

**JUCÉLIA BARBOSA DA SILVA**

**INVESTIGAÇÃO DO POTENCIAL QUÍMICO E BIOLÓGICO DE *Vernonia  
condensata* Baker (Asteraceae)**

**JUIZ DE FORA – MG**

**2012**



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA**  
**FACULDADE DE FARMÁCIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**  
**MESTRADO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**  
**Jucélia Barbosa da Silva**

**INVESTIGAÇÃO DO POTENCIAL QUÍMICO E BIOLÓGICO DE**  
***Vernonia condensata* Baker (Asteraceae)**

**Dissertação de Mestrado**

**Orientador: Profa. Dra. Maria Silvana Alves**

**Coorientador: Prof. Dr. Orlando Vieira de Sousa**

**Coorientador: Profa. Dra. Antônia Ribeiro**

**Juiz de Fora – Minas Gerais**

**2012**



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA**  
**FACULDADE DE FARMÁCIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**  
**MESTRADO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**  
**Jucélia Barbosa da Silva**

**INVESTIGAÇÃO DO POTENCIAL QUÍMICO E BIOLÓGICO DE**  
***Vernonia condensata* Baker (Asteraceae)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Juiz de Fora para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas

**Juiz de Fora – MG**  
**2012**

**Investigação do Potencial Químico e Biológico de  
*Vernonia condensata* Baker (Asteraceae)**

**Jucélia Barbosa da Silva**

**ORIENTADORA: Profa. Dra. MARIA SILVANA ALVES**

Dissertação de Mestrado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, da Universidade Federal de Juiz de Fora – UFJF, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Aprovada em \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

**BANCA EXAMINADORA:**

---

Profa. Dra. Sílvia Ribeiro de Souza  
Universidade de Brasília

---

Profa. Dra. Elita Scio Fontes  
Universidade Federal de Juiz de Fora

---

Profa. Dra. Maria Silvana Alves  
Universidade Federal de Juiz de Fora

Barbosa da Silva, Jucélia.

Investigação do Potencial Químico e Biológico de *Vernonia condensata* Baker (Asteraceae) / Jucélia Barbosa da Silva. -- 2012.

133 f. : il.

Orientadora: Maria Silvana Alves

Coorientador: Orlando Vieira de Souza

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Faculdade de Farmácia e Bioquímica. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, 2012.

1. *Vernonia condensata*. 2. Antioxidantes. 3. Nociceptividade. 4. Inflamação. 5. Antibacterianos. I. Alves, Maria Silvana, orient. II. Vieira de Souza, Orlando, coorient. III. Título.

Dedico esse trabalho aos meus pais, Juvenal (junto às estrelas) e Célia, pelo imenso amor e por serem para mim exemplos de dedicação e perseverança que me inspiraram nessa jornada pelo mundo da Ciência.

Ao meu marido Jaime, sempre disposto a me ajudar e tranquilizar com sua temperança e paciência.

Ao Gustavo, meu filho, um lindo presente enviado por Deus, que deu leveza e inspiração no caminho que escolhi seguir.

As minhas irmãs, Jurema e Ivanoé, que sempre me davam aquele estímulo para não desistir e seguir sempre em frente.

A todos os amigos de laboratório e de Mestrado, em especial minha parceira Vanessa, que de um modo ou de outro contribuíram para que tudo isso valesse a pena.

## AGRADECIMENTOS

---

A Deus, Força Suprema, por me presentear com sabedoria e inteligência, por me oferecer tudo aquilo que necessito no momento preciso e por me permitir a realização de mais um sonho;

A minha Orientadora, Profa. Dra. Maria Silvana Alves, muito obrigada pela oportunidade, inspiração, empenho, dedicação, amizade e pelo precioso exercício conjunto da visão holística do "pesquisar";

Ao meu Coorientador, Prof. Dr. Orlando Vieira de Sousa, por ser a voz da razão e por mostrar estratégias interessantes a serem seguidas;

A minha família, por estar comigo em todos os momentos;

A minha querida amiga-irmã, Mestre Vanessa dos Santos Temponi, pela força e amizade;

Aos parceiros de pesquisa do Laboratório de Farmacologia de Produtos Naturais da Faculdade de Farmácia Dalyara Mendonça de Matos, Felipe Valente Fernandes e Geórgia de Assis Dias Alves, por terem me ajudado a superar mais esse desafio;

Aos Técnico-Administrativos em Educação (TAEs) Carolina Miranda Gasparetto, Jéssus de Paula Sarmiento, Oscavo Ferreira de Castro e Vaneida Maria Meurer, por terem me dado apoio nas atividades realizadas;

Aos parceiros e Mestres Rodrigo Luiz Fabri e Danielle Maria de Oliveira Aragão, por toda cooperação e solicitude;

Aos professores Doutores Elita Scio Fontes, José de Jesus Ribeiro Gomes de Pinho, Marco Antônio Moreira Furtado e minha Coorientadora Antônia Ribeiro, pelo apoio nas atividades realizadas e pelos oportunos conselhos nas horas acertadas;

Aos amigos e colaboradores do Laboratório de Análise de Alimentos e Águas da Faculdade de Farmácia (FF) da Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF), por toda ajuda e atenção dispensada;

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela bolsa concedida;

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), pelo suporte financeiro por meio do aporte de recursos no projeto "Potencial antimicrobiano de produtos naturais frente às amostras de referência e detentoras de determinantes de resistência de relevância clínica" (CDS-APQ-04680-10), o que viabilizou parcialmente a realização do presente trabalho.

À Faculdade de Farmácia/UFJF, na pessoa de sua Diretora Profa. Dra. Míriam Aparecida de Oliveira Pinto;

À Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas (PPGCF)/FF/UFJF, na pessoa de seu Coordenador Prof. Dr. Orlando Vieira de Sousa;

Ao Prof. Dr. Aílson André da Luz Araújo, Chefe do Departamento de Ciências Farmacêuticas/FF/UFJF;

E a todos que, direta ou indiretamente, me apoiaram e auxiliaram na execução dessa Dissertação.



***"Embora ninguém possa voltar atrás e fazer um novo começo, qualquer um pode (re)começar agora e fazer um novo fim."***

***Chico Xavier***

SILVA, J. B. Investigação do potencial químico e biológico de *Vernonia condensata* Baker (Asteraceae)/2012. 109 p. 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

*Vernonia condensata* Baker (Asteraceae), conhecida como necroton, é usada na medicina tradicional como analgésico, desintoxicante hepático e antimicrobiano. O objetivo do presente estudo foi avaliar o potencial químico e biológico dessa planta, visando fornecer novos subsídios para a melhor compreensão científica de seu uso medicinal. Folhas secas e pulverizadas foram exaustivamente extraídas com etanol por maceração estática. O extrato etanólico foi particionado, obtendo as frações hexânica, diclorometânica, em acetato de etila e butanólica. A prospecção fitoquímica foi realizada empregando reações clássicas de identificação das principais classes de metabólitos especiais. Os teores de fenóis e flavonoides totais foram determinados por espectrofotometria. A atividade antioxidante foi determinada pelo método de 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH), bioautografia com DPPH, poder de redução do  $\text{Fe}^{+3}$  e método do ácido tiobarbitúrico (TBA), enquanto o potencial antibacteriano foi investigado pelo método de difusão em ágar e pela determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) por meio do método de microdiluição. A toxidez aguda foi estabelecida pela dose letal 50% ( $\text{DL}_{50}$ ). A atividade antinociceptiva foi avaliada pelos testes de contorções abdominais, formalina e placa quente, enquanto a anti-inflamatória por meio dos métodos de edema de pata e pleurisia. Os dados foram demonstrados como média  $\pm$  erro padrão e a análise de variância seguida dos testes de Newman-Keuls, Bonferroni ou Tukey foi usada para medir o grau de significância ( $p < 0,05$ ). As reações químicas de identificação permitiram detectar a presença de taninos, flavonoides, cumarinas, saponinas, terpenos e esteroides. Os teores de fenóis totais variaram de 0,19 a 23,11 g/100 g, enquanto os flavonoides totais de 0,13 a 4,10 g/100 g. A  $\text{CE}_{50}$  do método DPPH variou de 4,28 a 75,10  $\mu\text{g/mL}$  e a bioautografia demonstrou a presença de constituintes antioxidantes. O poder de redução do  $\text{Fe}^{+3}$  foi de  $19,98 \pm 0,42$  a  $336,48 \pm 11,05$   $\mu\text{g/mL}$  e o teste de peroxidação lipídica demonstrou efeito significativo em diferentes concentrações. O extrato etanólico não foi tóxico nas doses testadas e reduziu as contorções abdominais e o tempo de lambida da pata aumentando, também, o tempo de latência sobre a placa quente revelando, dessa forma, atividade antinociceptiva. Além disso, o edema de pata e o volume e o número de leucócitos no exsudato pleural foram reduzidos, demonstrando a atividade anti-inflamatória do extrato. Quanto à atividade antibacteriana, os valores de CIM mostraram que as frações testadas foram ativas em maior ou menor grau frente às amostras de referência investigadas. Os dados de CIM foram compatíveis com aqueles preliminarmente observados na etapa de triagem através do método de difusão. Por meio da determinação da Concentração Bactericida Mínima (CBM) foi possível classificar o efeito bacteriostático ou bactericida do extrato etanólico e frações testadas. Os resultados obtidos no presente estudo indicaram que *V. condensata* corresponde a uma importante fonte de substâncias bioativas com propriedades antioxidante, antibacteriana, antinociceptiva e anti-inflamatória e pode constituir uma alternativa promissora para aplicações terapêuticas.

Palavras-chave: *Vernonia condensata*. Antioxidantes. Nociceptividade. Inflamação. Antibacterianos.

SILVA, J. B. Investigation of chemical and biological potential of *Vernonia condensata* Baker (Asteraceae)/2012. 109 p. 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.

## ABSTRACT

*Vernonia condensata* Baker (Asteraceae), known as necroton, is used in traditional medicine as an analgesic, liver detoxifying and antimicrobial. The aim of the present study was to evaluate the chemical and biological potential of this plant, ordering to provide new information for better scientific understanding of its medicinal use. Dried and powdered leaves were exhaustively extracted with ethanol by static maceration. The ethanol extract has been partitioned, obtaining the hexane, dichloromethane, in ethyl acetate and butanol fractions. The phytochemical screening was performed by classical identification chemical reactions for the major classes of special metabolites. The content of total phenols and flavonoids were determined by spectrophotometry. The antioxidant activity was determined by 2,2-diphenyl-1-picryl-hidrazil (DPPH) assay, bioautography with DPPH, reducing power of  $\text{Fe}^{+3}$  and thiobarbituric acid (TBA) test, while the antibacterial potential was investigated by ágar diffusion method and by Minimal Inhibitory Concentration (MIC) determination through the microdilution method. The acute toxicity was established by 50% lethal dose ( $\text{LD}_{50}$ ). The antinociceptive activity was evaluated by writhing, formalin and hot plate tests, while the anti-inflammatory activity by paw edema and pleurisy methods. Data were expressed as mean  $\pm$  standard error and the analysis of variance followed by Newman-Keuls, Bonferroni or Tukey tests was used to measure the degree of significance ( $p < 0.05$ ). Tannins, flavonoids, coumarins, saponins terpenes and steroids were detected. The total phenolic content ranged from 0.19 to 23.11 g/100 g, while the total flavonoids from 0.13 to 4.10 g/100 g. The  $\text{EC}_{50}$  of DPPH method ranged from 4.28 to 75.10  $\mu\text{g/mL}$  and bioautography showed the presence of antioxidant components. The reduction power of  $\text{Fe}^{+3}$  was  $19.98 \pm 0.42$  to  $336.48 \pm 11.05$   $\mu\text{g/mL}$  and the lipid peroxidation test showed significant effect at different concentrations. The ethanol extract was nontoxic at the doses tested and reduced the writhing and the paw licking time also increasing the latency time on the hot plate, presenting, in this way, antinociceptive activity. Moreover, the paw edema volume and the number of leukocytes in the pleural exudate were reduced, demonstrating the anti-inflammatory activity of the extract. Considering the antibacterial activity, the MIC values showed that the evaluated fractions were active in major or minor level against the reference strains tested. The MIC data were consistent with those observed in preliminary screening step using the diffusion method. Through the determination of the Minimal Bactericidal Concentration (MBC) was possible to classify the bacteriostatic or bactericidal effects of the ethanol extract and fractions tested. The results obtained in the present study indicated that *V. condensata* is an important source of bioactives substances with antioxidant, antibacterial, antinociceptive and antiinflammatory properties and may be a promising alternative to therapeutic applications.

Keywords: *Vernonia condensata*. Antioxidants. Nociception. Inflammation. Antibacterial Agents.

## LISTA DE FIGURAS

---

<b>Figura 1</b>	Fotografia do ramo reprodutivo de <i>Vernonia condensata</i> .....	<b>5</b>
<b>Figura 2</b>	Fotografia da morfologia externa de <i>Vernonia condensata</i> .....	<b>9</b>
<b>Figura 3</b>	Fotografia da morfologia externa foliar de <i>Vernonia condensata</i> .....	<b>10</b>
<b>Figura 4</b>	Corte histológico representativo da epiderme adaxial (A) e abaxial (B) da folha de <i>Vernonia condensata</i> .....	<b>10</b>
<b>Figura 5</b>	Corte histológico de tricomas presentes em <i>Vernonia condensata</i> ..	<b>10</b>
<b>Figura 6</b>	Estrutura química do vernoniosídeo B2.....	<b>11</b>
<b>Figura 7</b>	Esquema representativo da biossíntese simplificada dos constituintes fenólicos.....	<b>13</b>
<b>Figura 8</b>	Estrutura básica dos flavonoides.....	<b>15</b>
<b>Figura 9</b>	Mecanismos de ataque de EROs, partindo da redução monoelétrica do O <sub>2</sub> e dos sistemas de defesa antioxidante.....	<b>19</b>
<b>Figura 10</b>	Reação do 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH) com o flavonoide quercetina.....	<b>20</b>
<b>Figura 11</b>	Reação do ácido tiobarbitúrico com malonaldeído formando complexo cromogênico.....	<b>22</b>
<b>Figura 12</b>	Esquema representativo do mecanismo de propagação da dor.....	<b>29</b>
<b>Figura 13</b>	Imagens ilustrativas das etapas de preparo do material vegetal.....	<b>37</b>
<b>Figura 14</b>	Fluxograma dos processos de extração e fracionamento.....	<b>38</b>
<b>Figura 15</b>	Curva de calibração da rutina.....	<b>52</b>
<b>Figura 16</b>	Curva de calibração do ácido gálico.....	<b>52</b>
<b>Figura 17</b>	Bioautografia em cromatografia em camada delgada do extrato etanólico e frações obtidas das folhas de <i>Vernonia condensata</i> .....	<b>54</b>
<b>Figura 18</b>	Curva de calibração do malonaldeído.....	<b>55</b>
<b>Figura 19</b>	Efeito do extrato etanólico das folhas de <i>Vernonia condensata</i> sobre as contorções abdominais induzidas por ácido acético em camundongos.....	<b>59</b>
<b>Figura 20</b>	Efeito do extrato etanólico das folhas de <i>Vernonia condensata</i> sobre o tempo de sono induzido por diazepam, pentobarbital e meprobamato em camundongos.....	<b>61</b>

**LISTA DE TABELAS**

---

<b>Tabela 1</b>	Classificação das substâncias fenólicas.....	<b>12</b>
<b>Tabela 2</b>	Doenças relacionadas ao estresse oxidativo.....	<b>18</b>
<b>Tabela 3</b>	Principais classes de agentes antimicrobianos das plantas.....	<b>25</b>
<b>Tabela 4</b>	Prospecção fitoquímica do extrato etanólico e frações das folhas de <i>Vernonia condensata</i> .....	<b>51</b>
<b>Tabela 5</b>	Teores de fenóis e flavonoides totais dos extratos e frações das folhas de <i>Vernonia condensata</i> .....	<b>53</b>
<b>Tabela 6</b>	Atividade antioxidante do extrato etanólico e frações das folhas de <i>Vernonia condensata</i> .....	<b>54</b>
<b>Tabela 7</b>	Concentração de malonaldeído (MDA) em mMol/L obtida por meio do método do ácido tiobarbitúrico (TBA) com extrato etanólico e frações das folhas de <i>Vernonia condensata</i> .....	<b>56</b>
<b>Tabela 8</b>	Atividade antibacteriana do extrato etanólico e frações das folhas de <i>Vernonia condensata</i> pelo método de difusão em ágar.....	<b>57</b>
<b>Tabela 9</b>	Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM) do extrato etanólico e frações das folhas de <i>Vernonia condensata</i> .....	<b>58</b>
<b>Tabela 10</b>	Efeito do extrato etanólico das folhas de <i>Vernonia condensata</i> sobre a nocicepção induzida por formalina em camundongos.....	<b>60</b>
<b>Tabela 11</b>	Efeito do extrato etanólico das folhas de <i>Vernonia condensata</i> sobre o tempo de latência de camundongos expostos ao teste da placa quente..	<b>61</b>
<b>Tabela 12</b>	Efeito do extrato etanólico das folhas de <i>Vernonia condensata</i> sobre o edema de pata induzido por carragenina em ratos.....	<b>62</b>
<b>Tabela 13</b>	Efeito do extrato etanólico das folhas de <i>Vernonia condensata</i> sobre o exsudato pleural e número de leucócitos na pleurisia induzida por carragenina em ratos.....	<b>62</b>

**LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS**

---

AINES	Anti-inflamatórios não esteroidais
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
Aw	Atividade de água
BHT	2,6-diterbutil-4-metilfenol
CBM	Concentração Bactericida Mínima
CCD	Cromatografia em Camada Delgada
CGRP	<i>Calcitonin Gene-related Peptide-calcitonine</i>
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
COX	Ciclooxigenase
DL	Dose Letal
DMSO	Dimetilsulfóxido
DPPH	2,2-difenil-1-picril-hidrazila
EEB	Extrato Etanólico Bruto
EHEC	<i>Escherichia coli</i> enterohemorrágica
EROs	Espécies reativas de oxigênio
IASP	<i>International Association for the Study of Pain</i>
MDA	Malonaldeído
MHB	Müeller Hinton <i>Broth</i>
NK	Neurocininar
FA	Fração em Acetato de Etila
FB	Fração Butanólica
FD	Fração Diclorometânica
FH	Fração Hexânica
PG	Prostaglandinas
SNC	Sistema Nervoso Central
TBA	Ácido tiobarbitúrico
UTI	Unidade de Tratamento Intensivo

## SUMÁRIO

---

1	INTRODUÇÃO.....	1
2	REVISÃO DA LITERATURA.....	4
2.1	BIODIVERSIDADE E MEDICINA TRADICIONAL.....	4
2.2	FAMÍLIA ASTERACEAE.....	5
2.3	GÊNERO <i>Vernonia</i> .....	6
2.4	<i>Vernonia condensata</i> Baker.....	8
2.5	SUBSTÂNCIAS FENÓLICAS.....	11
2.6	FLAVONOIDES.....	14
2.7	RADICAIS LIVRES E SUBSTÂNCIAS ANTIOXIDANTES.....	16
2.8	ANTIMICROBIANOS E O EVENTO DE RESISTÊNCIA.....	22
2.8.1	Plantas como fontes de agentes antimicrobianos.....	24
2.8.2	Métodos para investigação da atividade antimicrobiana.....	26
2.8.3	Aspectos gerais sobre alguns micro-organismos de relevância.....	27
2.9	DOR E INFLAMAÇÃO.....	28
2.9.1	Considerações sobre analgésicos e anti-inflamatórios.....	31
2.9.2	Plantas como fontes de substâncias analgésicas e anti-inflamatórias.....	32
2.9.3	Métodos de investigação das atividades antinociceptiva e anti-inflamatória.....	33
2.10	DOSE LETAL 50%.....	35
3	OBJETIVOS.....	36
3.1	OBJETIVO GERAL.....	36
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	36
4	MATERIAL E MÉTODOS.....	37
4.1	MATERIAL VEGETAL.....	37
4.2	PROCESSOS DE EXTRAÇÃO E FRACIONAMENTO.....	37
4.3	PROSPECÇÃO FITOQUÍMICA.....	38
4.3.1	Pesquisa de flavonoides.....	38
4.3.1.1	Reação com cloreto de alumínio.....	39
4.3.1.2	Reação com hidróxido de sódio.....	39
4.3.1.3	Reação de Shinoda.....	39
4.3.2	Pesquisa de taninos.....	39
4.3.2.1	Reação com acetato de cobre.....	39

4.3.2.2	Reação com cloreto férrico.....	39
4.3.2.3	Reação com gelatina.....	40
4.3.2.4	Reação com sais de alcaloides.....	40
4.3.2.5	Reação com sais de chumbo.....	40
4.3.3	Pesquisa de cumarinas.....	40
4.3.4	Pesquisa de alcaloides.....	40
4.3.5	Pesquisa de saponinas.....	40
4.3.6	Pesquisa de triterpenos e esteroides.....	41
4.3.7	Pesquisa de antraquinonas.....	41
4.4	QUANTIFICAÇÃO DE FENÓIS TOTAIS.....	41
4.5	QUANTIFICAÇÃO DE FLAVONOIDES TOTAIS.....	42
4.6	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE.....	42
4.6.1	Atividade sequestrante de radicais livres 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH).....	42
4.6.2	Método de bioautografia com DPPH.....	43
4.6.3	Método do poder redutor do ferro.....	44
4.6.4	Método do ácido tiobarbitúrico (TBA).....	44
4.7	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA.....	45
4.7.1	Método de difusão em ágar.....	45
4.7.2	Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM).....	46
4.7.3	Determinação da Concentração Bactericida Mínima (CBM).....	47
4.8	AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES ANTINOCICEPTIVA E ANTI-INFLAMATÓRIA.....	47
4.8.1	Animais.....	47
4.8.2	Determinação da toxicidade aguda.....	48
4.8.3	Teste das contorções abdominais.....	48
4.8.4	Teste da formalina.....	48
4.8.5	Teste da placa quente.....	48
4.8.6	Teste de indução do sono.....	49
4.8.7	Método do edema de pata.....	49
4.8.8	Método de pleurisia.....	49
4.9	ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	50
5	RESULTADOS.....	51



5.1	PESQUISA E QUANTIFICAÇÃO DE CONSTITUINTES QUÍMICOS.....	51
5.2	ATIVIDADE ANTIOXIDANTE.....	53
5.3	ATIVIDADE ANTIBACTERIANA.....	57
5.4	ATIVIDADES ANTINOCICEPTIVA E ANTI-INFLAMATÓRIA DO EXTRATO ETANÓLICO.....	59
6	DISCUSSÃO.....	63
7	CONCLUSÃO.....	72
8	REFERÊNCIAS.....	73
9	ANEXO A - Artigo original intitulado "New approaches to clarify antinociceptive and anti-inflammatory effects of the ethanol extract from <i>Vernonia condensata</i> leaves", publicado no periódico <b>International Journal of Molecular Sciences</b> , v. 12, n. 12, p. 8993-9008, 2011.....	93

## 1- INTRODUÇÃO

---

Grande parcela da população mundial, especialmente nos países em desenvolvimento, depende da medicina tradicional para o tratamento de uma variedade de doenças. Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS) (OMS, 2002), a medicina tradicional é o somatório de conhecimentos, técnicas e procedimentos baseados nas teorias, crenças e experiências indígenas de diferentes culturas, sejam ou não explicáveis pela ciência, utilizados para a manutenção da saúde, assim como para a prevenção, o diagnóstico e a melhoria do tratamento de enfermidades físicas e mentais. Na medicina indígena, por exemplo, centenas de plantas são utilizadas terapêuticamente para fins medicinais e culturais (AHMAD; MEHMOOD; MOHAMMAD, 1997). A utilização de espécies vegetais se constitui, portanto, uma das mais antigas formas empregadas para o tratamento de enfermidades humanas e muito já se conhece a respeito de seu uso por parte da sabedoria popular, desprovido, contudo, do pleno embasamento científico.

Neste contexto, o uso de plantas medicinais encontra-se respaldado pela OMS, cujos estudos revelam que 80% da população mundial dependem principalmente da medicina tradicional e uma parte importante das terapias tradicionais envolve o uso de extratos vegetais ou de seus componentes ativos (VEIGA-JÚNIOR; PINTO; MACIEL, 2005; WHO, 1993). Desta forma, o reino vegetal constitui uma das mais importantes fontes de substâncias ativas com potencial terapêutico, sendo frequentemente usado pela população de todo o mundo, inclusive no Brasil (BLUMENTHAL, 2000; FARNSWORTH, 1989; RAVEN, 2001).

Com a maior biodiversidade do planeta, o Brasil conta com cerca de 60 mil espécies de plantas superiores conhecidas, sendo a maioria usada pelo homem como fonte de alimento, em edificações, e como medicamentos para cura de enfermidades. Neste sentido, as plantas são ferramentas essenciais para a descoberta de novas substâncias ativas capazes de combater doenças (SANT'ANA; ASSAD, 2002).

Entre as inúmeras possibilidades de nossa biodiversidade, a família Asteraceae possui distribuição cosmopolita, sendo a maior da classe Angiospermae, com aproximadamente 1.600 gêneros e 23.000 espécies, representando 10% da flora mundial (BREMER, 1994; SOUZA; LORENZI, 2005). No Brasil, as Asteráceas também estão bem evidenciadas, apresentando cerca de 300 gêneros e 2.000

espécies (MORAES; MONTEIRO, 2006). As plantas desta família são comuns nas formações abertas, como cerrado e campos rupestres. Em florestas secundárias, exemplares de Asteráceas podem ser relativamente comuns, especialmente espécies arbustivas ou arbóreas de *Vernonia*, como a *Vernonia condensata*, o "necroton" (SOUZA; LORENZI, 2005).

O gênero *Vernonia*, um dos maiores e mais importantes da família Asteraceae, é representado por aproximadamente 1.500 espécies distribuídas especialmente nas regiões tropicais e subtropicais (MISEREZ et al., 1996; SOUZA; LORENZI, 2005). Inúmeras espécies deste gênero integram o elenco de plantas medicinais de várias partes do mundo, inclusive do Brasil, onde o uso como fontes de medicamentos é bastante difundido. Substâncias bioativas como lactonas sesquiterpênicas com propriedades antineoplásica e antiplasmódica (ERASTO; GRIERSON; AFOLAYAN, 2006; PILLAY et al., 2007), glicosídeos esteroidais com atividade anti-inflamatória (LIU et al., 2009) e sesquiterpenoides citotóxicos (HUO et al., 2008) foram isoladas de espécies de *Vernonia*. As *Vernonias* também são ricas em constituintes terpenoídicos presentes, principalmente, em óleos essenciais que apresentam atividades antimicrobiana, inseticida e anticolinesterásica (MAIA et al., 2010; VAGIONAS et al., 2007). Em especial, a atividade antimicrobiana de extratos e óleos essenciais tem sido demonstrada em diferentes espécies de *Vernonia* (AKINPELU, 1999; GUPTA et al., 2003; KELMANSON; JÄGER; van STADEN, 2000; MAIA et al., 2010). Em 2002, Rabe, Mullholland e van Standen descreveram as lactonas sesquiterpênicas como um dos principais constituintes responsáveis por esta atividade.

No aspecto microbiológico, sabe-se que o aparecimento de micro-organismos multirresistentes tornou-se um problema grave e atual de saúde pública mundial devido à inexistência de um tratamento eficaz dos processos infecciosos causados por grupos patogênicos específicos, carreadores de importantes determinantes de resistência. A alta porcentagem de organismos com expressão de resistência aos antimicrobianos é constatada em amostras brasileiras provenientes de hospitais e de pacientes comunitários, principalmente de alguns locais pertencentes à região Sudeste, onde são realizados estudos de vigilância epidemiológica que corroboram esses dados (AGUILAR, 2009; CASTRO et al., 2002). Assim sendo, a visualização de novas possibilidades terapêuticas torna-se ponto estratégico de pesquisa científica, objetivando a busca de novos fitomedicamentos ou de importantes

protótipos para o desenvolvimento de novos fármacos baseados em metabólitos secundários bioativos.

O presente estudo teve como objetivo identificar os constituintes químicos e investigar as atividades farmacológicas do extrato etanólico e frações das folhas de *V. condensata*, visando fornecer novos subsídios para a melhor compreensão científica de seu uso medicinal.

## 2- REVISÃO DA LITERATURA

---

### 2.1- BIODIVERSIDADE E MEDICINA TRADICIONAL

Atualmente, uma grande parte da população mundial, principalmente nos países em desenvolvimento, depende de produtos provenientes do conhecimento tradicional para o tratamento de suas doenças, assim como para a própria subsistência. De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), a medicina tradicional é entendida como o somatório de conhecimentos, técnicas e procedimentos baseados nas teorias, crenças e experiências indígenas de diferentes culturas, sejam ou não explicáveis pela ciência, utilizados para a manutenção da saúde, assim como para a prevenção, o diagnóstico e a melhoria do tratamento de enfermidades físicas e mentais (OMS, 2002). Entre os produtos utilizados, destacam-se as plantas medicinais, que são empregadas, muitas vezes, como a única fonte de recurso terapêutico (DEVIIENNE; RADDI; POZETTI, 2004).

A biodiversidade tornou-se uma importante ferramenta para a indústria farmacêutica e o comércio de fármacos em nível mundial. Os produtos naturais e as formas fitoterápicas são responsáveis por 25% do receituário médico em países desenvolvidos e 80% naqueles em desenvolvimento. Assim, dos US\$320 bilhões/ano movimentados pelos produtos farmacêuticos, US\$ 20 bilhões/ano são oriundos de substâncias bioativas extraídas de plantas (ALMEIDA, 2003).

O Brasil, com uma economia essencialmente rural até metade do século XX, possuía um amplo uso da flora medicinal de espécies nativas e exóticas. A população não dispensava os saberes tradicionais, uma vez que esses eram os únicos recursos disponíveis para lidar com as enfermidades naquela época. As plantas utilizadas vinham dos quintais das casas e de matas adjacentes, estando sempre próximas de seus usuários (LORENZI; MATOS, 2002).

Dados estatísticos levantados por Di Stasi (1996) demonstraram que 20% da população brasileira utilizavam 63% dos medicamentos disponíveis no mercado e o restante consumia produtos de origem natural, principalmente plantas medicinais, como única fonte de recurso terapêutico.

## 2.2- FAMÍLIA ASTERACEAE

A Asteraceae, de distribuição cosmopolita, é a maior família da classe Angiospermae. Constitui-se por 1.600 gêneros e 23.000 espécies, representando 10% da flora mundial (SOUZA; LORENZI, 2005). As espécies desta família são plantas cujos hábitos podem ser arbóreos, arbustivos, herbáceos ou lianos, sendo amplamente distribuídas pelas regiões tropicais, subtropicais e temperadas (CANCELLI; EVALDT; BAUERMANN, 2007).

As Asteráceas apresentam grande diversidade nos países da América do Sul (CANCELLI; EVALDT; BAUERMANN, 2007), sendo comuns em formações abertas como o cerrado e campos rupestres (SOUZA; LORENZI, 2005). A presença de sementes com pápus plumosos, apêndices, estruturas de aderência e a biossíntese de metabólitos especiais foram fatores determinantes para a grande dispersão das espécies que tornaram seu sucesso biológico possível (CANCELLI; EVALDT; BAUERMANN, 2007).

Suas flores são reunidas em inflorescências do tipo capítulo e são circundadas por brácteas involucrais que podem variar de uma a muitas séries (Figura 1). O cálice é modificado numa estrutura denominada pápus, presente normalmente no fruto. A corola pode se apresentar de diversos tipos, sendo os mais comuns o tubuloso, o filiforme e o ligulado. O fruto característico é a cipsela ou aquênio (BREMER, 1994).

**Figura 1:** Fotografia do ramo reprodutivo de *Vernonia condensata*.



**Fonte:** LOLIS; MILANEZE-GUTIERRE (2003).

As inflorescências das espécies de Asteraceae são visitadas por diferentes animais, em especial pássaros e insetos em busca de néctar, pólen e partes florais, permitindo assim que essa família desempenhe um importante papel ecológico. Além desta importância ecológica, as Asteráceas possuem grande conotação econômica para o homem, sendo muitas delas utilizadas na medicina tradicional (JOLY, 1998).

As principais classes de fitoconstituintes encontrados nesta família e que possuem atividade farmacológica são flavonoides, quinonas, taninos, cumarinas, terpenoides, óleos essenciais e alcaloides (DEL-VECHIO-VIEIRA et al., 2009; MULEY; KHADABADI; BANARESE, 2009; SHER, 2009).

Entre as Asteráceas, o gênero *Vernonia* possui uma diversidade de espécies usadas na medicina tradicional em países da África e Américas Central e do Sul. Entre as espécies deste gênero popularmente utilizadas, destaca-se a *Vernonia condensata* em virtude de suas variadas indicações, como para tratamento de distúrbios gastrointestinais, analgésico e estimulante do apetite (MONTEIRO et al., 2001).

### **2.3- GÊNERO *Vernonia***

O nome *Vernonia* deve-se ao pesquisador Will Vernon, botânico que viajou pela América do Norte estudando as plantas desse gênero (CABRERA; KLEIN, 1980). *Vernonia* é um dos maiores e mais importantes gêneros da família Asteraceae, estando suas espécies distribuídas nas regiões tropicais e subtropicais, principalmente na África e na América do Sul (MAIA et al., 2010). Este gênero abriga aproximadamente 900 espécies, o que demonstra sua diversidade. As espécies apresentam-se como ervas, arbustos e rastejantes (SOUZA; LORENZI, 2005).

As espécies de *Vernonia* fazem parte do vasto grupo de plantas medicinais utilizado em todo o mundo, inclusive no Brasil (ERASTO; GRIERSON; AFOLAYAN, 2006). Têm sido descritas para a cura de diarreia seguida de vômitos, náusea, febre, como cicatrizante, analgésico e anti-inflamatório, e para o tratamento de úlceras. Quando usadas na forma de suco, possuem uma leve propriedade anestésica (SOUZA; LORENZI, 2005).

O gênero *Vernonia* abriga um amplo perfil fitoquímico, estando presentes todos os grupos de metabólitos especiais, com predomínio de triterpenos, esteroides, sesquiterpenos, lactonas sesquiterpênicas e flavonoides (COSTA et al.,

2008). Entre estes compostos, os flavonoides constituem os principais marcadores quimiotaxonômicos das Vernônias (VERDI; BRIGHENTE; PIZZOLATTI, 2005). As lactonas sesquiterpênicas, por sua vez, apresentam propriedades antitumoral e antiplasmódica, os glicosídeos esteroidais possuem atividade anti-inflamatória, e os sesquiterpenoides são citotóxicos. Observa-se, ainda, que plantas deste gênero são ricas em glândulas oleíferas e muitos dos seus óleos essenciais apresentam atividades biológicas (MAIA et al., 2010).

