA; FERREIRA, 2002; VIEGAS JR; BOLZANI; BARREIRO, 2006).

O Brasil é o país com maior diversidade vegetal do mundo, de um total presumido de milhares de espécies, somente foram catalogadas 40.982 espécies da flora brasileira, sendo 3.608 de Fungos, 3.495 de Algas, 1.521 de Briófitas, 1.176 de Pteridófitas, 26 de Gimnospermas e 31.156 de Angiospermas (FORZZA *et al.*, 2010).

As populações indígenas brasileiras se relacionavam com milhares de plantas nativas, de finalidades terapêuticas, alucinógenas e alimentícias. Esse valioso conhecimento sobre a aplicação etnofarmacológica de várias espécies tem sobrevivido ao tempo em grupos de descendentes destes povos, que habitam regiões de floresta, de norte a sul do Brasil (CRESPO, 2010).

A riqueza de conhecimento dos povos primitivos e dos índios, em relação ao meio ambiente em que viviam, pode ser considerada um grande legado. A convivência com os diversos grupos étnicos gerou relevantes contribuições, servindo de base para o estudo da relação das propriedades biológicas e farmacológicas dos metabólitos secundários dos vegetais (VIEGAS JR; BOLZANI; BARREIRO, 2006).

Nos dias atuais, populações mais isoladas mantêm o costume de transmitir a sabedoria deixada por seus ancestrais. Dessa forma, ao invés de se procurar moléculas com atividade medicinal ao acaso, é muito mais eficiente pesquisar comunidades que residem próximo às plantas medicinais e fazem uso destas (CAMARGO; TEIXEIRA, 2002). Logo, o estudo destas plantas pode gerar importantes dados para a elaboração de pesquisas farmacológicas e fitoquímicas, o que proporciona uma economia de tempo e dinheiro, ao se aproveitar o conhecimento empírico existente de longas datas (CORREIA; COSTA; FERREIRA, 2002; AMOROZO, 1996).

Nas comunidades tradicionais ou locais, o processo de produção de conhecimento e de pesquisa é contínuo e isto acontece através da inserção de uma rede de relações como parte de uma cultura viva, apontando para a necessidade de valorização da riqueza que esta diversidade cultural se constitui. Isso indica também o caráter diferenciado com que os conhecimentos tradicionais se processam que são específicos a condições próprias de produção de saber: o importante é manter a possibilidade dessas experiências, pois, de certa forma, esses grupos locais formam um batalhão de pesquisadores (CUNHA, 1998; FRANÇA *et al.*, 2008).

Com relação ao pioneirismo do resgate cultural no uso de plantas medicinais aliado a informações e a validação da eficácia e segurança, destaca-se o projeto Farmácias Vivas, iniciado na Universidade Federal do Ceará, pelo saudoso professor Dr. Francisco José de Abreu Matos. O principal diferencial desta iniciativa foi a interação da equipe científica acadêmica com a população de Fortaleza, que conseguiu controlar 80% dos problemas de saúde utilizando fitomedicamentos preparados a partir de 15 espécies vegetais obtidas nas comunidades (MATOS,

1985).

Várias plantas indicadas no uso popular, com atividade farmacológica, vêm sendo cientificamente validadas. No entanto, ainda existem muitas delas, de uso comum, sem qualquer avaliação quanto ao potencial químico-medicinal, o que pode ocasionar danos a saúde da população. A investigação científica pode proporcionar a identificação de substâncias menos tóxicas ou, por sua interação direta ou indireta com outras substâncias, formar fitocomplexo, reduzindo risco de efeito adverso. O estudo científico das plantas utilizadas pela população é importante na prevenção de toxicidade e na garantia da qualidade das mesmas (CAMARGO; TEIXEIRA, 2002; PELISSARI; PIETRO; MOREIRA, 2010).

O emprego para fins terapêuticos de forma coerente requer o uso de plantas medicinais selecionadas considerando sua eficácia e segurança terapêuticas, aliando a tradição popular com a validação científica, para chegar a uma escolha das formas corretas de preparação e administração dos produtos finais (LORENZI; MATOS, 2008). Portanto, amparados pela ciência, os medicamentos à base de plantas poderão dar origem a uma nova fase de terapia de diversas doenças, mais inteligente e promissora (FERNANDES, 2006).

Contudo, é preciso valorizar também o aspecto da sustentabilidade ecológica, pois apesar das inúmeras plantas cujo potencial farmacológico é atualmente pesquisado e confirmado, há uma falta de preocupação com espécies que não possuem estudos agronômicos e ecológicos que visem a sua reprodução ou pelo menos um extrativismo sustentável (TOLEDO *et al.*, 2003).

A documentação de pesquisas com plantas medicinais tem a sua importância aumentada devido à perda rápida de habitats naturais de várias espécies vegetais endêmicas que podem ser extintas antes mesmo de serem investigadas (CASTRO *et al.*, 2004). As espécies nativas, por exemplo, na maior parte das vezes, ainda são coletadas em seu ambiente natural, processo conhecido como extrativismo. A intensidade do processo de coleta e a não preocupação com a reposição, podem levar ao desaparecimento das plantas medicinais de uma localidade ou região. São poucas ou inexistentes as iniciativas no cultivo, inclusive para espécies que são exportadas, como fáfia (*Pfaffia paniculata* (Mart.) Kuntze), espinheira-santa (*Maytenus ilicifolia* (Schrad) Planch.), erva-de-bicho (*Polygonum acre* Lam.), pedrame-caá (*Myrcia sphaerocarpa* D.C.), chapéu-de-couro (*Echinodorus grandiflorus* (Cham. & Schltl.) Micheli) e outras (BRASIL, 2006; MING *et al.*, 2012).

*Uncaria tomentosa* (Willd.) DC. e *Uncaria guianensis* (Aubl.) Gmel., conhecidas comercialmente por unha-de-gato, trepadeiras lenhosas nativas das florestas tropicais amazônica, são um exemplo de um eminente risco de extinção em consequência do extrativismo indiscriminado de suas raízes, cascas do caule e folha, além do desflorestamento de seus habitats naturais (PEREIRA *et al.*, 2008).

É importante ressaltar também para o extrativismo excessivo das espécies madeireiras, inclusive as medicinais, onde, para fins de comercialização, não raro as plantas são retiradas inteiras (raiz, caule, folhas, flores) sem que o ciclo reprodutivo se complete, acarretando o desaparecimento da espécie (FACHIM; GUARIM, 1995).

A exploração para utilização como medicamento já tornou um perigo à existência de dezenas de espécies arbóreas. Dentre as catalogadas com risco de extinção devido ao uso da casca ou da madeira, estão pau-rosa - *Aniba rosaeodora* Ducke (perfume e cosmético), aroeira - *Myracrodruon urundeuva* Allemão (inflamações), jatobá - *Hymenaea courbaril* L. (astenia), catuaba - *Erythroxylum catuaba* Da Silva ex Hamet (impotência sexual), sucupira - *Pterodon emarginatus* Vogel (infecções de garganta), ipê roxo - *Tabebuia impetiginosa* (Mart. ex DC.) Standl. (câncer) (FREIRE, 2004). Este último está entre as espécies que têm sido motivo de estudos de análise genômica feitos para plantas arbóreas nativas, com a finalidade de avaliar a variabilidade genética entre e dentro das populações naturais e gerar com isso, subsídios a programas de conservação (RIBEIRO; RODRIGUES, 2006).

Outro exemplo do extrativismo da madeira é o candeeiro (*Vanillosmopsis arborea* Baker), cuja exploração ocorre para extração de óleo essencial, com reconhecida atividade anti-inflamatória devido às altas concentrações de  $\alpha$ -bisabolol (SANTOS *et al.*, 2011).

A espécie arbórea para-tudo - *H. brasiliiana* é outra planta que merece atenção, pois é comum encontrar indivíduos desta espécie no sudeste do Brasil, com parte da casca removida, provavelmente por ervaneiros, para tratar problemas do fígado (GROPPO; PIRANI; 2012). Não é raro encontrar exemplares desta espécie, mortos pela retirada de sua casca, ao redor de todo o tronco, suprimindo o caminho da seiva (ÁRVORES DO BRASIL, 2012). A retirada da casca de caules em desenvolvimento secundário promove a eliminação do floema e interrompe o fluxo de seiva descendente. A completa retirada da casca, ao redor do cilindro, provoca anelamento com morte radicular, e conseqüentemente, da planta. Além disso, outro

risco de morte da mesma é que, com a retirada da periderme, facilita ataque de pragas e doenças (FAHN, 1990; ESAU, 1977).

Diante das questões mencionadas, percebe-se a necessidade de ações que garantam que espécies vegetais com potencial farmacológico sejam, além de investigadas, também preservadas para as futuras gerações (FREIRE, 2004).

## 2.2 FAMÍLIA RUTACEAE

Rutaceae Juss. possui distribuição predominantemente pantropical, incluindo aproximadamente 150 gêneros e 2000 espécies. No Brasil, ocorrem 32 gêneros e 150 espécies. Integrantes desta família são importantes do ponto de vista econômico, uma vez que incluem frutos cítricos, vegetais que possuem madeira de boa qualidade, como *Euxylophora paraensis* Huber (pau-amarelo) e *Balfourodendron riedelianum* Engl. (pau-marfim) e plantas aromáticas, dentre as quais se destaca *Ruta graveolens* L., à qual se atribuem poderes mágicos. Espécies de *Pilocarpus* (jaborandi) são fonte de pilocarpina, alcaloide utilizado em doenças oftálmicas (SOUZA; LORENZI, 2008, GROPPPO, 2004).

Apesar da semelhança com outras famílias de Sapindales, em função das folhas compostas, como Meliaceae, Rutaceae pode ser facilmente diferenciada pelas 'folhas aromáticas com pontos pelúcidos, espalhados por toda a lâmina ou restritos às margens (GROPPPO, 2004)

Rutaceae possui uma grande variedade de substâncias químicas, principalmente alcaloides e cumarinas, além de lignanas, limonoides, flavonoides e terpenoides. (FREITAS *et al.*, 2003).

Estudos têm sido descritos sobre óleos essenciais presentes na família, revelando atividades, acaricida, antibacteriana, antidislipidêmica, antioxidante, anti-inflamatória, inseticida, ansiolítica, sedativa, relaxante, inibidora da acetilcolinesterase, entre outras (LEITE *et al.*, 2008; ARAÚJO-JÚNIOR, 2009; SÁ, 2011). A família também é muito valorizada pelo potencial medicinal de seu amplo número de alcaloides e cumarinas (SILVA, 2006).

Os alcaloides presentes em Rutaceae têm grande relevância na taxonomia e serviram de base para questionamentos contrários à classificação de Engler das principais sub-famílias Rutoideae e Toddalioideae (WATERMAN, 1975). É

considerada atípica a diversidade de produção de alcaloides, divididos em cinco tipos, de acordo com a origem metabólica, onde a maior variedade estrutural está nos derivados do ácido antranílico (Figura 1), tidos como eminentes precursores dos marcadores quimiotaxonômicos (WATERMAN, 1999).

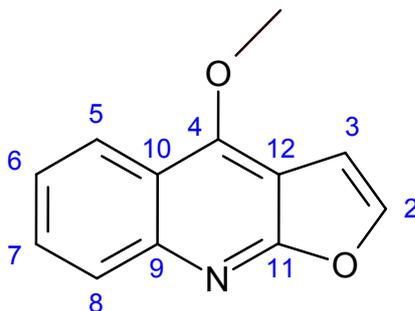


Figura 1. Exemplo de alcaloide derivado do ácido antranílico: dictamina.

Fonte: SIMÕES *et al.*, 2004.

O alcaloide rutaecarpina, em especial, já foi isolado em diversos gêneros da família Rutaceae: *Hortia*, *Esenbeckia*, *Evodia*, *Zanthoxylum*, *Phellodendron*, *Tetradium*, *Spiranthera*, *Vepris*, *Metrodorea*, *Bouchardatia* e *Fagara*. Este constituinte apresenta uma imensa variedade de propriedades medicinais: anti-trombólico, anti-cancerígeno, anti-inflamatória, anti-obesidade, analgésico, além de atividade de termorregulação, vasodilatadora e efeitos sobre sistema cardiovascular e endócrino (LEE *et al.*, 2008).

Dentre as cumarinas encontradas na família, destacam-se as furano- e piranocumarinas simples, como marcadores taxonômicos, através da distribuição de precursores do ácido cinâmico (GRAY; WATERMAN, 1978).

Entre os vários exemplos do potencial biológico das cumarinas presentes em Rutaceae estão a atividade anti-HBV (hepatite B) da colinina isolada da *Zanthoxylum schinifolium*, e a atividade anti-inflamatória da escopoletina (PINTO; LIMA; FERREIRA, 2009b).

### 2.3 GÊNERO *Hortia*

O gênero *Hortia* Vand. (Rutaceae) foi descrito pela primeira vez por Domenico Vandelli em 1788 (GROPPO; KALLUNKI; PIRANI, 2005). É constituído por árvores

ou arbustos de folhas simples aglomeradas próximo ao ápice dos ramos, flores vermelho e rosa. O fruto, do tipo baga, possui cavidades com abundância de óleo (GROPPO; PIRANI, 2005).

Compreende dez espécies distribuídas do Paraná ao estado de São Paulo no Brasil. Os nomes das espécies mais relatadas por pesquisadores são: *Hortia longifolia* Benth. ex Engl., *Hortia regia* Sandwith, *Hortia oreadica* Groppo, Kallunki & Pirani, *Hortia superba* Groppo, Kallunki & Pirani e as sinônimas *Hortia colombiana* Gleason; *Hortia arborea* Engl., *Hortia badinii* M. Lisboa ex Groppo e *Hortia brasiliana* Vand. ex DC. (SEVERINO *et al.*, 2009a; GROPPPO; PIRANI, 2012).

No Brasil, são encontradas nove espécies nativas de *Hortia*, sendo quatro endêmicas. O gênero está presente na Amazônia, Caatinga, Cerrado e Mata Atlântica e são amplamente distribuídas por todas as regiões, exceto a região sul do país. No sudeste, ocorre em todos os estados, inclusive Minas Gerais (GROPPO, 2010).

A presença de metabólitos como alcaloides, cumarinas, derivados do ácido diidrocinâmico e cinâmico demonstra que o gênero *Hortia*, por sua posição quimiotaxonômica, pertence à família Rutaceae. Porém, há controvérsia quanto à classificação, no que diz respeito aos estudos fitoquímicos, que deixam dúvidas sobre qual tribo as espécies de *Hortia* estão inseridas dentro desta família (SEVERINO *et al.*, 2009a). No entanto, mesmo sem uma conclusão definitiva, o sistema de Engler, com modificações de Scholz, é o mais aceito, mantendo *Hortia* na tribo Toddaliaea (BRAGA, 2005).

Atividade tripanocida foi demonstrada em lignanas e alcaloides de *Hortia* (AMBROZIN, 2008), o extrato hexânico do tronco subterrâneo de *H. oreadica* e seus derivados, os alcaloides dictamina e rutaecarpiana, também apresentaram tal atividade em teste *in vitro* (REZENDE *et al.*, 2010).

No gênero também já foram encontrados triterpenos, esteroides, ácidos graxos e flavonoides, divididos entre *H. brasiliana*, *H. superba*, *H. oreadica* e *H. longifolia* (PÁDUA, 1976; FERRACIN, 1992; BRAGA, 2005; SEVERINO 2009a). No extrato metanólico das folhas desta última, o triterpeno lupeol revelou possível atividade anti-fúngica (MÁXIMO *et al.*, 2010).

Em *Hortia regia* foram isolados uma série de constituintes terpenoides e alcaloides, a exemplo da hortiamina na forma de cristais incolores (TINTO; McLEAN; REYNOLDS, 1992). A partir desta espécie identificou-se também uma substância

oleosa, o diidroxilado metil-farnesato, relacionado com hormônios de insetos (JACOBS *et al.*, 1987) e o tetranortritepenoide guianina, isolado pela primeira vez nesta espécie, em 1986. (JACOBS; RAMDAYAL, 1986).

Poucos limonoides têm sido relatados no gênero *Hortia*. O extrato diclorometânico, do caule subterrâneo de *H. brasiliiana*, forneceu dois representantes chamados LIM1, inédito para *Hortia*, e LIM2, inédito na literatura (Figura 2) (BRAGA, 2004; BRAGA, 2005). Os limonoides ou tetranortriterpenos representam o nível máximo na seqüência de produção de terpenoides em plantas que geralmente são evitadas por insetos (VIEGAS JR, 2003).

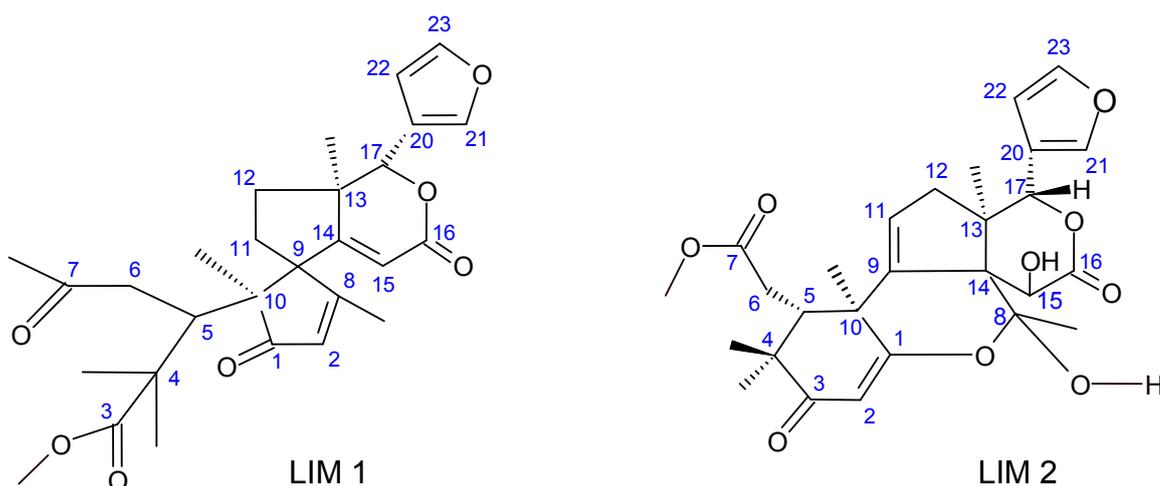
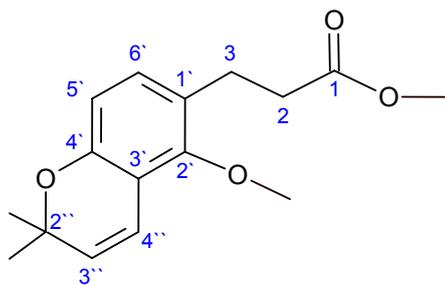


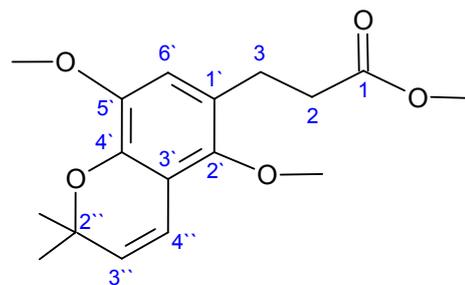
Figura 2. Novos tipos de limonoides em *H. brasiliiana*.

Fonte: BRAGA, 2004.

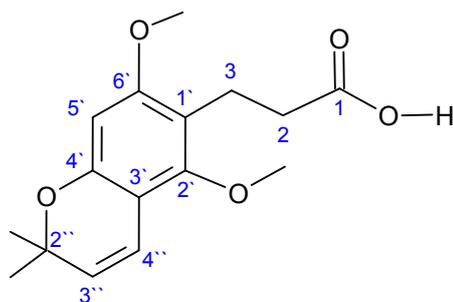
Testes realizados com extratos hexânicos e diclorometânicos do tronco subterrâneo de *H. oreadica* e derivados do ácido diidrocinâmico apresentaram-se eficientes no controle de formigas cortadeiras (SEVERINO *et al.*, 2011). O fracionamento do extrato diclorometânico do tronco subterrâneo desta espécie e das folhas de *H. brasiliiana* apresentou os seguintes derivados do ácido diidrocinâmico: 3-fenil-[2'-metoxi-(3'4'-O:5'',6'')-2'',2''-dimetilpirano]propionato de metila; 3-fenil-[2',5'-dimetoxi-(3'4'-O:5'',6'')-2'',2''-dimetilpirano]propionato de metila; 3-fenil-[2',6'-dimetoxi-(3'4'-O:5'',6'')-2'',2''-dimetilpirano]propionato de metila, além do alcaloide rutaecarpina (Figura 3) (SEVERINO, 2008).



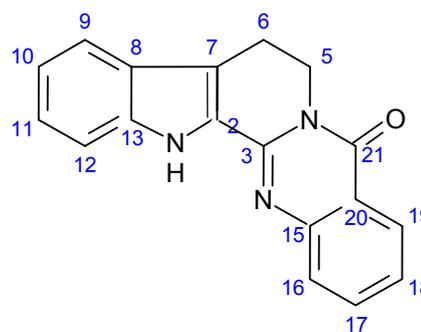
3-fenil-[2',6'-metoxi-(3'4'-O:5'',6'')-2'',2''-  
dimetilpirano]propionato de metila



3-fenil-[2',5'-dimetoxi-(3'4'-O:5'',6'')-2'',2''-  
dimetilpirano]propionato de metila



3-fenil-[2',6'-dimetoxi-(3'4'-O:5'',6'')-2'',2''-  
dimetilpirano]propionato de metila



Rutaecarpina

Figura 3. Derivados de ácidos diidrocinâmicos e alcaloide, isolados de *H. brasiliana* Vand. ex DC. e *Hortia oredica* Groppo, Kallunki & Pirani.

Fonte: SEVERINO, 2008.

O 3-fenil-[2',6'-dimetoxi-(3'4'-O:5'',6'')-2'',2''-dimetilpirano]propionato de metila e a rutaecarpina demonstraram atividade frente ao crescimento de *Mycobacterium tuberculosis*, patógeno causador da tuberculose (SEVERINO *et al*, 2009a).

Nos extratos metanólicos e hexânicos da casca do caule de *Hortia longifolia*, coletados na Amazônia, foi identificado um derivado do ácido cinâmico inédito na literatura, além do alcaloide esquimianina, uma amida e um limonóide, considerados como promissoras substâncias de atividades biológicas (Figura 4) (PINTO; LIMA; FERREIRA, 2009a).

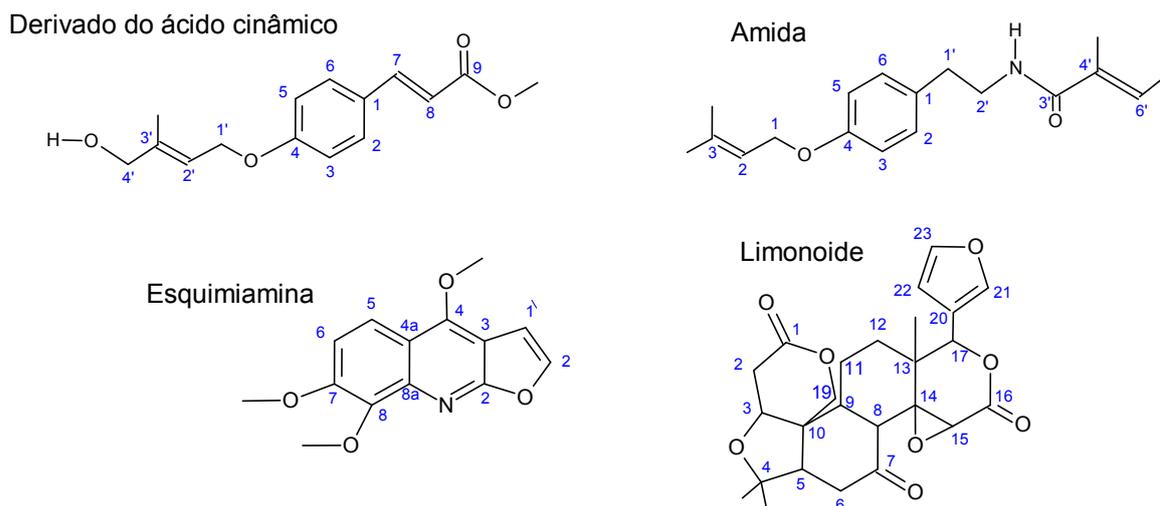


Figura 4. Substâncias isoladas de *Hortia longifolia*

Fonte: PINTO; LIMA; FERREIRA, 2009a.

A cumarina escopoletina, isolada de galhos de *H. longifolia*, foi a mais promissora das substâncias com efeitos hipoglicemiantes num estudo avaliando a inibição da  $\alpha$ -glucosidase, enzima responsável pela digestão de carboidratos a monossacarídeos (LIMA *et al.*, 2011). Além disso, a escopoletina revelou uma potencial atividade anti-inflamatória (PINTO; LIMA; FERREIRA, 2009b; CHAVES *et al.*, 2010).

A partir do extrato etanólico dos galhos de *H. superba* chegou-se ao isolamento de várias substâncias, sendo os alcaloides integriquinolona e n-metil-4-metoxi-2-quinolona e a cumarina isopimpenilina inéditos no gênero e as cumarinas escoparona e xantoxina, inéditas para a espécie. As cumarinas têm sido relatadas em grande quantidade em *Hortia* (FREITAS, 2010), entre estes relatos, há citações de atividades anti-bacteriana e anti-fúngica (SEVERINO *et al.*, 2009b).

## 2.4 *Hortia brasiliana* VAND. EX DC.

*H. brasiliana* é uma árvore de 4 a 30m de altura, que tem como sinônimas *Hortia arborea* Engl., *Hortia badinii* M. Lisboa ex Groppo, *Hortia colombiana* Gleason e *Hortia chocoensis* Cuatr. (Figura 5), sendo a primeira espécie do gênero a ser descrita (DE CANDOLLE, 1824).



Figura 5. Aspecto geral da morfologia externa da copa de *Hortia brasiliiana* Vand. ex DC., São Fernando, distrito de Muriaé-MG

Foto: Autor (2010)

Há registros do uso popular da casca de *H. brasiliiana* no controle da diabetes, no tratamento de disfunções estomacais, contra cólicas renais, como depurativa do sangue e emagrecedora (COELHO, 2009), no combate a febres (PIO-CORRÊA, 1984), diarréias, vômitos e doenças do fígado (GROPPO; PIRANI, 2012). Segundo Coelho (2009), *H. brasiliiana* foi a planta com maior variação de usos terapêuticos, entre as espécies utilizadas pela população da região do Vale do Aço – MG.

A espécie, nativa do Brasil, ocorre nos domínios fitogeográficos, com mais frequência na região Amazônica, mas também em áreas de Mata Atlântica, Caatinga e Cerrado (GROPPO; KALLUNKI; PIRANI, 2005; SOBRINHO, 2007). Destaca-se a seguinte distribuição geográfica: Nordeste (Pernambuco, Bahia) e Sudeste (Minas Gerais, Espírito Santo, São Paulo, Rio de Janeiro). Possui como nomes vernaculares: coronel na Bahia, laranjinha em Pernambuco, lima-d'anta ou casca-d'anta em Minas Gerais, para-tudo-vermelho no Espírito Santo e pratudo, para-tudo ou casca-para-tudo, na Bahia, Minas Gerais e Rio de Janeiro (PACHTER *et al.*, 1960; LORENZI, 1998; GROPPO; CRUZ-BARROS; CORREA, 2010).

É um vegetal que se desenvolve em encostas, topos de morros, solos argilosos de drenagem rápida, os quais são seu habitat preferido. Sua abrangência vai desde o nível do mar até 1200m de altitude, possuindo baixa taxa de germinação e lento desenvolvimento no campo (GROPPO; KALLUNKI; PIRANI, 2005).

Estudo sobre a propagação da espécie na Reserva Dois Irmãos, Nordeste brasileiro, mostrou que as sementes não possuem uma boa resistência para disseminação à partir da ingestão por cutias, único vertebrado registrado que se alimenta do fruto. Apenas 13% permaneceram intactas ao passar pelo aparelho digestivo do animal e somente uma semente entre 2000, germinou nas clareiras (MELO; TABARELLI, 2003).

*H. brasiliiana* possui indivíduos com flores de cor rósea e consistência coriácea, reunidas em densas inflorescências umbeliformes, terminais, com eixos resistentes. Floresce especialmente de janeiro a junho (GROPPO; PIRANI, 2012) e de agosto a janeiro onde o cerrado foi submetido ao corte em julho. A inflorescência é compacta com 800 a 1000 flores que têm suas antesas ao longo do dia ou da noite (Figura 6) (BARBOSA, 1999). Seus frutos são do tipo baga globosa, rugosa, de cor verde, mesmo quando maduros, com polpa succulenta esponjosa (FREITAS, 2010) (Figura 7).



Figura 6. Inflorescências de *Hortia brasiliiana* Vand. ex DC, Juiz de Fora-MG.  
Foto: Vinícius Dittrich - Herbário CESJ (2011).

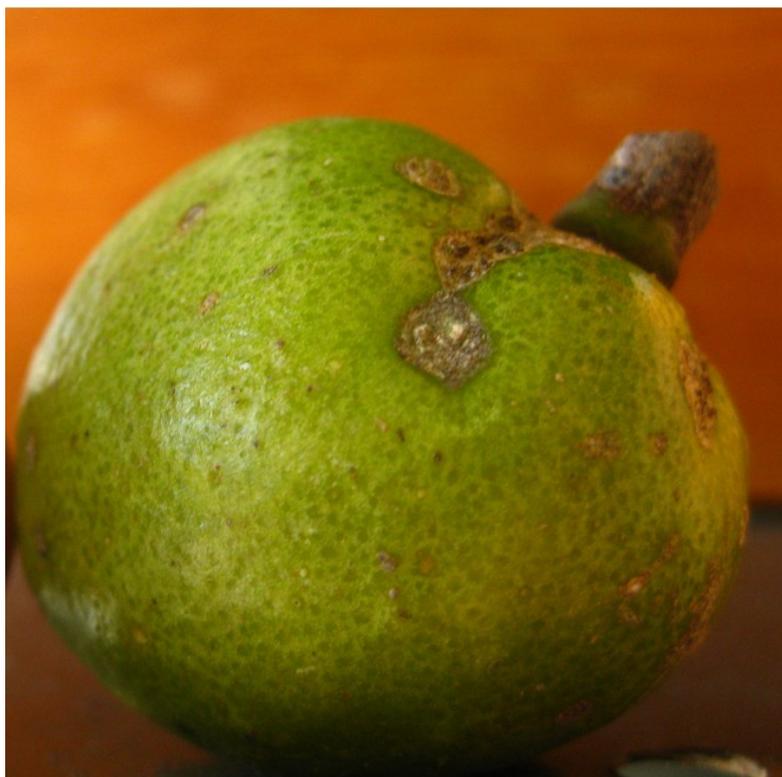


Figura 7. Fruto de *Hortia brasiliiana* Vand. ex DC., Juiz de Fora-MG.  
Foto: Vinícius Dittrich- Herbário CESJ (2011).

Gropo e colaboradores (2005) consideraram *H. arborea* como sinônimo de *H. brasiliiana*. Assim como estes autores, outros estudiosos trataram espécies arbóreas do leste brasileiro como *H. arborea* e espécies arbustivas do Brasil central como *H. brasiliiana* (GROPPO; KALLUNKI; PIRANI, 2005; PIO-CORREA, 1984, 1984; LORENZI, 1998; PIRANI, 2002).

Sobre *H. brasiliiana* e *H. colombiana*, a exemplo da forma e medidas das folhas e pecíolos, as diferenças não são significativas, em uma revisão taxonômica do gênero, três binômios (*H. colombiana* Gleason, *H. chocoensis* Cuatrec. e *H. badinii* M. Lisboa ex Gropo) foram propostos como sendo sinônimos de *H. brasiliiana* Vand. ex DC. (GROPPO; CRUZ-BARROS; CORREA, 2010).

Em 1960, confundiram *H. brasiliiana* com *Winteri* J. R. Forst. & G. Forst. (Magnoliaceae), numa busca por esta última para estudos, pois ambas eram chamadas popularmente de “casca para-tudo”. No entanto, o aparecimento de alcaloides furoquinolínicos, típicos da família Rutaceae, revelou o equívoco, o qual foi mantido devido à conclusão de haver maior riqueza de constituintes com

atividades biológicas na primeira espécie. Este foi o primeiro estudo fitoquímico sobre *H. brasiliiana* e utilizou o extrato etanólico da casca, demonstrando efeitos sedativos e hipotensores além da identificação de alcaloides do tipo furoquinolínicos e quinolínicos: dictamina, fagarina, esquimiamina, hortiamina, rutaecarpina e hortiacina (PACHTER *et al.*, 1960).

Hortiacina demonstrou especificidade na inibição das enzimas quinases envolvidas na sinalização de tumores, como carcinoma mamário (MARQUES, 2006). Além disso, tem demonstrado atividade anti-diabética e foi ativa em infecções causadas por *Trypanosoma* e *Leishmania* (MARQUES, 2006). Hortiacina é considerada como um derivado da rutaecarpina (LEE *et al.*, 2008), diferenciando desta pelo grupo metoxi na posição 10 (SUAREZ; MARTÍNEZ; DELLEMONACHE, 1998).

A rutaecarpina, encontrada também nas folhas e madeira de *H. brasiliiana* (SEVERINO *et al.*, 2009a; SUAREZ; MARTÍNEZ; DELLEMONACHE, 1998), demonstrou propriedades anti-cancerígenas, tanto *in vivo* quanto *in vitro* (JIANG, 2009). Há relatos da ação deste alcaloide na supressão do tampão plaquetário e inibição da ciclooxigenase (COX-2) (LIAO *et al.*, 2011). Estudos *in vitro* com rutaecarpina mostraram indícios de sua ação alérgica induzida por IgE, causando dermatite atópica e rinite (SHIN *et al.*, 2007). A forte e seletiva atividade inibitória sobre a COX-2 tem sido confirmada como sendo a origem da atividade anti-inflamatória da rutaecarpina (MOON *et al.*, 1999).

A partir de extratos hexânicos de folhas de *H. brasiliiana* foram isoladas substâncias com atividade contra *Xylella fastidiosa* - uma bactéria Gram-negativa causadora de várias doenças em culturas de laranjas. Houve atividade bactericida do extrato de *H. brasiliiana* em concentrações na faixa micromolar, relacionando tal atividade à rutaecarpina e ao limonóide guianina (SEVERINO *et al.*, 2009c).

Guianina e dictamina, isolados das raízes de *H. brasiliiana*, inibiram o crescimento dos patógenos bucais *Streptococcus salivarius*, *S. sanguinaris* e *S. mutans*. No entanto, o extrato hexânico foi mais ativo do que seus derivados, demonstrando que constituintes minoritários presentes provocam um sinergismo que potencializa o efeito (SEVERINO *et al.*, 2009b).

Alcaloides, cumarinas, aminas, derivados do ácido diidrocinâmico, dois sesquiterpenos inéditos para a espécie, nerolidol e epoxinerolidol, e dois novos limonoides, denominados hortiolida A e hortiolida B, considerados como tipos

estruturais com potencial atividade farmacológica, já foram identificados por separação cromatográfica isolados do extrato metanólico da madeira e da casca de *H. brasiliiana* (SUAREZ; MENICHINI; DELLEMONACHE, 2002).

O nerolidol (Figura 8) apresentou atividade antiulcerogênica em ratos, com redução significativa das lesões em até 56,57%, no modelo de úlcera induzida pelo stress, e no modelo de indução por etanol, o percentual alcançou 87,63% de redução (KLOPELL *et al.*, 2007). Demonstrou capacidade anti-bacteriana ao aumentar a permeabilidade e a suscetibilidade destas a outros constituintes antimicrobianos (BREHM-STECHER; JOHNSON, 2003) e inibiu o crescimento das formas promastigotas de *Leishmania amazonensis*, *L. brasiliensis*, *L. chagasi* e *L. amazonensis*, *in vitro*, resultando na redução de 95% das taxas de infecção, em camundongos (ARRUDA *et al.*, 2005).

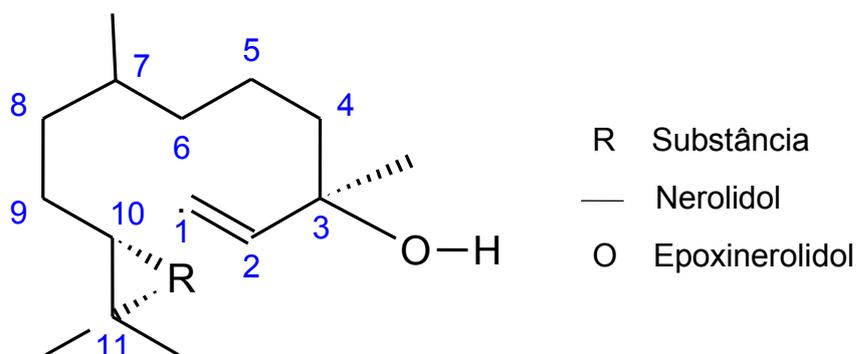


Figura 8. Sesquiterpenos inéditos em *H. brasiliiana*. R=radical.

Fonte: SUAREZ; MENICHINI; DELLEMONACHE, 2002.

Extratos da casca do tronco de *H. brasiliiana* revelaram diversos tipos de cumarinas como 6,7-demetoxicumarina; 3-[2-metoxi e 2,6-dimetoxi-6', 6'-dimetilpropano (2',3',3, 4) fenil]-1-propanois e o alcaloide esquimianina (CORREA; GOTTLIEB; PADUA, 1975; CORREA; GOTTLIEB; PADUA, 1979), o qual, juntamente com a fagarina, foram isolados também na madeira do vegetal, estes alcaloides furoquinolínicos revelaram atividades vasoconstritora, antidiarreica e espasmolítica (SUAREZ; MARTÍNEZ; DELLEMONACHE, 1998).

Derivados do ácido cinâmico considerados inéditos na literatura foram isolados do tronco (substância 1 e 2) e da casca (substância 3) de *H. brasiliiana* (Figura 9) (SEVERINO *et al.*, 2002).



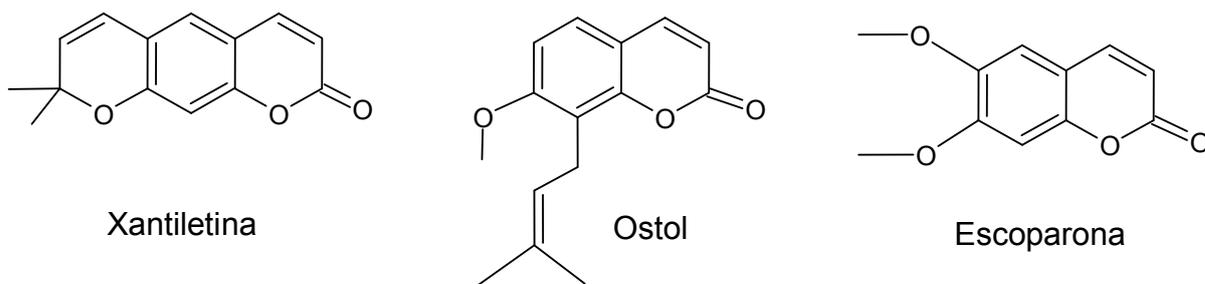


Figura 11. Cumarinas encontradas em *H. brasiliiana*.

Fonte: Adaptado de STEIN, 2005; RIBEIRO, 2006.

Xantiletina é uma piranocumarina que já demonstrou potencial antifúngico (GODOY *et al.*, 2005) e anticancerígeno (GLJNATILAU; KINGSTON, 1994). Seus derivados revelaram propriedades citotóxicas e analgésicas, além de serem ativos contra a bactéria *Helicobacter pylori*, causadora de úlceras (KIM *et al.*, 2011). A xantiletina tem sido reportada ainda, pela atividade antiplaquetária, com relatos de inibição da síntese de TXA<sub>2</sub> e a hidrólise de fosfatidilinositol (TENG *et al.*, 1992).

Há relatos, para ostol, relacionados à efeito hipotensor, além de relaxamento da musculatura lisa, cardíaca e também inibição da agregação plaquetária e anti-inflamatória (HOULT; PAYÁ, 1996; GARCIA-ARGAEZ *et al.*, 2000).

Escoparona revelou atividades leishmanicidas, inibitória da enzima acetilcolinesterase (MORAIS *et al.*, 2012), relaxante muscular, hipotensora, imunossupressora (SIMÕES *et al.*, 2004), além de promover diminuição da produção de citocinas, inibição da sinalização celular de fatores de transcrição pró-inflamatórios, modulação da função de mastócitos e linfócitos, reduzindo o recrutamento de células inflamatórias (FANG; WATANABE, 2003).

## 2.5 ÓLEOS ESSENCIAIS

Óleos essenciais se caracterizam como líquidos oleosos voláteis, dotados de aroma forte, quase sempre agradável, extraídos de plantas por alguns processos específicos, como a destilação por arraste com vapor de água (FABIANE *et al.*, 2008). São constituídos de uma mistura complexa de derivados arilpropanoídicos e terpenoídicos (ADORJAN; BUCHBAUER, 2010; MIGUEL, 2010). No entanto, por

questões econômicas, são normalmente obtidos sinteticamente. Porém, devido à dificuldade dos aromas sintéticos de se aproximarem da perfeição dos aromas naturais, houve um aumento da demanda pelos produtos originais obtidos diretamente das plantas (BRITO, 2010).

Os componentes químicos dos óleos voláteis podem ser divididos em duas classes: derivados dos terpenoides (mono e sesquiterpenos), formados pela via do ácido mevalônico-acetato e derivados dos arilpropanoides, substâncias aromáticas formadas pela via do ácido chiquímico (SIMÕES *et al.*, 2004).

Arilpropanoides são biossintetizados pela via do ácido chiquímico a partir da fenilalanina, a qual sofre ação da fenilalanina amonialiase, dando origem aos ácidos cinâmicos - precursores das substâncias aromáticas com cadeia lateral:  $ArC_3$ ,  $ArC_1$ ,  $ArC_2$  e  $ArC_3 (C_2)_n$ . As substâncias de composição  $ArC_3$  são denominadas de arilpropanoides. Nos organismos em geral, ao invés de utilizar a tirosina como precursor, ocorre a conversão do ácido cinâmico em ácido *p*-cumárico. Através de reduções enzimáticas, os ácidos *p*-cumáricos produzem propenilfenóis e/ou alilfenóis, e que sofrem oxidações posteriores com degradação das cadeias laterais gerando aldeídos aromáticos que, por ciclizações enzimáticas intramoleculares, formam as cumarinas. Álcool coniferílico, eugenol, safrol e anetol são substâncias formadas por redução dos ácidos cinâmicos (VOGT, 2009) (Figura 12).

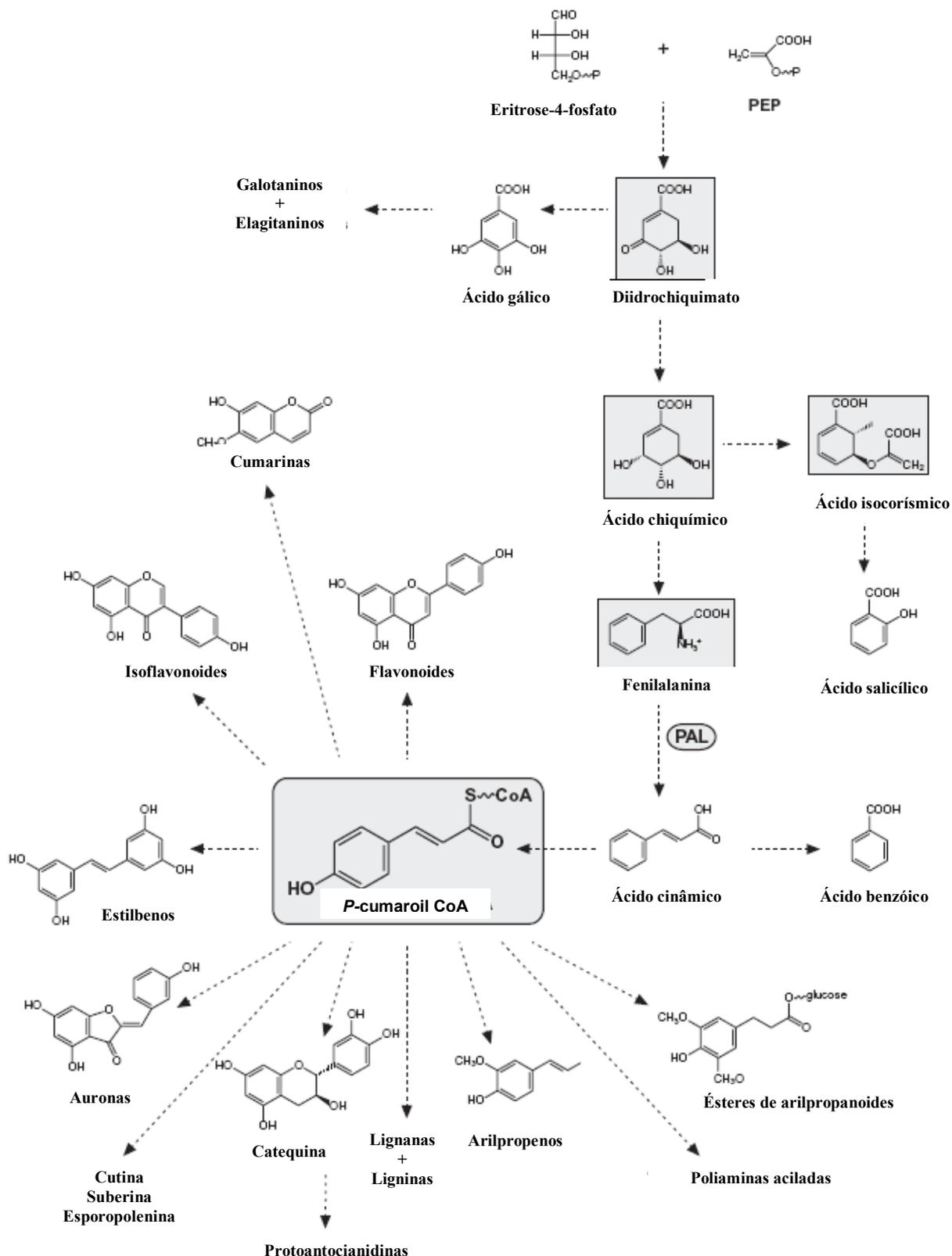


Figura 12. Diversificação de arilpropanoides baseada na via geral desta classe.

PAL = fenilalanina amonialiase; PEP = fosfoenolpiruvato

Fonte: Adaptado de VOGT, 2009.

Os terpenos formam uma diversificada categoria de produtos naturais largamente distribuídos na natureza, sendo a classe mais abundante dos constituintes do metabolismo secundário (HARBORNE, 1998). De acordo com o número de unidades isoprenicas ou unidades C5 presentes, os terpenos são classificados como: C5 (hemiterpenos), C10 (monoterpenos), C15 (sesquiterpenos), C20 (diterpenos), C30 (triterpenos), C40 (tetraterpenos ou carotenoides) e unidades maiores (politerpenos). Os monos e os sesquiterpenos são constituintes voláteis que, normalmente, fazem parte dos óleos essenciais. A via biossintética dos terpenos também leva à formação dos metabólitos pertencentes às classes dos esteroides, saponinas e heterosídeos (CHENG *et al.*, 2007).

A biossíntese dos terpenos acontece pela via acetato/mevalonato através da reação de duas moléculas de acetil-CoA, produzindo a acetoacetil-CoA. Após condensação aldólica, uma molécula de acetil-CoA e uma reação hidrólise, sob a ação da acetil-CoA acetiltransferase e HMG-CoA sintase, origina a 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA (HMG-CoA) que é reduzida a ácido mevalônico. O ácido mevalônico forma, então, o pirofosfato de isopentenila (IPP) que é uma unidade de cinco átomos de carbono. A reação do pirofosfato de isopentenila e seu isômero pirofosfato de dimetilalila éster alílico (DMAPP) produz a molécula de pirofosfato de *trans*-geranila (GPP) que é usada para formar os demais terpenos (CHENG *et al.*, 2007; AHARONI *et al.*, 2006).

Os monoterpenos são resultados da condensação tipo cabeça-cauda entre pirofosfato de dimetilalila e pirofosfato de isopentenila. Os sesquiterpenos são formados pelas ligações cabeça-cauda entre pirofosfato de *trans*-geranila e pirofosfato de isopentenila, e os diterpenos são produzidos a partir da reação de condensação cabeça-cauda entre pirofosfato de farnesila e pirofosfato de isopentenila. Os triterpenos e esteroides são originados a partir do esqualeno através da reação de duas moléculas de pirofosfato de farnesila (FPP) com ligação cauda-cauda (CHENG *et al.*, 2007; AHARONI *et al.*, 2006; McGARVEY; CROTEAU, 1995) (Figura 13).

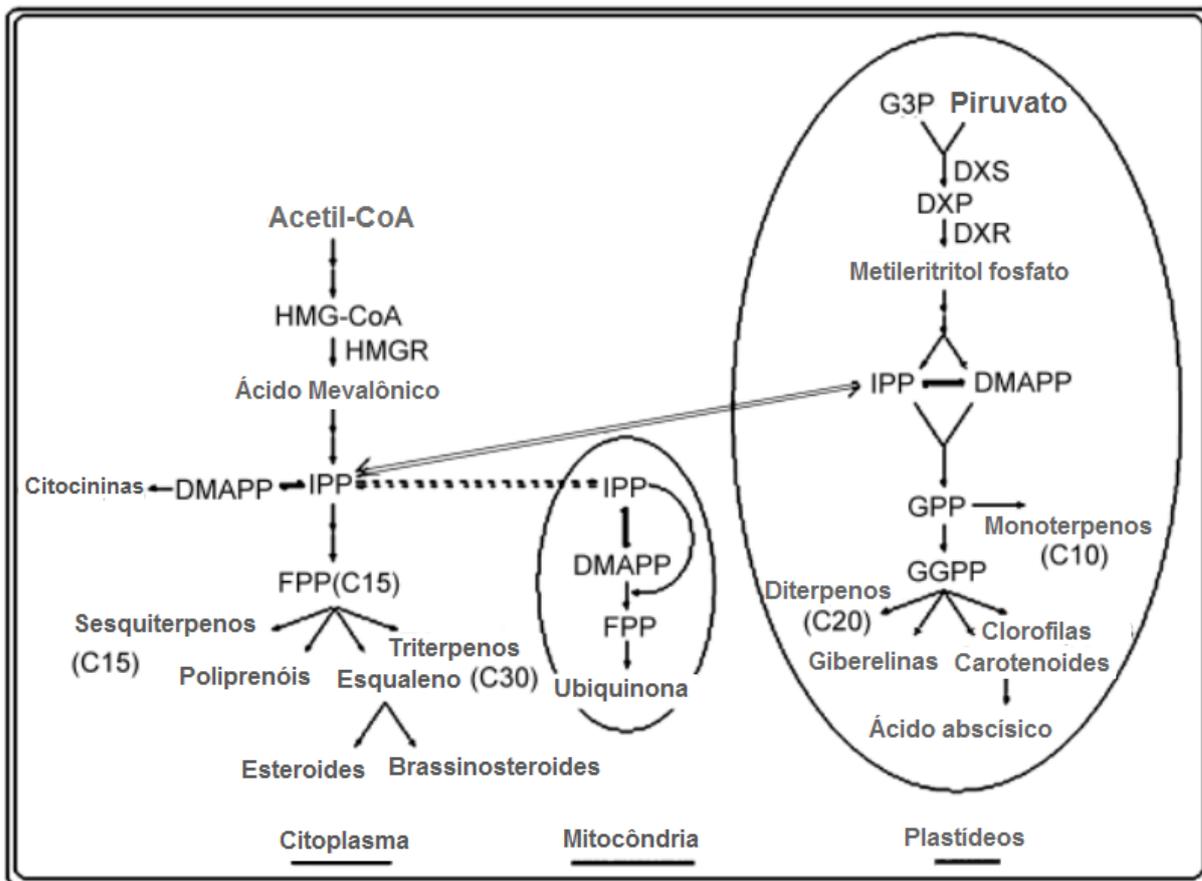


Figura 13. Via biossintética dos isoprenoides na célula vegetal.

DMAPP = difosfato de dimetilalila; DXP = 5-fosfato 1-deoxi-*D*-xilulose; DXR = 5-fosfato de 1-deoxi-*D*-xilulose redutoisomerase; DXS = 5-fosfato de 1-deoxi-*D*-xilulose sintase; FPP = difosfato de farnesila; GGPP = difosfato de geranylgeranila; GPP = difosfato de geranila; HMGCóA = 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A; IPP = difosfato de isopentenila.

Fonte: Adaptado de CHENG *et al.*, 2007.

Monoterpenos podem ser acíclicos, monocíclicos e bicíclicos (Figura 14). Considerando cada um dos subgrupos, os monoterpenos podem ser classificados ainda em hidrocarbonetos não saturados (mirceno), álcoois (mentol), aldeídos (geranial), cetonas (mentona) e lactonas ou monoterpenos iridoides (nepetalactona) (McGARVEY; CROTEAU, 1995; SIMÕES *et al.*, 2004; CHENG *et al.*, 2007).

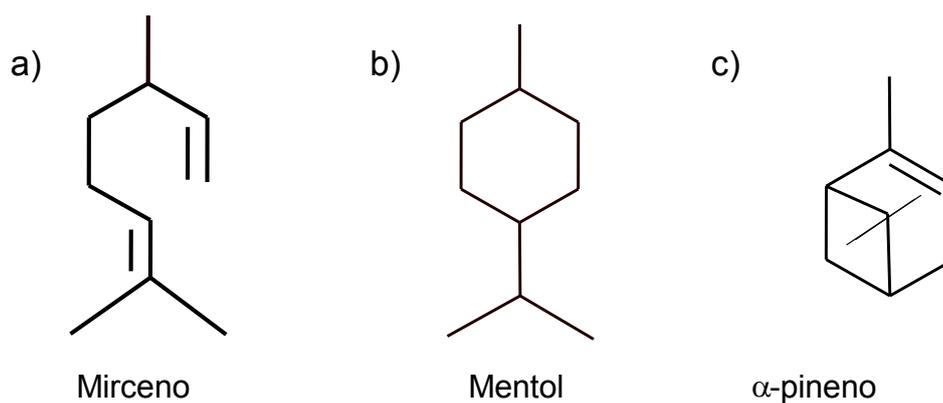


Figura 14. Representantes de monoterpenoides: a) acíclico b) monocíclico e c) bicíclico.

Fonte: Adaptado de SIMÕES *et al.*, 2004.

Sesquiterpenos seguem a mesma natureza das variações estruturais dos monoterpenos, podendo ser acíclicos, monocíclicos, bicíclicos e lactonas sesquiterpênicas (Figura 15) (SIMÕES *et al.*, 2004). A partir dessa divisão, podem ser reunidos didaticamente em subgrupos derivados do humuleno, germacreno, bisaboleno, entre outros (Figura 16) (COUTINHO, 2009).

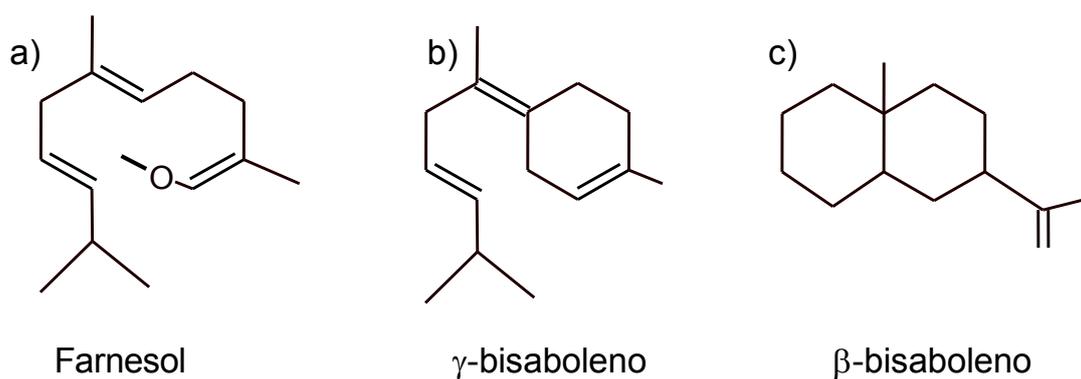


Figura 15. Representantes de sesquiterpenoides: a) acíclico, b) monocíclico e c) bicíclico.

Fonte: Adaptado de SIMÕES *et al.*, 2004.

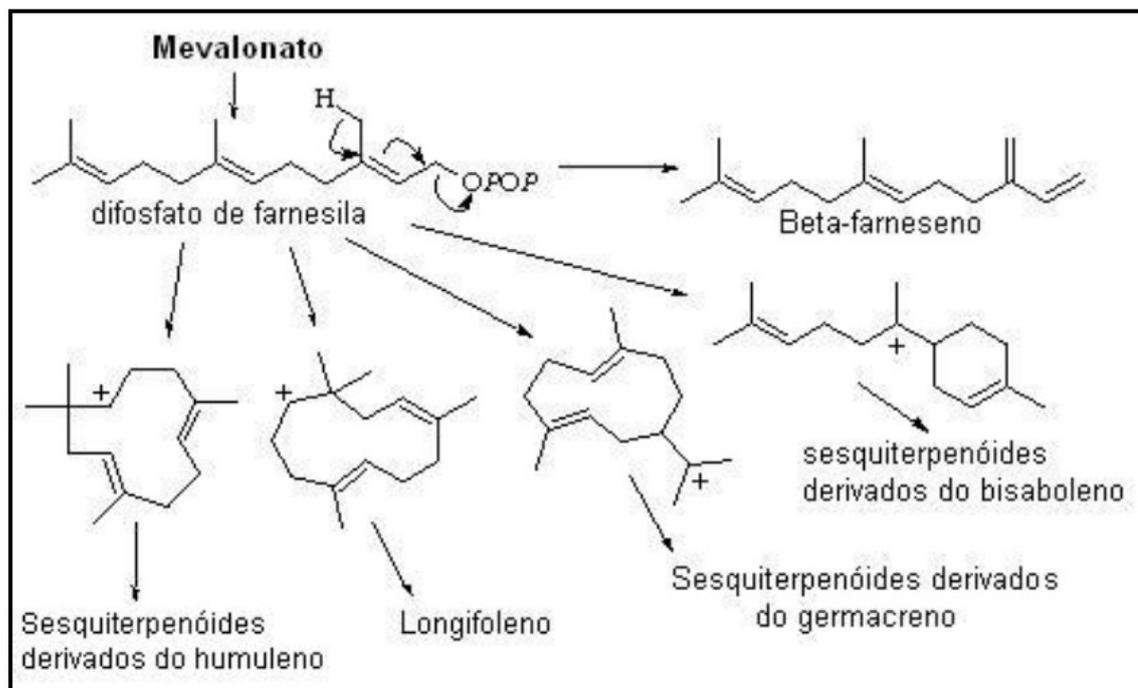


Figura 16. Formação de subgrupos de sesquiterpenóides.

Fonte: COUTINHO, 2009.

Os óleos essenciais podem ser encontrados em estruturas especializadas nas espécies vegetais, como tricomas glandulares, células parenquimáticas diferenciadas, canais oleíferos, bolsas lisígenas ou esquizolisígenas (CHENG *et al.*, 2007). Uma vez liberados, os constituintes voláteis apresentam propriedades que estão associadas à polinização, à proteção contra a perda de água, ao aumento da temperatura, à inibição da germinação e à proteção contra predadores (BAKKALI *et al.*, 2007; ADORJAN; BUCHBAUER, 2010).

A toxicidade dos óleos essenciais já foi observada tanto intoxicação aguda como na crônica, sendo dependente da dose e da via de administração (BAKKALI *et al.*, 2007; HUMMELBRUNNER; ISMAN, 2001; HOSSEINZADEH *et al.*, 2009). Óleos essenciais inibem o crescimento de bactérias, fungos, vírus e protozoários, produzindo menor probabilidade de resistência (SIENKIEWICZ; DENYS, 2008). Essas substâncias têm auxiliado no controle fitossanitário e na diminuição dos efeitos deletérios de oxidantes e radicais contribuindo na conservação de alimentos (SANTOS, 2004).

Ação ansiolítica de óleos essenciais, através da inalação, foi confirmada por testes *in vivo* (LEITE *et al.*, 2008). Além disso, essas substâncias têm demonstrado diferentes propriedades farmacológicas (LEAL-CARDOSO; FONTELES, 1999;

BAKKALI *et al.*, 2007; MIGUEL, 2010; SIMÕES *et al.*, 2004; ARAÚJO *et al.*, 2005): ação carminativa (anestesia a região da cárdia do estômago, relaxando e expulsando o ar do trato gastrintestinal); antiespasmódica (relaxam a musculatura lisa intestinal, diminuindo ou suprimindo espasmos); estimulante do apetite (estimulam as secreções do aparelho digestivo); cardiovascular (aumentam o ritmo cardíaco e a pressão arterial); revulsiva (aumentam a microcirculação local com efeito rubefaciente, sensação de calor e anestésico local); secretolítica (provocam atividade secretora do epitélio respiratório, fluidificando e expulsando o muco); sobre o sistema nervoso central (agem como estimulante, depressor ou podem provocar convulsões); anti-nociceptiva (diminuem estímulos de dor) e anti-inflamatória (diminuem produção de mediadores inflamatórios).

## **2.6 PROCESSO INFLAMATÓRIO E AÇÃO ANTI-INFLAMATÓRIA**

A resposta inflamatória consiste em uma defesa do organismo contra os agentes agressores, fazendo parte da imunidade inata, não específica, nos casos agudos, com reações ocorrendo independentemente de sua etiologia. Neste sentido, a inflamação objetiva eliminar o agente inflamatório e remover tecidos degenerados, preparando a região afetada para o reparo (SIQUEIRA JR.; DANTAS, 2000). O processo inflamatório ocorre, em seqüência cronológica: lesões celulares e teciduais, distúrbios circulatórios, exsudação, fenômenos reparadores. A inflamação, portanto, é definida como o conjunto de todas essas alterações ou fenômenos e é útil a defesa do organismo (PEAKMAN; VERGANI, 2011).

O processo inflamatório poderá seguir dois caminhos distintos, conforme a natureza da agressão e as condições do hospedeiro. Têm-se assim, as formas exsudativas, características dos processos inflamatórios agudos e as formas proliferativas ou formativas, que caracterizam os crônicos, relacionados à imunidade específica. Os fenômenos vasculares e celulares da inflamação elucidam seus sinais clínicos (SILVA; BERALDO; ROSENFELD, 1949; PEAKMAN; VERGANI, 2011; SIQUEIRA JR.; DANTAS, 2000; VIEGAS *et al.*, 2005).

Os danos tissulares sejam de natureza física, química ou biológica, desencadeiam imediatamente uma série de eventos, causando rubor, tumor, calor e dor. Estes sinais resultam da ativação de células nervosas, estromais, vasculares e

circulatórias através de estímulos físicos ou sinalizações químicas de estruturas das células rompidas (porções da membrana celular e organelas), fragmentos dos elementos inertes dos tecidos (colágenos, elastinas, fibronectinas, e outros), proteínas séricas que extravasam dos vasos rompidos e por ação de mediadores inflamatórios pré-formados (liberados principalmente dos grânulos das plaquetas, mastócitos e terminações nervosas periféricas) ou neo-sintetizados (eicosanoides e PAF) (COTRAN *et al.*, 2001; BALBINO; PEREIRA; CURI, 2005; SANTOS *et al.*, 1976).

Os mediadores supra-citados, ao se ligarem a receptores na superfície da membrana das células locais, influenciam significativas mudanças no seu metabolismo, na expressão de genes e, por consequência, em seu fenótipo (BALBINO; PEREIRA; CURI, 2005; OLIANI; GIL, 2006). Como resposta, observa-se a produção de uma segunda linha de mediadores de natureza lipídica (eicosanoides) e peptídica (citocinas, fatores de crescimento e neuropeptídeos) e a externalização de proteínas de adesão para leucócitos, chamadas de moléculas de adesão intercelular (ICAM) e moléculas de adesão celular-vascular (VCAM), utilizadas como marcadores, também fazem parte do recrutamento de agentes inflamatórios e se encontram nas células endoteliais na superfície da membrana voltada para a luz dos vasos. Os leucócitos circulantes aderem-se ao endotélio vascular e transmigram para o tecido intersticial em direção ao local da lesão, sob sinalização de agentes quimiotáticos (por exemplo, citocinas e leucotrienos). Em seguida, os leucócitos fagocitam o agente agressor e degradam o tecido necrótico (Figura 17) (BEVILACQUA, 1993; FILHO *et al.*, 2003; FRANCISCHETTI *et al.*, 2010; COUTINHO; MUZITANO; COSTA, 2009).

Além disso, como decorrência do próprio trauma ou da ativação celular, o microambiente tem sua composição físico-química alterada (baixa tensão de O<sub>2</sub>, diminuição de pH, presença de espécies reativas de nitrogênio e oxigênio, geração, por macrófagos, de óxido nítrico (NO) atuando como radical livre, sendo esta também outra forma de sinalização que ativa as células envolvidas no reparo tissular (SIES; GROOT, 1992; BALBINO; PEREIRA; CURI, 2005; OLIANI; GIL, 2006).

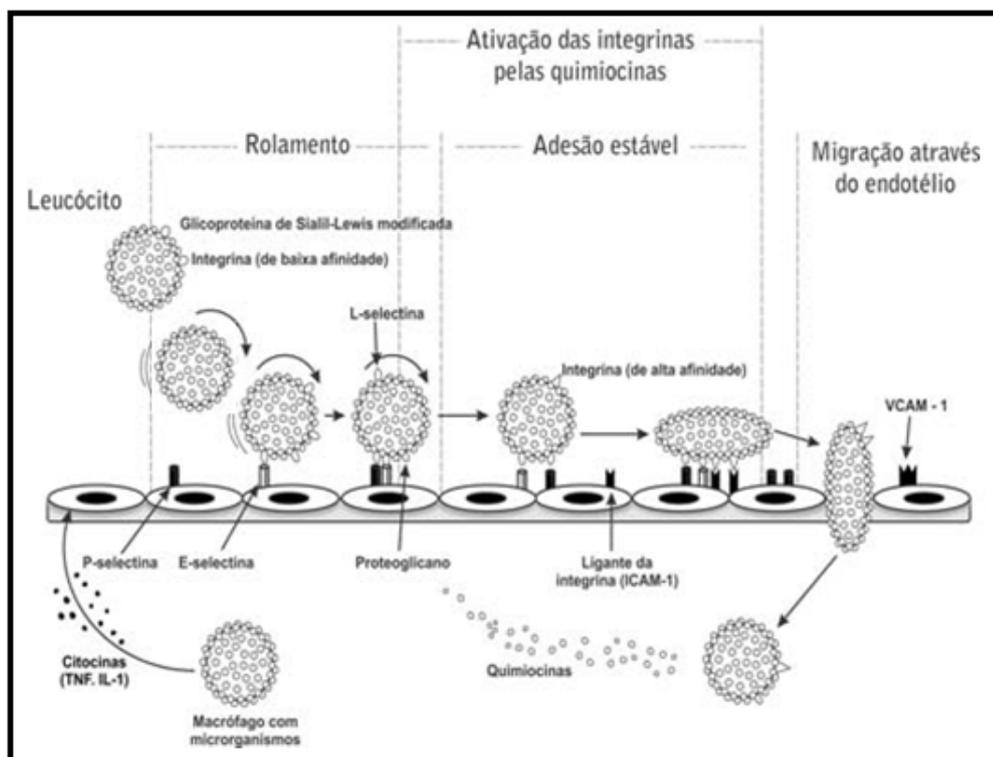


Figura 17. Esquema ilustrativo da migração de leucócitos através do endotélio vascular.

Fonte: FRANCISCHETTI *et al.*, 2010.

Além da descrição anterior, é importante enfatizar que uma lesão tissular periférica leva à liberação de mediadores químicos (ex. citocinas, histamina, bradicininas, serotonina, eicosanoides e radicais livres). Estes promovem e facilitam a transmissão dolorosa levando à hiperalgesia. Ocorrem alterações inflamatórias com os sintomas de calor, rubor, dor e edema, além da liberação de neurotransmissores excitatórios (aspartato, glutamato e substância P) que propagam a dor pelas vias sensoriais nociceptivas. Desse modo, os mediadores da inflamação também estão envolvidos na transmissão da dor em nível central e periférico (SERHAN; CHIANG, 2004).

Em nível central, os neurotransmissores citados são liberados na medula espinhal e ativam os receptores NMDA, provocam a atuação de 2º mensageiros (tais como, fosfolipase C, AMP cíclico, fosfatidilinositol (IP-3)), promovem a abertura dos canais de cálcio aumentando o influxo destes íons para o interior das membranas celulares, além de estimular a formação de oncogenes (RANG *et al.*, 2007).

Os eicosanoides, um dos mais importantes mediadores do processo inflamatório, são formados a partir do ácido araquidônico (AA), liberado dos

fosfolípidios de membranas celulares pela ação da enzima fosfolipase A2 (PLA2). O AA serve de substrato para quatro grupos de enzimas: ciclooxigenase (COX), 5-lipoxigenase (5-LO), 12-lipoxigenase (12-LO) e 15-lipoxigenase (15-LO). Através de uma série de reações em cascata são formados os mediadores pró-inflamatórios: prostaglandinas (PG), tromboxanas (TX) e leucotrienos (LT) (Figura 18) (SERHAN; OLIW, 2001).