Estudos realizados com espécies do gênero *Vernonia* revelaram importantes atividades farmacológicas como potencial anti-helmíntico, antiparasitário, antiulcerogênico, antimicrobiano, antipirético, analgésico, anti-inflamatório, entre outros (ADEBOYE; ASIJE; AWE, 1997; AKINPELU, 1999; ALAWA et al., 2003; KELMANSON; JÄGER; van STADEN, 2000; LATHA; GEETHA; VARALAKSHMI, 1998; TONA et al., 2004). Os extratos etéreos e isoamílicos de *Vernonia amygdalina* mostraram apreciável atividade contra *Trypanosoma brucei* e *Leishmania donovani* e significativa ação *in vitro* frente ao *Plasmodium falciparum* (ALAWA et al., 2004; TONA et al., 2004). Estudo realizado por Akinpelu (1999) empregando extrato metanólico na concentração de 25 mg/mL a partir de folhas desta mesma espécie demonstrou atividade antibacteriana frente a amostras de *Bacillus subtilis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus vulgaris*, *Shigella dysenteriae* e *Staphylococcus aureus*. Awe, Makinde e Olajide (1999) verificaram que o extrato metanólico desta planta promoveu um aumento da motilidade intestinal, sugerindo um efeito laxante em camundongos. Além disto, o extrato metanólico também demonstrou efeito antitrombótico induzido nas doses de 100 e 200 mg/kg, o que poderia estar relacionado à ação antiagregante plaquetária das lactonas sesquiterpênicas.

Oketch-Rabah e outros (1998) evidenciaram a atividade antiprotozoária *in vitro* contra *Plasmodium falciparum* e formas promastigotas de *Leishmania major* do extrato das folhas de *Vernonia brachycalyx*.

Os extratos metanólico e em acetato de etila das folhas, caules e raízes de *Vernonia colorata*, na concentração de 1,0 mg/mL, inibiram o crescimento de *B. subtilis*, *Escherichia coli*, *K. pneumoniae*, *Micrococcus luteus*, *P. aeruginosa*, *S. aureus* e *Staphylococcus epidermidis*, demonstrando atividade antibacteriana (KELMANSON; JÄGER; van STADEN, 2000).



O extrato metanólico das flores de *Vernonia cinerea* apresentou atividade anti-inflamatória, enquanto o clorofórmico promoveu ação diurética em ratos (ADEBOYE; ASIJE; AWE, 1997; LATHA; GEETHA; VARALAKSHMI, 1998). Esta espécie também demonstrou atividade antibacteriana contra *B. subtilis*, *E. coli*, *K. pneumoniae*, *M. luteus*, *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *S. epidermidis*, *Salmonella typhi* e *Shigella dysenteriae* (GUPTA et al., 2003).

Lactonas sesquiterpênicas isoladas de *Vernonia anthelmintica* inibiram o crescimento de bactérias Gram-Positivas e Gram-Negativas (RABE; MULLHOLLAND; van STADEN, 2002).

Testes realizados em camundongos albinos infectados com *Trypanosoma cruzi* revelaram que 100% das formas tripomastigotas do tipo Y foram exterminadas quando submetidas à ação dos extratos das espécies *Vernonia crotonoides* e *Vernonia pedunculada* na concentração de 12 mg/mL. As espécies *Vernonia condensata*, *Vernonia linearis*, *Vernonia polyanthes*, *Vernonia varroaefoliade*, *Vernonia ferruginae* e *Vernonia herbaceae* não apresentaram atividade tripanossomicida (CHIARI et al., 1996).

A partir da investigação de extratos de *V. condensata* foram verificados os efeitos analgésico, antiulcerogênico e sedativo. O extrato bruto aquoso apresentou significativa diminuição no número de contrações abdominais induzidas por ácido acético, constatando-se assim o efeito analgésico. Adicionalmente, os extratos aquoso bruto e diclorometânico apresentaram ação sedativa (FRUTUOSO et al., 1994).

#### **2.4- *Vernonia condensata* Baker**

*Vernonia condensata* Baker possui algumas sinonímias como *Gymnanthemum amygdalinum* (Delile) Sch. Bip. ex Walp, *Vernonia bahiensis* Toledo, *Vernonanthura condensata* (Baker) H. Rob. e *Vernonia sylvestris* Glaz (THE PLANT LIST, 2010). Apesar desta diversidade taxonômica, no presente estudo a espécie foi referenciada em todo o texto como *Vernonia condensata*.

Importante membro da família Asteraceae, esta planta medicinal distribui-se amplamente por todo o país (MONTEIRO et al., 2001), sendo popularmente conhecida como figatil, necroton, alumã e boldo (LOLIS; MILANEZE-GUTIERRE, 2003). Apresenta-se como um arbusto grande ou arvoreta, pouco ramificada, de ramos quebradiços de 2 a 4 m de altura (LORENZI; MATOS, 2002).

Anatomicamente, as folhas de *V. condensata* podem ser descritas como alternas, pecioladas, levemente coriáceas, não latescentes, simples, de limbo inteiro, ovalado, ápice agudo, base atenuada e bordo serrilhado, com tamanho variando entre 5 a 12 cm. Como anexos epidérmicos ocorrem tricomas glandulares de dois tipos: um com pedúnculo formado por duas células pequenas dando aparência sésstil e com cabeça glandular arredondada constituída por duas células, e outro que possui grande célula apical conferindo-lhe o formato de uma biruta e destacando-se facilmente durante o processo de preparo de lâminas histológicas (LOLIS; MILANEZE-GUTIERRE, 2003). As flores são discretas de coloração esbranquiçada e estão reunidas em pequenas panículas terminais e axilares de capítulos alongados (LORENZI; MATOS, 2002) (Figuras 2, 3, 4 e 5).

**Figura 2:** Fotografia da morfologia externa de *Vernonia condensata*.



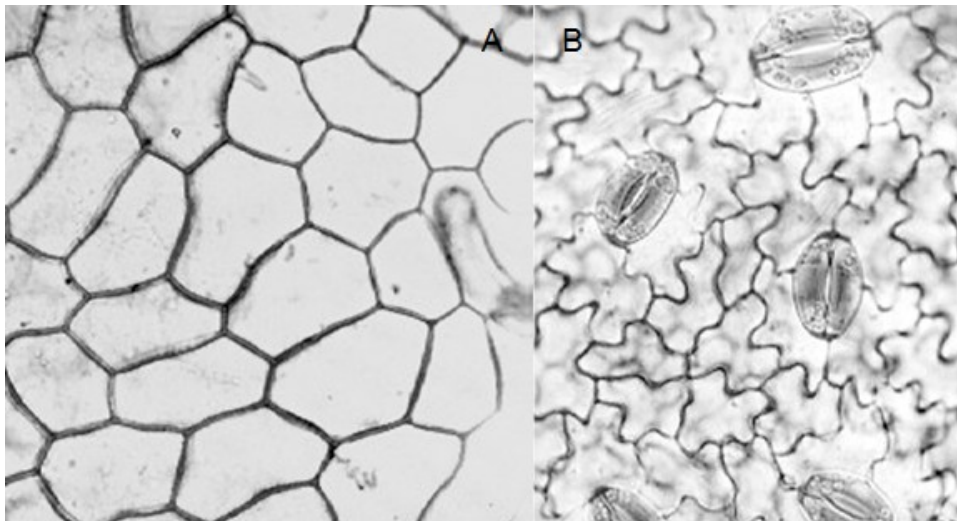
**Fonte:** Os Autores (2012).

**Figura 3:** Fotografia da morfologia externa foliar de *Vernonia condensata*.



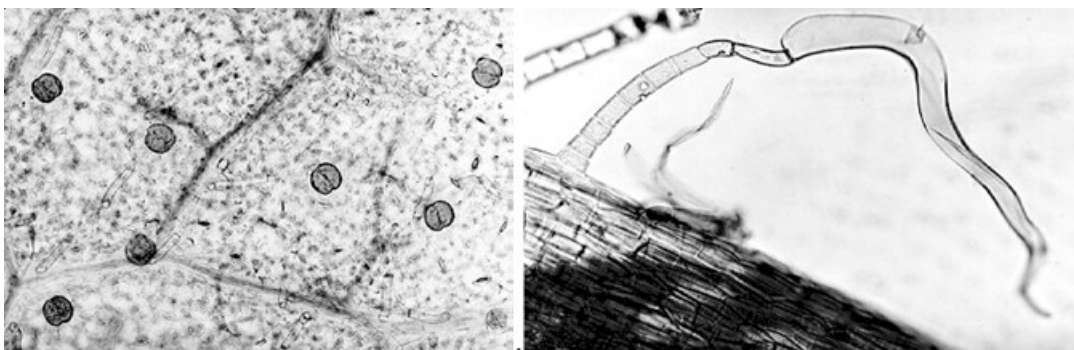
Fonte: Os Autores (2012).

**Figura 4:** Corte histológico representativo da epiderme adaxial (A) e abaxial (B) da folha de *Vernonia condensata*.



Fonte: LOLIS; MILANEZE-GUTIERRE (2003).

**Figura 5:** Corte histológico de tricomas presentes em *Vernonia condensata*.

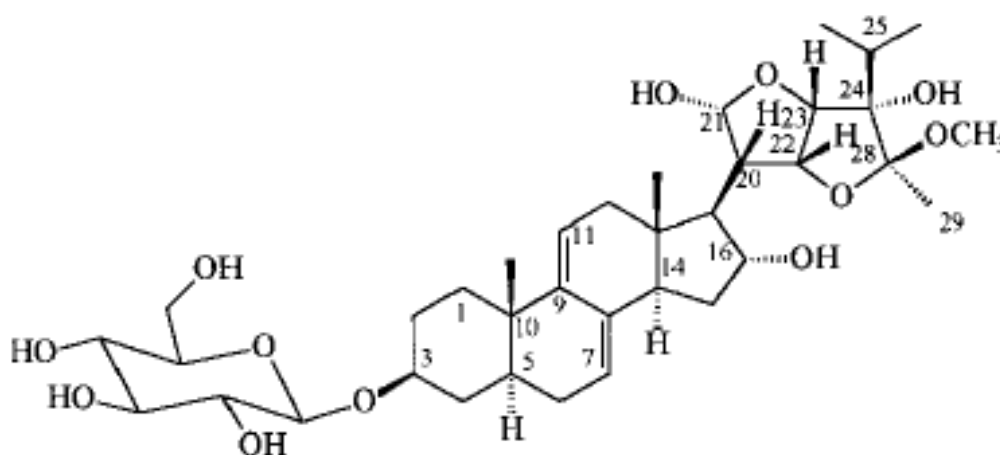


Fonte: LOLIS; MILANEZE-GUTIERRE (2003).

No Brasil, o figatil é uma das espécies de *Vernonia* mais utilizadas na medicina tradicional (MONTEIRO et al., 2001). Suas folhas são empregadas no preparo de infusões e sumos, sendo usados como analgésicos e colagogos, no tratamento de cefaleias de origem digestiva e mal estar hepático, atuando também como protetora da mucosa gastrointestinal (VICENTE; ALMEIDA; CARVALHO, 2009).

Quanto aos aspectos químicos e farmacológicos, estudos comprovaram que o extrato polar das folhas de *V. condensata* apresentou atividades analgésica e anti-inflamatória (FRUTUOSO et al., 1994; RISSO; SCARMINIO; MOREIRA, 2010). Investigações fitoquímicas descreveram o isolamento do glicosídeo esteroide, vernoniosídeo B2, presente nas folhas desta espécie (Figura 6) (VALVERDE et al., 2001).

**Figura 6:** Estrutura química do vernoniosídeo B2.



**Fonte:** VALVERDE et al. (2001).

Bouzada e outros (2009), ao analisarem o perfil fitoquímico do extrato metanólico da referida planta, demonstraram a presença de alcaloides, terpenos, esteroides, taninos e cumarinas.

## 2.5- SUBSTÂNCIAS FENÓLICAS

Substâncias fenólicas são metabólitos secundários presentes em todas as espécies vegetais (MICHALAK, 2006; OZYIGIT, 2008; SIMÕES et al., 2007; SOARES, 2002). Estes constituintes compreendem uma classe com uma grande diversidade de estruturas simples e complexas, caracterizados por no mínimo um

anel benzênico (aromático) e um ou mais grupos hidroxila (SIMÕES et al., 2007). Os fenóis mais encontrados em plantas são mostrados na Tabela 1.

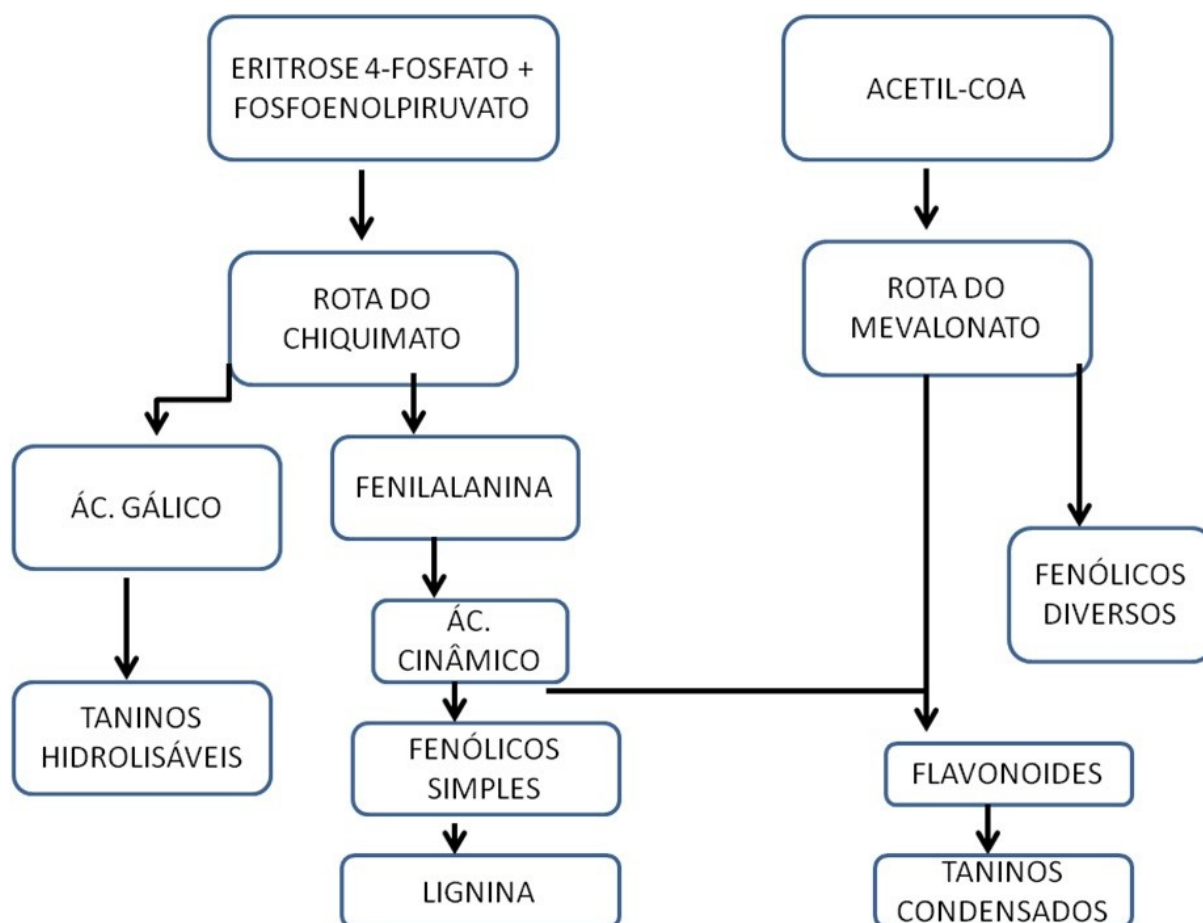
**Tabela 1:** Classificação das substâncias fenólicas.

Nº de Carbono (C)	Esqueleto Básico	Classe
6	C <sub>6</sub>	Fenóis simples, benzoquinonas
7	C <sub>6</sub> -C <sub>1</sub>	Ácidos fenólicos
8	C <sub>6</sub> -C <sub>2</sub>	Acetofenona, ácido fenilacético
9	C <sub>6</sub> -C <sub>3</sub>	Ácido hidroxicinâmico, polipropeno, cumarina, isocumarina
10	C <sub>6</sub> -C <sub>4</sub>	Naftoquinona
13	C <sub>2</sub> -C <sub>1</sub> -C <sub>6</sub>	Xantona
14	C <sub>6</sub> -C <sub>2</sub> -C <sub>6</sub>	Estilbeno, antraquinona
15	C <sub>6</sub> -C <sub>3</sub> -C <sub>6</sub>	Flavonoides, isoflavonoides
18	(C <sub>6</sub> -C <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	Lignanas, neolignanas
30	(C <sub>6</sub> -C <sub>3</sub> -C <sub>6</sub> ) <sub>2</sub>	Biflavonoides
	(C <sub>6</sub> -C <sub>3</sub> ) <sub>n</sub> (C <sub>6</sub> ) <sub>n</sub>	Lignanas
N	(C <sub>6</sub> -C <sub>3</sub> -C <sub>6</sub> ) <sub>n</sub>	Catecolmelaninas (taninos condensados)

**Fonte:** OZYIGIT (2008).

As substâncias fenólicas são biossintetizadas por meio de diferentes rotas metabólicas, resultando em um grupo bastante heterogêneo. As duas rotas metabólicas básicas que dão origem à maioria das substâncias fenólicas são as dos ácidos chiquímico e mevalônico (SIMÕES et al., 2007) (Figura 7).

**Figura 7:** Esquema representativo da biossíntese simplificada dos constituintes fenólicos.



**Fonte:** Os Autores (2012).

A origem biogenética determina o padrão de substituição da substância fenólica resultante. Desta maneira, pela via do ácido chiquímico obtêm-se substâncias com grupos hidroxila em posição *orto*, que se formam a partir do ácido cinâmico, e pela via do acetato-polimalato originam-se substâncias com grupos hidroxila dispostos em *meta* (MICHALAK, 2006; SIMÕES et al., 2007).