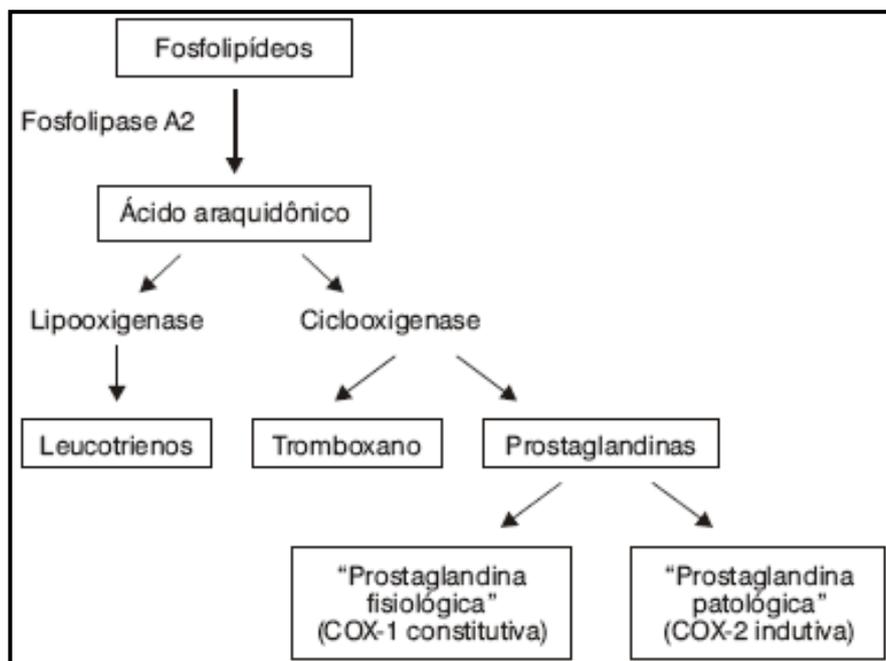


Figura 18. Esquema simplificado da biossíntese de prostaglandinas.

Fonte: HILÁRIO; TERRERI; LEN, 2006.

Em 1990, foi descoberto que a COX existe em duas isoformas, COX-1 e COX-2. A COX-1 é uma enzima presente constitutivamente na maioria das células e está relacionada à homeostase normal e citoproteção gástrica. A COX-2 é uma enzima induzida nas células inflamatórias por algum estímulo inflamatório (DUBOIS *et al*, 1998; FU *et al.*, 1990; FELDMAN; McMAHON, 2000). Inicialmente necessárias, a excessiva expressão delas têm conseqüências patogênicas. A capacidade de uma substância inibi-las sinaliza um potencial anti-inflamatório (RANG *et al.*, 2007; SUH *et al.*, 1998).

Uma terceira isoforma da COX é denominada COX-3, sendo uma variante do gene da COX-1, a princípio estaria relacionada com o mecanismo inicial pelo qual as drogas analgésicas e antipiréticas do tipo anti-inflamatórios não esteroides (AINEs)

promovem redução de dor e febre, porém não seria afetada por inibidores seletivos da COX-2 e ao contrário desta, seria capaz de produzir substâncias anti-inflamatórias (CHANDRASEKHARAN *et al.*, 2002). A algum tempo, pesquisadores vem se esforçando no intuito de conseguir uma melhor compreensão a respeito de sua função e modulação (BAZAN; FLOWER, 2002; DAVIES *et al.*, 2004).

Na continuidade do processo, ocorrem no tecido lesado à infiltração de células circulantes (neutrófilos e monócitos) e a migração de células das áreas adjacentes como células epiteliais, queratinócitos e fibroblastos. Estas últimas, em cooperação com as células locais, anteriormente ativadas, serão as protagonistas da fibroplasia (produção de colágeno pelos fibroblastos) e deposição de matriz extracelular, angiogênese (formação de novos vasos), cicatrização e re-epitelização da região da ferida (SINGER; CLARK, 1999). O processo do reparo do tecido possui três fases que são a inflamação, a formação de tecido de granulação com deposição de matriz extracelular e a remodelação que não são mutuamente excludentes, mas sobrepostas no tempo. O reparo completo de tecidos resulta de alternâncias sucessivas de reações anabólicas e catabólicas que têm os leucócitos como um de seus mais importantes protagonistas. Essas células, além de suas conhecidas atividades imunes, estão intimamente envolvidas com as reações catabólicas de degradação de tecidos, pela produção de proteases e espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, e também com as reações anabólicas de formação de tecidos, pela produção de fatores de crescimento, responsáveis pela recomposição da celularidade regional ou restabelecimento da sua homeostasia com a formação de cicatriz (BALBINO; PEREIRA; CURI, 2005).

A resposta inflamatória está associada a uma série de fatores como doenças auto-imunes, sepse, aterosclerose, alergias, câncer, dentre algumas. Não se conhece um tratamento conclusivo contra esse processo fisiológico, devido à particularidade dos mediadores do sistema imune e seus subtipos celulares. Portanto, há uma grande necessidade de se buscar novos compostos medicinais, e as plantas medicinais se encontram entre as melhores opções de escolha (SOUZA; OLIVEIRA; NICOLE, 2011).

Tanto a inflamação quanto a úlcera têm em comum o estresse oxidativo, provocado pela ação exacerbada das células fagocitárias, terminando no aparecimento de lesões, daí estudos de plantas com potencial antioxidante

comumente serem realizados com espécies vegetais de atividade anti-ulcerogênica e anti-inflamatória (BAIK *et al.*, 1996).

A existência de numerosos agentes obtidos de produtos naturais, os quais fornecem uma gama enorme de moléculas com potencial medicinal, é uma fonte para descobrimento de novos medicamentos com distintos mecanismos de atividade anti-inflamatória (RECIO *et al.*, 1995).

### **2.6.1 Substâncias de origem vegetal com atividade anti-inflamatória**

A descoberta de novos fármacos a partir de plantas conduziu ao isolamento e identificação de substâncias que são utilizadas na terapêutica ou que serviram como protótipos para a síntese de novos fármacos (VIEGAS JR; BOLZANI; BARREIRO, 2006; BALUNAS; KINGHORN, 2005; FABRICANT; FARNSWORTH, 2001). Estima-se que 40% dos medicamentos disponíveis clinicamente foram desenvolvidos a partir de fontes naturais: 25% de plantas, 13% de microrganismos e 3% de animais. Dos fármacos aprovados no período entre 1981 e 2002, cerca de 60% eram produtos naturais ou foram desenvolvidos a partir destes (CALIXTO, 2003; NEWMAN; CRAGG, 2007).

Um exemplo de produto oriundo de pesquisa brasileira é o anti-inflamatório fitoterápico Acheflan®, indicado no tratamento local de processos inflamatórios, sob as formas de aerosol e creme, cada uma contendo 5,0 mg do óleo essencial de erva-baleeira (*Cordia verbenaceae* DC., Boraginaceae), padronizado em 2,3-2,9% do terpeno  $\alpha$ -humuleno. Outro exemplo é o Daflon 500 mg®, medicamento composto por fração flavonoídica purificada, sob forma micronizada contendo 450 mg de diosmina e 50 mg de flavonoides titulados em hesperidina. Apresenta ação venotônica e vasoprotetora (COUTINHO; MUZITANO; COSTA, 2009).

Existem inúmeras substâncias de origem natural, com grande diversidade química, que apresentam atividade anti-inflamatória, como terpenos (TOLSTIKOVA *et al.*, 2006; BRINKER *et al.*, 2007), alcaloides (RAMSEWAK *et al.*, 1999, BUBENYÁK *et al.*, 2008), lignanas (BAN *et al.*, 2002; KASSUYA *et al.*, 2006), cumarinas (SILVÁN *et al.*, 1996) e constituintes fenólicos, especialmente flavonoides (MIDDLETON; KANDASWAMI; THEOHARIDES, 2000; HAVSTEEN, 2002; CAZAROLLI *et al.*, 2008).

Os flavonoides pertencem à classe dos constituintes fenólicos que têm sido estudados por suas propriedades anti-inflamatórias (MELO; GUERRA, 2002; BURNS *et al.*, 2001). Cerca de 40 substâncias, derivadas ou baseadas nesta classe, com ação anti-inflamatória, foram aprovadas entre 1983 e 1994 para uso terapêutico (BRICKS; SILVA, 2005; YOON; BAEK, 2005;). Os flavonoides agem modulando células envolvidas com a inflamação (por exemplo, inibindo a proliferação de linfócitos T), inibindo a produção de citocinas pró-inflamatórias (por exemplo, TNF- $\alpha$  e IL-1), regulando a atividade das enzimas da via do ácido araquidônico, tais como fosfolipase A2, ciclo-oxigenase e lipo-oxigenase, além de modularem a enzima formadora de óxido nítrico, a óxido nítrico sintase induzida (iNOS) (YOON; BAEK, 2005; KASSUYA *et al.*, 2006; SILVÁN *et al.*, 1996; MIDDLETON; KANDASWAMI; THEOHARIDES, 2000; HAVSTEEN, 2002; VEITCH; GRAYER, 2008).

Outros constituintes fenólicos, não flavonoídicos, se concentram nos derivados dos ácidos hidroxicinâmico e hidroxibenzóico. Entre os primeiros se destacam os ácidos p-cumárico, ferúlico, caféico e sináptico. No grupo dos ácidos hidroxibenzóicos, destacam-se os ácidos protocatecuíco, vanílico, siríngico, gentísico, salicílico, elágico e gálico (HARBORNE, 1998; SIMÕES, 2004; SOUSA, 2008). Esses ácidos fenólicos tem atuação semelhante aos flavonoides, no que diz respeito à essa capacidade antioxidantes (ANGELO; JORGE, 2007). O processo oxidativo nos seres vivos é considerado um fator de desencadeamento do processo inflamatório, visto que provoca uma desregulação celular, dano tecidual e disfunção endotelial entre outras, conduzindo a várias patologias (NAITO; YOSHIKAWA, 2005; DUMMER; THOMÉ; VERONESE, 2007). A presença das hidroxilas nas moléculas têm sido relacionadas como a principal causa de atividades anti-oxidantes nestes compostos (RAJALAKSMI; NARASIMHAN, 1995).

## **2.7 IMPORTÂNCIA DOS MÉTODOS DE ANÁLISES APLICADOS AOS PRODUTOS NATURAIS**

Importantes técnicas para separação e/ou identificação de substâncias foram desenvolvidas e aperfeiçoadas. Entre as principais, destacam-se a cromatografia em camada delgada (CCD), cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), cromatografia com fase gasosa (CG), ressonância magnética nuclear (RMN),

espectrometria de massas (EM) e espectroscopia na região do ultravioleta (UV) e do infra-vermelho (IF) (ANGNES, 2005).

Os métodos cromatográficos são procedimentos de análise fitoquímica mais utilizados atualmente, os quais, de forma resumida, consistem na passagem de um eluente (fase móvel) através de uma superfície plana ou coluna suporte (fase estacionária), onde se aplica a amostra. As substâncias presentes em uma amostra são retidas ou eluídas de acordo com o grau de afinidade pela fase estacionária. Os constituintes de menor afinidade são mais rapidamente separados. Esses métodos são utilizados na avaliação da qualidade de produtos medicinais naturais e constam em documentos da Organização Mundial de Saúde (WHO, 1992; WHO, 1998), em farmacopeias nacionais e internacionais. Por exemplo, a cromatografia em camada delgada (CCD), por ser uma metodologia simples, acessível e de grande utilidade na análise de drogas vegetais (MATOS, 1997; SIMÕES *et al*, 2004).

A CCD é um método rápido, eficiente, de baixo custo e empregado em grande escala no controle de qualidade de plantas medicinais, tanto na matéria-prima quanto no produto acabado (JULIÃO *et al.*, 2003). Geralmente são utilizadas fases estacionárias extremamente polares e solventes com uma polaridade média em relação à polaridade dos componentes da amostra (DEGANI, CASS; VIEIRA, 1998).

A cromatografia com fase gasosa (CG) consiste na distribuição dos componentes da amostra entre uma fase estacionária (sólido ou líquido) e uma fase móvel sendo o gás denominado carreador ou de arraste, onde as substâncias serão transportadas e separadas através da coluna. O componente da amostra cuja afinidade pela fase estacionária seja maior exigirá maior tempo para ser eluído que aquele cuja interação seja menor. O ponto de ebulição do componente determina o tempo de eluição, entre dois componentes de uma mistura com a mesma afinidade pela fase estacionária, aquele que possuir maior ponto de ebulição apresentará maior tempo de eluição (CHAAR, 2000).

A combinação de cromatografia com fase gasosa aliada à detecção por espectro de massas (CG-EM) é um grande facilitador na análise de misturas complexas, pois exige quantidade reduzida da amostra a ser analisada e possui compatibilidade, sensibilidade e especificidade dos dados (McFADDEN, 1988).

O espectrômetro de massas é um instrumento que permite determinar a massa molecular de substâncias eletricamente carregadas por um sistema de ionização, ou íons previamente formados pela dissociação molecular induzida por

colisão, com apresentação de um espectro de massas para cada sinal cromatográfico, de acordo com o padrão de fragmentação. A massa molar já caracteriza a classe de substância. O padrão de fragmentação pode ser comparado aos dados de uma biblioteca de espectros de massas, geralmente instalada no computador, acoplado ao aparelho. O programa computacional com o banco de dado faz propostas quanto à identidade da substância analisada e cabe ao analisador identificar corretamente (SILVERSTEIN; WEBSTER; KIEMLE, 2005; NICARETA, 2006).

Para identificação das substâncias, compara-se o tempo de retenção relativo da amostra com padrões, geralmente buscando auxílio no índice de retenção, o qual apresenta a retenção de substâncias numa escala uniforme, determinada por uma série padrão, utilizando uma mistura de alcanos de diferentes números de átomos de carbono. Ele fornece informações sobre a seqüência de eluição da substância e varia em função da fase estacionária e da temperatura. Uma variação desse índice pode ser usada quando não há uma escala logarítmica, na programação de temperatura, sendo chamada de índice de Kratz (VAN DEN DOOL; KRATZ, 1963; PINI, 1995; JANZANTTI; FRANCO; WOSIACKI, 2003).

A técnica de cromatografia líquida, em especial a CLAE, é complementar à cromatografia com fase gasosa, pelo fato de permitir a separação e análise de substâncias termicamente instáveis, não voláteis ou de elevada polaridade (BARCELÓ; HENNION, 1997). É uma das técnicas de maior crescimento tanto em análises qualitativas como quantitativas, principalmente na área farmacêutica, devido à sensibilidade e seletividade do método. A separação dos constituintes ocorre com base nas características físico-químicas de cada substância e interações (eletrostáticas, hidrofóbicas, pontes de hidrogênio ou forças de Van der Waals) entre o soluto e a fase estacionária, resultando numa migração pela coluna de forma seletiva pela fase móvel, a qual não deve ter qualquer interação química com a amostra (TONHI *et al.*, 2002; CASS; DEGANI, 2001).

A CLAE pode ser acoplada à espectroscopia de ultravioleta (UV), a qual se utiliza de radiação de baixo comprimento de onda (200 – 400 nm) e alta energia. Para que os componentes de uma amostra sejam detectáveis, é necessário que apresentem características moleculares como presença de ligações insaturadas, ligações  $\pi$  (duplas ou triplas). Ao ser incidido sobre a amostra uma determinada quantidade de radiação UV, esta é absorvida (absorbância) excitando os elétrons

das ligações e induzindo um salto quântico de um orbital de menor para um de maior energia (estado ativado). A energia absorvida é liberada no retorno dos elétrons ao estado fundamental havendo detecção, pelo espectrofotômetro, do comprimento de onda (nm) com pico máximo de absorbância característico da amostra analisada (REDA, 2004).

Deve-se ressaltar que a abordagem convencional baseada no espectro de UV é freqüentemente limitada quando a amostra contém substâncias muito semelhantes, cromóforos semelhantes e ausência destes. Esta técnica está sendo preterida em relação a outras técnicas espectrométricas, devido à possibilidade de obtenção de espectros semelhantes para substâncias muito diferentes (PEREIRA, 2010; SILVERSTEIN; WEBSTER; KIEMLE, 2005).

O controle da autenticidade e qualidade dos medicamentos naturais é necessário e imprescindível. A identificação dos vegetais e seus princípios ativos proporcionam aos laboratórios especializados e à população condições de, ao realizarem o estudo e preparação de um fitoterápico, que sejam alicerçados ao conhecimento científico (ALICE *et al.*, 1995).

A análise anatômica, macro e microscópica também é uma ferramenta importante no uso racional de fitoterápicos (BARBOSA, 2004). A identidade botânica da matéria-prima de um medicamento natural, confere autenticidade ao mesmo e é realizada principalmente através destas análises, além da verificação dos constituintes químicos da espécie. Entretanto, a maioria das plantas comercializadas *in natura* está em forma de pós, permitindo somente a identificação da droga pelos aspectos microscópicos. Um exemplo é a análise de canais ou cavidades secretoras, responsáveis pela liberação de variadas substâncias químicas como óleos essenciais, que permite, dependendo da deformação ou rompimento, uma verificação qualitativa e quantitativa de uma matéria-prima vegetal (WALLIS, 1960; SÁ, 1992; SIMÕES *et al.*, 2004).

### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1 OBJETIVO GERAL**

Caracterizar os constituintes químicos e avaliar o potencial farmacológico dos extratos das folhas (FO), cascas do ramo lateral (CR) e cascas do tronco (CT) de *Hortia brasiliiana* Vand. ex DC., com intuito de evidenciar o uso popular através da experimentação científica.

#### **3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

Realizar uma caracterização morfo-anatômica das folhas de *H. brasiliiana*.

Caracterizar em *H. brasiliiana*, por cromatografia com fase gasosa acoplada à espectrometria de massas, os componentes do óleo essencial obtido das folhas e dos extratos hexânicos de FO, CR e CT.

Avaliar em *H. brasiliiana*, a influência do efeito da hora de coleta, da idade das folhas e de indivíduo em estágio de frutificação, na composição do óleo essencial obtidos das folhas.

Caracterizar e comparar os constituintes dos extratos FO, CR e CT de *H. brasiliiana* por cromatografia em camada delgada e cromatografia líquida de alta eficiência associada à espectroscopia de UV.

Identificar constituintes químicos em *H. brasiliiana*.

Investigar as atividades antinociceptiva e anti-inflamatória dos extratos hexânicos de FO, CR e CT de *H. brasiliiana*.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 COLETA DO MATERIAL VEGETAL

*Hortia brasiliiana* Vand. ex DC. foi coletada nas cidades de Muriaé e Juiz de Fora, Minas Gerais, totalizando quatro indivíduos. A espécie foi identificada pelo Dr. Milton Groppo Júnior, da Universidade de São Paulo – USP. Tombos realizados no Herbário CESJ da UFJF.

**Amostra 1:** Folhas (FO), cascas do ramo lateral (CR) e cascas do tronco (CT) de *H. brasiliiana* foram coletadas no distrito de São Fernando, Muriaé, Minas Gerais, no dia 19 de setembro de 2010, para caracterização química e testes farmacológicos. Uma segunda coleta de folhas foi realizada para análise morfoanatômica. Número de tombo 59192.

**Amostra 2:** Para extração e análise de óleo essencial, folhas foram coletadas, no condomínio Villagio da Serra, BR040, Juiz de Fora, Minas Gerais, no dia 10 de fevereiro de 2011, em três turnos, 8:30, 14:30 e 18:30 hs, chamando-se de HM1, HM2 e HM3 para cada uma das três repetições de coleta matutina respectivamente, HT1, HT2 e HT3 para cada uma das três repetições de coleta vespertina respectivamente, HN1, HN2 e HN3 para cada uma das três repetições de coleta noturna respectivamente. Estas coletas tiveram como objetivo a análise comparativa dos constituintes de acordo com a influência do horário de coleta. Número de tombo 59191.

**Amostra 3:** Para extração e análise de óleo essencial, folhas foram coletadas no condomínio Salvaterra, bairro Salvaterra, Juiz de Fora, Minas Gerais, no dia 20 de outubro de 2011, em dois estágios diferentes de amadurecimento, denominados estágio folha nova (FN) e estágio folha madura (FM). Número de tombo 59193. Uma coleta foi feita das folhas de outro indivíduo no mesmo local, porém em estágio de frutificação (FG). Número de tombo 59194. Estas coletas tiveram como objetivo a análise comparativa dos constituintes de acordo com idade das folhas e o período de frutificação.

**Amostra1:** Para obtenção de extratos brutos, as amostras foram submetidas à secagem na temperatura de 50°C, em estufa de circulação forçada de ar até atingir peso constante.

**Amostras 2 e 3:** No processo de obtenção de óleo, quando não levadas imediatamente, após coleta, para extração, as folhas frescas eram mantidas em freezer e rasuradas apenas no momento de realização da hidrodestilação.

## **4.2 CARACTERIZAÇÃO MORFOANATÔMICA DAS FOLHAS**

Folhas frescas (Amostra 1) foram avaliadas quanto à exsudação de óleo na superfície epidérmica através da utilização de lupa e microscópio estereoscópico.

O preparo das lâminas microscópicas temporárias constou de cortes transversais de folhas corados com Azul de Astra e Fucsina para realçar as estruturas secretoras presentes.

Para quantificação das glândulas secretoras presentes na superfície epidérmica foram seccionadas lâminas foliares (Amostra 3) com 1cm<sup>2</sup> da região mediana foliar, excetuando-se a margem, nervura central, ápice e a base. Um fragmento da porção intercostal direita e esquerda de cinco folhas foram clarificados com hipoclorito de sódio 50%. Após lavados, os fragmentos foram corados com Sudan III, para evidenciar substâncias lipídicas.

Os fragmentos selecionados foram fotografados em fotomicroscópio marca BX41 com fotomicrografia aclopada, marca Canon Power Shot A640, e em microscópio estereoscópico marca Olympus. Posteriormente foi feita a contagem do total das cavidades para comparação entre as partes abaxial e adaxial de três tamanhos de folhas, denominadas folha pequena (FP), folha média (FC) e folha grande (FD), além de uma quarta folha denominada folha madura (FM).

## **4.3 PROCESSOS DE EXTRAÇÃO**

### **4.3.1 Óleo essencial**

Para extração do óleo essencial, as folhas foram rasuradas e acondicionadas em balões de vidro de 12 litros, sendo que o volume de água destilada e material vegetal atingia 6 litros em sistema de hidrodestilação utilizando-se aparelho tipo Clevenger modificado. Após um período ininterrupto de 3 horas de destilação, foram obtidos os óleos essenciais para serem analisados em CG-EM.

Os constituintes dos óleos essenciais obtidos foram avaliados quanto à influência do horário de coleta em triplicata, na Amostra 2, e quanto à influência do estágio de desenvolvimento das folhas e do período de frutificação, na Amostra 3.

#### **4.3.2 Extratos hexânicos e metanólicos**

FO, CR e CT (Amostra 1) foram fragmentadas manualmente e submetidas à extração em hexano seguido por metanol, por maceração estática, até exaustão. Dessa forma, foram obtidos os extratos hexânicos, avaliados por CG-EM, CLAE-UV e CCD; e os extratos metanólicos, avaliados por CLAE-UV e CCD.

#### **4.3.3 Extratos aquosos**

FO, CR e CT (Amostra 1) foram fragmentadas manualmente e submetidas à extração com decocção por 15 min. Após congelamento os extratos foram liofilizados e analisados por CLAE-UV e CCD.

### **4.4 CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA**

A análise dos constituintes químicos por CG-EM foi realizada na Plataforma Analítica de Farmanguinhos (FIOCRUZ), utilizando um cromatógrafo com fase gasosa Hewlett Packard 6890 equipado com uma coluna capilar de sílica fundida (HP-5, 30m x 0,25 mm e espessura da película 0.25 $\mu$ m), hélio como gás de arraste, taxa de fluxo 1.0mL/min; programação de temperatura de 70°C a 290°C (2°C / min), acoplado a um espectrômetro de massas Hewlett-Packard 5972. Os parâmetros operacionais foram: fonte, 70eV íon 250°C equipado com EI.

A identificação das substâncias foi realizada por comparação de seus índices de retenção (IR) com valores de literatura (ADAMS, 1995) e com o banco de dados

do espectrômetro de massas (WILEY 7n.1). Esses índices foram calculados usando dados de CG de uma série homóloga de hidrocarbonetos alifáticos saturados com C8 a C22, utilizando-se a mesma coluna e condições da análise de CG para os extratos.

A análise dos constituintes químicos por CLAE-UV foi realizada na Plataforma Analítica de Farmanguinhos (FIOCRUZ) com cromatógrafo líquido de alta eficiência marca Shimadzu LC-10, duas bombas LC-10 AT, injetor Rheodyne 7725, com alça de amostragem de 20 µL e detector de arranjo de fotodiodos SPD-M10A. Coluna utilizada: Zorbax SB-18; 250 x 4,6 mm, com partículas de 5 µL. Um gradiente linear foi estabelecido num sistema binário de solventes, A: B, que variou de 0 a 100% de B, sendo executado numa taxa de fluxo de 1 mL/min. ao longo de 60 minutos, onde A constituiu-se de acetonitrila: H<sub>2</sub>O, 5:95, com 0,05% TFA e B - acetonitrila: H<sub>2</sub>O, 65:35, com TFA a 0,05%. A fase móvel foi devolvida à sua composição original ao longo de 60 minutos, havendo um adicional de 10 minutos para a coluna se re-equilibrar antes da injeção da amostra seguinte. O volume da amostra consistiu em 20 µL a uma concentração de 1 mg/mL e a temperatura foi mantida a 25°C durante a análise. A detecção foi realizada simultaneamente a 220 e 335 nm.

Análise dos constituintes químicos por CCD foi realizada utilizando-se cromatoplasas sílicagel 60 0,2 mm, com indicador fluorescência UV<sub>254</sub>, marca Macherey-Nagel.

Foram pesados 5mg de cada um dos extratos aquosos, hexânicos e metanólicos e posteriormente diluídos em 1mL de solvente na seguinte forma: extrato metanólico e aquoso em metanol; e extrato hexânico em clorofórmio.

Com o auxílio de tubos capilares de vidro, retirou-se 20 µL de cada solução para serem aplicadas na origem de cinco cromatoplasas.

Cada placa recebeu aplicações de extrato de FO, CR e CT e foram eluídas de acordo com o solvente dos referidos extratos, conforme segue: extrato hexânico= hexano : acetato de etila (1:1, v/v); extrato metanólico = acetato de etila 100% e/ou acetato de etila : metanol (9:1); extrato aquoso= acetato de etila : metanol : água (100:13,5:10).

Após eluição, as placas foram secas e observadas sob luz ultravioleta (UV<sub>254</sub> e UV<sub>365</sub> marca Biothec) ou a olho nu, de acordo com a literatura (WAGNER; BLADT, 2001), sendo registrados os resultados.

Posteriormente foram utilizados os reveladores para as principais classes de substâncias químicas de interesse (SHARMA; BAKHASHI, 1991; WAGNER; BLADT, 2001; CARVALHO *et al.*, 2006; GIANVECHIO *et al.*, 2006; MACIEL *et al.*, 2006):

- DRG (Dragendorff) para a detecção de alcaloides (coloração amarronzada).

-NP/PEG (difenilboriloxietilamina/polietilenoglicol), para a detecção de flavonoides (amarelo, laranja) e ácidos fenólicos (azul) sobre luz ultravioleta de comprimento de onda de 365 nm.

-KOH (hidróxido de potássio) para a detecção de antraquinonas (vermelho-amarelo) e cumarinas (azul-verde/verde amarelado) sobre luz uv 365 nm.

-VS (vanilina sulfúrica) para a detecção de terpenoides (amarelo-marrom) e ácidos graxos (azul).

-LB (Liebermann-Burchard) detecção de triterpenoides e esteroides (coloração levemente rósea a avermelhada).

## **4.5 ATIVIDADES ANTINOCICEPTIVA E ANTI-INFLAMATÓRIA**

### **4.5.1 Animais**

Foram utilizados camundongos Swiss (25-30 g) e ratos Wistar (200-240 g) machos provenientes do Centro de Biologia da Reprodução da Universidade Federal de Juiz de Fora. Os animais foram mantidos em gaiolas de polipropileno (47x34x18 cm) com ração e água *ad libitum* em temperatura ambiente ( $22\pm 2$  °C) durante 3 dias no ciclo claro/escuro de 12 horas (claro de 06:00 às 18:00 h). Doze horas antes da realização dos experimentos, os animais foram privados de alimentação. O protocolo utilizado foi aprovado pelo Comitê de Ética na Experimentação Animal (CEEA) desta instituição (nº 036/2010).

### **4.5.2 Teste de contorções abdominais**

Os extratos hexânicos de *H. brasiliiana* (50, 100 e 200 mg/kg) foram administrados em camundongos, por via oral (v.o.), uma hora antes da aplicação de 10 mL/kg de ácido acético 0,6% (n = 8) (COLLIER *et al.*, 1968) intraperitonealmente. O número de contorções abdominais foi contado entre 10 e 30 minutos após esse

procedimento. O grupo controle recebeu 10 mL/kg de salina (v.o.). Indometacina (10 mg/kg, v.o.) e ácido acetilsalicílico (200 mg/kg), anti-inflamatórios não-esteroides, foram usados como controles positivos.

#### **4.5.3 Teste da formalina**

Um volume de 20 µL de formalina 2,5% (em salina estéril) foi aplicado no espaço subplantar da pata direita dos camundongos (n = 8) e duração do tempo de lambida foi determinado de 0 a 5 minutos (1ª fase) e 15 a 30 minutos (2ª fase) (HUNSKAAR; HOLE, 1987). Os extratos hexânicos de *H. brasiliiana* foram administrados nas doses de 50, 100 e 200 mg/kg (v.o.) 1 hora antes da injeção da formalina. Os animais controle receberam 10 mL/kg de salina (v.o.). Morfina (1 mg/kg, s.c.) e indometacina foram usadas como controles positivos.

#### **4.5.4 Teste da placa quente**

Quatro grupos de oito camundongos foram tratados com salina ou extratos hexânicos de *H. brasiliiana* (50, 100 e 200 mg/kg, v.o.). Os animais foram colocados em placa quente aquecida a 55±1 °C (EDDY; LEIMBACH, 1953). A medida dos tempos que os animais levam para levantar a pata foi realizada com base em 0, 30, 60 e 90 minutos, após administração do extrato, com tempo máximo de permanência sobre a placa quente de 40 segundos, para evitar lesões. Em outro grupo de animais, o efeito do pré-tratamento com naloxona (1 mg/kg, s.c.) sobre a analgesia produzido pelo extrato (200 mg/kg, v.o.) foi determinado. Morfina (1 mg/kg, s.c.), na ausência e na presença de naloxona, foi usada como controle positivo do teste.

#### **4.5.5 Edema de pata induzido por carragenina**

O edema de pata foi induzido pela injeção de 0,1 mL de carragenina (2% p/v) em salina estéril e administrada na região subplantar da pata direita de rato Wistar machos (n = 6). Uma hora antes da injeção de carragenina, os extratos hexânicos de *H. brasiliiana* foram administrados (v.o.) nas doses de 50, 100 e 200 mg/kg (WINTER *et al.*, 1962). O grupo controle recebeu 10 mL/kg de salina (v.o.). Na pata esquerda,

usada como controle, foi injetada 0,1 mL de salina estéril. Nos tempos 2h, 3h e 4h após injeção de carragenina, a medida do edema foi feita pela diferença entre o volume da água deslocado da pata direita e o da pata esquerda utilizando um pletismômetro. Indometacina (10 mg/kg, v.o.) foi usada como controle positivo do teste.

#### **4.5.6 Pleurisia induzida por carragenina**

A pleurisia foi induzida em ratos Wistar pela injeção intrapleural de 0,5 mL, entre a terceira e a quinta costela do lado direito do mediastino, de uma suspensão de carragenina 2% em solução salina estéril (VINEGAR *et al.*, 1973). Grupos de seis ratos foram tratados com os extratos hexânicos de *H. brasiliiana* (50, 100 e 200 mg/kg, v.o.), indometacina (10 mg/kg, v.o.) ou salina (10 mL/kg, v.o.) uma hora antes da aplicação do agente inflamatório. Quatro horas após a indução da inflamação, os animais foram anestesiados com cloridrato de cetamina (75 mg/kg) e cloridrato de xilazina (10 mg/kg) e sacrificados. Uma incisão foi feita entre a terceira e quinta costela em cada lado do mediastino. O exsudato pleural foi coletado, transferido a um tubo cônico de centrífuga e o volume foi determinado. Uma alíquota de 20 µL do exsudato foi usada para determinar a contagem total de leucócitos em câmara de Neubauer.

#### **4.6 ANÁLISES ESTATÍSTICAS**

Os resultados foram demonstrados através da média±erro padrão da média. Análise de variância (ANOVA) seguida do teste de Student Newman-Keuls foi utilizada para medir o grau de significância ( $p < 0,05$ ).

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 CARACTERIZAÇÃO MORFO-ANATÔMICA DAS FOLHAS

A Figura 19 ilustra a presença das estruturas secretoras em folhas de *H. brasiliiana* onde se verificam cavidades secretoras em vários tamanhos e estruturas com afloramento na epiderme. A foto D representa um corte transversal de lâmina foliar que detalha estrutura secretora corado com azul de Astra após clarificação (Figura 19). As demais fotos apresentaram coloração com SUDAN III após clarificação. Nestas, podem ser vistas as cavidades secretoras em diversos estágios e aumentos de tamanho (Figura 19). As fotos foram obtidas nos seguintes tamanhos: em microscopia ótica (A=4x; B=10x; D=20x; C e E=40x) e em microscópio estereoscópico (F=4X) (Figura 19).

Considerando as alterações foliares, a folha é o órgão vegetal de maior plasticidade e com grande capacidade de adaptação de suas estruturas internas, pois sua anatomia sofre muita interferência das condições ambientais (LANGE *et al.*, 1983). Uma avaliação foliar revela particularidades importantes na identificação da espécie e do teor de óleos essenciais e outras substâncias naturais (WALLIS, 1960; SÁ, 1992).

A família Rutaceae apresenta como sinapomorfia a presença de cavidades translúcidas em suas folhas (JUDD *et al.*, 1999). Estas estruturas foram verificadas contendo óleos essenciais nas folhas de *H. brasiliiana*, sendo distribuídas em todo o parênquima foliar como pontos translúcidos, a olho nu (Figura 19).