É importante ressaltar que uma característica da biogênese de derivados fenólicos é a capacidade que os vegetais têm de produzir uma mesma substância a partir de diferentes intermediários, isto é, apresentam rotas biogenéticas alternativas. Além disto, podem ocorrer acoplamentos oxidativos por ligações C-C e C-O intramoleculares com formação de anéis e intermoleculares com formação de polímeros. Desta forma, os compostos fenólicos constituem um grupo de metabólitos secundários com a maior diversidade em número de substâncias (MICHALAK, 2006; SIMÕES et al., 2007).

A extração das substâncias fenólicas de plantas é influenciada por sua natureza química, pelo método de extração, pelo tamanho das partículas na amostra, tempo e condições de armazenamento, além da presença de substâncias interferentes (ANDREO; JORGE, 2006; SIMÕES et al., 2007). A solubilidade e outras propriedades físico-químicas também são influenciadas pela posição de moléculas de açúcar ligadas à estrutura química (FURLONG et al., 2003).

A presença destes compostos em plantas tem sido muito estudada devido às atividades farmacológicas e antinutricionais apresentadas e também por inibirem a oxidação lipídica e a proliferação de fungos, além de participarem de processos responsáveis pela cor, adstringência e aroma em vários alimentos (ANDREO; JORGE, 2006; SOARES, 2002; SOUSA et al., 2007). A atividade antioxidante de substâncias fenólicas deve-se principalmente às suas estruturas químicas que conferem propriedades redutoras. Estas características desempenham um papel importante na neutralização ou sequestro de radicais livres e quelação de metais de transição, agindo tanto na etapa de iniciação como na propagação do processo oxidativo. Os intermediários formados pela ação de antioxidantes fenólicos são relativamente estáveis, devido à ressonância observada no anel aromático presente na estrutura (ANDREO; JORGE, 2006; SOUSA et al., 2007).

Outras atividades biológicas também são atribuídas às substâncias fenólicas como propriedades anti-histamínica, anti-inflamatória, antibacteriana, antiviral e a capacidade de redução de lipoproteínas de baixa densidade. Efeitos cardiovasculares como vasodilatação pelo aumento da síntese de ácido nítrico endotelial também têm sido relatados na literatura. Além disso, fenóis são relacionados à prevenção de doenças neurodegenerativas e câncer (PERRON; BRUMAGHIM, 2009; VINSON et al., 2001).

## **2.6- FLAVONOIDES**

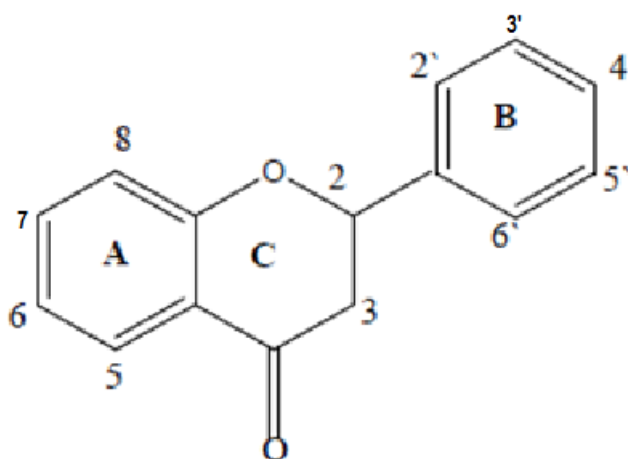
Os flavonoides representam um dos grupos fenólicos mais importantes e diversificados entre os produtos de origem natural e são amplamente distribuídos no reino vegetal. Atualmente, são conhecidos mais de 4200 flavonoides diferentes, sendo que o número de novas estruturas identificadas praticamente dobrou nos últimos vinte anos (SIMÕES et al., 2007).

A palavra flavonoides deriva do latim *flavus* que significa amarelo, justificada pela relação que esses compostos têm com a coloração de flores, sementes e frutos

(WINKEL-SHIRLEY, 2001). Os flavonoides possuem diversas funções, destacando-se a propriedade de proteção dos vegetais contra incidência de raios ultravioleta e visível e contra insetos, fungos e vírus, a habilidade de atração de polinizadores, a capacidade antioxidante, o controle da ação de hormônios vegetais, a atuação como agentes alelopáticos, e a ação como inibidores enzimáticos (DORNAS et al., 2007; SIMÕES et al., 2007).

A estrutura básica dos flavonoides consiste em um núcleo fundamental, constituído de quinze átomos de carbono arranjados em três anéis, sendo dois fenólicos substituídos (A e B) e um pirano (cadeia heterocíclica C) acoplado ao anel A (Figura 8) (ARAÚJO et al., 2005; DORNAS et al., 2007).

**Figura 8:** Estrutura básica dos flavonoides.



**Fonte:** Adaptado de DORNAS et al. (2007).

Os flavonoides são sintetizados a partir da via mista proveniente do acetil-CoA e ácido chiquímico (WINKEL-SHIRLEY, 2002). Dessa forma, de acordo com o substituinte no núcleo principal, estes metabólitos podem ser classificados em flavonas, flavonóis, chalconas, auronas, flavanonas, flavanas, antocianidinas, leucoantocianidinas, proantocianidinas, isoflavonas e neoflavonoides (DORNAS et al., 2007; SIMÕES et al., 2007).

Estudos confirmam a importância dos flavonoides para a saúde humana na prevenção e no tratamento de doenças (ARAÚJO et al., 2005; GONZÁLEZ-GALLEGO; SÁNCHEZ-CAMPOS; TUÑÓN, 2007). A propriedade fundamental destas moléculas, responsável pela maioria dos seus efeitos benéficos, é a antioxidante.



Entre os diversos efeitos farmacológicos dos flavonoides descritos na literatura podem ser citados os seguintes:

- Proteção vascular contra a deposição de lipoproteína de baixa densidade (LDL) oxidada nas paredes dos vasos e que formam ateromas que podem ocasionar infarto do miocárdio (ARAÚJO et al., 2005; DORNAS et al., 2007);
- Inibição da agregação plaquetária que pode levar a trombose, proteção cerebral contra o estresse oxidativo, relacionado com doenças cerebrovasculares como isquemia e doenças neuro-degenerativas (ARAÚJO et al., 2005);
- Proteção das células pancreáticas produtoras de insulina e glucagon, sensíveis aos agentes oxidantes (DORNAS et al., 2007);
- Proteção das células renais do estresse oxidativo (DORNAS et al., 2007);
- Proteção anticarcinogênica (ARAÚJO et al., 2005; DORNAS et al., 2007);
- Ação antiúlcera gástrica e duodenal (DONATINI et al., 2009; GONZÁLEZ-GALLEGO; SÁNCHEZ-CAMPOS; TUÑÓN, 2007);
- Ações antialérgica e antiviral (GONZÁLEZ-GALLEGO; SÁNCHEZ-CAMPOS; TUÑÓN, 2007);
- Ação anti-inflamatória por inibir enzimas envolvidas no processo inflamatório (GONZÁLEZ-GALLEGO; SÁNCHEZ-CAMPOS; TUÑÓN, 2007);
- Ação anti-helmíntica (SILVA et al., 2008).

## **2.7- RADICAIS LIVRES E SUBSTÂNCIAS ANTIOXIDANTES**

Em 1956, Harman propôs o conceito de radicais livres atuando no processo de envelhecimento. A expressão "Radical Livre" possui diferentes definições, entre elas aquela na qual os radicais livres são descritos como "espécies com um ou mais elétrons desemparelhados" (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1989). Esta definição engloba o átomo de hidrogênio (com um elétron desemparelhado), a maioria dos íons de metais de transição, e o oxigênio molecular. A definição de Espécie Reativa de Oxigênio (ERO) abrange espécies de radicais livres (EROs) e outras que, embora não possuam elétrons desemparelhados, são muito reativas em decorrência de sua instabilidade. Por esse motivo, este termo tem sido empregado com maior frequência (RIBEIRO et al., 2005).

As formas químicas pertencentes as EROs incluem os radicais livres de oxigênio, como o radical superóxido ( $O^{2-}$ ), radical hidroxil (OH.), óxido nítrico (NO), peroxinitrito, e também espécies não radicalares, como o peróxido de hidrogênio

( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) e o oxigênio singlete ( $^1\text{O}_2$ ). Todas as formas de vida aeróbica estão constantemente sujeitas ao efeito oxidante dos metabólitos reativos de oxigênio, uma vez que essas espécies são produzidas nas diversas vias metabólicas aeróbicas (MATA et al., 2007).

Em geral, 95 a 98% do oxigênio absorvido pelos organismos aeróbicos são reduzidos, formando água na cadeia respiratória por meio do transporte de elétrons na mitocôndria e no retículo endoplasmático. No sistema enzimático citocromo, no processo de fosforilação oxidativa, procede à redução tetravalente do  $\text{O}_2$  pelo sistema citocromooxidase, fornecendo simultaneamente quatro elétrons para o oxigênio, que se reduz diretamente à água. As fontes que cedem os cátions de hidrogênio e os elétrons para a reação são, basicamente, o NADH, o FADH e a ubiquinona ou coenzima Q. Todavia, de 2 a 5% do  $\text{O}_2$  é reduzido univalentemente, processo em que uma molécula recebe apenas um elétron, o qual vai ocupar um dos orbitais externos, ao mesmo tempo em que o outro continua não parelhado, produzindo intermediários altamente reativos, e por isso, tóxicos e destrutivos (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1989).

Os radicais livres formados por elétrons livres ou não pareados têm uma instabilidade elétrica muito grande e, por essa razão, mesmo tendo meia-vida muito curta, apresentam grande capacidade reativa e podem captar um elétron ou qualquer substância próxima para sua estabilização, independente da mesma ser uma molécula, uma célula, ou tecido do organismo; a partir desta etapa, acontecem reações em cadeia que levam à lesão celular. Devido a esse comportamento, são denominados de substâncias oxidantes, podendo oxidar ácidos nucleicos, proteínas e lipídios, e iniciar doenças degenerativas ((HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1989; MATA et al., 2007).

O oxigênio tem atividade fundamental no metabolismo celular aeróbico no processo de respiração celular, a fim de gerar o ATP. Desta forma, a formação de radicais livres pelo organismo em condições normais torna-se inevitável. As EROs, produzidas pelos macrófagos e neutrófilos, também são usadas contra bactérias e fungos invasores do organismo, produzindo ação lesiva sobre os mesmos (RIBEIRO et al., 2005).

No organismo saudável, as células possuem um equilíbrio entre a produção dos compostos altamente reativos e os diversos sistemas de defesa, sejam enzimáticos ou não. Quando esse equilíbrio deixa de existir, ocorrem danos

oxidativos devido ao acúmulo de radicais livres, definido como estresse oxidativo e, como consequência, surgem doenças tais como as apresentadas na Tabela 2.

**Tabela 2:** Doenças relacionadas ao estresse oxidativo.

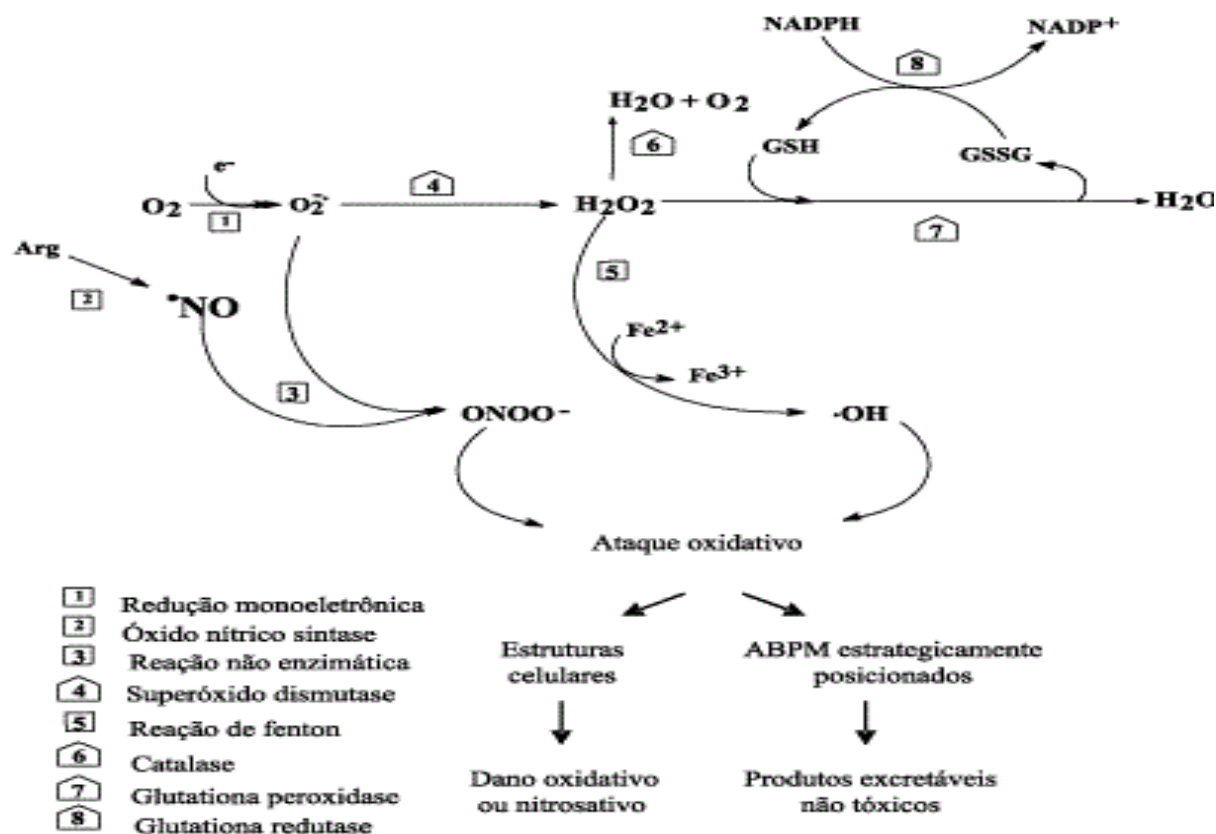
Doença	Natureza de envolvimento com EROs*
Aterosclerose, síndrome de Bloom, Kwashiorkor, doença de Keshan	Falha ou consumo excessivo de defesas antioxidantes
Doença de Parkinson, estados tóxicos causados por álcool, fumo, doença de Alzheimer, asma, artrite reumatoide, asbestose, Síndrome de Insuficiência Respiratória do Adulto, esclerose múltipla	Uso de drogas e toxinas; na doença de Parkinson as toxinas produzidas estariam envolvidas com a produção de radicais livres; produção de $O_2^-$ , $H_2O_2$ e HClO por células fagocíticas ativadas
Diabetes <i>mellitus</i> , anoxia, injúria da reperfusão, pré-eclâmpsia	Oxidação anormal de substratos ou mudanças na concentração de oxigênio
Doença granulomatosa crônica, deficiência de enzimas antioxidantes (acatalasemia)	Defeito genético no sistema antioxidante, especificamente o sistema NADPH oxidase

\*EROs = Espécies Reativas de Oxigênio.

**Fonte:** VASCONCELOS et al., 2007.

Os mecanismos enzimáticos de ação antioxidante incluem a atividade das enzimas superóxido dismutase, glutathione redutase, glutathione peroxidase e catalase (Figura 9). Por meio desta maquinaria, o organismo mantém a concentração de EROs dentro de limites fisiológicos e através do Sistema Tiorredoxina regula o nível de alvos moleculares oxidados (RIBEIRO et al., 2005).

**Figura 9:** Mecanismos de ataque de EROs, partindo da redução monoelétrica do O<sub>2</sub> e os sistemas de defesa antioxidante. (O símbolo □ refere-se a mecanismos de produção de EROs e o símbolo ◡, às principais enzimas da defesa antioxidante).



**Fonte:** GANDRA et al. (2004).

Os antioxidantes são substâncias que, quando presentes em concentrações mais baixas que o substrato oxidável, retardam ou inibem significativamente sua oxidação (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1989). Os antioxidantes não enzimáticos podem agir no organismo por três mecanismos distintos, a saber: 1) supressão da formação de radical livre (quelação de metais ou inibição de enzimas geradoras de radicais livres); 2) eliminação de radicais livres ou desativação pela formação de um produto estável; e 3) participação em processo de reparo. Algumas destas moléculas são endógenas, outras exógenas, sintéticas ou naturais. Os antioxidantes exógenos provenientes da dieta, como tocoferol, ácido ascórbico, carotenoides e substâncias fenólicas encontradas em alimentos de origem animal ou vegetal, constituem o principal mecanismo antioxidante não enzimático do organismo.