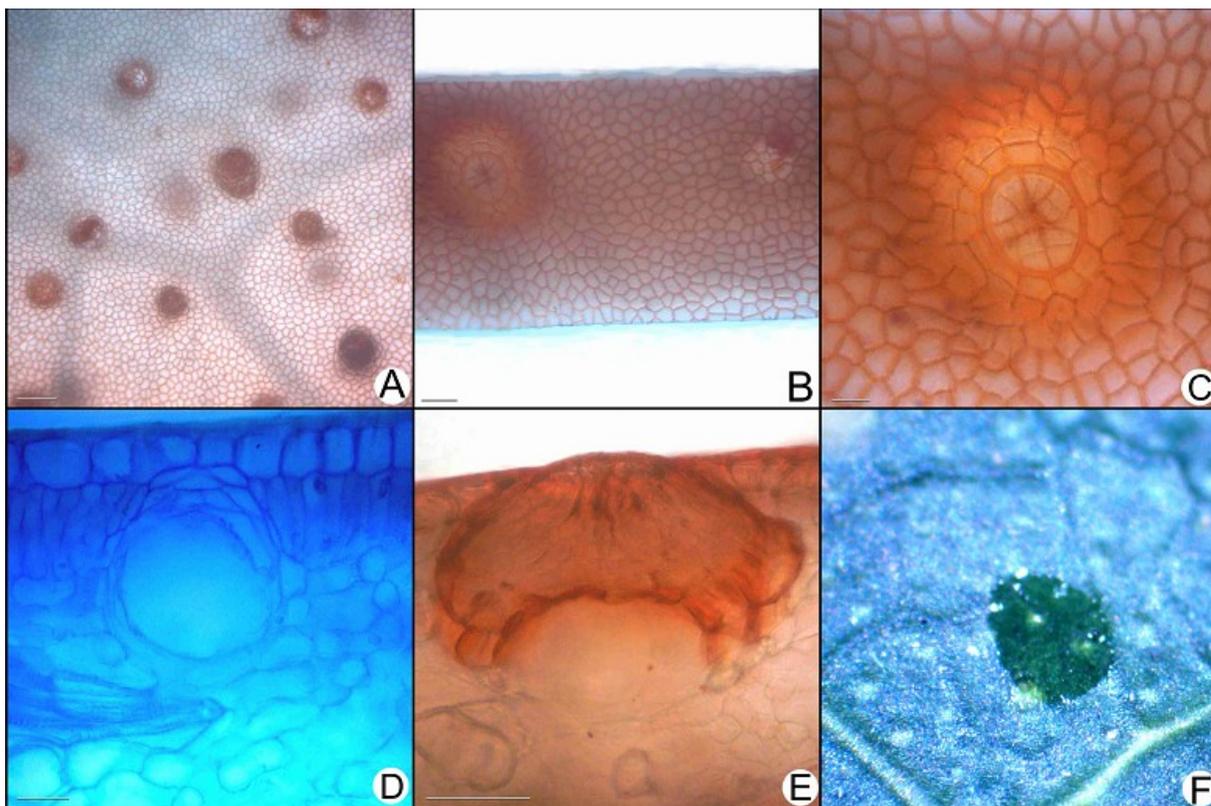


Figura 19. Cortes transversais de lâmina foliar de *Hortia brasiliana* Vand. ex DC. Foto A: cavidades secretoras em vários tamanhos e estágios de desenvolvimento, em folha clarificada. Foto B: duas cavidades sendo que a da esquerda apresenta afloramento na epiderme, em destaque na foto C. Fotos D e E: seções transversais de estrutura nova sem afloramento epidérmico e estrutura em estágio de afloramento epidérmico, respectivamente. Foto F: extravasamento de óleo essencial em visão frontal epidérmica em microscópio estereoscópico.

Barras: A=100µm; B à E=50 µm; F= sem barra

Os óleos essenciais podem ser utilizados pelos vegetais com finalidades de competição planta-planta, atração de polinizadores e proteção contra ataques de predadores (TAIZ; ZEIGER, 2009).

Na relação do número de cavidades secretoras de óleo essencial expostas na epiderme das folhas, pode-se perceber que na parte abaxial há um maior número, nos estágios iniciais analisados, nas folhas médias e principalmente nas folhas pequenas (Figura 20), o que pode demonstrar uma adaptação do vegetal à sobrevivência, pois *H. brasiliana* apresenta estômatos apenas na parte abaxial e sabe-se que estas estruturas representam uma potencial porta de entrada de microrganismos (LARCHER, 1986). Neste sentido, o óleo poderia estar agindo como

proteção contra herbivoria e microrganismos patogênicos sendo que nas folhas grandes e maduras parece não haver diferença na quantidade adaxial e abaxial, o que poderia ser explicado por estas já possuírem uma estrutura tecidual mais rígida e resistente. Há herbívoros que rejeitam folhas maduras pelo fato deles não possuírem um aparelho bucal adequado preferindo folhas novas, devido a estas possuírem uma espessura mais fina (COLEY, 1983; RIBEIRO; PIMENTA; FERNANDES, 1994).

A maior concentração de cavidades na parte abaxial, onde se encontram os estômatos, estruturas responsáveis pela maior taxa de transpiração vegetal, pode ainda ter uma relação com a possibilidade de diminuição da perda de água.

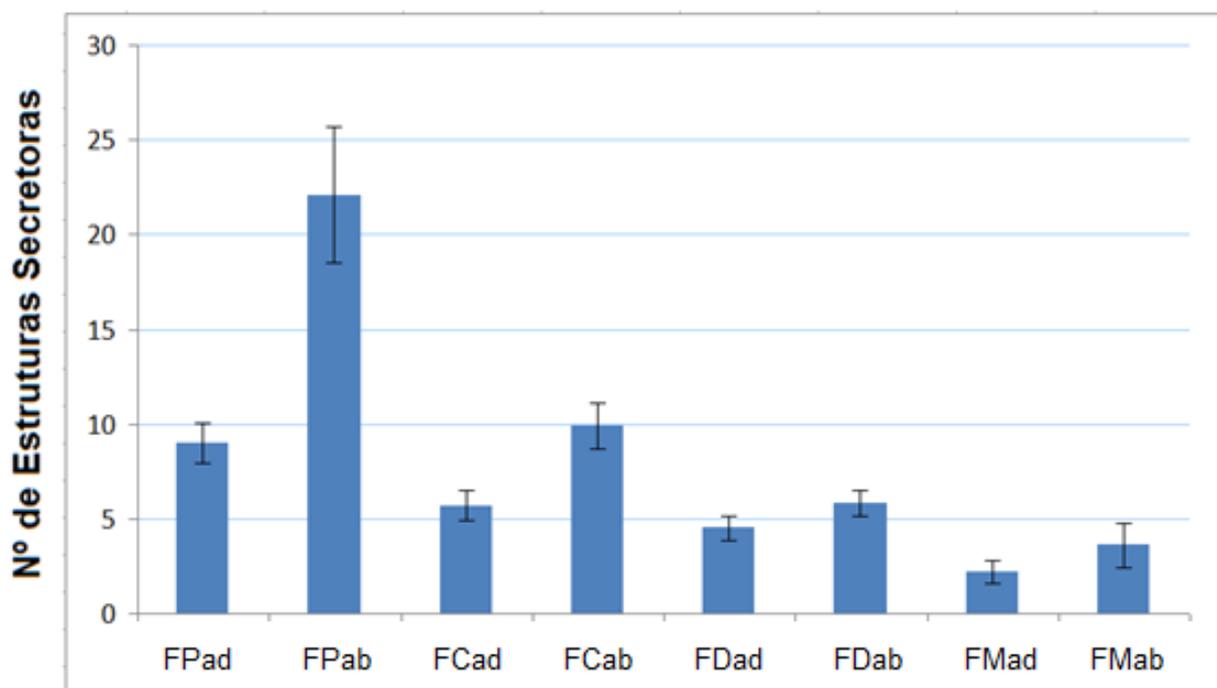


Figura 20. Comparação da quantidade de estruturas secretoras presentes nas folhas de *Hortia brasiliiana*. FPad=folha pequena adaxial; FPab=folha pequena abaxial; FCad =folha média adaxial; FCab =folha média abaxial; FDad= folha grande adaxial; FDab=folha grande abaxial; FMad=folha madura adaxial; FMab=folha madura abaxial. Barra referente a desvio padrão de 10 repetições (secções à esquerda e direita na porção intercostal de 5 folhas).

## 5.2 CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DO ÓLEO ESSENCIAL DAS FOLHAS (AMOSTRA 2)

As folhas da Amostra 2 foram coletadas em três turnos com três repetições cada: manhã (8:30hs) denominadas HM1, HM2 e HM3), tarde (14:30hs) denominadas HT1, HT2 e HT3 e noite (18:30hs) denominadas HN1, HN2 e HN3). A influência do horário de coleta foi avaliada com base na variação dos constituintes e de suas concentrações, sendo agrupadas em estruturas acíclicas, cíclicas e bicíclicas.

Do total de constituintes identificados no óleo essencial, 20 substâncias estão presentes em, pelo menos, uma das repetições dos três horários avaliados. Destas, as oito mais frequentes foram identificadas em todas as repetições: Z- $\beta$ -farneseno,  $\alpha$ -curcumeno, zingibereno,  $\delta$ -cadineno,  $\beta$ -sesquifelandreno,  $\alpha$ -cadinol,  $\alpha$ -bisabolol e Z- $\alpha$ -trans-bergamotol (Tabela 1).

Os componentes dos óleos essenciais geralmente variam entre 20 e 60 substâncias, destacando duas ou três em altas concentrações, chamadas de majoritárias (CROTEAU; KUTCHAN; LEWIS, 2002). Neste sentido, o constituinte majoritário em todos os horários e repetições da Amostra 2, exceto em HM1, foi *Epi*- $\alpha$ -cadinol (Tabela 1 e Figura 21), com maior concentração em HM3 (21,61%). Em HM1 foi o E- $\beta$ -guaiano com 17,96% (Tabela 1).

A segunda substância de maior teor, em todos os horários e repetições da Amostra 2, foi o zingibereno (Tabela 1 e Figura 22), enquanto o 3º componente majoritário variou entre Z- $\alpha$ -trans-bergamotol (Figura 23), E- $\beta$ -guaiano (Figura 24),  $\alpha$ -bisabolol (Figura 25), E-hidrato de sesquisabineno (Figura 26) e  $\beta$ -sesquifelandreno (Figura 27), de acordo com as repetições (Tabela 1).

O óleo essencial, ainda quando extraído do mesmo órgão do vegetal, pode variar significativamente a sua composição química, de acordo com a época do ano ou até mesmo do horário de coleta dentro de um mesmo dia (REIS *et al.*, 2003).

O horário de coleta demonstrou pouca influência na composição dos óleos essenciais analisados. No entanto, a variedade de substâncias nas repetições do período matutino ficou abaixo dos outros horários (Tabela 1) divergindo das recomendações que são feitas em muitas espécies, para melhor aproveitamento da coleta neste período, em função da temperatura mais amena (SIMÕES *et al.*, 2004).

Tabela 1. Principais constituintes químicos do óleo essencial das folhas de *H. brasiliense* (Amostra 2) identificados por CG-EM.

Substâncias	C.	HM1	HM2	HM3	HT1	HT2	HT3	HN1	HN2	HN3	TR	IR-I.	IR-c.
<i>Z</i> - $\beta$ -farneseno	A	4,30	3,09	5,32	3,83	4,88	4,37	2,67	5,20	4,98	22,12	1443	1454
$\gamma$ -curcumeno	B	6,74	0	0	1,32	0	0	0	0	1,46	22,82	1480	1482
$\alpha$ -curcumeno	B	4,51	2,42	6,31	2,77	2,40	2,90	2,03	2,28	3,40	22,90	1483	1485
Zingibereno	B	13,71	8,34	13,13	9,69	10,16	9,40	8,22	10,74	11,32	23,24	1495	1498
<i>E</i> - $\beta$ -guaiano	C	17,96	8,09	0	0	0	0	3,11	0	4,10	23,51	1500	1510
$\beta$ -bisaboleno	B	8,53	0	5,14	4,93	4,86	6,48	2,60	5,32	5,31	23,56	1509	1512
$\gamma$ -cadineno	C	3,43	3,06	0	0	0	2,35	3,23	1,38	2,85	23,77	1513	1520
Sesquicineol	B	0	0	0	1,49	0	0	0	0	0	23,77	1514	1520
$\delta$ -cadineno	C	7,96	4,71	5,41	2,91	2,79	4,12	4,46	2,49	4,96	23,86	1524	1524
$\beta$ -sesquifelandreno	B	8,11	4,39	7,54	5,20	5,54	5,25	4,05	5,85	6,58	23,97	1524	1529
(~) <i>Z</i> -hidrato de sesquisabineno	B	0	2,43	0	1,82	2,21	2,18	2,65	1,82	2,13	24,69	desc	1559
<i>E</i> -hidrato de sesquisabineno	B	0	4,80	4,92	4,92	8,05	5,41	4,74	6,57	3,97	25,31	1580	1585
(~) <i>E</i> -hidrato de sequisabineno	B	0	5,13	5,24	4,27	5,33	5,34	4,60	5,27	4,22	25,56	desc	1595
<i>Epi</i> - $\alpha$ -cadinol	C	0	14,48	21,61	10,39	20,22	15,63	21,48	16,56	12,13	26,36	1640	1630
$\alpha$ cadinol	C	3,74	4,11	6,43	4,04	3,12	3,48	3,74	2,98	3,64	27,13	1653	1664
$\beta$ -bisabolol	B	0	0	0	1,76	0	0	0	1,10	1,45	27,43	1671	1677
$\alpha$ -bisabolol	B	2,12	6,77	10,42	9,60	6,85	7,02	7,20	6,30	5,63	27,76	1683	1691
<i>Epi</i> - $\alpha$ -bisabolol	B	3,18	3,18	0	0	2,83	2,99	2,97	2,83	3,12	27,81	1686	1694
<i>Z</i> - $\alpha$ -trans-bergamotol	B	9,55	8,10	8,53	6,36	6,54	7,39	6,58	4,90	6,42	27,93	1693	1699
n.d.	-	0	2,50	0	2,29	3,63	2,55	3,59	3,35	1,87	28,08	n.d.	1706
(~) <i>Z</i> - $\alpha$ -bergamotol	B	3,52	3,59	0	2,42	3,46	2,93	3,41	2,23	2,76	28,27	desc	1715
<i>Z</i> - $\beta$ -santalol	B	2,63	2,83	0	2,04	2,61	2,40	2,38	1,71	2,22	28,58	1720	1729
$\alpha$ -sinensal	A	0	1,84	0	1,40	0	1,65	1,67	1,04	1,48	29,20	1752	1758
TOTAL		99,99	93,86	100	84,11	95,48	93,84	95,38	89,92	96	-	-	-

C.=classe; HM1=folha da 1ª coleta matutina; HM2=folha da 2ª coleta matutina; HM3=folha da 3ª coleta matutina; HT1= folha da 1ª coleta vespertina; HT2=folha da 2ª coleta vespertina; HT3=folha da 3ª coleta vespertina; HN1=folha da 1ª coleta noturna; HN2=folha da 2ª coleta noturna; HN3=folha da 3ª coleta noturna; TR=tempo de retenção; IR-I.=índice de retenção da literatura; IR-c.=índice de retenção calculado; (~) =semelhante; n.d.=não determinado; desc.=desconhecido. A = grupos acíclicos; B = grupos monocíclicos; C = grupos bicíclicos. (Agrupamento baseado nos padrões de fragmentação de massas).

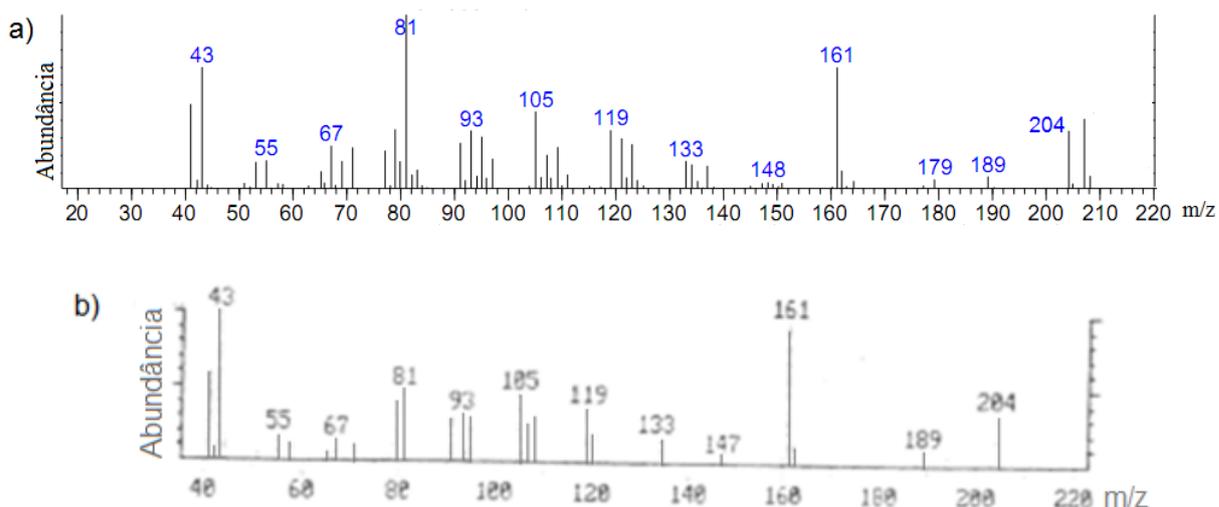


Figura 21. Espectro de massas do *Epi- $\alpha$ -cadinol*, constituinte majoritário do óleo essencial da Amostra 2 de *H. brasiliiana*. a) espectro de massa obtido da amostra. b) espectro de massa da literatura (ADAMS, 1995).

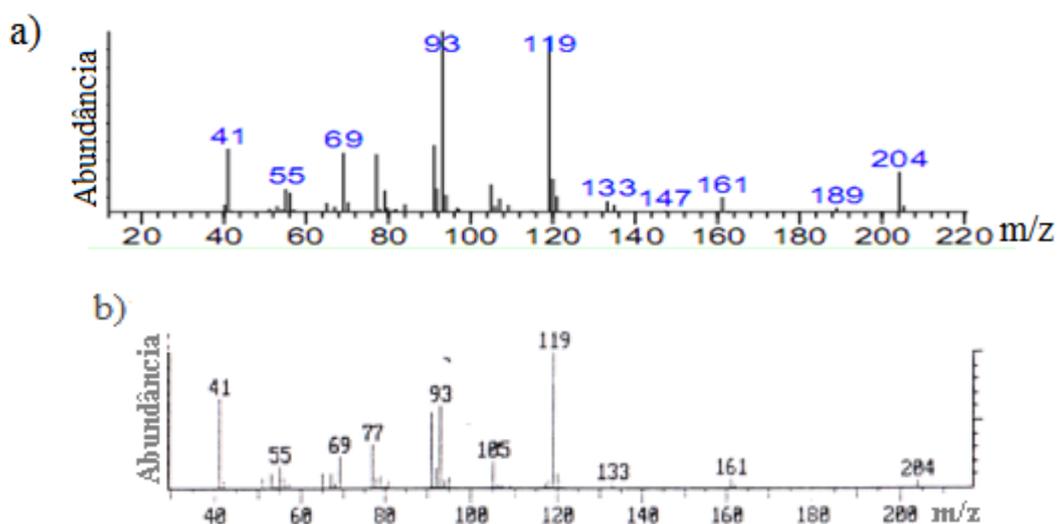


Figura 22. Espectro de massas do zingibereno, 2º constituinte majoritário em todas as coletas e horários da Amostra 2 de *H. brasiliiana*. a) espectro de massa obtido da amostra. b) espectro de massa da literatura (ADAMS, 1995).

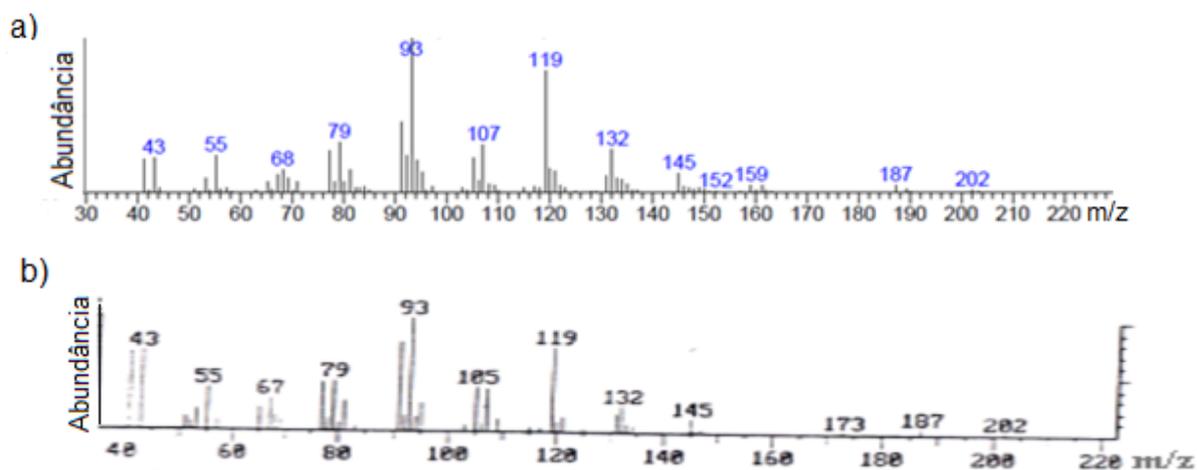


Figura 23. Espectro de massas do Z- $\alpha$ -trans-bergamotol, 1<sup>o</sup> majoritário em todas as coletas da Amostra 3 e 3<sup>o</sup> majoritário nas coletas HM1, HT1 e HT3 da Amostra 2 de *H. brasiliensis*. a) espectro de massa obtido da amostra. b) espectro de massa da literatura (ADAMS, 1995).

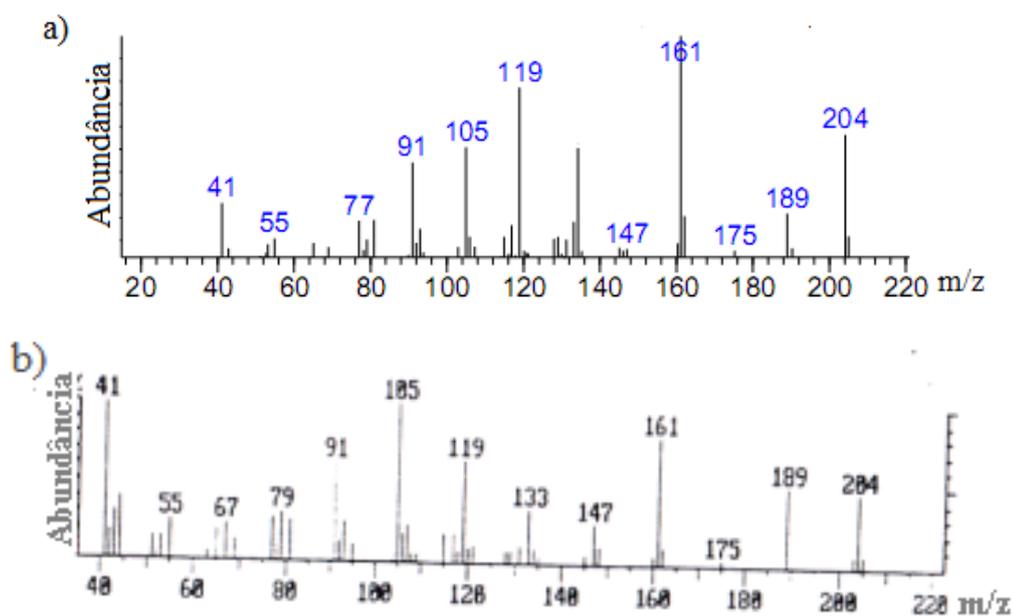


Figura 24. Espectro de massas do E- $\beta$ -guaiene, 1<sup>o</sup> majoritário na coleta HM1 e 3<sup>o</sup> em HM2, da Amostra 2 de *H. brasiliensis*. a) espectro de massa obtido da amostra. b) espectro de massa da literatura (ADAMS, 1995).

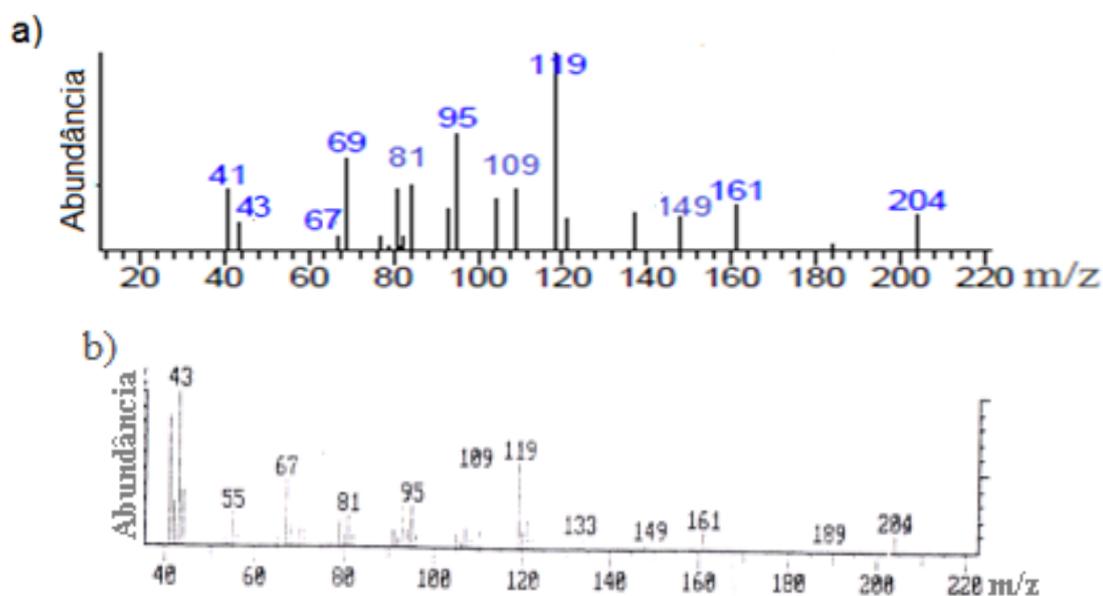


Figura 25. Espectro de massas do  $\alpha$ -bisabolol, 3º majoritário na coleta HM3 e HN1 da Amostra 2 de *H. brasiliiana*. a) espectro de massa obtido da amostra. b) espectro de massa da literatura (ADAMS, 1995).

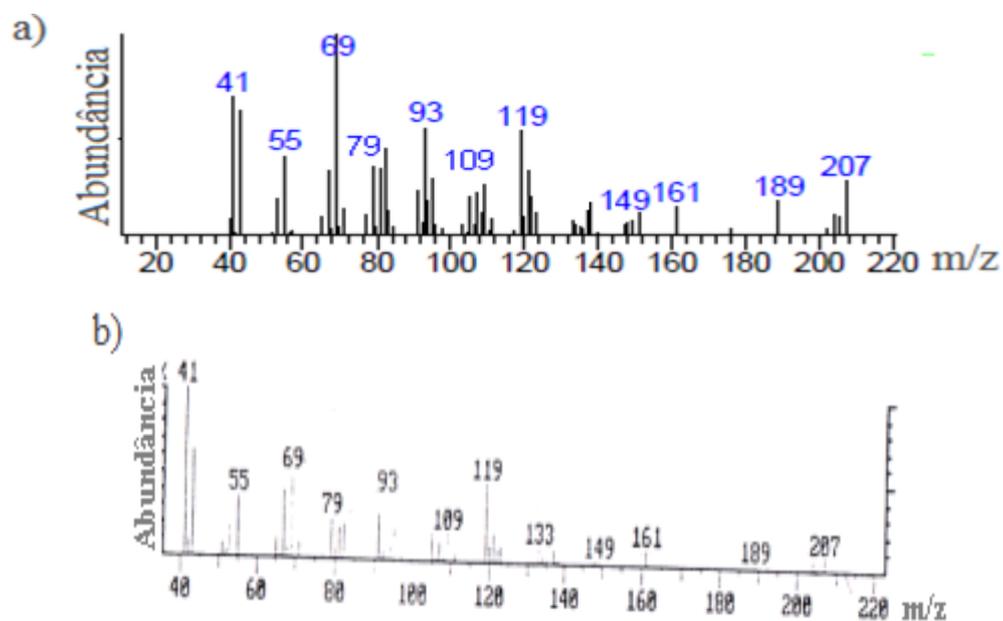


Figura 26. Espectro de massas do *E*-hidrato de sesquisabineno, 3º majoritário na coleta HT2 e HN2 da Amostra 2 de *H. brasiliiana*. a) espectro de massa obtido da amostra. b) espectro de massa da literatura (ADAMS, 1995).

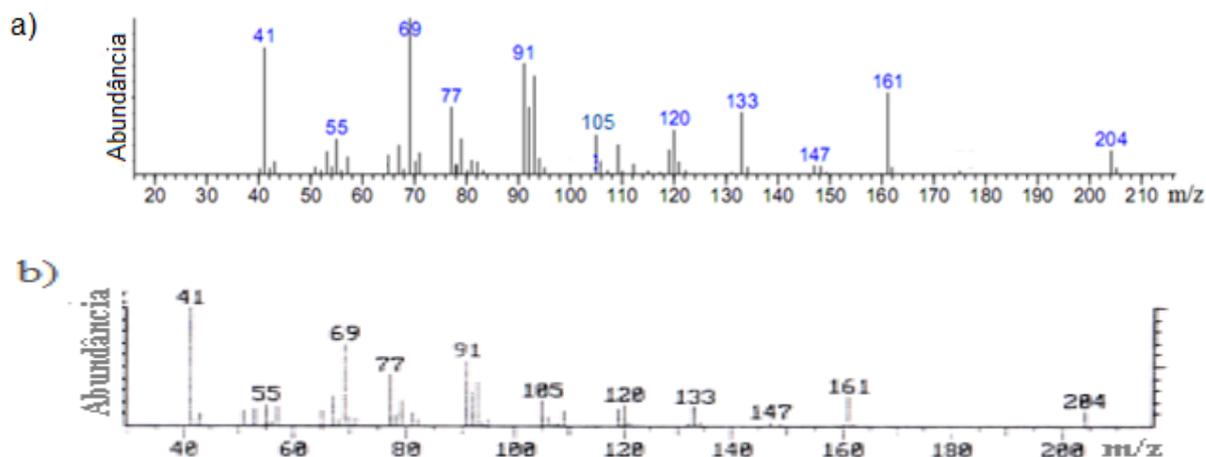


Figura 27. Espectro de massas do  $\beta$ -sesquifelandreno, 3<sup>o</sup> majoritário na coleta HN3 da Amostra 2 e de FG da Amostra 3 de *H. brasiliiana*. a) espectro de massa obtido da amostra. b) espectro de massa da literatura (ADAMS, 1995).

De acordo com a classificação dos grupos acíclicos, monocíclicos e bicíclicos (SIMÕES *et al*, 2004), estabeleceu-se as classes A, B e C, respectivamente, por semelhança do padrão de fragmentação das substâncias analisadas. As substâncias majoritárias da Amostra 2 pertencem às classes B e C. A classe B foi significativamente mais abundante e a classe A a menos presente. O maior destaque, quanto ao horário de coleta, foi a predominância de constituintes da classe C no óleo essencial obtido à partir da coleta do horário da manhã (Figura 28).

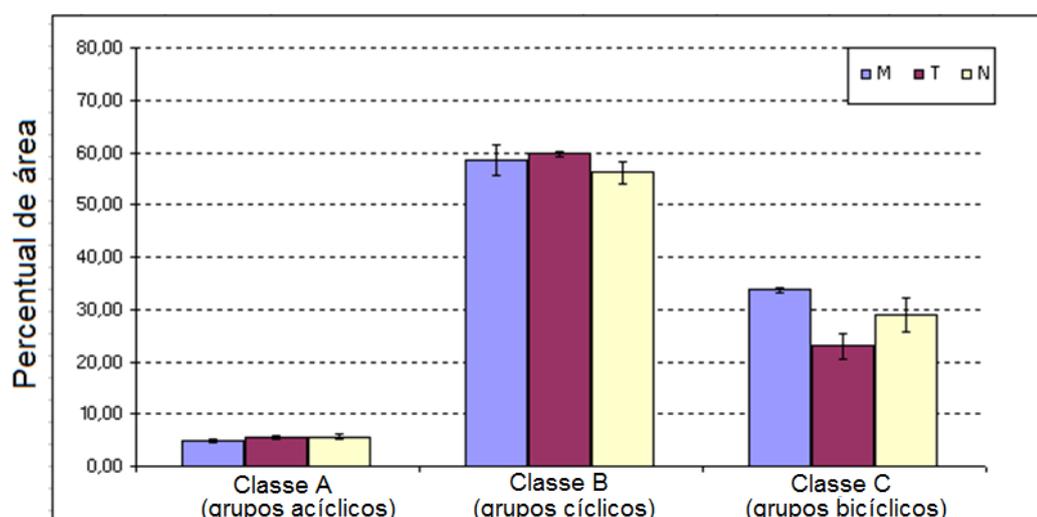


Figura 28. Comparação das classes A, B e C por área dos constituintes do óleo essencial das folhas de *H. brasiliiana*, na média das repetições dos três turnos de coleta (Amostra 2). M = matutino; T = vespertino; N = noturno. Barra referente a desvio padrão de três repetições.

### 5.3 CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DO ÓLEO ESSENCIAL DAS FOLHAS (AMOSTRA 3)

As folhas da Amostra 3 foram coletadas em dois estágios diferentes de amadurecimento, sendo denominadas estágio folha nova (FN) e estágio folha madura (FM), e uma outra coleta quando a espécie estava no período de frutificação (FG).

Considerando a composição química do óleo essencial, oito substâncias mais frequentes foram identificadas em todas as coletas:  $\alpha$ -curcumeno, Z-hidrato de sesquisabineno, E-hidrato de sesquisabineno,  $\beta$ -bisabolol,  $\alpha$ -bisabolol, Epi- $\alpha$ -bisabolol, Z- $\alpha$ -trans-bergamotol e Z- $\beta$ -santalol (Tabela 2).

Os constituintes de FM estão presentes em FN, mas aquela contém ainda mais 10 substâncias, a saber: Z- $\beta$ -farneseno, zingibereno,  $\beta$ -bisabolenol, sesquicineol,  $\delta$ -cadineno,  $\beta$ -sesquifelandreno, elemol, E-nerolidol, Epi- $\alpha$ -cadinol e  $\alpha$ -sinensal (Tabela 2). FM também conteve todos os contituintes de FG, além de mais cinco:  $\delta$ -cadineno, Epi- $\alpha$ -cadinol,  $\alpha$ -cadinol, oplopanona e um componente não determinado (Tabela 2).

A Amostra 3 teve como constituinte majoritário em todas as coletas o Z- $\alpha$ -trans-bergamotol (Tabela 2 e Figura 23), sendo em FM: 11,25%; em FN: 11,98% e FG: 14,71%.

A diferença mais acentuada entre os constituintes do óleo essencial de FM e FN, esteve no 2º majoritário desta última, o oplopanona, com 11,01% contrastando com 0,54% da primeira (Figura 29). O 2º majoritário em FM e o 3º de FN não puderam ser identificados. O 2º majoritário de FG e o 3º de FM foi o  $\alpha$ -curcumeno (Figura 30). O 3º de FG foi o  $\beta$ -sesquifelandreno (Figura 27).

Tabela 2. Principais constituintes químicos do óleo essencial das folhas de *H. brasiliiana* (Amostra 3) identificados por CG-EM.

Substâncias	C.	FM	FN	FG	TR	IR-l.	IR-c.
Z- $\beta$ -farneseno	A	2,61	0	4,49	22,12	1443	1454
$\alpha$ -curcumeno	B	6,42	2,99	7,53	22,90	1483	1485
Zingibereno	B	1,67	0	3,99	23,24	1495	1498
$\beta$ -bisaboleno	B	3,48	0	5,38	23,56	1509	1512
Sesquicineol	B	0,51	0	0,57	23,77	1514	1520
$\delta$ -cadineno	C	0,32	0	0	23,86	1524	1524
$\beta$ -sesquifelandreno	B	3,56	0	6,33	23,97	1524	1529
Z-hidrato de sesquisabineno	B	1,77	1,41	2,04	24,43	1545	1548
Elemol	B	0,46	0	0,33	24,58	1549	1554
(~) Z-hidrato de sesquisabineno	B	2,82	2,84	3,45	24,69	desc.	1559
E-nerolidol	A	1,20	0	1,02	24,80	1564	1563
E-hidrato de sesquisabineno	B	4,18	5,04	5,18	25,31	1580	1585
(~) E-hidrato de sesquisabineno	B	4,52	8,33	5,49	25,56	desc.	1595
Epi- $\alpha$ -cadinol	C	5,68	0	0	26,36	1640	1630
n.d	C	6,57	6,65	0	26,49	n.d	1636
$\alpha$ -cadinol	C	2,01	2,35	0	27,13	1653	1664
$\beta$ -bisabolol	B	2,15	3,48	2,49	27,43	1671	1677
$\alpha$ -bisabolol	B	4,90	7,09	5,64	27,76	1683	1691
Epi- $\alpha$ -bisabolol	B	4,19	6,49	3,70	27,81	1686	1694
Z- $\alpha$ -trans-bergamotol	B	11,25	11,98	14,71	27,93	1693	1699
(~) Z- $\alpha$ -trans-bergamotol	B	2,50	2,73	1,41	28,27	Desc.	1715
Z- $\beta$ -santalol	B	2,98	5,73	3,46	28,58	1720	1729
Oplopanona	C	0,54	11,01	0	28,90	1733	1744
$\alpha$ -sinensal	A	2,05	0	2,15	29,20	1752	1758
TOTAL		78,34	78,12	79,36	-	-	-

C.=classe; FM=folha madura; FN=folha nova; FG= folha de indivíduo em estágio de frutificação; TR=tempo de retenção; IR-l.=índice de retenção da literatura; IR-c.=índice de retenção calculado; (~)=semelhante; n.d.=não determinado; desc.=desconhecido. A = grupos acíclicos; B = grupos monocíclicos; C = grupos bicíclicos.

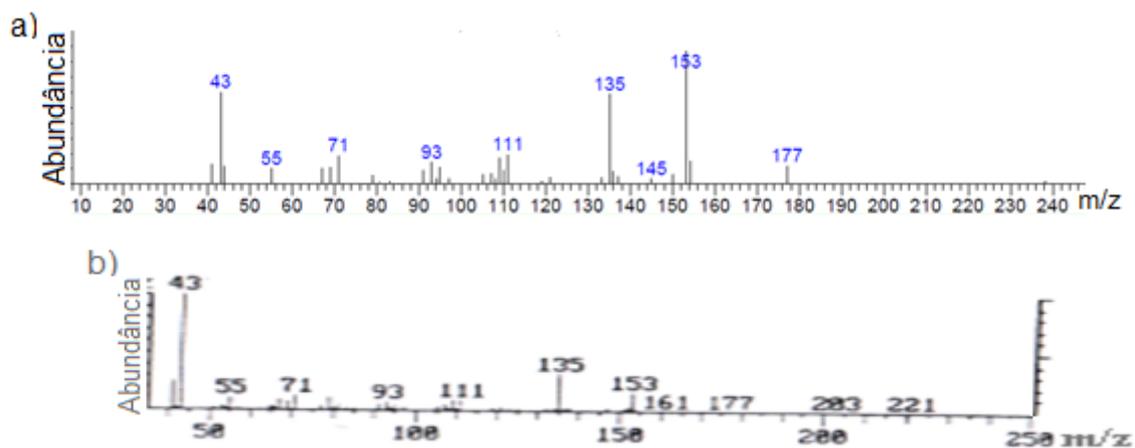


Figura 29. Espectro de massas do oplopanona, 2º majoritário na coleta FN da Amostra 3 de *H. brasiliiana*. a) espectro de massa obtido da amostra. b) espectro de massa da literatura (ADAMS, 1995).

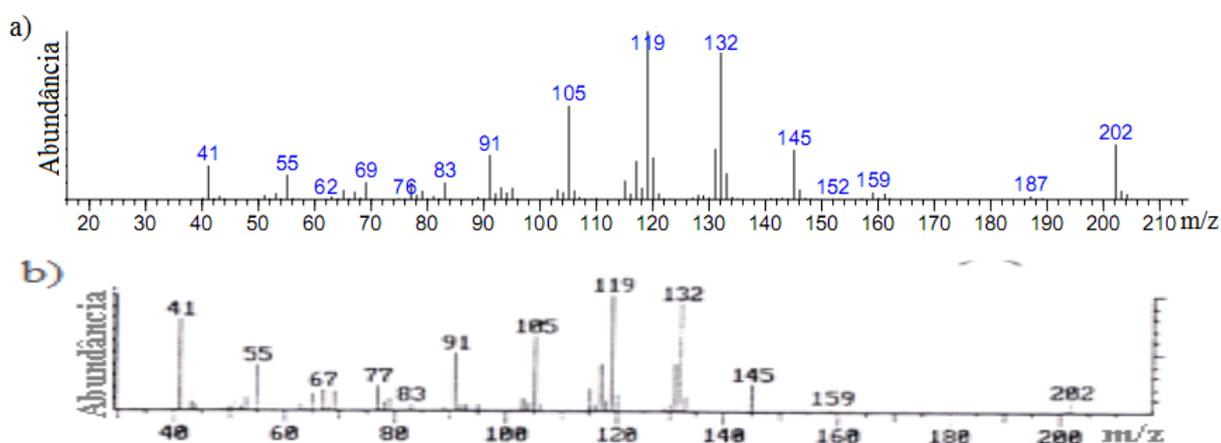


Figura 30. Espectro de massas do  $\alpha$ -curcumeno, 2º majoritário na coleta FG e 3º na coleta FM da Amostra 3 de *H. brasiliiana*. a) espectro de massa obtido da amostra. b) espectro de massa da literatura (ADAMS, 1995).

O óleo essencial de FM possui mais substâncias que FN, conforme foi visto anteriormente, porém, desses constituintes em comum, a maioria está em maior concentração em FN (Tabela 2), sendo provável que eles estejam relacionados com funções de proteção da mesma, corroborando com os resultados da análise morfoanatômica, em relação à possível função do óleo essencial contra pragas, necessidade que pode estar diminuída nas folhas maduras, por já possuírem maior resistência física.

Essas variações também sugerem a possibilidade das substâncias estarem se convertendo uma nas outras. Através de reações nucleofílicas, ciclizações e

rearranjos moleculares, os compostos aromáticos mono e sesquiterpenoides sofrem inúmeras variações estruturais (PETERSEN, 2006). O aumento do número de isômeros nestas classes está diretamente relacionado com o aumento do número de carbonos, gerando uma grande variedade dentro da classe, ainda que o mecanismo de formação destas estruturas não esteja totalmente elucidado (BULOW; KONING, 2000).

Um exemplo é a forma  $\beta$  do bisabolol (Amostra 2 e 3), elucidada na década de 60 e considerada um derivado do  $\gamma$ -curcumeno (Amostra 2) (MINYARD, THOMPSON, HEDIN, 1968).

Na Amostra 3, na comparação entre FN e FM, se repetiu a equivalência das classes B e C entre os majoritários. Houve predominância da classe B nos constituintes gerais, a classe A foi minoritária em FM e ausente em FN (Figura 31). Já no óleo de FG, foi a classe C a ausente, continuando a predominância da classe B, assim como foi averiguado na Amostra 2 (Figura 32).

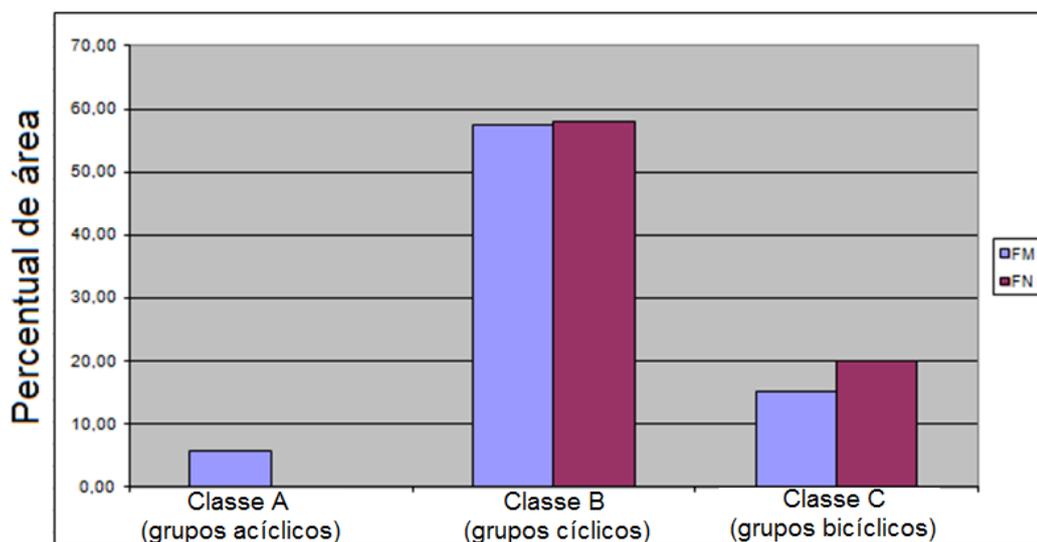


Figura 31. Comparação das classes A, B e C, por área dos constituintes do óleo essencial da folha madura (FM) e folha nova (FN) de *H. brasiliiana* (Amostra 3).

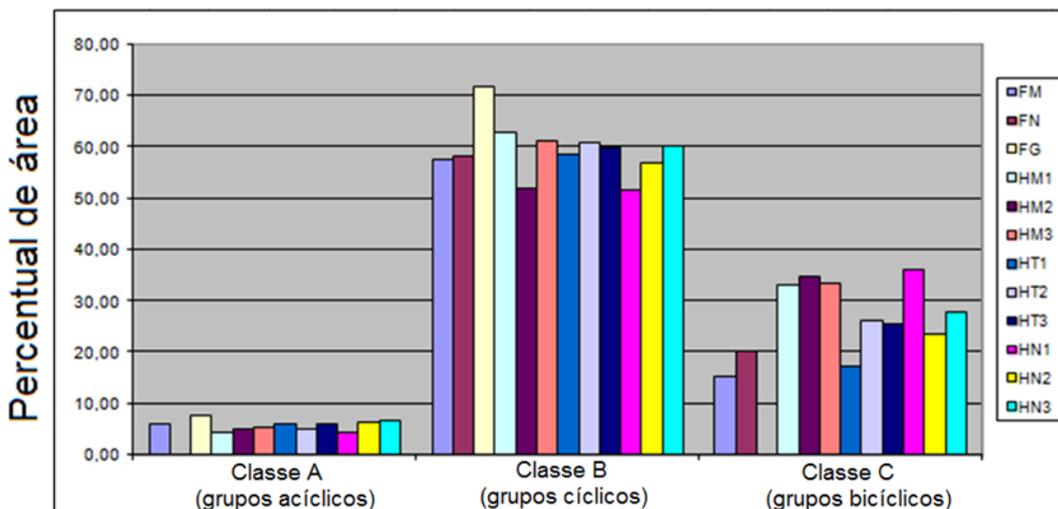


Figura 32. Comparação das classes A, B e C, por área dos constituintes do óleo essencial de *H. brasiliiana*: folha madura (FM), folha nova (FN), folha de indivíduo em estágio de frutificação (FG), HM1, 2 e 3 (coleta matutina), HT 1, 2 e 3 (coleta vespertina), HN1, 2 e 3 (coleta noturna).

A análise das Amostras 2 e 3 identificou sesquiterpenos inéditos para *H. brasiliiana*, a saber:  $Z$ - $\beta$ -farneseno,  $\gamma$ -curcumeno,  $\alpha$ -curcumeno, zingibereno,  $E$ - $\beta$ -guaiano,  $\beta$ -bisaboleno,  $\gamma$ -cadineno, sesquicineol,  $\delta$ -cadineno,  $\beta$ -sesquifelandreno,  $E$ -hidrato de sesquisabineno,  $Epi$ - $\alpha$ -cadinol,  $\alpha$ -cadinol,  $\beta$ -bisabolol,  $\alpha$ -bisabolol,  $Epi$ - $\alpha$ -bisabolol,  $Z$ - $\alpha$ -trans-bergamotol,  $Z$ - $\beta$ -santalol,  $\alpha$ -sinensal,  $Z$ -hidrato de sesquisabineno, elemol,  $E$ -hidrato de sesquisabineno e oplopanona.

Das substâncias presentes nos óleos essenciais das folhas das Amostras 2 e 3, todas pertencem à classe dos sesquiterpenos (Tabelas 1 e 2). É quase ausente relatos de sesquiterpenos em *H. brasiliiana* e até o momento não se encontrou na literatura, nenhum estudo sobre a caracterização dos constituintes do óleo essencial da espécie.

Houve oscilação quanto aos constituintes majoritários dependente do indivíduo analisado. Não foi constatado padrão de oscilação, quanto ao horário de coleta avaliado. Como a planta apresenta desenvolvimento lento e não é caducifolia, é provável que os sesquiterpenos mantenham-se oscilando pela ação enzimática e características intrínsecas das moléculas presentes nas cavidades secretoras mantidas por relativamente longos períodos nos mesófilos foliares. Dessa forma, novos estudos tais como diferença quanto a exposição ao sol, microclima de cada

indivíduo, características de solo, poderão contribuir para elucidação dos padrões de oscilações dentre os sesquiterpenos presentes nas folhas de *H. brasiliiana*.

#### 5.4 CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DOS EXTRATOS HEXÂNICOS

Os extratos hexânicos, através da análise de CG-EM foram comparados com dados da literatura (ADAMS, 1995) e banco de dados.

Foi considerada satisfatória a caracterização por CG/EM quanto à sua representatividade. No extrato hexânico das folhas (FO), foram encontradas 96,94% das classes de substâncias, enquanto o extrato hexânico das cascas do ramo lateral (CR) apresentou 80,96%. O extrato hexânico das cascas do tronco (CT) apresentou 93,11% das classes (Tabela 3).

Alguns constituintes dos extratos também foram encontrados na análise do óleo essencial das folhas:  $\alpha$ -curcumeno,  $\beta$ -bisaboleno,  $\beta$ -sesquifelandreno e nerolidol. Apesar do óleo essencial das folhas da Amostra 1 não ter sido apresentado, fez a sua extração encontrando também constituintes em comum com extrato hexânico de FO, sendo eles, o guaiol, o qual foi o majoritário do óleo (18,5%),  $\beta$ -bisaboleno e  $\beta$ -sesquifelandreno.

Classes de substâncias em comum nos extratos hexânicos de FO e CR, estiveram presentes, respectivamente, na porcentagem de 36,3 e 30,9%. Classes em comum nos extratos hexânicos de CR e CT, foram detectadas, respectivamente, na porcentagem de 26,9 e 93,11%, ou seja, praticamente todas as classes de substâncias encontradas no extrato hexânico de CT estão também presentes no extrato hexânico de CR (Tabela 3).

Considerando os constituintes químicos, alcaloides e cumarinas estão entre os principais componentes identificados em *H. brasiliiana* na literatura, sendo descritos como marcadores da espécie (PACHTER *et al.*, 1960; SUÁREZ; MARTÍNEZ; DELLEMONACHE, 1998; SEVERINO, 2008; LIAO *et al.*, 2011). Entretanto, baseado na polaridade das substâncias extraídas, sesquiterpenos, diterpenos, ácidos graxos, hidrocarbonetos e triterpenos pentacíclicos foram detectados, nos extratos hexânicos de *H. brasiliiana*, na análise por CG-EM do presente estudo e essas classes químicas podem ser responsáveis pelas atividades farmacológicas descritas no mesmo.

Tabela 3. Constituintes químicos do extrato hexânico das diferentes partes de *H. brasiliensis* identificados por CG-EM.

Substância	Classe química	FO (%)	CR (%)	CT (%)	TRM
$\alpha$ -curcumeno	sesquiterpeno	2,70	4,22	-	18,67
$\beta$ -bisaboleno	sesquiterpeno	0,86	1,21	-	19,32
$\beta$ -sesquifelandreno	sesquiterpeno	1,16	-	-	19,72
Nerolidol	sesquiterpeno	-	9,60	0,94	20,54
(~) Lanceol	sesquiterpeno	-	1,48	-	21,08
Óxido de cariofileno	sesquiterpeno	0,94	17,86	-	21,27
(~) Norbornadiene	sesquiterpeno	-	0,74	-	21,39
Guaiol	sesquiterpeno	9,72	-	-	21,50
n.d.	sesquiterpeno	-	3,09	-	21,89
Óxi $\alpha$ -muuroloeno	sesquiterpeno	-	2,94	-	23,20
(~) Diidrolinalol	sesquiterpeno	1,61	1,00	-	23,47
n.d.	sesquiterpeno	-	5,88	-	23,54
(~) <i>E</i> - $\alpha$ -bergamoteno	sesquiterpeno	1,30	-	-	23,63
<i>E</i> -bergamotal	sesquiterpeno	2,53	-	-	23,99
desc.	-	-	1,85	-	24,37
desc.	-	0,69	1,28	-	24,61
n.d.	tipo diterpeno	1,62	2,47	-	24,67
n.d.	tipo diterpeno	2,32	2,15	-	26,10
n.d.	tipo diterpeno	-	2,01	-	26,36
n.d.	tipo diterpeno	-	2,89	-	27,26
n.d.	tipo diterpeno	-	2,29	-	28,05
n.d.	ácidos graxos	-	0,99	26,11	28,92
n.d.	ácidos graxos	-	4,78	33,20	31,01
n.d.	ácidos graxos	-	1,99	25,20	32,25
n.d.	ácidos graxos	-	4,82	2,34	32,85
n.d.	ácidos graxos	-	4,06	4,29	33,91
n.d.	ácidos graxos	-	0,63	1,03	36,28
Nonacosano	hidrocarboneto	25,57	0,73	-	44,33
Eicosano	hidrocarboneto	10,80	-	-	46,95
n.d.	triterpeno pentacíclico	5,12	-	-	50,33
n.d.	triterpeno pentacíclico	2,73	-	-	50,56
n.d.	triterpeno pentacíclico	18,49	-	-	51,05
n.d.	triterpeno pentacíclico	8,78	-	-	54,89
TOTAL	-	96,94	80,96	93,11	

FO = folhas; CR = cascas do ramo lateral; CT = cascas do tronco; TRM = tempo de retenção médio; n.d.=não determinado; desc. = desconhecido; (~) = semelhante. Classe química proposta com base nos padrões de fragmentação de massas.

Dentre as substâncias majoritárias do extrato hexânico de FO, que totalizaram 81,2%, destacam-se os hidrocarbonetos nonacosano (25,6%) e eicosano (10,8%), um triterpeno pentacíclico (18,5%) e o sesquiterpeno guaiol (9,7%) (Tabela 3).

O guaiol é bastante apreciado pela indústria de perfumaria, sendo usado como fixador em perfumes de luxo (CRAVEIRO, 2007). Guaiol e  $\delta$ -guaieno têm origem em comum e já foram sintetizados em laboratório pela conversão direta do bulnesol (MULAY; FOX, 1962). Testes com guaienos demonstraram, *in vitro*, a capacidade inibitória da produção de óxido nítrico, em células macrófagas, sugerindo possuir atividade anti-inflamatória (WANG; UNEHARA; KITANAKA, 2005).

Triterpenos são uma classe química que exibem propriedades anti-inflamatória, antitumoral, anti-oxidante (VECHIA; GNOATTO; GOSMANN, 2009; SANTOS, 2005). Em *H. longifolia* foi considerado o possível responsável pela atividade anti-fúngica (MÁXIMO *et al.*, 2010).

Das sete substâncias majoritárias detectadas no extrato hexânico de CR (51,2%), foram encontrados ácidos graxos (13,6%) e sesquiterpenos (37,6%). Entre os sesquiterpenos identificados, destacam-se o nerolidol (9,6%), o qual apareceu também em CT, e óxido de cariofileno (17,9%), o qual foi também identificado no extrato hexânico em FO.

O óxido de cariofileno, componente majoritário do extrato hexânico de CR, é derivado do  $\beta$ -cariofileno, através de auto-oxidação e ciclização pelo contato com o ar. Estudo com óleo de copaíba demonstrou que o óxido de cariofileno atua diretamente na inibição de fungos, e a forma  $\beta$  foi particularmente efetiva contra insetos (VEIGA; PINTO, 2002; SKÖLD *et al.*, 2006). As duas formas são detentoras de efeitos anticancerígenos (ZHENG, KENNEY, LAM, 1992) e anti-inflamatórios (SHIMIZU, 1990; TAMBE *et al.*, 1996). O nerolidol foi o segundo componente majoritário encontrado no extrato hexânico de CR, apresenta atividade antimicrobiana (BREHM-STECHER; JOHNSON, 2003), anti-protozoária (ARRUDA *et al.*, 2005) e antiulcerogênica (KLOPELL *et al.*, 2007).

Os quatro majoritários no extrato hexânico de CT, os quais são ácidos graxos, totalizaram 88,8% das substâncias detectadas, enquanto essas mesmas substâncias no extrato hexânico CR perfizeram 11,8%.

Ácidos graxos foram relatados como os possíveis responsáveis pela ação antimicrobiana de *H. oreadica* (SEVERINO *et al.*, 2009a). Quando poliinsaturados,

têm demonstrado atividades anti-triglicérides (JORGE *et al.*, 1997), anti-oxidante (KINSELLA *et al.*, 1993), anti-arrítmica (KANG; LEAF, 1996), cardioprotetora (KROMHOUT; BOSSCHIETER; COULANDER, 1985) e anti-inflamatória (CAMANDOLA *et al.*, 1996; SELLMAYER; DANESCH; WEBER, 1996).

Sesquiterpenos identificados, principalmente em FO e CR, como  $\alpha$ -curcumeno,  $\beta$ -bisaboleno e  $\beta$ -sesquifelandreno, têm sido relatados com propriedades antiulcerogênicas e anti-inflamatória. O  $\beta$ -bisaboleno apresentou também propriedades analgésicas. (YAMAHARA *et al.*, 1992; PIERI; MUSSI; MOREIRA, 2009).

Foram identificados mais quatro sesquiterpenos inéditos para *H. brasiliiana*: óxido de cariofileno, guaiol, óxi- $\alpha$ -muuroleno e *E*-bergamotal.

Na análise comparativa por CG-EM de extratos hexânicos, CR se manteve intermediário entre FO e CT, possuindo constituintes em comum a eles, contudo, em proporções bastante desiguais. Os três extratos podem ser considerados diferentes quimicamente, pressupondo-se comportamentos farmacológicos também diferentes.

## **5.5 COMPARAÇÃO QUÍMICA DOS EXTRATOS HEXÂNICOS, METANÓLICOS E AQUOSOS**

### **5.5.1 Análise por cromatografia em camada delgada**

A cromatografia com camada delgada (CCD) se mostrou satisfatória para comparação química entre as amostras dos extratos de FO, CR e CT. É importante ressaltar que os perfis cromatográficos indicam constituição química diferente para os extratos de *H. brasiliiana* (Tabela 4).

A revelação com vanilina sulfúrica no extrato hexânico apresentou cinco manchas azul-violeta em FO, três manchas marrons em CR e uma azul em CT, indicando a presença de terpenoides e ácidos graxos. Para o extrato metanólico de FO, uma mancha azul foi detectada (Tabela 4).

A revelação com reagente de Liebermann-Burchard mostrou no extrato hexânico das CT uma mancha vermelha, sugerindo a presença de esteroides e triterpenos (Tabela 4).

Ao se utilizar o revelador com NPPEG observou-se uma mancha azul fluorescente no extrato metanólico das CR e duas no extrato metanólico de CT, em posições diferentes, indicando presença de ácidos fenólicos (Tabela 4).

Os extratos metanólicos revelados com KOH indicaram presença de uma mancha azul, o que sugere a presença de compostos cumáricos (Tabela 4).

Apesar da evidência da presença de alcaloides em *H. brasiliiana* (CORREA; GOTTLIEB; PADUA, 1979; SEVERINO, 2008), a reação com reagente de Dragendorff não detectou estes constituintes nos extratos avaliados.

Tabela 4. Análise por CCD de extratos hexânicos, metanólicos e aquosos de *H. brasiliiana*.

<b>Classe química</b>	<b>Terpenoide/ Ácido graxo</b>	<b>Triterpeno/ Esteróide</b>	<b>Ácido fenólico</b>	<b>Cumarina</b>	<b>Alcaloide</b>
Revelador	VS	LB	NPPEG	KOH	DRG
HFO	X	-	-	-	-
HCR	X	-	-	-	-
HCT	X	X	-	-	-
MFO	X	-	-	X	-
MCR	-	-	X	X	-
MCT	-	-	X	X	-
AFO	-	-	-	-	-
ACR	-	-	-	-	-
ACT	-	-	-	-	-

H HFO=extrato hexânico da folha; HCR= extrato hexânico da casca do ramo lateral; HCT= extrato hexânico da casca do tronco; MFO=extrato metanólico de folha; MCR=extrato metanólico da casca do ramo lateral; MCT=extrato metanólico da casca do tronco; AFO=extrato aquoso de folha; ACR=extrato aquoso de casca do ramo lateral; ACT=extrato aquoso de casca do tronco; VS=vanilina sulfúrica; LB=Liebermann-Burchard; NP/PEG= difenilboriloxietilamina/polietilenoglicol; KOH=hidróxido de potássio; DRG=Dragendorff.

### **5.5.2 Análise por cromatografia líquida de alta eficiência associada à espectroscopia do ultravioleta**

As análises por CLAE-UV corroboraram com as diferenças químicas apresentadas, entre as diferentes partes vegetais de *H. brasiliiana*, nos extratos avaliados por CCD e na análise do extrato hexânico por CG-EM. Novamente, assim como em CG-EM, a constituição química de CR se mostrou intermediária entre FO e CT, mas em diferentes proporções. Pode-se constatar assim, que FO, CR e CT não possuem substâncias em comum, quando observados em conjunto.

Com isso, ficou evidenciado que a alternativa ecológica de substituir, no uso popular medicinal, as cascas de tronco pelas folhas, por serem renováveis, não seria possível em função dessa diferente constituição.

A comparação química se baseou nos tempos de retenção e comparação dos espectros ultravioletas de referências da literatura (GOODWIN; POLLOCK, 1954; SANTOS, 2005; REIMBERG, 2006; MIRA *et al*, 2008; LIANDA, 2010).

As substâncias em comum nos extratos hexânicos de FO e CR apresentaram respectivamente áreas: 11,35 e 9,81% / 16,00 e 3,78% (220nm). Nos extratos hexânicos de CR e CT foram detectadas substâncias em comum respectivamente, com áreas de: 3,21 e 21,66% / 4,83 e 21,04% (220nm). Apesar da análise do extrato hexânico de FO a 220nm e do extrato hexânico de CR à 335 nm não terem alcançado um percentual de área acima de 50%, a mesma se manteve relevante por estar apresentando constituintes majoritários das amostras (Tabelas 5).

Tabela 5. Análise em CLAE-UV da área dos constituintes majoritários do extrato hexânico de *H. brasiliensis* por tempo de retenção.

Tempo de Retenção	FO (%) 220nm	FO (%) 335nm	CR (%) 220nm	CR (%) 335nm	CT (%) 220nm	CT (%) 335nm
45,21	-	-	0,9	-	-	-
44,67	-	-	-	-	-	-
47,95	-	-	-	-	-	-
48,61	-	-	-	-	-	-
50,21	-	-	1,77	1,77	-	-
51,77	-	-	-	-	-	20,63
51,94	-	-	2,90	26,25	-	-
52,51	-	-	-	-	-	-
54,11	-	-	3,07	-	-	-
54,98	-	-	-	-	-	12,90
56,29	-	-	-	-	31,11	-
56,46	-	-	2,31	-	-	-
58,21	-	-	-	-	1,25	32,95
58,33	-	-	2,36	15,04	-	-
58,86 e 59,10	-	-	3,21	-	21,66	-
61,10	-	-	8,03	-	-	-
63,34 a 63,74	-	-	4,83	-	21,04	7,22
64,73	-	-	6,65	-	-	-
68,65	-	-	1,65	-	-	-
73,42	-	-	-	-	-	-
74,39 a 74,40	11,35	-	9,81	-	-	-
75,64 a 75,65	16,00	-	3,78	-	-	-
76,29	16,73	-	-	-	-	-
TOTAL	44,08	-	50,37	43,06	75,06	73,77

FO = folhas; CR = cascas do ramo lateral; CT = cascas do tronco.

Na análise dos extratos metanólicos, FO, CR e CT apresentaram as mesmas substâncias, respectivamente nas áreas: 34,33, 37,28 e 15,23% / 5,52, 14,03 e 11,39% (220 nm) / 12,54, 16,79 e 10,77% (335nm). As substâncias em comum dos extratos metanólicos de FO e de CR mostraram áreas, respectivamente: 7,92 e 4,60% (220 nm) / 12,95 e 7,23% (335nm). Quando comparados os extratos metanólicos de FO e CT, as substâncias em comum apresentaram as respectivas áreas de 5,73 e 4,00% (220 nm). Além disso, os extratos metanólicos de CR e CT produziram substâncias em comum com nas áreas de 4,38 e 5,99% (335nm) (Tabelas 6).

Tabela 6. Análise em CLAE-UV da área dos constituintes majoritários do extrato metanólico de *H. brasiliana* por tempo de retenção.

Tempo de Retenção	FO (%) 220nm	FO (%) 335nm	CR (%) 220nm	CR (%) 335nm	CT (%) 220nm	CT (%) 335nm
3,61	5,73	-	-	-	4,00	-
8,89 a 9,25	34,33	-	37,28	-	15,23	-
15,00	-	-	-	-	5,29	-
15,08	-	-	-	-	-	5,32
20,10	-	-	-	-	-	2,73
20,50	-	-	-	-	4,36	-
21,49	-	-	-	-	2,75	-
22,47	-	-	-	-	-	4,14
24,89	2,16	-	-	-	-	-
24,94 a 24,97	-	-	-	4,38	2,49	5,99
25,54	-	12,50	-	-	-	-
25,86	-	-	-	-	2,31	3,63
26,35 a 26,38	5,52	12,54	14,03	16,79	11,39	10,77
27,03	-	-	-	-	1,19	3,27
27,54	-	-	4,91	-	-	-
27,72	-	-	-	-	1,33	4,08
29,31	-	-	-	-	4,10	7,46
29,86	-	-	-	-	3,36	11,60
31,85	3,08	40,95	-	-	-	-
32,11 a 32,14	7,92	12,95	4,60	7,23	-	-
45,69	-	-	-	-	2,73	-
49,85	-	-	2,05	8,86	-	-
51,78	-	-	5,70	32,58	-	-
52,11	-	-	-	-	2,40	8,58
58,10	-	-	-	-	-	2,22
TOTAL	58,74	78,94	68,57	69,84	62,93	69,79

FO = folhas; CR = cascas do ramo lateral; CT = cascas do tronco

Na análise dos extratos aquosos de FO, CR e CT apresentaram as mesmas substâncias com áreas, respectivamente: 49,49, 55,38 e 7,09% / 6,21, 12,07 e 7,61% (220 nm). As substâncias em comum dos extratos aquosos de FO, CR produziram áreas, respectivamente: 2,73 e 9,08% / 5,54 e 4,28% (220nm) / 6,18 e 12,18% / 24,99 e 8,10% (335nm). A comparação dos extratos aquosos de CR e CT mostrou substâncias em comum com as respectivas áreas: 3,59 e 5,80 / 4,40% e 4,43 (220nm) e / 39,96% / 10,72% (335nm) (Tabela 7).

Tabela 7. Análise em CLAE-UV da área dos constituintes majoritários do extrato aquoso de *H. brasiliiana* por tempo de retenção.

<b>Tempo de Retenção</b>	<b>FO (%) 220nm</b>	<b>FO (%) 335nm</b>	<b>CR (%) 220nm</b>	<b>CR (%) 335nm</b>	<b>CT (%) 220nm</b>	<b>CT (%) 335nm</b>
3,86	-	-	-	-	3,46	-
6,50	-	-	-	-	2,52	-
8,67 a 8,75	49,49	-	55,38	-	7,09	-
8,86	-	-	-	-	11,73	-
10,78	-	-	-	-	4,58	-
15,03 a 15,07	-	-	3,59	-	5,80	-
15,10	-	-	-	-	-	6,92
15,50	3,36	-	-	-	-	-
16,78	-	-	-	-	-	1,95
17,40	3,24	-	-	-	-	-
20,73 a 20,96	-	-	4,40	-	4,43	-
21,24	-	-	-	-	-	1,02
21,32	-	-	-	-	3,77	-
22,01	-	-	-	-	3,32	-
22,73	-	-	-	-	2,13	1,87
24,04	-	-	-	-	2,48	-
24,45	2,17	16,02	-	-	-	-
25,27	3,17	-	-	-	-	-
25,30	-	-	3,51	13,78	-	-
25,54	-	-	-	-	2,45	5,77
25,88	-	-	-	-	-	1,62
25,97	-	6,66	-	-	-	-
26,29	-	-	-	13,88	-	-
26,68	-	18,07	-	-	-	-
26,78 a 27,07	6,21	-	12,07	39,96	7,61	10,72
27,09 a 27,13	-	6,18	-	12,18	-	-
27,97 a 28,00	2,73	-	9,08	-	-	-
28,18	-	-	-	-	-	4,47
29,72	-	-	-	-	-	3,34
30,12	-	-	-	-	-	4,49
30,47	-	-	-	-	-	14,36
32,35	-	-	-	5,75	-	-
32,62 a 32,63	5,54	24,99	4,28	8,10	-	-
46,30	-	-	-	-	15,63	0,86
49,12	-	-	-	-	3,24	-
<b>TOTAL</b>	<b>75,91</b>	<b>71,92</b>	<b>92,31</b>	<b>93,65</b>	<b>80,24</b>	<b>79,58</b>

FO= folhas; CR=cascas do ramo lateral; CT=cascas do tronco.