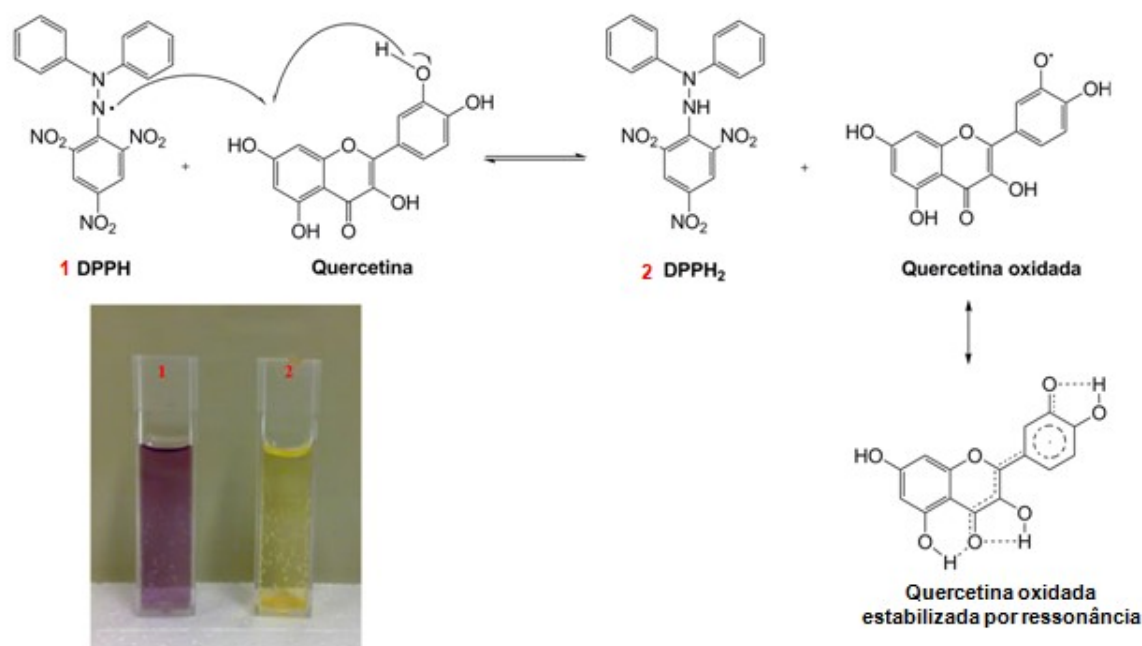
Dentre as diversas classes de substâncias antioxidantes de ocorrência natural, os mais ativos e frequentemente encontrados são as substâncias fenólicas,

como os flavonoides. As propriedades benéficas dessas substâncias podem ser atribuídas à capacidade de sequestrar radicais livres. Os constituintes fenólicos podem inibir os processos da oxidação em certos sistemas, mas isso não significa que eles possam proteger as células e os tecidos de todos os tipos de danos oxidativos. Além disso, estes constituintes podem apresentar atividade pró-oxidante em determinadas condições (BIANCHI; ANTUNES, 1999).

Conforme relatado por Sousa e outros (2007), estudos têm demonstrado a possibilidade de efeitos tóxicos dos antioxidantes tradicionais da indústria alimentícia (butil-hidroxi-anisol, butil-hidroxi-tolueno e galato de propila). Neste sentido, pesquisas com produtos naturais com atividade antioxidante têm sido realizadas para substituir as substâncias sintéticas disponíveis ou para propor uma associação entre eles (SOUSA et al., 2007).

Um dos métodos mais utilizados para se determinar a atividade antioxidante consiste em avaliar a atividade sequestrante do radical livre 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH). Esta substância passa da coloração púrpura para amarela (cor da forma reduzida difenil-picril-hidrazina) por ação de um antioxidante ou espécie radicalar, conforme observado na Figura 10, resultando em decréscimo da absorvância (SOUSA et al., 2007).

**Figura 10:** Reação do 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH) com o flavonoide quercetina.



**Fonte:** TEIXEIRA; SILVA (2011).

Considerando a reação demonstrada na Figura 10, a quantidade de DPPH consumida pelo antioxidante corresponde à percentagem de atividade antioxidante (%AA) e denomina-se Concentração Efetiva ( $CE_{50}$ ) ou Concentração Inibitória ( $CI_{50}$ ), correspondendo à quantidade de antioxidante necessária para decrescer a concentração inicial de DPPH em 50%. Logo, quanto menor a  $CE_{50}$  de um extrato maior a sua atividade antioxidante (MENSOR et al., 2001).

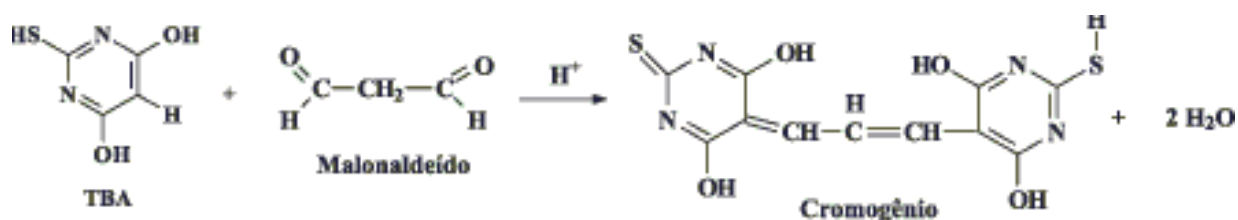
Existem, ainda, os métodos baseados na redução do  $Fe^{+3}$ , que determinam o poder redutor e são amplamente utilizados para avaliação da atividade antioxidante. Esses testes avaliam a capacidade de compostos fenólicos reduzirem o  $Fe^{+3}$ , com conseqüente formação de um complexo colorido decorrente da presença de  $Fe^{+2}$  (ROGINSKY; LISSI, 2005). É um método de baixo custo, simples e rápido, onde os reagentes são de fácil preparo e os resultados altamente reprodutíveis (BENZIE; STRAIN, 1996). Porém, a medida da capacidade de redução não reflete necessariamente a capacidade antioxidante (FRANKEL; MEYER, 2000). Nem todo redutor que tem habilidade em reduzir o ferro é antioxidante e nem todo antioxidante é capaz de reduzir o ferro (por exemplo, glutathione) (PRIOR, 2003). Além disso, este método não inclui nenhum substrato oxidável não fornecendo, portanto, informações sobre as propriedades protetoras dos antioxidantes (FRANKEL; MEYER, 2000).

Entre as diversas atividades exibidas pelas substâncias antioxidantes, uma das de maior interesse é a inibição da peroxidação lipídica. Os lipídios são abundantes nas células e susceptíveis à oxidação por possuírem grupos metilênicos entre duplas ligações. Os ácidos graxos poli-insaturados são alvos importantes para os oxidantes. Como a oxidação desencadeia uma cascata autocatalítica que gera numerosas substâncias oxidantes e genotóxicas, esses danos aos lipídios têm grandes implicações para a integridade do DNA, das proteínas e de outros lipídios (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1999; LOUREIRO; Di MASCIO; MEDEIROS, 2002).

A peroxidação lipídica inicia-se pelo ataque à bicamada lipídica de qualquer espécie suficientemente reativa para retirar um átomo de hidrogênio bis-aliílico de um ácido graxo poli-insaturado. Após ser iniciado, o processo torna-se autocatalítico e somente termina quando se esgotarem as reservas de ácidos graxos insaturados e oxigênio (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1999). Os principais produtos finais da lipoxidação compreendem álcoois, aldeídos, cetonas, ésteres e outros hidrocarbonetos derivados da decomposição de hidroperóxidos (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1999; LOUREIRO; Di MASCIO; MEDEIROS, 2002). Atualmente, é

possível encontrar diversos métodos para avaliar a peroxidação lipídica, sendo a determinação de espécies reativas com o ácido tiobarbitúrico (TBA) uma dessas ferramentas analíticas. O ensaio quantifica a formação de um dos produtos finais da peroxidação lipídica, o malonaldeído (MDA), que pode ser potencialmente tóxico para outras macromoléculas celulares (ROGINSKY; LISSI, 2005; SILVA; BORGES; FERREIRA, 1999).

**Figura 11:** Reação do ácido tiobarbitúrico com malonaldeído formando complexo cromogênico.



**Fonte:** OSAWA; FELÍCIO; GONÇALVES (2005).

Em comparação com os métodos do DPPH e do poder de redução do ferro, o método de TBA está mais próximo das condições biológicas, pois utiliza um substrato oxidável existente biologicamente (ácidos graxos). É um método simples e sensível, porém o teste não é específico para o MDA visto que outras substâncias também reagem com esse composto como, por exemplo, alcanos, alcenos, alcadienos e aldeídos (KAPPUS, 1985). Metais de transição e açúcares (glicose e sacarose) também interferem nesta reação (ESTERBAUER et al., 1984).

## 2.8- ANTIMICROBIANOS E O EVENTO DE RESISTÊNCIA

Os antimicrobianos são fármacos que têm a capacidade de inibir o crescimento de micro-organismos ou mesmo eliminá-los, sendo indicados, portanto, para o tratamento de infecções microbianas sensíveis aos mesmos. Ao se usar uma droga antimicrobiana, outro conceito importante que surge é o espectro de ação, isto é, o percentual de micro-organismos sensíveis àquele fármaco (GUIMARÃES; MOMESSO; PUPO, 2010; TAVARES, 2001).

Apesar da grande diversidade de antimicrobianos que agem sobre os diferentes micro-organismos patogênicos, estudos buscam um antimicrobiano ideal, ou seja, aquele que apresenta maior espectro de ação, menor toxicidade, menor custo e menor índice de resistência bacteriana (NASCIMENTO et al., 2000).

Considerando esses aspectos, estes fármacos podem ser classificados de várias maneiras, considerando seu espectro de ação, o tipo de atividade antimicrobiana, o grupo químico ao qual pertencem e o mecanismo de ação exibido (TAVARES, 2001).

Desde a descoberta das penicilinas naturais, a indústria farmacêutica avançou em suas pesquisas e conduziu ao surgimento de diversos antimicrobianos com espectro de ação cada vez mais amplo. Entretanto, a exposição a essas substâncias desencadeou a resistência bacteriana, limitando as opções terapêuticas dos processos infecciosos (CUNICO, 2004).

A resistência aos antimicrobianos trata-se, muitas vezes, de um fenômeno ecológico como uma resposta da bactéria frente ao uso indiscriminado de antibióticos ou a presença dessas substâncias no meio ambiente. A questão da resistência microbiana é um problema crescente e a perspectiva futura do uso de drogas antimicrobianas, incerta. Assim, faz-se necessário adotar posturas e medidas para enfrentar o problema, controle no uso de antibióticos, desenvolvimento de pesquisas que visem elucidar os mecanismos genéticos da resistência microbiana e, ainda, estudos que busquem novas drogas, sintéticas e naturais (DEMAIN, 2001; FREI; BURGESS, 2005; LEVY et al., 2001; NASCIMENTO et al., 2000).

Como as bactérias se multiplicam rapidamente, podem sofrer mutação através da troca de material genético entre linhagens de mesma espécie ou de espécies diferentes. Esses micro-organismos possuem alta capacidade de adaptação a diversos fatores, como a exposição a agentes químicos potentes (DEMAIN, 2001; FERNANDES, 2006; FREI; BURGESS, 2005; LEVY et al., 2001).

No século XX, a resistência bacteriana era predominante nos ambientes hospitalares. Contudo, atualmente ocorre em vários ambientes e pode comprometer indivíduos saudáveis (FREI; BURGESS, 2005). O uso extensivo e inapropriado dos antibióticos, as más condições de higiene, o fluxo contínuo de viajantes, o aumento de pacientes imunocomprometidos e a demora no diagnóstico das infecções bacterianas propiciam o aumento da resistência (GUIMARÃES; MOMESSO; PUPO, 2010). No entanto, durante o tratamento de uma infecção não se pode prever qual micro-organismo desenvolverá a resistência. Por exemplo, observou-se resistência de *Enterococcus* frente à vancomicina que é inicialmente utilizada para o tratamento de infecções por *Staphylococcus aureus* resistente à metilina (HIRAMATSU et al., 1997).



### 2.8.1- Plantas como fontes de agentes antimicrobianos

A busca por novos agentes antibióticos tem crescido nos últimos anos por diversas razões, entre elas destacam-se as doenças infecciosas como a segunda maior causa de mortalidade do mundo; altas taxas de resistência microbiana, especialmente em ambientes hospitalares; o decréscimo constante observado no número total de novos agentes antimicrobianos aprovados pelas agências reguladoras; e a necessidade de agentes que atuem por mecanismos de ação diferentes aos fármacos em uso (COATES; HU, 2007; PAYNE et al., 2007).

Estudos etnofarmacológicos têm permitido a verificação do uso popular de plantas com a finalidade de obtenção dos mais variados efeitos medicamentosos, incluindo sua aplicação como antimicrobianos (CASTRO et al., 2000; KUMAR; BERWAL, 1998; POZETTI et al., 1972). A atividade antimicrobiana desejada pode ser encontrada em várias espécies de plantas medicinais. A flora brasileira apresenta-se altamente diversificada em espécies que, na sua maioria, ainda não foi pesquisada quanto às suas ações biológicas (AURICCHIO; BACCHI, 2003; SIMÕES et al., 2007).

O uso de extratos vegetais com atividade antimicrobiana pode delinear caminhos significativos nos tratamentos terapêuticos. Vários países desenvolvem inúmeros estudos para desenvolver fórmulas a partir de plantas empregadas pela medicina tradicional para fins antimicrobianos (LOGUERCIO et al., 2005). As plantas sintetizam diversas substâncias em seu metabolismo secundário com atividade antimicrobiana. Estes produtos são reconhecidos por suas substâncias ativas, como por exemplo, os fenólicos e os óleos essenciais (NASCIMENTO et al., 2000).

Os princípios ativos naturais geralmente apresentam estruturas químicas complexas importantes para as interações específicas e reconhecimento por alvos macromoleculares em bactérias patogênicas. Assim, nas últimas décadas, pesquisadores de todo o mundo têm conduzido estudos com base em fontes naturais, frequentemente associadas à diversidade química. Um grande número de organismos tem sido explorado nos mais diversos *habitats*, especialmente em locais de condições ambientais extremas (ambientes que possuem alterações drásticas de temperatura, pH, umidade e/ou luminosidade) (WALSH, 2003).

Os antimicrobianos isolados de plantas, na maioria das vezes, possuem diferenças estruturais em relação aos antibióticos derivados de micro-organismos, o

que permite que atuem como reguladores do metabolismo intermediário, ativando ou bloqueando reações enzimáticas, afetando diretamente a síntese enzimática, ou mesmo alterando estruturas de membranas (SINGH; SHUKLA, 1984). As principais classes de metabólitos secundários com propriedades antimicrobianas encontrados nas plantas estão descritas na Tabela 3.

**Tabela 3:** Principais classes de agentes antimicrobianos das plantas.

Classe	Subclasse	Exemplo	Mecanismo	
Compostos Fenólicos	Fenóis Simples	Catecol	Privação de substrato	
		Epicatequina	Ruptura da membrana	
	Ácidos Fenólicos	Ácido Cinâmico	Ruptura da membrana	
	Quinonas	Hipericina	Ligação a adesinas, complexação com a parede celular e inativação de enzimas	
	Flavonoides	Crisina	Ligação a adesinas Complexação com a parede celular	
	Flavonas	Abissinona	Inativação enzimática Inibição transcriptase reversa do HIV	
	Flavonois	Totarol	Desconhecido Ligação a proteínas Ligação a adesinas Inibição enzimática	
	Taninos	Elagitanino	Privação de substrato Complexação com parede celular Ruptura da membrana Complexação com íons metálicos	
		Cumarinas	Warfarina	Interação com DNA eucariótico (atividade antiviral)
	Terpenoides, óleos essenciais		Capsaicina	Ruptura de membrana
Alcaloides		Berberina	Intercalação na parede celular e/ou DNA	
		Piperina	Intercalação na parede celular e/ou DNA	
Lectinas e polipeptídeos		Manose-aglutinina específica	Bloqueio da fusão viral ou adsorção	
		Fabatina	Formação de pontes dissulfeto	
Poliacetilenos		8S-Heptadeca-2(Z),9(Z)-diene-4,6-diino-1,8-diol	Desconhecido	

**Fonte:** Adaptado de COWAN (1999).

## 2.8.2- Métodos para investigação da atividade antimicrobiana

Diferentes métodos podem ser empregados para verificar a atividade *in vitro* de micro-organismos frente aos agentes antimicrobianos com base em princípios diferentes. Desta forma, os resultados obtidos podem ser profundamente influenciados não só pelo método escolhido, mas também pelos micro-organismos utilizados na realização do teste e pelo grau de solubilidade das substâncias no meio (VANDEN BERGHE; VLIETINCK, 1991).

Os principais métodos microbiológicos para detecção de atividade antimicrobiana encontrados na literatura, tanto para detecção da atividade de bactérias como fungos, podem ser classificados em três tipos: ensaios bioautográficos, de difusão e de diluição (RIOS; RECIO; VILLAR, 1988).

Os ensaios bioautográficos compreendem métodos que empregam placas de cromatografia de camada delgada (CCD) para a análise. As substâncias são separadas por CCD e, em seguida, são colocadas em contato com placas de ágar previamente inoculadas com o micro-organismo teste. As regiões de inibição de crescimento microbiano observadas na cromatoplaça indicam a presença de substâncias com atividade antimicrobiana (RIOS; RECIO; VILLAR, 1988). Os métodos bioautográficos possuem importância particular na pesquisa de constituintes vegetais, pois permitem a localização direta dos constituintes ativos a partir de uma matriz complexa sendo, portanto, um método qualitativo (SILVEIRA et al., 2009).

Os ensaios de diluição são métodos em que as substâncias a serem testadas são adicionadas a um meio de cultura líquido previamente inoculado com o micro-organismo teste. Após incubação, o crescimento do micro-organismo é determinado pela leitura visual direta ou por turbidimetria (SILVEIRA et al., 2009).

O método de difusão, por sua vez, é aquele em que o efeito pode ser graduado e que depende da difusão da substância em teste em um meio de cultura sólido inoculado com o micro-organismo. A partir da difusão ocorre o surgimento de um halo de inibição, local onde não há crescimento do micro-organismo. Podem-se utilizar diferentes tipos de reservatórios tais como discos de papel, cilindros de porcelana ou de aço inoxidável e poços preparados no meio de cultura (SILVEIRA et al., 2009).

### 2.8.3- Aspectos gerais sobre alguns micro-organismos de relevância

Considerando-se os diversos grupos microbianos, representantes Gram-negativos altamente resistentes – espécies de *Acinetobacter*, *Pseudomonas* resistentes a múltiplas drogas (RMD) e, entre amostras de enterobactérias, espécies de *Klebsiella* e *Escherichia* resistentes aos carbapenêmicos – surgem como patógenos emergentes importantes, tanto nos Estados Unidos quanto em diversas outras partes do mundo. As opções terapêuticas para esses patógenos tornam-se extremamente limitadas, o que leva ao uso de drogas alternativas antigas, como a colistina, que foram associadas à significativa toxicidade e para as quais não existem evidências para orientar a seleção do esquema terapêutico (BOUCHER et al., 2009; FALAGAS; BLIZIOTIS, 2007).

Nos Estados Unidos, as bactérias Gram-positivas representam 60% das infecções nosocomiais, de acordo com o relatório da Fiscalização de Controle de Patógenos, sendo mais preocupantes aqueles casos de infecções hospitalares causadas por micro-organismos multirresistentes. De acordo com o Sistema Nacional de Vigilância de Infecções Hospitalares (NNIS) norte-americano, 59,5% das linhagens de *Staphylococcus aureus* isolados em Unidades de Tratamento Intensivo (UTI) foram resistentes à meticilina e 28,5% de enterococos resistentes à vancomicina (MOELLERING et al., 2007).

*Escherichia coli* é um bacilo Gram-negativo que pode se organizar isoladamente (preferencialmente), aos pares e em cadeias curtas, anaeróbio facultativo, imóvel ou móvel por meio de flagelos peritríquios, fermentador de glicose, redutor de nitrato a nitrito, citocromooxidase negativo, sendo comumente encontrado no intestino de humanos e animais de sangue quente (MADAPPA, 2011; WINN Jr. et al., 2006).

*Staphylococcus aureus* é um coco Gram-positivo que se agrupa em grumos, anaeróbio facultativo, mesófilo, catalase-positiva, capaz de crescer em elevadas concentrações de cloreto de sódio (até 15%). *S. aureus* deve ser sempre considerado como um potencial patógeno, especialmente em ambiente hospitalar, sendo um dos maiores responsáveis por infecções associadas aos cuidados à saúde. O perfil de resistência a antibióticos desta bactéria tem aumentado enormemente, mesmo em relação às drogas eficientes e de amplo espectro como a

metecilina (PRATTES; BLOCH-JUNIOR, 2001; TODAR, 2011; WINN JR. et al., 2006).

*Pseudomonas aeruginosa* é um bacilo Gram-negativo não-fermentador, aeróbio, oxidase negativa, motilidade positiva, e causador de infecções localizadas geralmente em decorrência de contaminação oportunista (WINN JR. et al., 2006).

*Salmonella typhimurium* é um bacilo Gram-negativo, que pode se organizar isoladamente (preferencialmente), aos pares e em cadeias curtas, anaeróbio facultativo, fermentador de glicose, redutor de nitrato a nitrito, citocromooxidase negativo, pertencente à família Enterobacteriaceae, sendo responsável pela infecção do intestino delgado conhecida como Salmonelose (OSKAY; SARI, 2007; WINN JR. et al., 2006 ).

## **2.9- DOR E INFLAMAÇÃO**

A dor é uma experiência sensorial, frequentemente não relacionada com a natureza ou intensidade da lesão tecidual. A sensação dolorosa apresenta um componente subjetivo que envolve aspectos emocionais, sociais, culturais, ambientais e cognitivos, além da percepção do estímulo nocivo propriamente dito (OLIVEIRA et al., 1997; RANG; DALE; RITTER, 1997). Logo, uma definição de dor bastante adequada aos estudos realizados é a proposta pela *International Association for the Study of Pain (IASP)*, segundo a qual a dor é uma experiência emocional, com sensação desagradável, associada à lesão tecidual presente, potencial ou descrita como tal (MERSKEY, 1994).

Existem vários tipos de dor e, para uma melhor compreensão, dividem-se as sensações dolorosas em nocicepção (estimulação das terminações dolorosas periféricas), percepção dolorosa (percepção consciente da nocicepção), sofrimento (sensações negativas associadas à dor), e comportamento doloroso (todas as modificações de comportamento associadas ao sofrimento). Em conjunto a essas situações clínicas, podem-se identificar substratos anatômicos, fisiológicos e psicológicos (LOESER; EGAN, 1989).

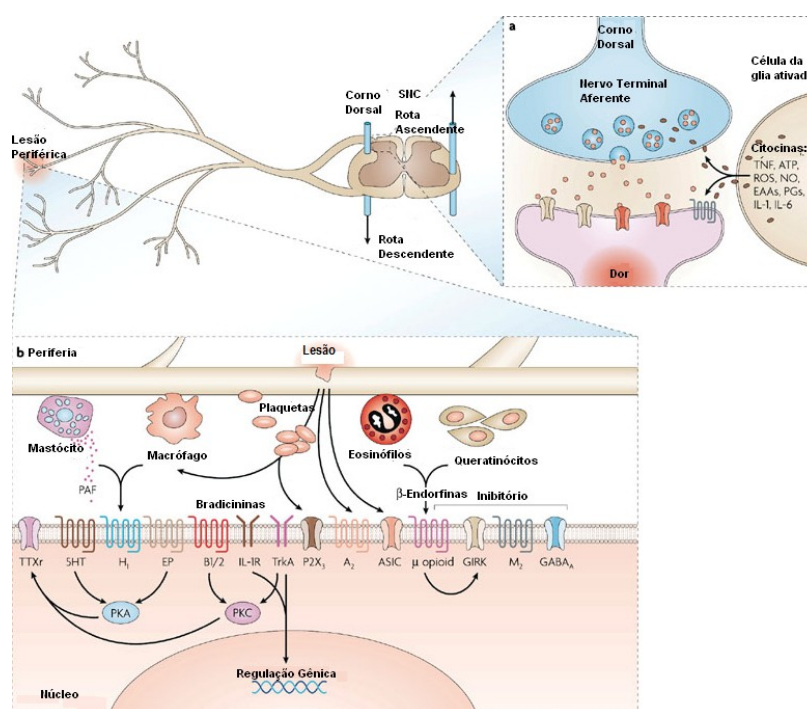
Atualmente, já se sabe que a maioria dos nociceptores é encontrada em uma variedade de espécies incluindo roedores, macacos e homem. Os nociceptores são fibras nervosas e grande quantidade dessas estruturas são denominadas fibras C, não mielinizadas, com baixa velocidade de condução, e outras são delicadas fibras

mielinizadas denominadas A delta, que conduzem mais rapidamente e respondem a estímulos periféricos semelhantes (RANG; DALE; RITTER, 1997).

A dor superficial aguda é mediada pelas fibras A delta que possuem um limiar alto; a dor visceral assemelha-se às dores profundas, caracterizadas pelas sensações difusas, constantes ou em queimadura, e é mediada pelas fibras polimodais C. Ambos os grupos de fibras, tanto A delta como C, penetram pela medula espinhal através do corno dorsal (DEWEY; BRASE; WELCH, 1994). Enquanto a primeira desencadeia reflexos de fuga, a última acompanha intensas sensações de desconforto e sofrimento (RANG; DALE; RITTER, 1997).

Os terminais aferentes primários liberam diversos neurotransmissores, aminoácidos e neuropeptídeos no corno dorsal da medula, onde exercem importante papel na modulação da transmissão nociceptiva (Figura 12). Entre essas substâncias, podem ser destacados aminoácidos excitatórios (glutamato e aspartato) e diversos outros neurotransmissores e neuropeptídeos, incluindo as taquicinas, neurocinina A (NKA) e neurocinina B (NKB), peptídeo geneticamente relacionado com a calcitonina (*Calcitonin Gene-Related Peptide-CGRP*), colecistocinina (CCK), somatostatina, óxido nítrico (NO), prostaglandinas (PG), galanina, encefalinas e endorfinas (CARVALHO; LEMONICA, 1998b).

**Figura 12:** Esquema representativo do mecanismo de propagação da dor.



**Fonte:** Adaptado de WOODCOCK; WITTER; DIONNE (2007).

O potencial de ação captado pelos nociceptores é conduzido através dos nervos periféricos para o Sistema Nervoso Central (SNC), e o impulso passa pelo corno posterior dorsal, medula espinhal, formação reticular do tronco cerebral e núcleos inespecíficos do tálamo para, finalmente, alcançar o córtex cerebral. Além disso, existem comunicações com os centros responsáveis pelo controle neurovegetativo, localizados no tronco encefálico e no hipotálamo, com o sistema límbico e com os centros motores subcorticais. Desse modo, várias partes do cérebro estão envolvidas na percepção da dor (SCHAFER, 1999).

A dor aguda tem função biológica de preservação da integridade e da defesa corporal, pois denota um dano ou iminência de lesão tecidual. Por outro lado, a dor crônica é uma das principais causas de incapacidade e afastamento do trabalho ou de perda da capacidade de cumprir as tarefas diárias e da qualidade de vida. Apesar dos avanços nas diversas áreas de conhecimentos relacionadas à dor, como epidemiologia, fisiopatologia e terapêuticas, os resultados dos tratamentos bem como a prevenção de queixas recorrentes ainda não são satisfatórios (TEIXEIRA, 2006; TEIXEIRA; FIGUEIRÓ, 2001).

A inflamação é uma resposta do tecido à injúria celular e é caracterizada como sendo um evento complexo, dinâmico e multimediado, podendo manifestar-se a partir de qualquer agente lesivo, seja físico (queimadura, trauma), biológico (ação de micro-organismos patogênicos) ou químico (substância cáustica). O processo inflamatório envolve uma série complexa de eventos bioquímicos e celulares que incluem extravasamento de fluidos, ativação enzimática, migração celular, liberação de mediadores, sensibilização e ativação de receptores, lise tecidual e de reparo. Os mediadores de maior relevância são os eicosanoides, os oxidantes biológicos, as citocinas, os fatores de adesão e as enzimas digestivas (proteases, collagenases, elastase e hialuronidase) (CARVALHO; LEMÔNICA, 1998a; WOODFORK; DYKE, 2004).

A resposta inflamatória pode ser dividida em fases. A fase rápida começa segundos após a lesão e envolve processo de vasodilatação, aumento do fluxo sanguíneo, edema e dor. A fase aguda é caracterizada pela indução de genes ligados a transcrição dos mediadores da inflamação, produzindo quantidades moderadas de mediadores inflamatórios. A fase crônica ocorre no transcurso de meses a anos, e caracteriza-se pelo aumento acentuado na produção de mediadores (WOODFORK; DYKE, 2004)

As classes de analgésicos mais utilizadas na terapia atual para o tratamento da dor são os opioides e os anti-inflamatórios não-esteroidais (AINEs) que, embora eficazes, apresentam efeitos adversos que tornam o tratamento clínico limitado (NEGUS et al., 2006; WOODCOCK; WITTER; DIONNE, 2007). Os opioides estão associados principalmente à constipação, depressão respiratória, dependência, náuseas e vômitos (SCHUG; GANDHAM, 2006), enquanto o uso de anti-inflamatórios não-esteroidais clássicos pode levar a uma grande variedade de eventos adversos como úlceras e redução da função plaquetária, aumentando o risco de sangramento (BRUNE, 2007).

### **2.9.1- Considerações sobre analgésicos e anti-inflamatórios**

Os fármacos analgésicos e anti-inflamatórios são necessários quando a resposta inflamatória é inadequada, insuficiente, persistente ou provoca destruição dos tecidos (WOODFORK; DYKE, 2004). Alguns dos fármacos analgésicos “clássicos”, notadamente os opiáceos e os AINEs têm suas origens em produtos naturais que foram usados por séculos (DICKESON; KIEFFER, 2006).

Como opioide entende-se qualquer substância, endógena ou sintética, que possui efeitos semelhantes à morfina, e que é bloqueada por antagonistas dos receptores opioides, como a naloxona. O termo mais antigo, opiáceo, é restrito aos fármacos sintéticos semelhantes à morfina, com estruturas não-peptídicas. São conhecidos três tipos de receptores opioides, denominados de  $\mu$ ,  $\delta$  e  $\kappa$ , sendo tipicamente acoplados a proteína G, mediando os principais efeitos farmacológicos dos opioides (FRIES, 1995).

Os opioides ainda são, entre os analgésicos conhecidos, os mais eficazes, estando entre os fármacos mais utilizados para o tratamento de dor intensa. Embora sejam importantes ferramentas no alívio da dor, sua utilização produz alguns efeitos indesejáveis como depressão respiratória, constipação, náuseas, vômitos, euforia, entre outros. Também podem induzir tolerância e dependência. A tolerância desenvolve-se rapidamente e é verificada quando há necessidade de um aumento nas doses do fármaco para manter o efeito farmacológico desejado. Possui considerável seletividade, no sentido de que o seu desenvolvimento não é necessariamente acompanhado por tolerância a outros. Já a dependência é de difícil identificação, sendo caracterizada por uma clara síndrome de abstinência, causando



irritabilidade, emagrecimento, e vários padrões de comportamento anormal, como convulsão e sinais de agressão (DICKENSON; KIEFFER, 2006).

Os AINEs possuem uma ampla variedade de aplicações clínicas como analgésicos, antipiréticos e anti-inflamatórios. Diferentemente dos analgésicos opioides, não causam dependência neurológica. As ações anti-inflamatórias dos AINEs são explicadas pela inibição da síntese de prostaglandina pela enzima ciclooxigenase (COX). A COX-2 é a isoforma predominante envolvida na síntese de prostaglandina durante o processo inflamatório (WOODFORK; DIKE, 2004).

As prostaglandinas (PGs), especialmente a PGE2, sensibilizam o nociceptor periférico às ações de outros estímulos nocivos (WOOLF; MANNION, 1999). Assim, os AINEs mostram-se eficazes principalmente contra a dor associada à inflamação ou à lesão tecidual, visto que eles evitam a sensibilização do nociceptor (BRUNE; FURST, 2007).

A ação anti-inflamatória se refere à redução de algumas PGs (PGE2 e PGI2) produzidas via COX-2, as quais conduzem a um aumento da permeabilidade vascular e edema (RAU; KNAUS, 2008). Do mesmo modo, o efeito analgésico ocorre através da redução da produção de PGs pró-nociceptivas (PGE2 e PGI2), havendo menor sensibilização de terminações nervosas nociceptivas a vários mediadores inflamatórios, tais como a bradicinina e a 5-hidroxitriptamina (BRUNE; FURST, 2007).

Dentre os efeitos adversos causados pelos AINEs clássicos, os mais comuns são dispepsia, náuseas, vômitos e, ainda, lesão gástrica em usuários crônicos, com o risco de hemorragia por anulação do efeito protetor das PGs sobre a mucosa gástrica. Pode haver insuficiência renal reversível (em indivíduos que apresentam vasoconstrição noradrenérgica ou mediada pela angiotensina) causada pela ausência de vasodilatação compensatória mediada pela PGE2. Reações cutâneas, distúrbios hepáticos e depressão da medula óssea também podem ocorrer (WOODFORK; DYKE, 2004).

### **2.9.2- Plantas como fontes de substâncias analgésicas e anti-inflamatórias**

Plantas que são utilizadas pela medicina popular como cicatrizantes, antimicrobianos, analgésicos, antitérmicos, no tratamento de edema ou doenças reumáticas, são indicadoras da presença de substâncias com propriedades anti-inflamatórias e, assim, uma investigação que vise à comprovação de sua eficácia

faz-se necessária. A evolução no entendimento dos aspectos moleculares da patofisiologia da inflamação favoreceu o estabelecimento de novos sistemas de testes *in vitro* e *in vivo* para a seleção de diversas substâncias que permitem a identificação de novos constituintes anti-inflamatórios (CARVALHO, 2004).

Extratos ou substâncias isoladas de diversas plantas utilizadas na medicina tradicional demonstraram, *in vitro*, promover a inibição da COX e/ou 5-LOX, como a *Achillea millefolium*, *Echinacea angustifolia*, *Echinacea purpurea*, *Hamamelis virginiana*, *Juniperus communis*, *Ledum palustre*, *Polygonum aviculare*, *Sanguinaria canadensis* e *Tanacetum vulgare* (BORCHERS et al., 2000).

A avaliação da atividade antinociceptiva do extrato aquoso de flores de *Brugmansia suaveolens* foi realizada por meio de testes *in vivo*, comprovando que o referido extrato apresenta baixa toxicidade e induz analgesia em camundongos (PARKER et al., 2007). Outro exemplo é o bisabolol, conhecido por ser responsável pelas propriedades anti-inflamatória e analgésica da camomila (*Matricaria chamomilla*). Entre as diversas propriedades medicinais atribuídas aos óleos de copaíba, as mais investigadas são as atividades anti-inflamatória e antitumoral (MACIEL et al., 2002).

### **2.9.3- Métodos de investigação das atividades antinociceptiva e anti-inflamatória**

Em ensaios pré-clínicos, mudanças comportamentais e fisiológicas podem ser induzidas pela administração de agentes que causam a dor (estimulam a nocicepção) e inflamação, assim para fins de avaliação das atividades antinociceptiva e anti-inflamatória, utilizam-se como ferramentas de pesquisa modelos animais, que são comumente usados em práticas de laboratório (SURALKAR et al., 2008).

O processo inflamatório pode ser agudo ou crônico, e a resposta inflamatória ocorre em três fases distintas previamente descritas. Muitos estudos dos processos inflamatórios que buscam novos fármacos e aperfeiçoamento dos existentes advêm de ensaios experimentais envolvendo os mediadores da inflamação em modelos animais (SURALKAR et al., 2008).

O modelo de edema de pata por carragenina em ratos baseia-se no princípio da liberação de vários mediadores inflamatórios induzida por esse agente. A formação de edema devido à aplicação de carragenina na pata do rato é um evento

bifásico. A fase inicial é atribuída à liberação de histamina e serotonina. A segunda fase do edema é devido à liberação de PGs, protease e lisossomos. A injeção subcutânea de carragenina na pata de rato produz inflamação resultante de extravasamento de plasma, exsudação de fluidos para o tecido lesionado e exsudação de proteínas plasmáticas, juntamente com o extravasamento de neutrófilos, devido ao metabolismo do ácido araquidônico. A primeira fase começa imediatamente após a injeção de carragenina e diminui em duas horas. A segunda fase tem início no final da primeira fase e permanece através da terceira hora até cinco horas (VINEGAR et al., 1969).