Substâncias encontradas na literatura (GOODWIN; POLLOCK, 1954; SANTOS, 2005; REIMBERG, 2006; MIRA *et al*, 2008; LIANDA, 2010) foram comparadas com as substâncias encontradas na análise UV das partes vegetais dos extratos de *H. brasiliiana*. Observaram-se substâncias fenólicas derivadas do ácido cinâmico e benzóico: ácidos *o* (orto) e *p* (para) -cumáricos, protocatecúrico, caféico, vanílico. (Tabela 8).

Esta classe química foi também encontrada no teste de CCD. Derivados do ácido cinâmico são muito relatados na literatura para *H. brasiliiana*, entre eles, os ácidos *o*- e *p*-cumáricos são considerados precursores das cumarinas, também relatadas na literatura para a espécie (DELLEMONACHE *et al.*, 1976; MURRAY; JORGE, 1984; FERRACIN, 1992).

Dentre os derivados do ácido cinâmico supostamente encontrados nos espectros UVs, aparentemente o ácido caféico teve a maior representatividade (11,6%). Este é o ácido fenólico que tem despertado mais atenção dos pesquisadores atualmente, estando envolvido com a diminuição de citocinas responsáveis pelo início do processo inflamatório (MILES; ZOUBOULI; CALDER, 2005). Seus ésteres apresentaram seletiva inibição da lipoxigenase, ligada à biogênese dos leucotrienos, conhecidos mediadores inflamatórios (KIMURA *et al*, 1987), além disso, apresentaram uma maior inibição da COX2, também uma importante formadora de mediadores pró-inflamatórios, em relação à isoforma COX-1, o que confere uma vantagem, já que esta última tem finalidades mais ligada à atividade constitutiva do que patológica. Ao contrário de outras substâncias fenólicas que necessitam de dosagens mais altas para realizar a inibição da COX2, esses ésteres conseguiram exercer atividade na faixa micromolar (SOUSA, 2008).

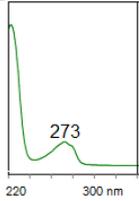
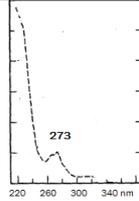
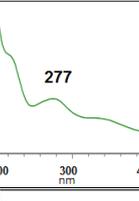
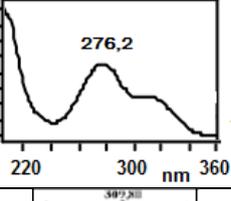
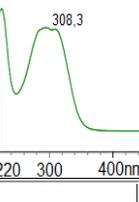
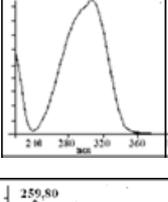
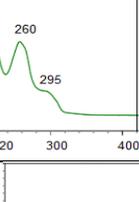
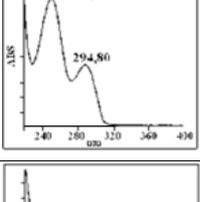
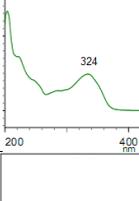
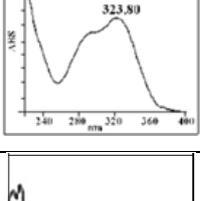
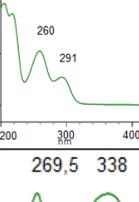
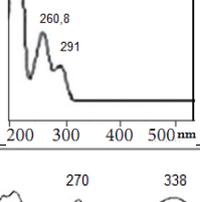
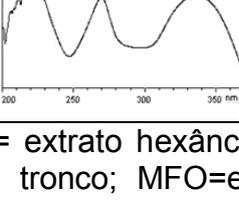
O maior percentual por área e números de repetições nas partes vegetais de *H. brasiliiana* parece ser da 3,4-diidroxycumarina, só não verificada no extrato hexânico de CT. No extrato aquoso de CR foi responsável por mais de 50% da amostra (Tabela 8). Estudos com diidroxycumarinas na posição orto têm demonstrado efeito inibidor da lipooxigenase, e conseqüentemente, atividade anti-inflamatória (WERNZ, 2007).

Houve indicativos da presença de flavonoides nos extratos metanólicos e aquosos, há relatos na literatura para a família e o gênero aos quais pertencem *H. brasiliiana*. Foi a segunda classe química com maior percentual de representatividade (12,5% no extrato metanólico de FO) nos espectros UVs das

amostras. De todos os compostos de origem natural, os flavonoides são os mais reconhecidos possuidores de atividade anti-inflamatória (Tabela 8) (KIM *et al*, 2004).

Embora possam ocorrer espectros UVs semelhantes para substâncias diferentes (PEREIRA, 2010; SILVERSTEIN; WEBSTER; KIEMLE, 2005), eles corroboram com os resultados do CCD e dados da literatura, indicando a relevância para a realização de testes anti-inflamatórios para *H. brasiliiana*.

Tabela 8. Possíveis constituintes em *H. brasiliense* comparados com UVs da literatura.

Nome	Espectro/amostra	Espectro/literatura	Extratos (%)
3,4-diidroxi cumarina GOODWIN; POLLOCK, 1953			HFO (11,35); HCR (9,08); MFO (34,33); MCR (37,24); MCT (15,22) AFO (49,49); ACR (55,38); ACT (7,09);
ácido o-cumárico SANTOS, 2005			ACT (2,13)
ácido p-cumárico LIANDA, 2009			ACT (2,47); MCR (2,49); MCT (2,49)
ácido protocatecúrico LIANDA, 2009			ACR (3,59)
ácido caféico LIANDA, 2009			MCT (11,60)
ácido vanílico (MIRA <i>et al</i> 2008)			ACH (4,58)
Flavonoide (isovitexina) REIMBERG, 2006			MFO (12,50); AFO (6,66)

HFO=extrato hexânico da folha; HCR= extrato hexânico da casca do ramo lateral; HCT= extrato hexânico da casca do tronco; MFO=extrato metanólico de folha; MCR=extrato metanólico da casca do ramo lateral; MCT=extrato metanólico da casca do tronco; AFO=extrato aquoso de folha; ACR=extrato aquoso de casca do ramo lateral; ACT=extrato aquoso de casca do tronco.

## 5.6 AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES ANTINOCICEPTIVA E ANTI-INFLAMATÓRIA DOS EXTRATOS HEXÂNICOS

### 5.6.1 Efeitos sobre as contorções induzidas por ácido acético 0,6%

Os extratos FO, CR e CT de *H. brasiliiana*, na dose de 200 mg/kg ( $50,00 \pm 1,70$ ;  $50,75 \pm 2,14$  e  $54,00 \pm 2,73$ , respectivamente), reduziram, significativamente, as contorções abdominais em 18,51 ( $p < 0,001$ ), 17,30 ( $p < 0,01$ ) e 12,00% ( $p < 0,05$ ) quando comparado ao grupo controle ( $61,36 \pm 2,05$ ) (Figura 33). Como esperado, a indometacina ( $22,62 \pm 1,70$ ,  $p < 0,001$ ) e o ácido acetilsalicílico ( $21,50 \pm 1,90$ ,  $p < 0,001$ ), fármacos de referência, reduziram significativamente as contorções abdominais.

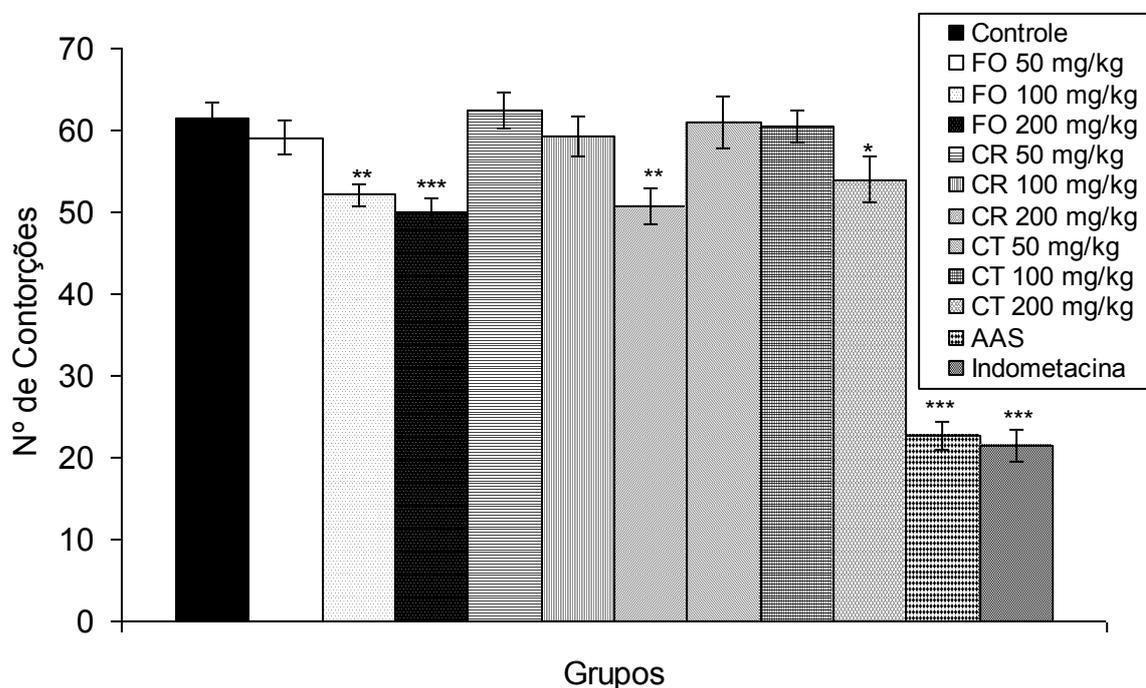


Figura 33. Efeitos dos extratos hexânicos de *H. brasiliiana* sobre as contorções induzidas por ácido acético 0,6% em camundongos. AAS = Ácido acetilsalicílico; FO= folhas; CR= cascas do ramo lateral; CT= cascas do tronco.

\* $p < 0,05$  \*\* $p < 0,01$  \*\*\* $p < 0,001$

Considerando a atividade antinociceptiva, a administração intraperitoneal de ácido acético induz a síntese de prostaglandinas e mediadores do sistema

simpaticomimético como PGE2 e PGF2 $\alpha$  (DERAEDT *et al.*, 1980). Desse modo, os resultados do teste de contorções abdominais induzidas por ácido acético demonstraram que os extratos hexânicos de *H. brasiliiana* reduziram as contorções abdominais quando comparado ao controle negativo. Esse dado sugere a hipótese da participação do extrato na inibição da síntese de prostaglandinas, pois o mecanismo nociceptivo de indução das contorções por ácido acético envolve metabólitos da via da ciclooxygenase (DUARTE *et al.*, 1992).

### 5.6.2 Efeitos sobre a nocicepção induzida por formalina

O efeito antinociceptivo foi também avaliado pelo teste de formalina que é um método que mimetiza a dor clínica (HUNSKAAR; HOLE, 1987).

A injeção subplantar de formalina promoveu uma resposta característica bifásica (Tabela 9). O tempo gasto na primeira fase (0-5 min) foi  $78,12 \pm 2,82$  s e na segunda fase (15-30 min) foi de  $82,50 \pm 3,10$  s para o grupo controle. Após 60 min de tratamento, nas doses de 100 e 200 mg/kg, o extrato FO reduziu a primeira fase do tempo de lambida em 9,43 e 16,32%, respectivamente, e a segunda fase teve efeito significativo nas doses de 100 ( $72,62 \pm 1,90$ ; 11,97%;  $p < 0,05$ ) e 200 mg/kg ( $63,12 \pm 1,44$ ; 23,49%;  $p < 0,001$ ). O extrato CR reduziu a duração do tempo da lambida da primeira fase nas doses de 100 e 200 mg/kg em 10,71%; ( $p < 0,05$ ) e 32,96%; ( $p < 0,001$ ), respectivamente. A segunda fase foi inibida na dose de 200 mg/kg (12,88%,  $p < 0,05$ ). Na dose de 200 mg/kg, o extrato CT inibiu significativamente ( $p < 0,001$ ) a primeira fase em 24,32% e a segunda fase foi inibida nas doses de 100 ( $73,25 \pm 2,56$ ;  $p < 0,05$ ) e 200 mg/kg ( $66,12 \pm 2,75$ ;  $p < 0,01$ ). A morfina e a indometacina reduziram a segunda fase ( $p < 0,001$ ).

O teste da formalina produz uma resposta bifásica, onde a primeira fase (0 a 5 min) é denominada neurogênica correspondendo uma ação em nível central, enquanto segunda fase (15 a 30 min) é chamada de inflamatória, pois, após 15 min da aplicação da formalina, é desencadeado o processo inflamatório pela presença do inchaço da pata direita (HUNSKAAR; HOLE, 1987; SHIBATA *et al.*, 1989). Substância P e bradicinina agem como mediadores na primeira fase e histamina, serotonina, prostaglandinas e bradicinina estão envolvidas na resposta nociceptiva da segunda fase (SHIBATA *et al.*, 2989). Substâncias com ação central reduzem o

tempo da lambida de ambas as fases (DUBUISSON; DENNIS, 1977; NEMIROVSKY *et al.*, 2001). A segunda fase é inibida por substâncias anti-inflamatórias não-esteroides e corticosteroides (HUNSKAAR; HOLE, 1987; SHIBATA *et al.*, 1989). Os resultados demonstraram os extratos agir em dois níveis, periférico e central, sugerindo atividades antinociceptiva e anti-inflamatória por reduzir a resposta bifásica (1ª e 2ª fases).

Tabela 9. Efeitos dos extratos hexânicos de *H. brasiliiana* sobre a nocicepção induzida por formalina em camundongos.

Grupos	Dose (mg/kg)	Duração do tempo da lambida (s)			
		Primeira fase		Segunda fase	
		Tempo	Inibição (%)	Tempo	Inibição (%)
Controle	Salina	78,12 ±2,82	-	82,50±3,10	-
	50	77,62±2,10	-	81,62±2,83	1,07
	100	70,75±1,44*	9,43	72,62±1,90*	11,97
FO	200	65,37±1,99**	16,32	63,12±1,44***	23,49
	50	74,25±2,10	4,95	82,12±2,23	-
	100	69,75±2,21*	10,71	80,62±2,51	2,28
CR	200	52,37±2,10***	32,96	71,87±2,92*	12,88
	50	76,62±3,29	1,92	82,37±3,34	-
	100	73,37±3,25	6,08	73,25±2,56*	11,21
CT	200	59,12±2,47***	24,32	66,12±2,75**	19,85
	1	21,37±1,71***	72,64	22,37±1,92***	72,88
	10	76,75±2,90	-	25,12±1,92***	69,55

FO= folhas; CR= cascas do ramo lateral; CT= cascas do tronco. \*p < 0,05; \*\*p < 0,01; \*\*\*p < 0,001

### 5.6.3 Efeitos sobre o tempo de reação de camundongos expostos à placa quente

Os extratos hexânicos FO, CR e CT de *H. brasiliiana* aumentaram o tempo de latência de camundongos expostos à placa quente (Tabela 10). No tempo de 60 min.

após tratamento, os extratos de FO e CT, na dose de 200mg/kg, aumentaram o tempo de latência, respectivamente, em 41,92 e 48,00% ( $p < 0,01$ ). No tempo de 90 min., extratos de FO, CR e CT aumentaram o tempo de latência, respectivamente, na dose de 100mg/kg, em 29,92, 32,00 e 36,00% ( $p < 0,05$ ), e na dose de 200mg/kg, em 55,69, 48,00 e 65,38% ( $p < 0,01$  e  $p < 0,001$ ). Morfina mostrou ser um potente analgésico, aumentando o tempo de latência. Naloxona, um antagonista opioide, bloqueou a ação da morfina, mas não alterou completamente o efeito antinociceptivo do extrato de CT.

Tabela 10. Efeitos dos extratos hexânicos de *H. brasiliiana* sobre o tempo de reação (s) de camundongos expostos à placa quente.

Grupos	Dose (mg/kg)	Tempo de latência (s)				
		0 min	30 min	60 min	90 min	
Controle	Salina	6,12±0,64	6,37±0,60	6,25±0,65	6,50±0,60	
	50	6,50±0,50	6,50±0,57	7,12±0,58	7,50±0,42	
	100	6,75±0,65	6,87±0,51	7,50±0,42	8,12±0,40*	
FO	200	6,62±0,65	7,37±0,60	8,87±0,48**	10,12±0,51***	
	50	5,75±0,53	6,25±0,43	6,75±0,50	7,12±0,48	
	100	6,12±0,40	6,50±0,62	6,87±0,51	8,25±0,53*	
CR	200	6,37±0,53	6,62±0,60	7,50±0,63	9,25±0,60**	
	50	5,50±0,65	6,12±0,51	6,12±0,44	6,75±0,53	
	100	5,62±0,68	5,87±0,44	7,37±0,56	8,50±0,42*	
CT	200	5,75±0,45	6,87±0,51	9,25±0,59**	10,75±0,60***	
	Morfina	1	6,25±0,65	10,25±0,67***	12,37±0,86***	15,25±0,80***
	Naloxona+Morfina	1 + 1	6,00±0,71	9,15±0,64**	8,75±0,67*	7,87±0,80
Naloxona+ExtratoFO	1 + 200	6,62±0,50	7,12±0,72	8,12±0,44*	7,75±0,53	
Naloxona+ExtratoCR	1 + 200	6,25±0,45	6,75±0,45	7,12±0,40	8,12±0,40*	
Naloxona+ExtratoCT	1 + 200	6,25±0,75	7,12±0,61	8,87±0,58**	9,87±0,58**	

FO= folhas; CR= cascas do ramo lateral; CT= cascas do tronco. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$

A ação central foi confirmada no teste da placa quente, mostrando efeito máximo após 90 minutos da resposta. Nossos resultados indicaram que a ação analgésica dos extratos pode ser dependente ou não do sistema opióide, pois o efeito de CR e CT não foi totalmente revertido na presença de naloxona, um antagonista opioide.

#### **5.6.4 Efeitos sobre o edema de pata induzido por carragenina**

Os extratos hexânicos FO, CR e CT de *H. brasiliiana* diminuíram o volume deslocado nos edemas de pata induzidos por carragenina em camundongos. (Tabela 11). O extrato FO, na dose de 200 mg/kg, no tempo 3h, reduziu o volume deslocado em 35,41% ( $p < 0,01$ ) e no tempo de 4h, a redução foi de 17,65% ( $p < 0,001$ ). O extrato CR gerou efeitos na dose de 200 mg/kg nos tempos 3 e 4h com redução no volume deslocado em 13,54 e 9,41% respectivamente ( $p < 0,05$ ). Nos tempos 3h e 4h, o extrato CT, na dose de 100 mg/kg, provocou redução de 16,67% e 23,53%, respectivamente, ( $p < 0,001$ ). Nos tempos 2, 3 e 4h, a dose de 200 mg/kg do extrato CT diminuiu em 18,42%, 27,08% e 40%, respectivamente ( $p < 0,001$ ). A indometacina, na dose de 10 mg/kg, foi significativa em reduzir o volume deslocado após 2 h de aplicação da carragenina.

O efeito anti-inflamatório, observado no teste da formalina, foi confirmado pelo método de edema de pata induzido por carragenina em ratos, um modelo animal empregado largamente para estudos de atividade anti-inflamatória de substâncias e extratos vegetais. A resposta inflamatória induzida por carragenina é caracterizada pela formação de edema resultado da liberação de diversos mediadores como histamina, serotonina e bradicinina; que é subsequente sustentada pela liberação de prostaglandinas induzidas por isoformas de ciclooxigenase (COX-2) (DI ROSA *et al.*, 1971; SEIBERT *et al.*, 1994; NANTEL *et al.*, 1999). No presente estudo, o tratamento com extrato hexânico de *H. brasiliiana* produziu uma proeminente inibição do edema de rato induzido por carragenina. Os extratos podem ter inibido uma das vias que biossintetiza a bradicinina, a histamina, a substância P e/ou o fator de agregação plaquetária (PAF) que participam da resposta inflamatória induzida pela carragenina (STOCHLA; MASLINSKI, 1982; GILLIGAN *et al.*, 1994; DE CAMPOS *et al.*, 1994). Vale destacar que o extrato de CT foi o único a apresentar atividade no tempo 2h, onde há produção de mediadores como bradicidina,

histamina, diferentemente dos tempos 3 e 4h, onde há produção de prostaglandinas (DI ROSA *et al*, 1971) Portanto, as evidências permitem como sugestão que a ação anti-inflamatória de *H. brasiliiana* está relacionada à inibição de uma ou mais vias da sinalização intracelular envolvidas nos efeitos desses mediadores.

Tabela 11. Efeitos dos extratos hexânicos de *H. brasiliiana* sobre o edema de pata induzido por carragenina.

Grupos	Dose (mg/kg)	Volume deslocado (mL)			
		1 h	2 h	3 h	4 h
Controle	Salina	0,55±0,02	0,76±0,02	0,96±0,03	0,85±0,02
	50	0,56±0,02	0,77±0,02	0,94±0,03	0,84±0,02
FO	100	0,56±0,01	0,76±0,02	0,86±0,02*	0,78±0,02*
	200	0,54±0,0	0,75±0,02	0,62±0,02**	0,70±0,02***
	50	0,53±0,02	0,73±0,01	0,89±0,02	0,84±0,03
CR	100	0,56±0,02	0,73±0,01	0,88±0,02	0,83±0,02
	200	0,54±0,02	0,71±0,02	0,83±0,01*	0,77±0,03*
	50	0,53±0,04	0,77±0,02	0,93±0,02	0,79±0,02
CT	100	0,53±0,02	0,71±0,02	0,80±0,01***	0,65±0,03***
	200	0,50±0,03	0,62±0,02***	0,70±0,01***	0,51±0,02***
	10	0,53±0,02	0,56±0,02***	0,62±0,02***	0,47±0,01***

FO= folhas; CR= cascas do ramo lateral; CT= cascas do tronco. \*p < 0,05, \*\*p < 0,01, \*\*\*p < 0,001

### 5.6.5 Efeitos sobre a pleurisia induzida por carragenina

Os extratos FO, CR e CT de *H. brasiliiana* diminuíram o volume do exsudato e o nº de leucócitos no teste de pleurisia induzida por carragenina (Tabela 12). Após tratamento, a dose de 200 mg/kg (0,87±0,05, p < 0,05) de FO reduziu o volume do exsudato, enquanto 100 e 200 mg/kg diminuíram a migração leucocitária (12,55±0,22, p < 0,05; 11,52±0,25, p < 0,001, respectivamente) quando comparadas ao grupo controle. O extrato CR, na dose de 200 mg/kg, diminuiu o volume do exsudato em 25,94% (p < 0,01) e 15,10% o nº de leucócitos (p < 0,001). Na dose de 200 mg/kg do extrato CT, houve redução de 41,67% no volume do exsudato e

19,82% no nº de leucócitos ( $p < 0,001$  em ambos). Este extrato foi o único a gerar efeitos na dose de 100mg/kg, em relação ao volume do exsudato, reduzindo 23,15% ( $p < 0,05$ ). A indometacina, na dose de 10 mg/kg, a partir de 2h, provocou significativa redução do volume do exsudato e número de leucócitos ( $p < 0,001$ ).

Tabela 12. Efeitos dos extratos hexânicos de *H. brasiliiana* sobre o volume de exsudato e o número de leucócitos na pleurisia induzida por carragenina.

Grupos	Dose (mg/kg)	Volume do exsudato (mL)	Inibição (%)	Nº de Leucócitos ( $\times 10^3$ cels/mm <sup>3</sup> )	Inibição (%)
Controle	Salina	1,08±0,06	-	13,37±0,24	-
	50	1,07±0,07	-	13,42±0,27	-
FO	100	1,03±0,08	4,62	12,55±0,22*	6,13
	200	0,87±0,05*	19,44	11,52±0,25***	13,83
CR	50	1,08±0,05	-	13,33±0,30	-
	100	0,98±0,06	9,25	12,38±0,24*	7,40
	200	0,80±0,06**	25,94	11,35±0,33***	15,10
CT	50	1,02±0,06	-	12,97±0,38	2,99
	100	0,83±0,05*	23,15	12,13±0,18**	9,27
	200	0,63±0,04***	41,67	10,72±0,40***	19,82
Indometacina	10	0,62±0,07***	42,59	9,27±0,53***	30,67

FO=folhas; CR= cascas do ramo lateral; CT=cascas do tronco. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$

A formação do exsudato na cavidade pleural (AMMENDOLA *et al.*, 1975; ALMEIDA *et al.*, 1980) e a migração leucocitária (ALMEIDA *et al.*, 1980; CAPASSO *et al.*, 1975) foram produzidas pela injeção intrapleural de carragenina e este método foi usado para confirmar os resultados obtidos do edema de pata. Fármacos anti-inflamatórios não-esteroides, tais como indometacina, inibem o acúmulo de exsudato e a mobilização dos leucócitos entre 3 e 6 horas aplicação de carragenina (ALMEIDA *et al.*, 1980; VINEGAR *et al.*, 1973). Os extratos de *H. brasiliiana* confirmaram atividade anti-inflamatória, demonstrada pela redução do edema de pata.

As atividades antinocicepiva e anti-inflamatória verificadas no presente estudo foram também descritas com plantas pertencentes à família Rutaceae (LEE *et al.*, 2008; LIAO *et al.*, 2011; MOON *et al.*, 1999; VILLALBA *et al.*, 2007). Provavelmente, componentes similares detectados em nossos experimentos podem ser responsáveis por essas propriedades, pois a análise fitoquímica dos extratos hexânicos do *H. brasiliiana* demonstraram a presença de sesquiterpenos, diterpenos, hidrocarbonetos e triterpenos pentacíclicos, sugerindo ação sinérgica (VALENCIA *et al.*, 1994; CARVALHO *et al.*, 1996; GOMES *et al.*, 2010; GEETHA; VARALAKSHMI, 2001). Além disso, substâncias tais como triterpenos, comum em extratos hexânicos, têm demonstrado atividades antinociceptiva e anti-inflamatória (FOURIE; SNYCKERS, 1989; GEETHA; VARALAKSHMI, 2001). Baseado nas classes de substâncias detectadas em *H. brasiliiana*, mecanismos de ação podem explicar as atividades observadas com os extratos hexânicos. Por exemplo, a atividade anti-inflamatória dos extratos de *H. brasiliiana* pode estar associada ao efeito inibitório de triterpenos sobre o fator nuclear  $\kappa$ B (FN- $\kappa$ B) (NAM, 2006). Os mecanismos anti-inflamatórios do ácido asiático, um triterpeno pentacíclico, têm sido relacionados à diminuição nos níveis de malondialdeído (MDA), iNOS, COX-2, e FN- $\kappa$ B no edema de pata via aumento das atividades de superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutatona peroxidase (GPx) no fígado (HUANG *et al.*, 2011).

Os resultados da farmacologia demonstram a relevância dos três extratos e, conseqüentemente, o estudo das três partes da planta como fonte das substâncias bioativas, sugerindo o aprofundamento na caracterização química de cada parte avaliada para obtenção de respectivos marcadores biológicos. Além disso, deve-se salientar que foram avaliados farmacologicamente extratos apolares e sugere-se a avaliação de extratos mais polares, tais como os aquosos, de uso popular, para posteriormente correlacionar com as respectivas constituições químicas já determinadas como diferentes principalmente entre casca de tronco e folhas.

## 6 CONCLUSÕES

De acordo com os resultados apresentados, foi possível obter as seguintes conclusões:

1. A análise morfo-anatômica revelou uma possível maior quantidade de cavidades secretoras de óleo essencial na parte abaxial das folhas novas, podendo estar relacionado com a proteção destas.
2. O óleo essencial de folhas de *H. brasiliiana* apresentou constituição restrita aos sesquiterpenos, porém com oscilações entre indivíduos avaliados. Os constituintes majoritários da Amostra 2 foram: *Epi- $\alpha$ -cadinol*, *E- $\beta$ -guaieno*, zingibereno, *Z- $\alpha$ -trans-bergamotol*,  *$\alpha$ -bisabolol*, *E-hidrato de sesquisabineno* e  *$\beta$ -sesquifelandreno*. Para a Amostra 3 foram detectados majoritariamente: *Z- $\alpha$ -trans-bergamotol*, oplopanona,  *$\alpha$ -curcumeno* e  *$\beta$ -sesquifelandreno*.
3. A análise por CG-EM dos extratos hexânicos demonstrou a presença dos seguintes constituintes: óleos essenciais ( *$\alpha$ -curcumeno*,  *$\beta$ -bisaboleno*,  *$\beta$ -sesquifelandreno*, nerolidol, óxido de cariofileno, guaiol e *E-bergamotal*), os hidrocarbonetos nonacosano e eicosano, além de substâncias com padrão de fragmentação de massas de diterpenos, ácidos graxos, e triterpenos pentacíclicos.
4. No extrato hexânico da amostra 1 e no óleo essencial das amostras 2 e 3 foram encontrados sesquiterpenos inéditos em *H. brasiliiana*: *Z- $\beta$ -farneseno*,  *$\gamma$ -curcumeno*,  *$\alpha$ -curcumeno*, zingibereno, *E- $\beta$ -guaieno*,  *$\beta$ -bisaboleno*,  *$\gamma$ -cadineno*, sesquicineol,  *$\delta$ -cadineno*,  *$\beta$ -sesquifelandreno*, *E-hidrato de sesquisabineno*, *Epi- $\alpha$ -cadinol*,  *$\alpha$ -cadinol*,  *$\beta$ -bisabolol*,  *$\alpha$ -bisabolol*, *Epi- $\alpha$ -bisabolol*, *Z- $\alpha$ -trans-bergamotol*, *Z- $\beta$ -santalol*,  *$\alpha$ -sinensal*, *Z-hidrato de sesquisabineno*, elemol, *E-hidrato de sesquisabineno*, oplopanone, óxido de cariofileno, guaiol, *óxi- $\alpha$ -muuroleno* e *E-bergamotal*.
5. A caracterização química de extratos hexânicos, metanólicos e aquosos por CCD, CG-EM e CLAE-UV demonstrou a diferença química entre cascas de tronco, cascas de ramos laterais e folhas de *H. brasiliiana*.
6. As análises cromatográficas por CCD e CLAE-UV permitiram indicar a presença de flavonoides, cumarinas e derivados do ácido cinâmico e benzoico nas partes vegetais de *H. brasiliiana*.

7. Os extratos hexânicos de *H. brasiliiana* demonstraram atividades antinociceptiva e anti-inflamatória, com indícios de ação tanto a nível central quanto periférico, neste último caso, o extrato de CT parece agir em mais mediadores inflamatórios do que os outros extratos.
8. Os resultados obtidos sugerem que *H. brasiliiana* é uma fonte de substâncias bioativas com atividades antinociceptiva e anti-inflamatória, o que pode justificar o uso popular para algumas disfunções orgânicas. No entanto, estudos clínicos e toxicológicos aprofundados são necessários para confirmar a segurança, eficácia e a utilização como fitomedicamento.

## REFERÊNCIAS

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

ADORJAN, B.; BUCHBAUER, G. Biological properties of essential oils: an updated review. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 25, n. 6, p. 407-426, 2010.

AHARONI, A.; JONGSMA, M. A.; KIM, T-Y.; RI, M-B.; GIRI, A. P.; VERSTAPPEN, F. W. A.; SCHWAB, W.; BOUWMEESTER, H. J. Metabolic engineering of terpenoid biosynthesis in plants. **Phytochemistry Reviews**, v. 5, n. 1, p. 49-58, 2006.

ALICE, C. B.; SIQUEIRA, N. C. S.; MENTZ, L. A.; SILVA, G. A. A. B.; JOSÉ, K. F. D. **Plantas medicinais de uso popular: atlas farmacognóstico**. Canoas: Editora da ULBRA, 1995. 208p.

ALMEIDA, A. P.; BAYER, B. M.; HORAKOVA, Z.; BEAVEN, M. A. Influence of indomethacin and other anti-inflammatory drugs on mobilization and production of neutrophils: studies with carrageenan-induced inflammation in rats. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 214, n.1, p. 74-79, 1980.

ALVIM, N. A. T.; FERREIRA, M. A.; CABRAL, I. E.; FILHO, A. J. A. O uso de plantas medicinais como recurso terapêutico: das influências da formação profissional às implicações éticas e legais de sua aplicabilidade como extensão da prática de cuidar realizada pela enfermeira. **Revista Latino-Americana de Enfermagem**, v. 14, n. 3, p. 1-9, 2006.

AMBROZIN, A. R. P.; VIEIRA, P. C.; FERNANDES, J. B.; SILVA, M. F. G. F.; ALBUQUERQUE, S. Trypanocidal activity of Meliaceae and Rutaceae plant extracts. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 99, n. 2, p. 227-231, 2004.

AMBROZIN, A. R. P.; VIEIRA, P. C.; FERNANDES, J. B.; SILVA, M. F. G. F.; ALBUQUERQUE, S. Piranoflavonas inéditas e atividades tripanocidas das

substâncias isoladas de *Conchocarpus heterophyllus*. **Química Nova**, v. 31, n. 4, p. 7-7, 2008.

AMMENDOLA, G.; DI ROSA, G. M.; SORRENTINO, L. Leucocyte migration and lysosomal enzymes release in rat carrageenin pleurisy. **Agents Actions**, v. 5, n. 3, p. 250-255. 1975.

AMOROZO, M. C. M. A abordagem etnobotânica na pesquisa de plantas medicinais. In: DI STASI, L. C. (Org.). **Plantas medicinais: arte e ciência - um guia de estudo interdisciplinar**. Botucatu: UNESP. 1996. 230p.

ANGELO, P.M., JORGE, N. Compostos fenólicos em alimentos – uma breve revisão. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 66, n. 1, p. 232-240, 2007.

ANGNES, S. I. A. **Isolamento, caracterização química e avaliação da propriedade inseticida do óleo essencial de *Piper amplum* Kunth**. 2005. 88f. Dissertação (Mestrado em Química). Universidade Regional de Blumenau. Santa Catarina.