O teste da formalina em camundongos é um modelo válido e confiável de nocicepção, sendo sensível para várias classes de substâncias analgésicas. O estímulo nocivo é uma injeção de formol diluído (a partir de 1% em salina) sob a pele da superfície dorsal da pata traseira direita. A resposta é a quantidade de tempo que os animais demandam lambendo a pata injetada. Dois períodos distintos da atividade de lambida podem ser identificados, numa fase inicial com duração nos primeiros 5 minutos e em uma fase final com duração de 20 a 30 minutos após a injeção de formalina. As duas fases do teste da formalina podem ter diferentes mecanismos nociceptivos. Sugere-se que a fase inicial seja devido a um efeito direto sobre os nociceptores e que as PGs não desempenham um papel importante nesse período. A fase tardia parece ser uma resposta com dor que pode ser inibida por anti-inflamatórios (HUNSKAAR; HOLE, 1987).

O teste da placa quente consiste em introduzir o animal (camundongo) em um espaço aberto cilíndrico com um piso composto por uma placa metálica que é aquecida a uma temperatura constante, o que leva a duas respostas comportamentais que podem ser medidas pelo tempo de sua reação, ou seja, lambida da pata ou salto. Ambas as respostas são consideradas integradas a medula supraespinal (LE BARS et al., 2001).

A administração intraperitoneal de agentes irritantes provoca um comportamento estereotipado em camundongos, caracterizado por contrações abdominais, movimentos de contração do corpo como um todo (observado em especial nas patas traseiras), torção do músculo dorso-abdominal, bem como uma redução na atividade motora e, ainda, incoordenação motora. Geralmente as medidas são de ocorrência por unidade de tempo de cólicas abdominais decorrentes da injeção dos agentes irritantes (ácido acético, 0,6%). Esses comportamentos são

considerados reflexos e uma evidência de dor visceral. Contudo, o peritônio parietal recebe uma inervação somática, sendo possível afirmar que a dor não seja totalmente visceral (LE BARS et al., 2001).

## **2.10- DOSE LETAL 50%**

Dose letal 50% ( $DL_{50}$ ) é uma dose calculada de uma substância ou extrato capaz de causar a morte de 50% de uma população animal definida como modelo experimental. Os dados obtidos pela  $DL_{50}$  são frequentemente usados como um indicador geral de toxicidade aguda de uma substância. O conceito e o cálculo da dose letal média para fins de comparação são amplamente utilizados (RTECS,1997).

A  $DL_{50}$  é geralmente expressa como a massa de substância administrada por unidade de massa do modelo de teste. Assim sendo, permite-se que a toxicidade relativa de substâncias diferentes seja comparada, e normaliza para a variação do tamanho dos animais expostos (RTECS,1997).

A escolha da letalidade de 50% como referência evita o potencial para a ambiguidade em se fazer medições nos extremos, e reduz a quantidade de testes necessários. No entanto, isso também significa que  $DL_{50}$  não é a dose letal para todos os indivíduos, alguns podem morrer por muito menos, enquanto outros sobrevivem com doses muito mais altas do que a  $DL_{50}$ . Medidas como " $DL_1$ " e " $DL_{99}$ " (dose necessária para matar 1% ou 99%, respectivamente, da população de teste), são ocasionalmente utilizadas para fins específicos.

Dosagem letal, muitas vezes, varia conforme o método de administração. Por exemplo, muitas substâncias são menos tóxicas quando administradas por via oral do que quando administradas por via intravenosa (HODGSON, 2004).

### 3- OBJETIVOS

---

#### 3.1- OBJETIVO GERAL

O presente estudo teve como objetivo investigar o potencial químico e farmacológico de *Vernonia condensata* Baker (Asteraceae), com intuito de corroborar com seu uso popular e valorizar a pesquisa da flora medicinal brasileira.

#### 3.2- OBJETIVOS ESPECÍFICOS

A partir do extrato etanólico e das frações hexânica, diclorometânica, em acetato de etila e butanólica obtidas das folhas de *V. condensata* Baker (Asteraceae), com exceção do item "e", que foi realizado somente com o extrato etanólico:

- a- Detectar as classes químicas do metabolismo secundário;
- b- Quantificar os teores de fenóis totais e flavonoides totais;
- c- Avaliar o potencial antioxidante por meio dos ensaios de DPPH, poder de redução do ferro e TBA;
- d- Determinar a toxidez aguda através da dose letal 50% (DL<sub>50</sub>) para estabelecer as doses a serem utilizadas nas investigações farmacológicas;
- e- Investigar as atividades antinociceptiva, anti-inflamatória e indutora do sono;
- f- Investigar o potencial antibacteriano por meio do Teste de Susceptibilidade aos Antimicrobianos (TSA) através da difusão em ágar e da determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) usando o método de microdiluição de acordo com as orientações do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) e dos efeitos bactericida ou bacteriostático.

## 4- MATERIAL E MÉTODOS

---

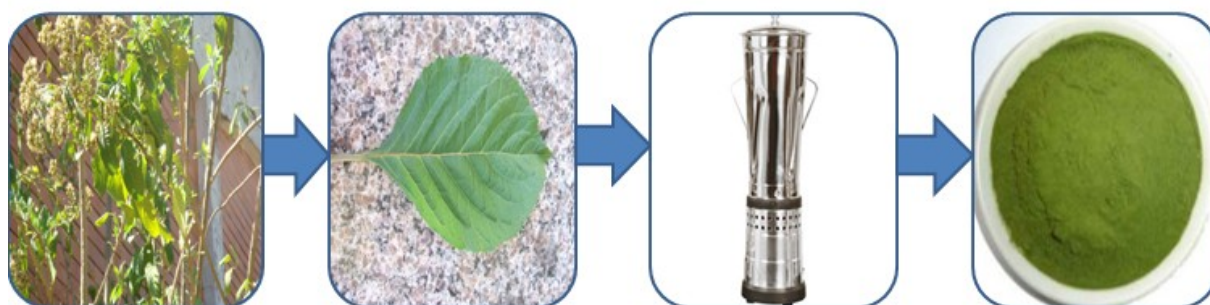
### 4.1- MATERIAL VEGETAL

Partes aéreas de *Vernonia condensata* Baker foram coletadas da planta cultivada no Horto Medicinal da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF), Juiz de Fora, Minas Gerais, Brasil. Uma exsicata (CESJ nº 52943) encontra-se depositada no Herbário Leopoldo Krieger (CESJ), Instituto de Ciências Biológicas, UFJF.

As coletas foram realizadas entre 08:00 e 09:00 horas, no período de julho a setembro de 2010. As folhas foram separadas dos galhos e secas à temperatura ambiente seguida de estufa com ventilação forçada para perda de 90 a 96% de umidade.

Após a secagem, o material botânico foi triturado em liquidificador industrial e pulverizado em tamise nº 18 para posterior preparo do extrato e frações (Figura 13).

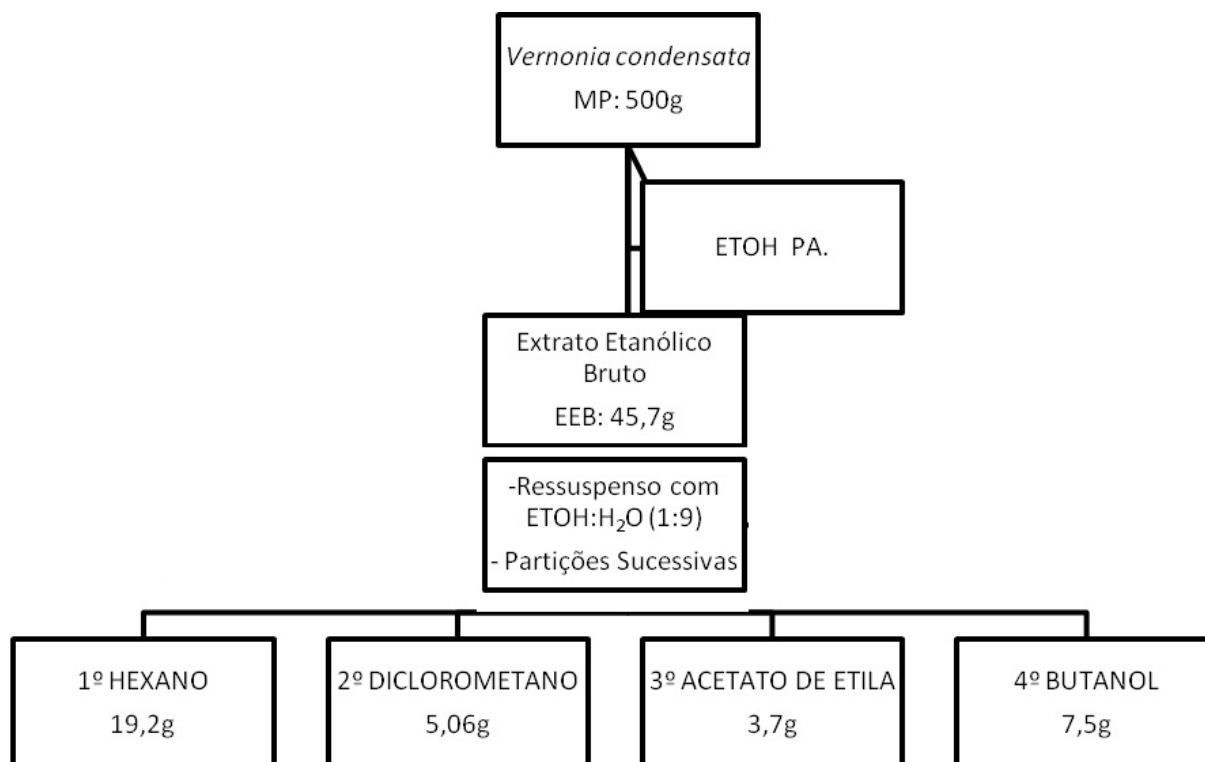
**Figura 13:** Imagens ilustrativas das etapas de preparo do material vegetal.



**Fonte:** Os Autores (2012).

### 4.2- PROCESSOS DE EXTRAÇÃO E FRACIONAMENTO

O material pulverizado foi submetido à extração por maceração estática em etanol P.A. Após rota-evaporação do solvente, parte do extrato etanólico (EE) seco foi suspenso em água: etanol (9:1) seguido de partição líquido/líquido com solventes orgânicos de polaridade crescente: hexano, diclorometano, acetato de etila e butanol (Figura 14) (CECHINEL FILHO; YUNES, 1998). Partes do extrato etanólico e das frações hexânica (FH), diclorometânica (FD), em acetato de etila (FA) e butanólica (FB) foram solubilizadas em dimetilsulfóxido 1% para realização dos testes biológicos.

**Figura 14:** Fluxograma dos processos de extração e fracionamento.

**Fonte:** Os Autores (2012).

### 4.3- PROSPECÇÃO FITOQUÍMICA

As classes de metabólitos secundários flavonoides, taninos, cumarinas, terpenoides e esteroides, saponinas, alcaloides e antraquinonas foram pesquisadas no extrato etanólico bruto e nas frações através de reações características dos grupos funcionais das moléculas com algumas modificações (MATOS, 1997; WAGNER, 1996).

Para os ensaios fitoquímicos foram pesados aproximadamente 100 mg do extrato etanólico bruto bem como das respectivas frações hexânica, diclorometânica, em acetato de etila e butanólica. Posteriormente, foi preparada uma solução de 1mg/mL em etanol a 98%.

#### 4.3.1- Pesquisa de flavonoides

A pesquisa de flavonoides foi realizada através das seguintes reações:

#### **4.3.1.1- Reação com cloreto de alumínio**

Em um pedaço de papel de filtro gotejou-se a amostra a ser testada e, em seguida, foram adicionadas gotas de solução alcoólica de cloreto de alumínio a 5%. O aparecimento de fluorescência de cor amarelada sob luz ultravioleta (UV) (365 nm) indicou a presença de flavonoides.

#### **4.3.1.2- Reação com hidróxido de sódio**

Em tubo de ensaio 12 x 75 mm foram adicionados 2 mL da amostra a ser testada e 0,5 mL de uma solução de hidróxido de sódio 1N. O desenvolvimento de coloração amarelada indicou a presença de flavonoides.

#### **4.3.1.3- Reação de Shinoda**

Em tubo de ensaio 12 x 75 mm foram adicionados 2 mL da amostra a ser testada e fragmentos de magnésio metálico. Em seguida, foram acrescentados 1 mL de ácido clorídrico concentrado. Foi considerada positiva para flavonoides a amostra que desenvolveu coloração rósea avermelhada.

#### **4.3.2- Pesquisa de taninos**

Em tubo de ensaio 12 x 75 mm foram adicionados 2 mL da amostra a ser testada para a realização das seguintes reações visando a pesquisa de taninos:

##### **4.3.2.1- Reação com acetato de cobre**

Ao volume da amostra a ser testada foram acrescentadas algumas gotas de acetato de cobre 3%. A formação de precipitado escuro indicou a presença de taninos.

##### **4.3.2.2- Reação com cloreto férrico**

Ao volume da amostra a ser testada foram acrescentados 5 mL de água destilada e algumas gotas de cloreto férrico a 2%. A reação positiva foi revelada por meio da formação de um precipitado e conforme a coloração do mesmo. Precipitado verde ou azul foi indicativo da presença de tanino condensado ou hidrolisável, respectivamente.



#### **4.3.2.3- Reação com gelatina**

Ao volume da amostra a ser testada acrescentou-se uma (1) gota de uma solução de ácido clorídrico a 10% e de gelatina a 2,5%. A formação de precipitado indicou a presença de taninos.

#### **4.3.2.4- Reação com sais de alcaloides**

Ao volume da amostra a ser testada foram adicionadas três (3) gotas de sais de alcaloides (cloridrato de quinina a 1%). O desenvolvimento de turvação ou precipitação foi considerado reação positiva.

#### **4.3.2.5- Reação com sais de chumbo**

Ao volume da amostra a ser testada foram adicionadas três (3) gotas de acetado de chumbo a 10%, sendo considerado positivo o tubo que apresentou turvação ou precipitação.

#### **4.3.3- Pesquisa de cumarinas**

Em tubo de ensaio 12 x 75 mm foi distribuído 1 mL da amostra a ser testada e, posteriormente, adicionou-se 1 mL de uma solução de hidróxido de potássio a 5%. A presença de cumarinas foi indicada pelo aparecimento de uma fluorescência azul brilhante sob luz UV.

#### **4.3.4- Pesquisa de alcaloides**

Em três tubos de ensaios 12 x 75 mm distintos, devidamente identificados [Tubos D (Dragendorff), H (Hager) e M (Mayer)], foram adicionados 2 mL da amostra a ser testada e, em seguida, foram acrescentadas 5 gotas dos respectivos reagentes (Reativos de Dragendorff, Hager e Mayer), utilizados para a identificação de alcaloides nos tubos correspondentes. O desenvolvimento de precipitação ou turvação branca com os reativos de Hager e Mayer e de cor alaranjada com o reagente de Dragendorff indicou a presença de alcaloides.

#### **4.3.5- Pesquisa de saponinas**

Em tubos de ensaio 13 x 100 mm devidamente numerados de 1 a 10 foram adicionados volumes crescentes da solução-teste, começando com 1 mL até 10 mL,

e completando o volume com água destilada para 10 mL. Cada tubo foi vedado com uma rolha e agitado vigorosamente por 15 segundos. Essa série de tubos ficou em repouso por 15 minutos para posterior detecção do índice de espuma através da presença persistente verificada pela presença de um anel de pelo menos 1 cm de altura no tubo.

#### **4.3.6- Pesquisa de triterpenos e esteroides**

Em tubo de ensaio 12 x 75 mm foram adicionados 2 mL da amostra e, em seguida, foram acrescentadas 2 gotas de anidrido acético e 2 a 4 gotas de ácido sulfúrico concentrado. O aparecimento de coloração azul-esverdeada ou vermelha foi indicativa da presença de esteroides ou triterpenos, respectivamente.

#### **4.3.7- Pesquisa de antraquinonas**

Em tubo de ensaio 12 x 75 mm foram adicionados 2 mL da amostra e, em seguida, foram acrescentados 0,5 mL de hidróxido de sódio 0,5M. O aparecimento de coloração vermelha indicou a presença de antraquinonas.

### **4.4- QUANTIFICAÇÃO DE FENÓIS TOTAIS**

A determinação de substâncias fenólicas foi realizada de acordo com o método espectrofotométrico de Folin-Ciocalteu, descrito por Souza e outros (2007) utilizando ácido gálico como padrão de referência. O reagente de Folin-Ciocalteu é uma solução de íons complexos. Esse reagente oxida os fenolatos, reduzindo-os a um complexo azul. Para realização desta quantificação, foi construída uma curva analítica utilizando 10, 20, 30, 40 e 50 µg/mL de ácido gálico e 2,5 mL do reagente de Folin-Ciocalteu diluído em água destilada 1:10 (v/v). Após 8 minutos, foram adicionados 2 mL de carbonato de sódio a 4%, e essa mistura foi mantida em repouso ao abrigo da luz por 60 minutos. As leituras de absorbância das amostras foram realizadas em espectrofotômetro a 765 nm. O mesmo procedimento foi realizado com o extrato etanólico e frações, substituindo-se o ácido gálico pela amostra e utilizando-se uma alíquota de 0,5 mL diluída em etanol PA. Foi empregado como branco 0,5 mL de água destilada. Os resultados foram expressos em g/100 g de extrato e obtidos por regressão linear da curva analítica. Todas as análises foram realizadas em triplicata.