ARAÚJO, P. F.; SOUZA, A. N. C.; MORAIS, S. M.; FERREIRA, S. C., CARDOSO, J. H. L. Antinociceptive effects of the essential oil of *Alpinia zerumbet* on mice. **Phytomedicine**, v. 12, n. 6-7, p. 482-6, 2005.

ARAÚJO-JÚNIOR, C. P. **Composição química e atividade biológica dos óleos essenciais de frutas cítricas**. 2009. 95f. Dissertação (Mestrado em Química). Universidade Federal Rural de Pernambuco. Recife.

ARRUDA, D. C.; D'ALEXANDRI, F. L.; KATZIN, A. M.; ULIANA, S. R. Anti-leishmanial activity of the terpene nerolidol. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v. 49, n. 5, p. 1679-1687, 2005.

ÁRVORES DO BRASIL. **Localização de árvores nativas do Vale do Aço – MG**. Disponível em: <http://www.arvores.brasil.nom.br/textos/local.htm>. [acesso em 17 de maio de 2012].

ASSAD, L. Fitoterápico não é panacéia. **Ciência e Cultura**, v. 62, n. 3, p. 11-13, 2010.

ÁVILA-PIRES, F. D. Teoria e prática das práticas alternativas. **Revista de Saúde Pública**, v. 29, n. 2, p. 147-151, 1995.

BAKKALI, F.; AVERBECK, S.; AVERBECK, D.; IDAOMAR, M. Biological effects of essential oils – a review. **Food Chemistry and Toxicology**, v. 46, n. 2, p. 446-475, 2007.

BALBINO, C. A.; PEREIRA, L. M.; CURI, R. Mecanismos envolvidos na cicatrização: uma revisão. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 41, n. 1, p. 27-51, 2005.

BALUNAS, M. J.; KINGHORN, A. D. Drug discovery from medicinal plants. **Life Sciences**, v. 78, n. 5, p. 431-441, 2005.

BAIK, S. C.; YOUN, H. S.; CHUNG, M. H.; LEE, W. K.; CHO, M. J.; KO, G. H.; PARK, C. K.; KASAI, H.; RHEE, K. H. Increased oxidative DNA damage in infected human gastric mucosa. **Cancer Research**, v. 56, n. 6, p. 1279-1282, 1996.

BAN, H. S.; LEE, S.; KIM, Y. P.; YAMAKI, K.; SHIN, K. H.; OHUCHI, K. Inhibition of prostaglandin E(2) production by taiwanin C isolated from the root of *Acanthopanax chiisanensis* and the mechanism of action. **Biochemical Pharmacology**, v. 64, n. 9, p. 1345-1354, 2002.

BARBOSA, A. A. A. *Hortia brasiliiana* Vand. (Rutaceae): polinização por aves Passeriformes no cerrado do sudeste brasileiro. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 22, n. 1, p. 99-105, 1999.

BARBOSA, W. L. Manual para análise fitoquímica e cromatográfica de extratos vegetais. **Revista Científica da UFPA**, v. 4, p. 1-19. 2004.

BARCELÓ, D.; HENNION, C. M. **Trace determination of pesticides and their degradation products in water. Techniques and Instrumentation in Analytical Chemistry.** Amsterdam: Elsevier, 1997. 556p.

BARROS, J. A. Pensando o processo saúde-doença: a que responde o modelo biomédico? **Saúde e Sociedade**, v. 11, n. 1, p. 67-84, 2002.

BAZAN, N. G.; FLOWER, R. J. Medicine: lipid signals in pain control. **Nature**, v. 14, n. 420, p. 135-138, 2002.

BEVILACQUA, M. P. Endothelial-leukocyte adhesion molecules. **Annual Review of Immunology**, v. 11, p. 767-804, 1993.

BIAVATTI, M. W.; VIEIRA, P. C.; SILVA, M. F. G. F.; FERNANDES, J. B.; VICTOR, S. R.; PAGNOCCA, F. C.; ALBUQUERQUE, S.; CARACELLI, I.; ZUKERMAN-SCHPECTOR, J. Biological activity of quinoline alkaloids from *Raulinoa echinata* and x-ray structure of flindersiamine. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v.13, n.1, p. 66-70, 2002.

BOTSARIS, A. S.; MACHADO, P. V. **Memento Terapêutico. Fitoterápicos.** Rio de Janeiro: Laboratório Flora Medicinal José Monteiro da Silva. v. 1. 1999. 98p.

BRAGA, P. A. C. Limonoides isolados de *Hortia brasiliiana* (Rutaceae). In: **Reunião Anual sobre Evolução, Sistemática e Ecologia Micromoleculares da UFF**, XXVI, 2004, Rio de Janeiro.

BRAGA, P. A. C. **Estudo fitoquímico de espécies de Hortia (Rutaceae), importância quimiosistemática e atividades biológicas dos constituintes isolados.** 2005. 269f. Tese (Doutorado em Química). Universidade Federal de São Carlos. São Paulo.

BRASIL, **Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento.** Plantas medicinais e orientações gerais para o cultivo: boas práticas agrícolas (BPA) de plantas

medicinais, aromáticas e Condimentares. SCHEFFER, M. C.; JÚNIOR, C. C.; UDRY, M. C.; MARQUES, N. E.; KORNIJEZUK, R. M. P., Brasília, 2006. 48 p.

BRASIL, **Ministério da Saúde**. Portal da Saúde. Disponível em [http://portal.saude.gov.br/portal/saude/profissional/area.cfm?id\\_area=1336](http://portal.saude.gov.br/portal/saude/profissional/area.cfm?id_area=1336) [acesso em 05 de maio de 2011].

BREHM-STECHER, B. F.; JOHNSON, E. A. Sensitization of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* to Antibiotics by the Sesquiterpenoids Nerolidol, Farnesol, Bisabolol, and Apitone. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 47, n. 10, p. 3357-3360, 2003.

BRICKS, L. F.; SILVA, C. A. A. Toxicidade dos antiinflamatórios não-hormonais. **Pediatria (São Paulo)**, v. 27, n. 3, p. 1981-1993, 2005.

BRINKER, A. M.; MA, J.; LIPSKY, P. E.; RASKIN, I. Medicinal chemistry and pharmacology of genus *Tripterygium* (Celastraceae). **Phytochemistry**, v. 68, n. 6, p. 732-766, 2007.

BRITO, H. R. **Caracterização química de óleos essenciais de *Spondias mombin* L., *Spondias purpurea* L. e *Spondias sp* (cajarana do sertão)**. 2010. 67f. Dissertação (Mestrado em Ciências Florestais). Centro de Saúde e Tecnologia Rural - Universidade Federal de Campina Grande. Pernambuco.

BUBENYÁK, M.; NOSZÁL, B.; KÓCZIÁN, K.; TAKÁCS, M.; BÉNI, S.; HERMECZ, I.; KÖKÖSI, J. Bioisosteric hybrids of two anti-inflammatory agents, rutaecarpine and piroxicam. **Tetrahedron Letters**, v. 49, n. 40, p. 5711-5713, 2008.

BULOW, N.; KONIG, W. A. The role of germacrene D as a precursor in sesquiterpene biosynthesis: investigations of acid catalyzed photochemically and thermally induced rearrangements. **Phytochemistry**, v. 55, n. 2, p. 141-168, 2000.

CALIXTO, J. B. Biodiversidade como fonte de medicamentos. **Ciência e Cultura**, v. 55, n. 3, p. 37-39, 2003.

BURNS, J.; GARDNER, P. T.; MATTHEWS, D.; DUTHIE, G. G.; LEAN, M. E.; CROZIER, A. Extraction of phenolics and changes in antioxidant activity of red wines during vinification. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.49, n. 12, p. 5797-5808, 2001.

CAMANDOLA, S.; LEONARDUZZI, G.; MUSSO, T.; VARELIO, L.; CARINI, R.; SCAVAZZA, A. Nuclear factor kB is activated by arachidonic acid but not by eicosapentaenoic acid. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 229, p. 643-647, 1996.

CAMARGO, E. P.; TEIXEIRA M. Produtos medicinais naturais. **Revista Latinoamericana de Psicopatologia Fundamental**, v. 5, n. 3, p. 138-143, 2002.

CAPASSO, F.; DUNN, C. J.; YAMAMOTO, S.; WILLOUGHBY, D. A.; GIROUD, J. P. Further studies on carrageenan-induced pleurisy in rats. **The Journal of Pathology**, v. 116, n.2, p. 117-124, 1975.

CARVALHO, W. A.; CARVALHO, R. D. S.; RIOS-SANTOS, F. Analgésicos inibidores específicos da ciclooxygenase-2: avanços terapêuticos. **Revista Brasileira de Anestesiologia**, v. 54, n. 3, p. 448-464, 2004.

CARVALHO, J. L. S.; CUNICO, M. M.; MIGUEL, M. D.; MIGUEL, O. G. Screening fitoquímico do *Nasturtium officinale*: controle de qualidade. **Visão Acadêmica**, v. 7, n.2, p. 1-14, 2006.

CARVALHO, J. C.; SILVA, M. F.; MACIEL, M. A.; PINTO, A. C.; NUNES, D. S.; LIMA, R. M.; BASTOS, J. K.; SARTI, S.J. Investigation of anti-inflammatory and antinociceptive activities of trans-dehydrocrotonin, a 19-nor-clerodane diterpene from *Croton cajucara*. Part 1. **Planta Medica**, v. 62, p. 402–404, 1996.

CASTRO, H.G.; FERREIRA, F.A.; SILVA, D.J.H.; MOSQUIM, P.R. **Metabólitos Secundários: contribuição ao estudo das plantas medicinais**. Viçosa: Ed. UFV, 2ª ed., 2004. 113p.

CASS, Q. B.; DEGANI, A. L. G. **Desenvolvimento de Métodos por HPLC Fundamentos, Estratégia e Validação**. São Carlos: Editora UFSCar, 2001. 77p.

CAZAROLLI, L. H.; ZANATTA, L.; ALBERTON, E. H.; FIGUEIREDO, M. S. R. B.; FOLADOR, P.; DAMAZIO, R.G.; PIZZOLATTI, M.G.; SILVA, F.R.M.B. Flavonoids: prospective drug candidates. **Mini-Reviews in Medicinal Chemistry**, v. 8, n. 13, p. 1429-1440, 2008.

CHAAR, J. S. **Estudos analíticos e modificação química por acetilação do linalol contido no óleo essencial da espécie *Aniba duckei* Kostermans**. 2000. 125f. Tese (Doutorado em Química). Instituto de Química de São Carlos - Universidade de São Paulo. São Paulo.

CHANDRASEKHARAN, N. V.; DAI, H.; ROOS, K. L.; EVANSON, N. K. ; TOMSIK, J. ; ELTON, T. S. ; SIMMONS, D. L. COX-3, a cyclooxygenase-1 variant inhibited by acetaminophen and other analgesic/ antipyretic drugs: cloning, structure, and expression. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, v. 99, n. 21, p. 13926-13931, 2002.

CHAVES, D. S. A.; COSTA, S. S.; ALMEIDA, A. P.; FRATTANI, F.; ASSAFIM, M.; ZINGALI, R. B. Metabólitos secundários de origem vegetal: uma fonte potencial de fármacos antitrombóticos. **Química Nova**, v. 33, n. 1, p. 172-180, 2010.

CHENG, A-X.; LOU, Y-G.; MAO, Y-B.; LU, S.; WANG, L-J.; CHEN, X-Y. Plant terpenoids: biosynthesis and ecological functions. **Journal of Integrative Plant Biology**, v. 49, n. 2, p. 179-186, 2007.

COELHO, P. R. **Projeto de assentamento Chico Mendes II: uma parceria possível entre reforma agrária e conservação da Mata Atlântica?** 2009. 97f. Dissertação (Mestrado em Ecologia Conservação e Manejo da Vida Silvestre) Instituto de Ciências Biológicas – Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte.

COLEY, P. D. Herbivory and defensive characteristics of tree species in a lowland tropical forest. **Ecological Monographs**, v. 53, n. 2, p. 209-233, 1983.

COLLIER, H. D. J.; DINNIN, L. C.; JOHNSON, C. A.; SCHNEIDER, C. The abdominal response and its suppression by analgesic drug in the mouse. **British Journal of Pharmacology and Chemotherapy**, v. 32, n. 2, p. 295-310, 1968.

CORREA, A. D.; SIQUEIRA-BATISTA, R.; QUINTAS, L. E. M. *Similia Similibus Curentur*: revisitando aspectos históricos da homeopatia nove anos depois. **História, Ciências, Saúde-Manguinhos**, v. 13, n. 1, p. 13-31, 2006.

CORREIA, C. R. D.; COSTA, P. R. R.; FERREIRA, V. F. Vinte e cinco anos de reações, estratégias e metodologias em química orgânica. **Química Nova**, v. 25, Supl. 1, p. 74-81, 2002.

CORREA, D. B.; GOTTLIEB, O. R.; PADUA, A. P. Chemistry of brazilian Rutaceae. I. dihydrocinnamic acids from *Hortia badinii*. **Phytochemistry**, v. 14, n. 9, p. 2059-2060, 1975.

CORREA, D. B.; GOTTLIEB, O. R.; PADUA, A. P. Chemistry of brazilian Rutaceae 3. dihydrocinnamyl alcohols from *Hortia badinii*. **Phytochemistry**, v. 18, n. 2, p. 351-351, 1979.

COTRAN, R. S. KUMAR, V.; ROBBINS, S. L.; SCHOEN, F. J. **Patologia estrutural e funcional**. Rio de Janeiro: Ganabara Koogan, 2001. 358 p.

COUTINHO, E. M. O. **Estudo fitoquímico e de atividade biológica de espécies de *Solanum* (Solanaceae)** 2009. 167f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas). Universidade Federal do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro.

COUTINHO, M. A. S.; MUZITANO, M. F.; COSTA, S. S. Flavonoides: potenciais agentes terapêuticos para o processo inflamatório. **Revista Virtual de Química**, v. 1, n. 3, p. 241-256, 2009

CRAVEIRO, A. A. Do laboratório ao mercado: 34 anos de P & D em óleos essenciais no Nordeste. In: **Simpósio Brasileiro de Óleos Essenciais (SBOE)**, IV, Universidade Federal do Ceará – Fortaleza. 2007.

CRESPO, M. S. **Florales del bosque atlântico – essências florales de espécies nativas del bosque atlântico brasileiro**. 1ª ed., Santiago: IBEFLOR, 2010. 169p.

CROTEAU, R.; KUTCHAN, T. M.; LEWIS, N. G. Natural products (secondary metabolites). In BUCHANAN, B.; W. GRUISSEM, W.; JONEAS, R. **Biochemistry & Molecular Biology of Plants**. England: John Wiley e Sons, 2002. 1408p.

CUNHA, M. C. Saberes locais, tramas identitárias e o sistema mundial na antropologia: entrevista. **Sexta Feira: Antropologia, Artes e Humanidades**. São Paulo: Pletora, n. 3, p. 80-87, 1998.

CUATRECASAS, J. Studies in South American plants – VI. **Brittonia**, v. 14, n. 1, p. 50-57. 1962.

DERAEDT, R.; JOUQUEY, S.; DELEVALLÉE, F.; FLAHAUT, M. Release of prostaglandins E and F in an algogenic reaction and its inhibition. **European Journal of Pharmacology**, v. 61, n. 1, p. 17-24, 1980.

DAVIES, N. M.; GOOD, R. L.; ROUPE, K. A.; YÁÑEZ, J. A. Cyclooxygenase-3: axiom, dogma, anomaly, enigma or splice error? - Not as easy as 1, 2, 3. **Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 7, n. 2, p. 217-226, 2004.

DE CAMPOS, R. O.; ALVES, R. V.; KYLE, D. J.; CHAKRAVARTY, S.; MAVUNKEL, B. J.; CALIXTO, J. B. Antioedematogenic and antinociceptive actions of NPC 18521, a novel bradykinin B2 receptor antagonist. **European Journal of Pharmacology**, v. 316, p. 277-286, 1996.

DE CANDOLLE, A. P. **Prodromus systematis naturalis regni vegetabilis**. Parte I. Paris: Treutell et Würtz, 1824. 745p.

DEGANI, A. L. G.; CASS, Q. B.; VIEIRA, P. C. Cromatografia: um breve ensaio. **Química Nova**, v. 1, n. 7, p. 21-25, 1998.

DELLEMONACHE, F.; MARLETTI, F.; MARINIBETTOLO, G. B.; DEMELLO, J. F.; DELIMA, O. G. Coumarins of *Hortia arborea* (Rutaceae) – Hortiolone e Hortiolone. **Gazzetta Chimica Italiana**, v. 106, n. 7-8, p. 681-689, 1976.

DELLEMONACHE, F.; VALERA, G. C.; MARINIBETTOLO, G. B. Coumarins of *Hortia arborea* 2. Hortiolone and Hortionone. **Gazzetta Chimica Italiana**, v. 107, n. 7-8, p. 399-402, 1977.

DI ROSA, M.; GIROUD, J. P.; WILLOUGHBY, D. A. Studies on the mediators of the acute inflammatory response induced in rats in different sites by carrageenan and turpentine. **The Journal of Pathology**, v. 104, n. 1, p. 15-29, 1971.

DUARTE, I. D. G.; FERREIRA-ALVES, D. L.; NAKAMURA-CRAIG, M. Possible participation of endogenous opioid peptides on the mechanism involved in analgesia by vouacapan. **Life Sciences**, v. 50, n. 12, p. 891-897, 1992.

DUBOIS, R. N.; ABRAMSON, S. B.; CROFFORD, L.; GUPTA, R. A.; SIMOND, L. S.; VAN DE PUTTEE, L. B. A.; LIPSKY, P. E. Cyclooxygenase in biology and disease. **The Journal of the Federation of American Societies for Experimental Biology**, v. 12, n. 12, p. 1063-1073, 1998.

DUBUISSON, D.; DENNIS, S.G. The formalin test: a quantitative study of the analgesic effects of morphine, meperidine, and brain stem stimulation in rats and cats. **Pain**, v. 4, n. 2, p. 161-174, 1977.

DUMMER, C. D.; THOMÉ, F. S.; VERONESE, F. V. Doença renal crônica, inflamação e aterosclerose: novos conceitos de um velho problema. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 53, n. 5, p. 446-450, 2007.

EDDY, N. B.; LEIMBACH, D. Synthetic analgesics. II. Dithienylbutenyl and dithienylbutylamines. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 107, n. 3, p. 385-393, 1953.

ENGLER, A. Rutaceae in: ENGLER, H. G. A ; PRANTL, K. **Die Natürlichen Pflanzenfamilien**, 2ª ed. Leipzig: Wilhelm Engelmann. 1931. 359p.

ESAU, K. **Anatomy of Seed Plants**. 2ª ed. New York: John Wiley & Sons. 1977. 550p.

FABIANE, K. C.; FERRONATTO, R.; SANTOS, A. C.; ONOFRE, S. B. Physicochemical characteristics of the essential oils of *Baccharis dracunculifolia* and *Baccharis uncinella* D.C. (Asteraceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n. 2, p. 197-203, 2008.

FABRICANT, D. S.; FARNSWORTH, N. R. The value of plants used in traditional medicine for drug discovery. **Environmental Health Perspectives**, v. 109, supl. 1, p. 69-75, 2001.

FACHIM, E.; GUARIM, V. L. M. S. Conservação da biodiversidade: espécies da flora de mato grosso. **Acta Botanica Brasilica**, v. 9, n. 2, p. 281-287, 1995.

FAHN, A. **Plant Anatomy**, 4ª ed. Oxford: Pergamon Press. 1990. 588p.

FANG, Y.; LI, Z.; WATANABE, Y. Pharmacokinetics of a novel anti-asthmatic scoparone, in the rabbit serum assessed by a simple HPLC method. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 86, n. 1, p. 127-130, 2003.

FELDMAN, M.; McMAHON, A. T. Do cyclooxygenase-2 inhibitors provide benefits similar to those of traditional nonsteroidal anti-inflammatory drugs, with less gastrointestinal toxicity? **Annals Internal Medicine**, v. 132, n. 2, p. 134-143, 2000.

FERNANDES, E. Biofármacos e biosíntese: questões bioéticas e legais envolvidas na nova geração de medicamentos. **Revista Fármacos e Medicamentos**, v. 1, n. 43, p. 34-36, 2006.

FERRACIN, R. J. **Estudo fitoquímico de *Hortia arborea*: uma contribuição a quimiosistemática de Cusparieae**. 1992. 135f. Dissertação (Mestrado em Química). Universidade Federal de São Carlos. São Paulo.

FILHO, A. C.; ARAÚJO, R. C.; GALVÃO, T. G.; CHAGAS, A. C. P. Inflamação e Aterosclerose: Integração de Novas Teorias e Valorização dos Novos Marcadores. **Revista Brasileira de Cardiologia Invasiva**, v. 11, n. 3, p. 14-19, 2003.

FORZZA, R. C.; LEITMAN, P. M.; COSTA, A.; CARVALHO, JR. A. A.; PEIXOTO, A. L.; WALTER B. M. T; BICUDO, C.; ZAPPI, D.; COSTA, D. P.; LLERAS, E.; MARTINELLI, G.; LIMA, H. C.; PRADO, J.; STEHMANN, J. R. ; BAUMGRATZ, J. F. A; PIRANI, J. R.; SYLVESTRE, L. S.; MAIA, L. C.; LOHMANN, L. G.; PAGANUCCI, L.; SILVEIRA, M.; NADRUZ, M.; MAMEDE, M. C. H.; BASTOS, M. N. C. (MUSEU GOELDI); MORIM, M. P.; BARBOSA, M. R.; MENEZES, M.; HOPKINS, M.; SECCO, R.; CAVALCANTI, T.; SOUZA, V. C. Introdução. in Lista de Espécies da Flora do Brasil. **Jardim Botânico do Rio de Janeiro**. 2010. Disponível em <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/2010> [acesso em 10 de setembro de 2011].

FOURIE, T.; SNYCKERS, F. O. A pentacyclic triterpene with anti-inflammatory and analgesic activity from the roots of *Commiphora merkeri*. **Journal of Natural Products**, v. 52, p. 1129-1131, 1989.

FRANCISCHETTI, I.; MORENO, J.B.; SCHOLZ, M.; YOSHIDA, W.B. Os leucócitos e a resposta inflamatória na lesão de isquemia-reperfusão. **Revista Brasileira de Cirurgia Cardiovascular**, v. 25, n. 4, p. 575-584, 2010.

FRANÇA, I. S. X.; SOUZA, J. A.; BAPTISTA, R. S.; BRITTO, V. R. S. Medicina popular: benefícios e malefícios das plantas medicinais. **Revista Brasileira de Enfermagem**, v. 61, n. 2, p. 201-208, 2008.

FREIRE, M. F. I. Plantas medicinais: a importância do saber cultivar. **Revista Científica Eletrônica Agronomia**, ano III, n. 5, 2004 - Disponível em: <http://www.revista.inf.br/agro05/revisao/revisao01.pdf> [acesso em 15 de maio de 2012].

FREITAS, C. M. J.; LUCCHESI, A. M.; SILVA, F. S.; VELOZO, E. S. Coumarins, furoquinoline alkaloids and terpenes from *Spiranthera odoratissima* (Rutaceae). **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 31, n. 7, p. 805-807, 2003.

FREITAS, S. D. L. **Estudo quimiosistemático de espécies de *Hortia* (Rutaceae) e busca de fungicidas à *Guignardia citricarpa***. 2010. 143f. Dissertação (Mestrado em Química). Universidade Federal de São Carlos. São Paulo.

FU, J. Y.; MASFERRER, J. L.; SEIBERT, K.; RAZ, A.; NEEDLEMAN, P. The induction and suppression of prostaglandin H<sub>2</sub> synthase (cyclooxygenase) in human monocytes. **Journal of Biological Chemistry**, v. 265, n. 28, p. 16737-16740, 1990.

GARCIA-ARGAEZ, A. N.; APAN, T. O. R.; DELGADO, H. P.; VELAZQUEZ, G.; MARTINEZ-VAZQUEZ, M. Anti-inflammatory activity of coumarins from *Decatropis bicolor* on TPA ear mice model. **Planta Medica**, v. 66, p. 279-281, 2000.

GEETHA, T.; VARALAKSHMI, P. Anti-inflammatory activity of lupeol and lupeol linoleate in rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 76, p. 77-80, 2001.

GIANVECHIO, C. M.; PRUDENTE, L. R.; PEREIRA, A. C.; PAULA, J. R.; BARA, M. T. F. Avaliação da qualidade de extratos vegetais. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. 3, n. 2, p. 53-62, 2006.

GILLIGAN, J. P.; LOVATO, S. J.; ERION, M. D.; JENG, A. Y. Modulation of carrageenan-induced hind paw edema by substance P. **Inflammation**, v. 18, p. 285-292, 1994.

GODOY, M. F. P.; VICTOR, S. R.; BELLINI, A. M.; GUERREIRO, G.; ROCHA, W. C.; BUENO, O. C.; HEBLING, M. J. A.; BACCCI-JR, M.; SILVA, M. F. G. F.; VIEIRA, P.

C.; FERNANDES, J. B.; PAGNOCCA, F. C. Inhibition of the symbiotic fungus of leaf-cutting ants by coumarins. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 16, n. 3b, p. 669-672, 2005.

GOMES, N. M., REZENDE, C. M.; FONTES, S. P.; MATHEUS, M. E.; PINTO ADA, C.; FERNANDES, P.D. Characterization of the antinociceptive and anti-inflammatory activities of fractions obtained from *Copaifera multijuga* Hayne. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 128, p.177–183, 2010.

GOODWIN, R. H.; POLLOCK, B. M. Ultraviolet absorption spectra of coumarin derivatives. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 49, n. 1, p. 1-6, 1954.

GLEASON, H. A. Studies on the flora of northern South America XVIII: Plantae Lauranceanae Colombianae. **Phytologia**, v. 1, p. 25-38, 1933.

GLJNATILAU, A. A. L.; KINGSTON, D. G. I. Biological activity of some coumarins from Sri Lankan Rutaceae. **Journal of Natural Products**, v. 57, n. 4, p.518-520, 1994.

GOLDKIND, L.; LAINE, L. A systematic review of NSAIDs withdrawn from the market due to hepatotoxicity: lessons learned from the bromfenac experience. **Pharmacoepidemiology Drug and Safety**, v. 15, n. 4, p. 213-220, 2006.

GRAY, A. I.; WATERMAN, P. G. Coumarins of the Rutaceae. **Phytochemistry**, v. 17, n. 5, p. 845-864, 1978.

GROPPO, M. **Filogenia de Rutaceae e revisão de *Hortia* Vand.** 2004. 110f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas). Universidade de São Paulo. São Paulo.

GROPPO, M.; KALLUNKI, J. A.; PIRANI, J. R. Synonymy of *Hortia arborea* with *H. brasiliiana* (Rutaceae) and a new species from Brazil. **Brittonia**, v. 57, n. 1, p. 28-34, 2005.

GROPPO, M.; PIRANI, J. R. Two new species of *Hortia* (Rutaceae) from Amazônia. **Novon: A Journal for Botanical Nomenclature**, v. 15, n. 1, p. 139-143, 2005.

GROPPO, M. New synonyms in *Hortia* and *Dictyloma* (Rutaceae), with validation of the name *Hortia badinii*. **Novon: A Journal for Botanical Nomenclature**, v. 20, n. 2, p. 163-165, 2010.

GROPPO, M.; CRUZ-BARROS, M. A. V.; CORREA, A. M. S. Pollen morphology of species of *Hortia* (Rutaceae). **Revista Brasileira de Botânica**, v. 33, n. 1, p. 13-20, 2010.

GROPPO, M.; PIRANI, J. R. A Revision of *Hortia* (Rutaceae). **Systematic Botany**, v. 37, n. 1, p. 197-212, 2012.

HARBORNE, J. B. **Phytochemical Methods. A guide to modern techniques of plant analysis**. London: Springer, 1998. 288 p.

HAVSTEEN, B. H. The biochemistry and medical significance of the flavonoids. **Pharmacology and Therapeutics**, v. 96, n. 2-3, p. 67-202, 2002.

HILÁRIO, M. O. E.; TERRERI, M. T.; LEN, C. A. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs: cyclooxygenase 2 inhibitors. **Jornal de Pediatria**, v. 82, n. 5, p. 206-212, 2006.

HOSSEINZADEH, H.; SADEGHNIA, H. R.; IMENSHAHIDI, M.; BAZZAZ, B. S. F. Review of the pharmacological and toxicological effects of *Salvia leriifolia*. **Iranian Journal of Basic Medical Sciences**, v. 12, n. 1, p. 1-8, 2009.

HOULT, J. R. S.; PAYÁ, M. Pharmacological and biochemical actions of simple coumarins: natural products with therapeutic potential. **General Pharmacology**, v.27, n. 4, p. 713-722. 1996.

HUANG, S-S.; CHIU, C-S.; CHEN, H-J.; HOU, W-C.; SHEU, M-J.; LIN, Y-C.; SHIE, P-H.; HUANG, G-J. Antinociceptive activities and the mechanisms of anti-

inflammation of asiatic acid in mice. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2011, p. 1–10, 2011.

HUMMELBRUNNER, L. A.; ISMAN, M. B. Acute, sublethal, antifeedant, and synergistic effects of monoterpenoid essential oil compounds on the tobacco cutworm, *Spodoptera litura* (Lep., Noctuidae). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, n. 2, p. 715-720, 2001.

HUNSKAAR, S.; HOLE, K. The formalin test in mice: dissociation between inflammatory and non-inflammatory pain. **Pain**, v. 30, n. 1, p. 103-104, 1987.

JACOBS, H.; RAMDAYAL, F. Guyanin, a novel tetranortriterpenoid. Structure elucidation by 2-D NMR spectroscopy. **Tetrahedron Letters**, v. 27, n. 13, p. 1453-1456, 1986.

JACOBS, H.; RAMADAYAL, F.; McLEAN, S.; PERPICK-DUMONT, M.; PUZZUOLI, F.; REYNOLDS, W. F. Constituents of *Hortia regia*: 6,7-dimethoxycoumarin, rutaecarpine, skimmianine, and (+)-methyl (E,E)-10,11-dihydroxy-3,7,11-trimethyl-2,6-dodecadienoate. **Journal of Natural Products**, v. 50, n. 3, p. 507-509, 1987.

JANZANTTI, N. S.; FRANCO, M. R. B.; WOSIACKI, G. Efeito do processamento na composição de voláteis de suco clarificado de maçã Fuji. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 23, n. 3, p. 523-528, 2003.

JIANG, J.; HU, C. Evodiamine: a novel anti-cancer alkaloid from *Evodia rutaecarpa*. **Molecules**, v. 14, n. 5, p. 1852-1859, 2009.

JORGE, P. A. R.; NEYRA, L. C.; OZAKI, R. M.; ALMEIDA, E. Efeito dos ácidos graxos ômega-3 sobre o relaxamento-dependente do endotélio em coelhos hipercolesterolêmicos. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 69, n. 1, p. 13-18. 1997.

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

JULIÃO, L. S.; TAVARES, E. S.; LAGE, C. L. S.; LEITÃO, S. G. Cromatografia em camada fina de extratos de três quimiotipos de *Lippia alba* (mill) (erva-cidreira). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 13, supl. 1, p. 36-38. 2003.

KANG, J. X.; LEAF, A. The cardiac antiarrhythmic effects of polyunsaturated fatty acid. **Lipids**, v. 31, supl. 1, p. 41-44. 1996.

KASSUYA, C. A. L.; SILVESTRE, A.; JR, O. M. L.; MAROTTA, D. M.; REHDER, V. L. G.; CALIXTO, J. B. Antiinflammatory and antiallodynic actions of the lignan niranthin isolated from *Phyllanthus amarus*. Evidence for interaction with platelet activating factor receptor. **European Journal of Pharmacology**, v. 546, n. 1-3, p. 182-188, 2006.

KIM, H. P.; SON, K. H.; CHANG, H. W.; KANG, S. S. Anti-inflammatory plant flavonoids and cellular action mechanisms. **Journal of Pharmacological Sciences**, v. 96, n. 3, p. 229-245, 2004.

KIM, S. H.; LANGFORD, M. L.; BOUCHER, J. L.; TESTERMAN, T. L.; MCGEE, D. J. Helicobacter pylori arginase mutant colonizes arginase II knockout mice. **World Journal of Gastroenterology**, v. 17, n. 28, p. 3300-3309, 2011.

KIMURA, Y.; OKUDA, H.; NISHIBE, S.; ARICHI, S. Effects of caffeoylglycosides on arachidonate metabolism in leukocytes. **Planta Medica**, v. 53, n. 2, p. 148-53, 1987.

KINSELLA, J. E.; FRANKEL, E.; GERMAN, B.; KANNER, J. Possible mechanisms for the protective role of antioxidants in wine and plant foods. **Food Technology**, v. 47, n. 4, p. 85-89. 1993.

KLOPELL, F. C.; LEMOS, M.; SOUSA, J. P. B.; COMUNELLO, E.; MAISTRO, E. L.; BASTOS, J. K. e ANDRADE, S. F. Nerolidol, na Antiulcer Constituent from the

Essential oil of *Baccharis dracunculifolia* DC. (Asteraceae). **Zeitschrift für Naturforschung**, v. 62, n. 7-8, p. 537-542, 2007.

KROMHOUT, D.; BOSSCHIETER, E.B.; COULANDER, C.J. The inverse relation between fish consumption and 20 year mortality from coronary heart disease. **The New England Journal of Medicine**, v.312, n.19, p.156-161, 1985.

LANGE, O. L.; NOBEL, P. S.; OSMOND, C. B.; ZIEGLER, H. **Physiological plant ecology. Responses to the chemical and biological environment**. New York: Springer-Verlang, 1983. 810p.

LAPA, A. J. In: ASSAD, L. Fitoterápico não é panacéia. **Ciência e Cultura**, v. 62, n. 3, p. 11-13, 2010.

LARCHER, W. **Ecofisiologia vegetal**. São Paulo: EPU, 1986. 339p.

LEAL-CARDOSO, J. H.; FONTELES, M. C. Pharmacological effects of essential oils of plants of the northeast of Brazil. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 71, n. 2, p. 207-213, 1999.

LEE, S. H, SON, J-K., JEONG, B. S.; JEONG, T-C.; CHANG, H. W.; LEE, E-S; JAHNG, Y. Progress in the studies on Rutaecarpine. **Molecules**, v.13, n. 2, p. 272-300, 2008.

LEITE, M. P.; FASSIN JR., J; BAZILONI, E. M. F; ALMEIDA, R, N.; MATTEI, R.; LEITE, J. R. Efeitos comportamentais de ratos após inalação do óleo essencial de *Citrus aurantium* L. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, supl. 0, p. 661-666, 2008.

LIANDA, R. L. P. **Perfil de substâncias fenólicas de méis brasileiros por cromatografia líquida de alta eficiência e avaliação do potencial antioxidante**. 2009. 156f. Tese (Doutorado em Química). Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro.

LIAO, J-F.; CHIOU, W-F.; SHEN, Y-C.; WANG, G-J.; CHEN, C-F. Anti-inflammatory and anti-infectious effects of *Evodia rutaecarpa* (*Wuzhuyu*) and its major bioactive components. **Chinese Medicine**, v. 6, n. 6, p. 1-8, 2011.

LIMA, M. P.; PINTO, D. S.; LIMA, E. S.; FERREIRA, A. G. Avaliação da inibição de  $\alpha$ -glicosidase por substâncias de *Hortia longifolia* (Rutaceae). In: **Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química (SBQ)**, XXXIV, 2011, Santa Catarina.

LISBOA, M. A. Uma nova espécie de Rutaceae. **Revista da Escola de Farmácia (UFOP)**, v. 3, p. 7-10. 1974.

LORENZI, H. **Árvores Brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. Nova Odessa: Plantarum, v. 2. 1998. 352p.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas**. 2ª ed., Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2008. 544p.

MACIEL, R. L.; MOREIRA-CAMPOS, L. M.; SILVA, B. C.; BRANDÃO, M. G. L. Características físico-químicas e químicas e estudo preliminar de estabilidade de tinturas preparadas com espécies de *Arnica lychnophora* em comparação com *Arnica montana*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16, n. 1, p. 99-104, 2006.

MARQUES, A. S. F. **Estudos fitoquímicos de três espécies de rutaceae e avaliação biológica de produtos naturais em modelos celulares e bioquímicos de tripanosomatídeos**. 2006. 266f. Tese (Doutorado em Ciências). Universidade Federal de São Carlos – UFSCar. São Paulo.

MATOS, F. J. A. Recuperação de informações, seleção e divulgação de plantas medicinais. **Revista Brasileira de Farmácia**, v. 66, n. 4, p. 49-61, 1985.

MATOS, F. J. A. **Introdução à fitoquímica experimental**. 2ª ed. Fortaleza: Edições UFC, 1997. 141p.

McFADDEN, W. H. **Techniques of combined gas chromatography/mass spectrometry: applications in organic analysis**. Malaba: Krieger Publishing Company, 1988. 463p.

McGARVEY, D. J.; CROTEAU, R. Terpenoid metabolism. **The Plant Cell**, v. 7, n. 7, p. 1015-1026, 1995.

MÁXIMO, A. C.; LIMA, M. P.; VERAS, S. M.; SOUZA, M. G. Fitoquímica e prospecção de princípios ativos para o controle de *Crinipellis pernicioso* (Stahel) Singer. In: **Jornada de Iniciação Científica do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia**, XIX, 2010, Manaus.

MELO, E. A.; GUERRA, N. B. Ação antioxidante de compostos fenólicos naturalmente presentes em alimentos. **Boletim da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.36, n. 1, p. 1-11, 2002.

MELO, F.P.L.; TABARELLI, M. Seed dispersal and demography of pioneer trees: the case of *Hortia arborea*. **Plant Biology**, v. 5, n. 4, p. 359-365, 2003.

MIDDLETON, E.; KANDASWAMI, C.; THEOHARIDES, T. C. The effects of plant flavonoids on mammalian cells: Implications for inflammation, heart disease, and cancer. **Pharmacological Reviews**, v. 52, n. 4, p. 673-751, 2000.

MIGUEL, M. G. Antioxidant and anti-inflammatory activities of essential oils: a short review. **Molecules**, v. 15, n. 12, p. 9252-9287, 2010.

MILES, E. A.; ZOUBOULI, P.; CALDER, P. C. Effects of polyphenols on human Th1 and Th2 cytokine production. **Clinical Nutrition**, v. 24, n. 5, p. 780-784, 2005.

MING; L. C.; SILVA, S. M. P.; SILVA, M. A. S.; HIDALGO, A. F.; MARCHESE, J. A.; CHAVES, F. C. M. **Manejo e cultivo de plantas medicinais: algumas reflexões sobre as perspectivas e necessidades no Brasil**. Faculdade de Ciências Agrônomicas - UNESP. Disponível em:

<http://www.crn9.org.br/uploads/file/CONUT/Palestras> [acesso em 15 de maio de 2012].

MINNAARD, A. J.; WIJNBERG, J. B. P. A.; GROOT, A. A síntese de (+)-hedycryol, a partir de natural (-)- guaiol. **Tetrahedron**, v. 50, n. 16, p. 4755-4764, 1994.

MINYARD, J. P.; THOMPSON, A. C.; HEDIN, P. A. Constituents of the cotton bud, beta.-Bisabolol, a new sesquiterpene alcohol. **The Journal of Organic Chemistry**, v. 33, n. 2, p. 909-911, 1968.

MIRA, N. V. M.; BARROS, R. M. C.; SCHIOCCHET, M. A.; NOLDIN, J. A.; LANFER-MARQUEZ, U. M. **Extração, análise e distribuição dos ácidos fenólicos em genótipos pigmentados e não pigmentados de arroz (*Oryza sativa* L.)**. Ciência e Tecnologia de Alimentos, v. 28, n. 4, p. 994-1002, 2008.

MIRANDA, J. A. **Caracterização fotofísica de derivados de cumarinas**. 2001. 144f. Dissertação (Mestrado em Química). Instituto de Química – Universidade Federal de Uberlândia. Minas Gerais.

MOON, T. C.; MURAKAMI, M.; KUDO, I; SON, K. H.; KIM, H. P. KANG, S. S.; CHANG, H. W. A new class of COX-2 Inhibitor, rutaecarpine from *Evodia rutaecarpa*. **Inflammation Research**, v. 48 , n. 12, p. 621-625, 1999.

MORAIS, S. M.; FALCÃO, M. J. C.; ALCANTARA, T. T. N.; OLIVEIRA, N. M. L.; FERREIRA, P. A. T.; NILCE V. G. P. S.; BRASIL, N. V. G. P. S.; VILA-NOVA , N. S. Atividade leishmanicida e antiacetilcolinesterase da escoparona isolada da espécie *Platymiscium floribundum* Vog. In: **Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química (SBQ)**, XXXV, 2012, Águas de Lindóia.

MULAY, L. N.; FOX, M. E. Magnetic Anisotropy of Ferrocene. **Journal of the American Chemical Society**, v. 84, n. 7, p. 1308-1310, 1962.

MURRAY, R. H.; JORGE, Z. D. A simple method for differentiating between angular and linear 5-metoxifuranecoumarins. **Phytochemistry**, v. 23, n. 3, p. 697-699, 1984.

NAITO, Y.; YOSHIKAWA, T. Role of nitric oxide derived from inducible nitric oxide synthase in *H. pylori*-infected gastric mucosal injury. **Nippon Rinsho**, v. 63, supl. 11, p. 109-115, 2005.

NAM, N. H. Naturally occurring NF-kappaB inhibitors. **Mini-Review in Medicinal Chemistry**, v. 6, p. 945-951, 2006.

NANTEL, F.; DENIS, D.; GORDON, R.; NORTHEY, A.; CIRINO, M.; METTERS, K. M.; CHAN, C. C. Distribution and regulation of cyclooxygenase-2 in carrageenan-induced inflammation. **British Journal of Pharmacology**, v. 128, n. 4, p. 853-859, 1999.

NAPOLITANO, H. B.; SILVA, M.; ELLENA, J.; RODRIGUES, B. D. G.; ALMEIDA, A. L. C.; VIEIRA, P. C.; OLIVA, G.; THIEMANN, O. H. Aurapten, a coumarin with growth inhibition against *Leishmania major* promastigotes. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 37, n. 12, p. 1847-1852, 2004.

NEMIROVSKY, A.; CHEN, L.; ZELMA, V.; JURNA, I. The antinociceptive effect of the combination of spinal morphine with systemic morphine or buprenorphine. **Anesthesia & Analgesia**, v. 93, p. 197-203, 2001.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. **Journal of Natural Products**, v. 70, n. 3, p. 461-477, 2007.

NICARETA, C. **Óleos essenciais de *Solanum* e a interação com morcegos frugívoros**. 2006. 77f. Dissertação (Mestrado em Química). Universidade Federal do Paraná. Santa Catarina.

NOVAIS, T. S.; COSTA, J. F. O.; DAVID, J. P. L.; DAVID, J. M.; QUEIROZ, L. P.; FRANÇA, F.; GIULIETTI, A. M.; SOARES, M. B. P.; SANTOS, R. R. Atividade

antibacteriana em alguns extratos de vegetais do semi-árido brasileiro. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.13, supl. 2, p. 5-8, 2003.

OLIANI, S. M.; GIL, C. D. Proteína antiinflamatória anexina 1: mecanismos celulares e relevância clínica. **Arquivo de Ciência da Saúde**, v. 13, n. 4, p. 186-191, 2006.

PACHTER, I. J.; RAFFAUF, R. F.; ULLYOT, G. E., RIBEIRO, O. The Alkaloids of *Hortia arborea* Engl. **Journal of the American Chemical Society**, v. 82, n. 19, p. 5187–5193, 1960.

PÁDUA, A. P. **Estudo químico de *Hortia badinii* e *Hortia longifolia***. 1976. 195f. Tese (Doutorado em Química) Universidade Federal de Belo Horizonte. Minas Gerais.

PARKY, D. C. **Great moments in pharmacy**. Michigan: Northwood Institute Press, 1966. 238p.

PEAKMAN, M.; VERGANI, D. **Imunologia básica e clínica**. 2ª ed., Amsterdam: Elsevier, 2011. 376p.

PELLISSARI, G. P.; PIETRO, R. C. L. R.; MOREIRA, R. R. D. Atividade antibacteriana do óleo essencial de *Melampodium divaricatum* (Rich.) DC., Asteraceae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, n. 1, p. 70-74, 2010.

PEREIRA, M. A. **Perfil cromatográfico das substâncias fenólicas presentes em extratos de mel de assa-peixe e avaliação de seu poder antioxidante**. 2010. 77p. Monografia (licenciatura em Química). Instituto de Ciências Exatas – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro.

PEREIRA, R. C. A.; VALENTE, L. M. M. PINTO, J. E. B. P.; BERTOLUCCI, S. K. V. BEZERRA, G. M.; ALVES, F. F.; SANTOS, P. F. P.; BENEVIDES, P. J. C.; SIANI, A. C.; ROSÁRIO, S. L.; MAZZEI, J. L.; D'AVILA, L. A.; GOMES, L. N. F.; AQUINO-NETO, F. R.; EMMERICK, I. C. M.; CARVALHAES, S. F. In vitro cultivated *Uncaria tomentosa* and *Uncaria guianensis* with determination of the pentacyclic oxindole

alkaloid contents and profiles. **Journal Brazilian Chemical Society**, v. 19, n. 6, p. 1193-1200, 2008.

PETERSEN, R. Z. **Biotransformação de terpenoides por culturas de células vegetais e fungos filamentosos**. 2006. 206f. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas). Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre.

PIERI, F. A.; MUSSI, M. C.; MOREIRA, M. A. S. Óleo de copaíba (*Copaifera* sp.): histórico, extração, aplicações industriais e propriedades medicinais. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 11, n. 4, p. 465-472, 2009.

PINI, G. F. **Estudos da classificação de óleos essenciais com uso combinado de cromatografia gasosa e métodos quimiométricos**. 1995. 65f. Dissertação (Mestrado em Química). Universidade Estadual de Campinas. São Paulo.

PINTO, D. S.; LIMA, M. P.; FERREIRA, A. G. Extrato metanólico dos galhos de *Hortia longifolia*: amida, alcaloide, limonóide e derivado do ácido cinâmico. In: **Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química (SBQ)**, XXXII, 2009a, Fortaleza.

PINTO, D. S.; LIMA, M. P.; FERREIRA, A. G. Identificação de derivado do ácido ferúlico e cumarina nos galhos de *Hortia longifolia* (Rutaceae). In: **Reunião Anual da Sociedade Brasileira para o Progresso da Ciência**, LXI, 2009b, Manaus.

PIO-CORRÊA, M. **Dicionário das plantas úteis e exóticas cultivadas**. Rio de Janeiro: Instituto Brasileiro de Desenvolvimento Florestal, v. 5. 1984. 690p.

PIRANI, J. R. Rutaceae. In: WANDERLEY, G. L.; SHEPHERD & GIULIETTI, A. M. (Org). **Flora Fanerogâmica do Estado de São Paulo**. São Paulo: Instituto de Botânica, 2002. v. 2, 432p.

RAJALAKSMI, D.; NARASIMHAN, S. Food antioxidants: sources and methods of evaluation. In: MADHAVI, D. L.; DESHPANDES. S.; SALUNKHE, D. K. **Food**

**Antioxidants – technological, toxicological and health perspectives.** New York: Marcel Dekker, 1995.

RAMSEWAK, R. S.; NAIR, M. G.; STRASBURG, G. M.; DEWITT, D. L.; NITISS, J. L. Biologically active carbazole alkaloids from *Murraya koenigii*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 47, n. 2, p. 444-447, 1999.

RANG, H. P.; DALE, M. M.; RITTER, J. M.; FLOWER, R. J. **Farmacologia**. 6<sup>a</sup> ed., Amsterdam: Elsevier, 2007. 890p.

RECIO, M. C.; GINER, R. M.; MÁNES, S.; RIOS, J. L. Structural requirements for the anti-inflammatory activity of natural terpenoids. **Planta Medica**, v. 61, n. 2, p. 182-185, 1995.

REDA, S. Y. **Estudo comparativo de óleos vegetais submetidos a estresse térmico**. 2004. 153f. Dissertação (Mestrado em Tecnológica de Matérias-Primas) Universidade Estadual de Ponta Grossa. Paraná.

REIMBERG, M. C. H. **Estudos de algumas variáveis que interferem na concentração de flavonoides do cultivo de folhas de *Passiflora incarnata* L.** 2006. 77f. Dissertação (Mestrado em Química). Instituto de Química de São Carlos – Universidade de São Paulo. São Carlos.

REIS, M. S.; MARIOT, A.; STEENBOCK, W. Diversidade e domesticação de plantas medicinais. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A. PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5.ed., Porto Alegre / Florianópolis: Editora UFRGS / Editora UFSC, 2003. 1102p.

REZENDE, K. C. S.; SEVERINO, C. G. P.; SEVERINO, V. G. P.; SILVA, M. F. G. F.; FERNANDES, J. B.; VIEIRA, P. C.; LUCARINI, R.; CUNHA, W. R.; MARTINS, C. H. G.; SILVA, M. L. A.; FERREIRA, D.; ESPERANDIM, V. R. SARAIVA, J. ALBUQUERQUE, S. Atividade tripanocida do extrato hexânico e substâncias

isoladas de *Hortia oreadica* (Rutaceae). In: **Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química (SBQ)**, XXXIII, 2010, Águas de Lindóia.

RIBEIRO, A. B. **Fitoquímica do caule de *Citrus limonia* enxertado com *C. sinensis* e da espécie *nycticalanthus speciosus* (Rutaceae) e biossíntese de cumarinas preniladas.** 2006. 265f. Tese (Doutorado em química). Universidade Federal de São Carlos. São Paulo.

RIBEIRO, R. A.; RODRIGUES, F. M. Genética da conservação em espécies vegetais do cerrado. **Revista de Ciências Médicas e Biológicas**, v. 5, n. 3, p. 253-260, 2006.

RIBEIRO, S. P.; PIMENTA, H. R.; FERNANDES, G. W. Herbivory by chewing and sucking insects on *Tabebuia ochraceae*. **Biotropica**, v. 26, p. 302-307, 1994.

ROCHA, A. M. **A tradição do Ayurveda.** Rio de Janeiro: Águia Dourada, 2010. 288p.

ROCHA, G. M.; ROCHA, M. E. N. Uso popular de plantas medicinais. **Saúde & Ambiente em Revista**, v. 1, n. 2, p. 76-85, 2006.

SÁ, C. G. **Extração e testes de atividades farmacológicas do óleo essencial de *Citrus sinensis* (L.) Osbeck direcionados para a doença de Alzheimer.** 2011. 83f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas). Universidade Federal do Piauí, Terezina.

SÁ, M. F. A. **Estudo anatômico e ensaios fitoquímicos de *Baccharis myriocephala* D.L. (carqueja).** 1992. 91f. Dissertação. (Mestrado em Botânica). Universidade Federal do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro.

SANTOS, H. R.; MARCO, C. A.; FEITOSA, A. G. S.; RODRIGUES, F. F. G.; ALCANTARA, F. D. O.; TAVARES, R. C. N. Rendimento e qualidade do óleo essencial de *Vanillosmopsis arborea* Baker influenciado pelo diâmetro dos ramos. **Cadernos de Agroecologia**, v. 6, n. 2, p. 1-5, 2011.

SANTOS, L. A. **Estudo químico das atividades citotóxica, antioxidante e antifúngica de *Prunus myrtifolia* (L.) Urban. (ROSACEAE).** 2005. 194f. Tese (Doutorado em Química) Instituto de Química - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho. Araraquara.

SANTOS, M. R. M. **Composição terpênica e atividade anti-oxidante de plantas e infusões.** 2010. 149f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica e Química dos Alimentos). Universidade de Aveiro. Aveiro.

SANTOS, R. I. Metabolismo básico e origem dos metabólitos secundários. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A. PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento.** Porto Alegre/Florianópolis: Editora UFRGS/Editora UFSC, 2004. 1102 p.

SANTOS, R. R.; LEME, J. G.; FERREIRA, S. H.; BECHARA, G. H.; SUDO, L. S. Does the pro-inflammatory factor in lymphocytes (LpIF) explain the role of these cells in acute inflammation? **Agents and Actions**, v. 6, n. 6, p. 690-693, 1976.

SANTOS, S. C. **Caracterização cromatográfica de extratos medicinais de guaco: *Mikania laevigata* Schultz Bip. ex Baker e *M. glomerata* Sprengel e ação de *m. laevigata* na inflamação alérgica pulmonar.** 2005. 94f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas). Universidade do Vale do Itajaí. Santa Catarina.

SCHOCKEN, N. R. L. **Obtenção de quimiotipos híbridos de *Lippia alba* (Mill) N.E. Brown.** 2007. 82f. Dissertação (Mestrado em Agricultura Tropical e Subtropical). Instituto Agrônomo de Campinas. São Paulo.

SEIBERT, K.; ZHANG, Y.; LEAHY, K.; HAUSER, S.; MASFERRER, J.; PERKINS, W.; LEE, L.; ISAKSON, P. Pharmacological and biochemical demonstration of the role of cyclooxygenase 2 in inflammation and pain. **Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A**, v. 91, n. 25, p.12013-12017, 1994.

SELLMAYER, A.; DANESCH, U.; WEBER, P. C. Effects of different polyunsaturated fatty acids on growth related early gene expression and cell growth. **Lipids**, v. 31, p. 37-40, 1996.

SERHAN, C. N.; CHIANG, N. Novel endogenous small molecules as the checkpoint controllers in inflammation and resolution: entrée for resolomics. **Rheumatic Disease Clinics of North America**, v. 30, n. 1, p. 69-95, 2004.

SERHAN, C. N.; OLIW, E. Unorthodox routes to prostanoid formation: new twists in cyclooxygenase-initiated pathways. **Journal of Clinical Investigation**, v. 107, n. 12, p. 1481-1489, 2001.

SEVERINO, C. G. P.; BRAGA, P. A. C.; SILVA, M. F. G. F.; FERNANDES, J. B.; VIEIRA, P. C. Derivados do ácido cinâmico isolados de *Hortia brasiliiana* (Rutaceae). In: **Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química (SBQ)**, XXV, 2002, Poços de Caldas.

SEVERINO, C. G. P. **Estudo fitoquímico e avaliação do potencial antimicrobiano de espécies de *Hortia* (Rutaceae): *H. oreadica*, *H. brasiliiana* e *H. superpa***. 2008. 191f. Dissertação (Mestrado em Química). Departamento de Química, Universidade Federal de São Carlos. São Paulo.

SEVERINO, V. G. P.; SILVA, M. F. G. F.; FERNANDES, J. B.; VIEIRA, P. C.; LUCARINI, R.; CUNHA, W. R.; MARTINS, C. H. G. (a). Avaliação antibacteriana de extratos e substâncias de *Hortia oreadica* (Rutaceae) frente à patógenos causadores de infecções pulmonares. In: **Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química (SBQ)**, XXXII, 2009(a), Fortaleza.

SEVERINO, V. G. P.; SILVA, M. F. G. F.; LUCARINI, R.; MONTANARI, L. B.; CUNHA, W. R.; VINHOLIS, A. H. C.; MARTINS, C. H. G. Determination of the antibacterial activity of crude extracts and compounds isolated from *Hortia oreadica* (Rutaceae) against oral pathogens. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 40, n. 3, p. 535-540, 2009(b).

SEVERINO, V. G. P.; CAZAL, M. C.; FORIM, M. R.; GRAÇAS, M. F.; SILVA, F.; RODRIGUES-FILHO, E.; FERNANDES, J. B.; VIEIRA, P. C. Isolation of secondary metabolites from *Hortia oreadica* (Rutaceae) leaves through high-speed counter-current chromatography. **Journal Chromatography A**, v. 1216, n. 19, p. 4275-4281, 2009(c).

SEVERINO, V. G. P.; NEBO, L.; CECCATO, M.; FERNANDES, J. B.; BUENO, O. C.; SILVA, M. F. G. F.; VIEIRA, P. C. Atividade inseticida de *Hortia oreadica* (Rutaceae) em operárias de *Atta sexdens rubropilosa* Forel (Hymenoptera: Formicidae). In: **Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química (SBQ)**, XXXIV, 2011, Santa Catarina.

SHARMA, R. K.; BAKHASHI, N. N. Catalytic upgrading of biomass-derived oils to transportation fuels and chemicals. **Journal of Chemical & Engineering**, v. 69, n. 5, p. 1071, 1991.

SHIBATA, M.; OHKUBO, T.; TAKAHASHI, H.; INOKI, R. Modified formalin test; characteristic biphasic pain response. **Pain**, v. 38, p. 347–352, 1989.

SHIMIZU M. Quantity estimation of some contaminants in commonly used medicinal plants. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, v. 38, p. 2283-2287. 1990.

SHIN, Y. W.; BAE, E. A.; CAI, X. F.; LEE, J. J.; KIM, D. H. In vitro and in vivo antiallergic effect of the fructus of *Evodia rutaecarpa* and its constituents. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 30, n. 1, p. 197-199, 2007.

SIENKIEWICZ, M.; DENYS, A. Activity of essential oils in prevention and therapy of mycoses. **Pediatrics i Medycyna Rodzina**, v. 4, p. 178-182, 2008.

SIES, H.; GROOT, H. Role of reactive oxygen species in cell toxicity. **Toxicology Letters**, v. 64, p. 547-551, 1992.

SILVA, C. F. **Avaliação da eficácia de *Typha domingensis* Pers (Taboa) e *Operculina hamiltonii* (G. don) D. F. Austin & Staples) (Batata de Purga), *in natura*, sobre infecções helmínticas gastrintestinais em caprinos naturalmente**

**infectados, em clima semi-árido.** 2009. 73f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia). Centro de Saúde e Tecnologia Rural - Universidade Federal de Campina Grande. Patos.

SILVA, C. V. **Alcaloides benzofenantridínicos e outros metabólitos do caule e frutos de *Zanthoxylum tingoassuiba* St. Hil.** 2006. 124f. Dissertação (Mestrado em Química) Universidade Federal da Bahia. Salvador.

SILVA, E. R.; M; BERALDO, W. T.; ROSENFELD, G. Bradykinin, a hypotensive and smooth muscle stimulating factor released from plasma globulin by snake venoms and by trypsin. **American Journal of Physiology**, v. 156, n. 2, p.261-273, 1949.

SILVA, M. A.; BARBOSA, J. S.; ALBUQUERQUE, H. N. Levantamento das plantas espontâneas e suas potencialidades fitoterapêuticas: um estudo no complexo Aluizio Campos – Campina Grande-PB. **Revista Brasileira de Informações Científicas (RBIC)**, v. 1, n. 1, p. 52-66, 2010.

SILVÁN, A. M.; ABAD, M. J.; BERMEJO, P.; SOLLHUBER, M.; VILLAR, A. Antiinflammatory activity of coumarins from *Santolina oblongifolia*. **Journal of Natural Products**, v. 59, n. 12, p. 1183-1185, 1996.

SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X.; KIEMLE, D. J. **Spectrometric Identification of Organic Compounds.** 70<sup>a</sup> ed., New York: John Willey & Sons, 2005. 502p.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A. PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento.** 5<sup>a</sup> ed. Porto Alegre: UFSC, 2004. 1102 p.

SINGER, A. J.; CLARK, R. A. F. Cutaneous wound healing. **New England Journal of Medicine**, v. 341, n. 10, p. 738-746, 1999.

SIQUEIRA JR., J. F.; DANTAS, C. J. S. **Mecanismos celulares e moleculares da inflamação.** 1<sup>a</sup> ed., São Paulo: MEDSI, 2000. 238p.

SKÖLD, M.; KARLBERG, A. T.; MATURA, M.; BÖRJE, A. The fragrance chemical beta-caryophyllene air oxidation and skin sensitization. **Food and Chemical Toxicology**, v. 44, n. 4, p. 538-545, 2006.

SOBRINHO, F. A. P. **Conhecimento etnobotânico de mateiros residentes no entorno de Unidades de Conservação no estado do Rio de Janeiro**. Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro: Escola Nacional de Botânica Tropical, 2007. 73p.

SOUSA, J. B. A. S. P. **Atividade biológica de derivados do ácido caféico: efeito antioxidante e anti-inflamatório**. 2008. 78f. Dissertação (Mestrado em Controle de Qualidade) Universidade do Porto. Faculdade de Farmácia. Porto.

SOUZA, W. J. M.; OLIVERIA, J. F. F.; NICOLE, R. Plantas medicinais com potencial atividade anti-inflamatória utilizadas pela população: um guia prático e ilustrativo. **Revista Forence**, v. 1, n. 1, p. 1-23, 2011.

SOUZA, V. C.; LORENZI, H. **Botânica sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias fanerógamas nativas e exóticas no Brasil, baseado em APGII**. 2ª ed., Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2008. 704p.

STEIN, A. C. **Análise química de espécies de *Pterocaulon* (Asteraceae) e determinação da atividade antifúngica**. 142f. 2005. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas). Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre.

STOCHLA, K.; MASLINSKI, S. Carrageenan-induced oedema in the rat paw-histamine participation. **Agents Actions**, v. 12, n. 1-2, p. 201-202, 1982.

SUAREZ, L. E. C.; MARTÍNEZ, J. C.; DELLEMONACHE, F. Alcaloides presentes em *Hortia colombiana*. **Revista Colombiana de Química**, v. 27, n. 1, p. 23-29, 1998.

SUAREZ, L. E. C.; MENICHINI, F.; DELLEMONACHE, F. Tetranortriterpenoids and dihydrocinnamic acid derivatives from *Hortia colombiana*. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 113, n. 3. p. 339-344, 2002.

SUH, N.; HONDA, T.; FINLAY, H. J.; BARCHOWSKY, A.; WILLIAMS, C.; BENOIT, N. E.; XIE, Q. W.; NATHAN, C.; GRIBBLE, G. W.; SPORN, M. B. Novel triterpenoids suppress inducible nitric oxide synthase (iNOS) and inducible cyclooxygenase (COX-2) in mouse macrophages. **Cancer Research**, v. 58, n. 4, p. 717-723, 1998.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. 4<sup>a</sup> ed. Porto Alegre: Artmed, 2009. 848p.

TAMBE, Y.; TSUJIUCHI, H.; HONDA, G.; IKESHIRO, Y.; TANAKA, S. Gastric cytoprotection of the non-steroidal anti-inflammatory sesquiterpene, beta-caryophyllene. **Planta Medica**, v. 62, n. 5, p. 469-970, 1996.

TENG, C. M.; LI, H. L.; WU, T. S.; HUANG, S. C.; HUANG, T. F. Antiplatelet actions of some coumarin compounds isolated from plant sources. **Thrombosis Research**, v. 66, n. 5, p. 549-557, 1992.

TINTO, W. F.; MCLEAN, S.; REYNOLDS, W. F. Hortiamide, a new tyramine alkaloid from *Hortia regia*. **Journal of Natural Products**, v. 55, n. 11, p. 1676-1678, 1992.

TOLEDO, A. C. O.; HIRATA, L. L.; BUFFON, M. C. M. MIGUEL, M. D.; MIGUEL, O. G. Fitoterápicos: uma abordagem farmacotécnica. **Revista Lecta**, v. 21, n. 1, p. 7-13, 2003.

TOLSTIKOVA, T. G.; SOROKINA, I. V.; TOLSTIKOV, G. A.; TOLSTIKOV, A. G.; FLEKHTER, O. B. Biological activity and pharmacological prospects of lupane terpenoids: II. Semisynthetic lupane derivatives. **Russian Journal of Bioorganic Chemistry**, v. 32, n. 3, p. 261-276, 2006.

TONHI, E.; COLLINS, K. E.; JARDINS, I. C. S. F.; COLLINS, C. H. Fases estacionárias para Cromatografia Líquida de Alta Eficiência em Fase Reversa

(CLAE-FR) baseadas em superfícies de óxidos inorgânicos funcionalizados. **Química Nova**, v. 25, n. 4, p.616-623, 2002.

TORRES, R. P.; SOUZA, M. A. F. A dinâmica do mercado farmacêutico brasileiro segundo o modelo das estratégias genéricas de Porter. **Sociedade, Contabilidade e Gestão**, v. 5, n. Especial, p. 118-132, 2010.

VALENCIA, E.; FERIA, M.; DÍAZ, J.G.; GONZÁLEZ, A.; BERMEJO, J. Antinociceptive, anti-inflammatory and antipyretic effects of lapidin, a bicyclic sesquiterpene. **Planta Medica**, v. 60, p. 395-399, 1994.

VAN DEN DOOL, E.; KRATZ, P. A generalization of the retention index system Including linear temperature programmed gas-Liquid partition chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 11, p. 463-471, 1963.

VECHIA, L. D. V.; GNOATTO, S. C. B.; GOSMANN, G. Derivados oleananos e ursanos e sua importância na descoberta de novos fármacos com atividade antitumoral, anti-inflamatória e antioxidante. **Química Nova**, v. 32, n. 5, p. 1245-1252, 2009.

VEIGA, V. F.; PINTO, A. C. O Gênero *Copaifera* L. **Química Nova**, v. 25, n. 2, p. 273-286, 2002.

VEITCH, N. C.; GRAYER, R. E. J. Flavonoids and their glycosides, including anthocyaninins. **Natural Product Reports**, v. 25, n.3, p. 555-611, 2008.

VIEGAS JR, C. Terpenos com atividade inseticida: uma alternativa para o controle químico de insetos. **Química Nova**, v. 26, n. 3, p. 390-400, 2003.

VIEGAS, V. N.; ABREU, M. E. R.; PANARELLO, A. F.; PAGNONCELLI, R. M. Modulação do processo inflamatório agudo: terapia medicamentosa e laser não ablativo. **Revista da Faculdade de Odontologia da UPF**, v. 10, n. 2, p. 21-25, 2005.

VIEGAS JR, C.; BOLZANI, V. S.; BARREIRO, E. J. Os produtos naturais e a química medicinal moderna. **Química Nova**, v. 29, n. 2, p. 326-337, 2006.

VILLALBA, M. A.; CARMO, M. I.; LEITE, M. N. ; SOUSA, O. V. Atividades farmacológicas dos extratos de *Zanthoxylum chiloperone* (Rutaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, n. 2, p. 236-241, 2007.

VINEGAR, R.; TRUAX, J. F.; SELPH, J. L. Some quantitative temporal characteristics of carrageenin-induced pleurisy in the rat. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, v. 143, n. 3, p. 711-714, 1973.

VOGT, T. Phenylpropanoid biosynthesis: invited review. **Molecular Plant**, v. 3, n. 1, p. 2–20, 2009.

WAGNER, H.; BLANDT, S. **Plant Drug Analysis**. Berlim-New York: Springer, 2001, 384p.

WALLIS, T. E. **Texbook of Pharmacognosy**. 4<sup>a</sup> ed. Boston: L. Canudo, 1960. 1628p.

WANG, L-Y.; UNEHARA, T.; KITANAKA, S. Anti-inflammatory activity of new guaiane type sesquiterpene from *Wikstroemia indica*. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 53, n. 1, p. 137-139, 2005.

WATERMAN, P. G. Alkaloids of the rutaceae: their distribution and systematic significance. **Biochemical Systematics and Ecology**. v. 3, n. 3, p. 149-180, 1975.

WATERMAN, P. G. The chemical systematics of alkaloids: a review emphasizing the contribution of Robert Hegnauer. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 27, n. 4, p. 395-406, 1999.

WERZ, O., Inhibition of 5-lipoxygenase product synthesis by natural compounds of plant origin. **Planta Medica**, v. 73, n.13, p. 1331-1357. 2007.

WINTER, C. A.; RISLEY, E. A.; NUSS, G. W. Carrageenin-induced edema in hind paw of the rat as an assay for antiinflammatory drugs. **Proceedings of the Society for Experimental Biology Medicine**, v. 111, p. 544-547, 1962.

WHO. **Quality control methods for medicinal plant materials**. New York: World Health Organization, 1992. 122p.

WHO. **Quality control methods for medicinal plant materials**. Geneva: World Health Organization, 1998. 115p.

YAMAHARA, J.; HATAKEYAMA, S.; TANIGUCHI, K.; KAWAMURA, M.; YOSHIKAWA M.; Stomachic principles in ginger. Pungent and anti-ulcer effects of low polar constituents isolated from ginger, the dried rhizoma of *Zingiber officinale* Roscoe cultivated in Taiwan. The absolute stereostructure of a new diarylheptanoid. **Yakugaku Zasshi**, v. 112, n. 9, p. 645-655, 1992.

YOON, J. H.; BAEK, S. J. Molecular targets of dietary polyphenols with anti-inflammatory properties. **Yonsei Medicinal Journal**, v. 46, n. 5, p. 585-596, 2005.

YUNES, R. A.; CALIXTO, J. B. **Plantas medicinais sob a ótica da moderna química medicinal**. Chapecó: Argos, 2001. 523p.

ZHENG, G. Q.; KENNEY, P. M.; LAM, L. K. V. Sesquiterpenes from clove (*Eugenia caryophyllata*) as potential anticarcinogenic agents. **Journal of Natural Products**, v. 55, n. 7, p. 999-1003.,1992.

ZIBETTI, F. W. A medicina tradicional e a propriedade intelectual. In: **Reunião de Monitoramento da FUNASA**, I, 2007, Brasília.