#### **4.5- QUANTIFICAÇÃO DE FLAVONOIDES TOTAIS**

Os testes para quantificação dos teores de flavonoides totais foram realizados empregando método espectrofotométrico (SOBRINHO et al., 2008; VENNAT et al., 1992). Ácido acético glacial, solução de piridina:etanol e solução de cloreto de alumínio foram utilizados na reação para quantificação. A rutina (2, 5, 10, 20, 50 µg/mL) foi usada como padrão para construção da curva de calibração. Os dados foram submetidos à análise de regressão linear, pelo método dos mínimos quadrados, sendo calculada a equação da reta e o coeficiente de correlação (r). O comprimento de onda de 420 nm foi utilizado para a realização das leituras em absorbância. As amostras foram analisadas em triplicata.

#### **4.6- AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE**

##### **4.6.1- Atividade sequestrante de radicais livres 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH)**

A atividade antioxidante foi determinada utilizando o método espectrofotométrico segundo Mensor e outros (2001). O extrato etanólico e as frações foram levados à resíduo seco em rotavapor e, em seguida, foram preparadas soluções de concentração 1 mg/mL em etanol 95%. A partir dessas soluções iniciais foram preparadas diluições nas concentrações de 20, 25, 30, 35, 40, 50 e 60 µg/mL do extrato etanólico bruto (EEB); 80, 100, 140, 150 e 160 µg/mL da fração hexânica (FH); 5, 10, 20, 30, 50, 60 e 70 µg/mL da fração diclorometânica (FD); 1, 3, 5, 10, 20, 25 e 30 µg/mL da fração em acetato de etila (FA); e 30, 40, 50, 60 e 70 µg/mL da fração butanólica (FB). Para realização do teste foi preparada uma solução 0,03 mM de DPPH. O controle positivo foi feito com rutina a partir de soluções nas concentrações 1, 3, 5, 10, 15 e 30 µg/mL. Todas as análises foram feitas em triplicata. Após 60 minutos de reação, verificou-se a capacidade das amostras em reduzir o 2,2-difenil-1-picril hidrazila em 2,2-difenil-1-picril hidrazina, observada pela mudança da cor púrpura para amarela. Essa mudança de cor foi detectada por meio da diminuição da absorbância em espectrofotômetro sob comprimento de onda de 518 nm. A partir das leituras das absorbâncias das amostras, determinou-se a porcentagem de atividade antioxidante (%AA), que corresponde à quantidade de DPPH reduzida utilizando a seguinte fórmula:

$$\%AA = 100 - \frac{[\text{Abscontrole} - (\text{Absamostra} - \text{Absbranco})] \times 100}{\text{Abscontrole}}$$

Onde:

**Abscontrole** = a absorvância de 2,5 mL de solvente utilizado na extração + 1 mL da solução de DPPH;

**Absamostra** = a absorvância de 2,5 mL do extrato ou respectivas frações + 1 mL da solução DPPH;

**Absbranco** = a absorvância de 2,5 mL do extrato ou respectivas frações + 1 mL do solvente utilizado na extração.

Após a obtenção da atividade antioxidante, a Concentração Efetiva 50% ( $CE_{50}$ ) do extrato etanólico e frações foram obtidas através da análise de regressão linear pelo método dos mínimos quadrados, obtendo-se a equação da reta e o coeficiente de correlação ( $r$ ). A abscissa do gráfico corresponde à concentração do extrato ou frações testados e a ordenada à porcentagem da atividade antioxidante. Assim, quanto maior a redução do DPPH por uma amostra, menor é a  $CE_{50}$  e maior é sua atividade antioxidante.

#### 4.6.2- Método de bioautografia com DPPH

A atividade antioxidante foi também avaliada por cromatografia em camada delgada com gel de sílica (cromatoplas), utilizando DPPH como reagente. Foram preparadas soluções-estoque do extrato etanólico e frações a uma concentração de 10 mg/mL. Essas soluções foram aplicadas nas cromatoplas (10  $\mu$ l) e eluídas com diclorometano:metanol 5% para a fração hexânica e diclorometano:metanol 15% para as frações diclorometânica, em acetato de etila e butanólica. O extrato etanólico foi eluído com ambos sistemas de solventes. Após a eluição, as cromatoplas foram reveladas com solução de DPPH a 2,54 mM. Após 30 min, ao abrigo da luz, a visualização foi realizada, e a presença de halos brancos ou amarelados foi considerada positiva para atividade antioxidante (CAVIN et al., 1998).

Cromatoplas de referência foram desenvolvidas em sílica gel, com as mesmas fases móveis (diclorometano:metanol 5 e 15%), a fim de se identificar qual (is) a(s) classe(s) de fitoconstituente(s) bioativo(s) estava(m) presente(s) nas amostras. Foram utilizados os reveladores ácido sulfúrico:vanilina (revelador universal); hidróxido de potássio a 10% (reativo de Borntrager para identificação de cumarinas); NP/PEG (para identificação de flavonoides), e Liebermann-Burchard (para identificação de esteroides e triterpenos). O fator de retenção ( $R_f$ ) foi calculado para cada banda que apresentou zonas brancas ou amareladas, isto é, que reagiram com o DPPH.

#### **4.6.3- Método do poder de redução do ferro**

O poder de redução das amostras foi determinado pelo método descrito por Oyaizu (1986). As amostras foram diluídas em água destilada obtendo as seguintes concentrações 250; 125; 62,5; 31,25; 15,625 e 7,813 µg/mL, e 53,64; 28,82; 13,41; 6,7; 3,35 e 1,675 µg/mL para as frações hexânica e diclorometânica e para as frações em acetato de etila e butanólica e extrato etanólico, respectivamente. A essas diluições foram adicionados 2,5 mL de tampão fosfato de potássio 200 µM pH 6,6 e 2,5 mL de ferrocianeto de potássio a 1%. Essa mistura foi incubada a 50 °C por 20 minutos. Uma alíquota de 2,5 mL de ácido tricloroacético a 10% foi adicionada à mistura e procedeu-se a centrifugação a 3000 rpm. A camada superior foi retirada e acrescida de 2,5 mL de água destilada e 0,5 mL de cloreto férrico a 0,1%. A absorbância foi medida a 700 nm em espectrofotômetro. Ácido ascórbico e rutina foram usados como referência. A CE<sub>50</sub> foi calculada a partir da curva absorbância *versus* concentração e esse valor determinou a concentração efetiva na qual a absorbância foi 0,5 para o poder de redução. Todas as leituras foram realizadas em triplicata.

#### **4.6.4- Método do ácido tiobarbitúrico (TBA)**

Este método determina a presença de malonaldeído e substâncias provenientes de peroxidação lipídica (BUEGE; AUST, 1978), formando um complexo colorido que é determinado por espectrofotometria. O teste foi realizado conforme preconizado por Wong e outros (1995), com modificações.

Foram preparadas três amostras com 25 g de carne moída, 17 mL de água destilada e 200 µL de extrato etanólico e frações dissolvidos em metanol nas concentrações de 7,5; 15; e 30 mg/200 µl. 2,6-di-terc-butil-4-metilfenol (BHT) foi usado como controle positivo e metanol como controle negativo. Todas as soluções preparadas foram homogeneizadas e, em seguida, aquecidas, até o cozimento inicial da carne. Posteriormente, adicionou-se água destilada até completar o volume para 100 mL, e procedeu-se à homogeneização e transferência do homogenato obtido para frascos âmbar, armazenando-os sob refrigeração.

No dia do preparo das amostras e nos quatro dias consecutivos, 0,5 g de cada homogenato foram transferidos para tubos de ensaio 12 x 75 mm e misturados com 50 µl de solução etanólica de BHT a 4% (p/v), 2,5 mL de ácido fosfórico a 1% (v/v) e

1,25 mL de ácido tiobarbitúrico a 1% (p/v) em hidróxido de sódio 0,05 M. As soluções foram aquecidas em banho fervente por 15 minutos e, em seguida, resfriadas em banho de gelo por 10 minutos. Depois de resfriadas, adicionou-se 3,0 mL de butanol em cada tubo de ensaio para que o complexo ácido tiobarbitúrico (TBA)-malonaldeído (MDA) (indicativo de oxidação da carne) passasse para a fase orgânica com uma leve agitação por inversão (10 vezes). Os tubos foram centrifugados a 4000 rpm por 5 minutos e retirou-se o sobrenadante (fase butanólica) de cada amostra. As análises foram realizadas em triplicata. A leitura foi feita em espectrofotômetro a 535 nm e calculou-se a concentração do complexo TBA-MDA a partir da curva padrão de MDA. Butanol foi usado como branco.

#### **4.7- AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA**

Para a avaliação da atividade antibacteriana foram realizados ensaios com dois propósitos: 1) de triagem ou *screening*, utilizando o método de difusão em ágar; e 2) de determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM), empregando o método de microdiluição. Os procedimentos seguiram as recomendações descritas nos documentos elaborados pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) (CLSI, 2009a, 2009b). Para os experimentos microbiológicos foram utilizadas as seguintes amostras de referência, representativas de grupos bacterianos Gram-positivos e Gram-negativos: *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 (coco Gram-positivo), *Escherichia coli* ATCC 10536 (bacilo Gram-negativo fermentador), *Salmonella typhimurium* ATCC 13311 (bacilo Gram-negativo fermentador) e *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 (bacilo Gram-negativo não-fermentador).

##### **4.7.1- Método de difusão em ágar**

Para a triagem do potencial antibacteriano de *V. condensata* foram utilizados o extrato etanólico e as frações FH, FD, FA e FB. As soluções-teste foram preparadas a partir do extrato etanólico e frações, dissolvendo-os em dimetilsulfóxido (DMSO) até obter-se uma solução com concentração final de 500 mg/mL. Suspensões bacterianas das amostras de referência selecionadas previamente ativadas (cepas de bactérias cultivadas em ágar Müller-Hinton, a  $35^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$ , em aerobiose, 16 a 18 horas), foram preparadas a partir de cinco (5) Unidades Formadoras de Colônias (UFC) em 4 mL de solução fisiológica estéril (cloreto de sódio a 0,9%), comparadas e ajustadas à escala padrão 0,5 de McFarland. Em

seguida, com auxílio de um *swab* estéril, as suspensões devidamente padronizadas foram inoculadas na superfície de uma placa de Petri de 150 mm de diâmetro contendo ágar Müller-Hinton em três sentidos (diagonal, vertical e horizontal) para obtenção de crescimento homogêneo. Após as inoculações, 20 µL das soluções-teste foram aplicadas em poços de 6 mm. Como controles foram utilizados discos de antibióticos comerciais de 6 mm impregnados com ampicilina 10 µg e cloranfenicol 30 µg para validação do procedimento, e DMSO, usado no preparo das soluções-teste, para verificação de provável interferência no ensaio. As placas foram incubadas em estufa bacteriológica, a  $35^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$ , em aerobiose, por 16-18 horas. Após o período de incubação, as zonas de inibição de crescimento bacteriano foram medidas com auxílio de halômetro e registradas em milímetros de diâmetro (CLSI, 2011). Todas as análises foram realizadas em triplicata.

#### **4.7.2- Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)**

Para a determinação da menor concentração da solução-teste com capacidade inibitória de crescimento *in vitro* das amostras de referência [Concentração Inibitória Mínima (CIM)] foi utilizado o método de microdiluição em caldo descrito pelo CLSI (2009b), com modificações. Todos os testes foram realizados empregando caldo Müller-Hinton (CMH). A partir de soluções-estoque de 12,5 mg/mL em DMSO a 1% foram preparadas diluições sucessivas de 5,0 a 0,0025 mg/mL do extrato etanólico e das frações FH, FD, FA, e FB em microplacas de 96 poços. Para isso, foram transferidos 160 µl destas soluções para os poços que já continham 200 µL de CMH na primeira fileira (A) de A1 a A9. A partir da fileira B, todos os poços continham 180 µl de CMH. Após homogeneização utilizando pipeta multicanal, foram transferidos 180 µL da fileira A para a B, e assim sucessivamente até a H (última fileira), procedendo-se à diluição seriada. Em seguida, foram descartados 180 µL dos poços da fileira H. Para realizar o teste e completar o volume final de 200 µL, foram adicionados 20 µL dos inóculos bacterianos previamente padronizados em todos os poços, inclusive nos controles positivo e negativo. As suspensões bacterianas previamente ativadas (cepas de bactérias cultivadas em ágar Müller-Hinton, a  $35^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$ , em aerobiose, 16 a 18 horas) foram preparadas a partir de cinco (5) Unidades Formadoras de Colônias (UFC) em 4 mL de solução fisiológica estéril (cloreto de sódio a 0,9%), comparadas e ajustadas à escala padrão 0,5 de McFarland. Finalmente, as placas foram incubadas em estufa

bacteriológica a  $35^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$ , em aerobiose, 16 a 20 horas. Os testes foram realizados simultaneamente com o controle de crescimento (CMH + micro-organismo) e o controle negativo (CMH + extrato). Cloranfenicol foi utilizado como composto de referência nas concentrações de 500 a 0,24  $\mu\text{g/mL}$ . A CIM foi calculada como a menor diluição que apresentou completa inibição da cepa testada. Todos os testes foram realizados em duplicatas. A leitura foi feita pela observação da presença ou ausência de turbidez indicativa de crescimento bacteriano. Para melhor visualização dos resultados foi utilizada solução de iodonitrotetrazolium (INT) na concentração de 2 mg/mL. Foram aplicados 10  $\mu\text{l}$  dessa solução sobre cada poço e, após incubação, foi observada coloração avermelhada indicativa de crescimento bacteriano ou manutenção da cor original compatível com ausência de crescimento.

#### **4.7.3- Determinação da Concentração Bactericida Mínima (CBM)**

A determinação da Concentração Bactericida Mínima (CBM) foi realizada em placa de Petri de 90 mm de diâmetro contendo ágar Müller Hinton. A placa de Petri contendo o meio de cultura foi previamente demarcada de acordo com as posições das diluições do extrato e frações na microplaca. Uma alíquota do conteúdo dos poços na microplaca onde não foi visualizado crescimento foi transferida com o auxílio de uma alça calibrada estéril para o local correspondente previamente identificado na placa de Petri. A placa foi incubada em estufa bacteriológica a  $35^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$ , em aerobiose, por 16 a 18 horas. Foi determinada como CBM a menor concentração que não permitiu o desenvolvimento dos micro-organismos, classificando o efeito como bactericida ou bacteriostático.

### **4.8- AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES ANTINOCICEPTIVA E ANTI-INFLAMATÓRIA**

#### **4.8.1- Animais**

Foram utilizados ratos Wistar (180 - 240 g) machos e camundongos Swiss albinos machos (20 - 25 g) provenientes do Centro de Biologia da Reprodução da UFJF. Os animais foram mantidos em gaiolas plásticas com ração e água *ad libitum* a temperatura ambiente ( $22^{\circ} \pm 4^{\circ}\text{C}$ ). Doze horas antes da realização dos experimentos, os animais foram privados de ração. Os protocolos utilizados foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEEA) desta Instituição (Protocolo nº 036/2010).



#### **4.8.2- Determinação da toxicidade aguda**

Grupos de dez camundongos receberam doses de 0,5; 1; 1,5; 2 e 3 g/kg do EE, enquanto o grupo controle foi tratado com 10 mL/kg de DMSO a 1% em salina por via oral. Os grupos foram observados por 48 h e no final desse período o número de animais mortos foi contado (DIETRICH, 1983). A dose letal 50% (DL<sub>50</sub>) foi determinada pelo teste dos probitos usando o percentual de mortos *versus* log da dose (LITCHFIELD; WILCOXON, 1949). A partir da DL<sub>50</sub> foram definidas aquelas utilizadas nos experimentos para investigação das atividades biológicas.

#### **4.8.3- Teste das contorções abdominais**

O teste de contorções abdominais em camundongos foi realizado de acordo com Koster e outros (1959) e Collier e outros (1968). O EE foi administrado, solubilizado em DMSO e salina, por via oral. Uma hora após tratamento, 10 mL/kg de ácido acético a 0,6% foram administrados intraperitonealmente em cada camundongo e o número de contorções abdominais foi contado entre 10 e 30 minutos. O grupo controle recebeu 0,3 mL/30 g de DMSO a 1% em salina por via oral. A indometacina (10 mg/kg) e a morfina (1 mg/kg) foram os controles positivos administrados por via oral e subcutânea, respectivamente.

#### **4.8.4- Teste da formalina**

O teste foi realizado de acordo com Hunskaar e Hole (1987). Foram injetados 20 µl de formalina a 2,5% (em salina estéril) no espaço subplantar da pata direita de camundongos e a duração do tempo da lambida foi determinada de 0 a 5 minutos (1ª fase) e 15 a 30 minutos (2ª fase) após aplicação da formalina. O EE, solubilizado em DMSO a 1% e salina, foi administrado, por via oral (100, 200 e 400 mg/kg), 1 hora antes da injeção da formalina (n = 8). Os animais controle receberam 10 mL/kg de DMSO:salina 1% (v/v) por via oral. Morfina (1 mg/kg, subcutânea) e indometacina foram usadas como controle positivo.

#### **4.8.5- Teste da placa quente**

Camundongos foram tratados conforme método descrito por Eddy e Leimbach (1953). Os animais (n = 8) foram submetidos à placa aquecida a 55° ± 1°C. Três grupos de 8 camundongos foram tratados com EE (100, 200 e 400 mg/kg, v.o.) e o

grupo controle recebeu 10 mL/kg de DMSO:salina estéril 1% (v/v). As medidas foram realizadas nos tempos zero, 30, 60 e 90 minutos após administração do extrato, com um tempo máximo de permanência sobre a placa (*cut-off*) de 40 segundos para evitar lesão nas patas dos animais. O efeito do pré-tratamento com naloxona (1 mg/kg, subcutânea) sobre a analgesia produzida pelo extrato (maior dose, via oral) foi determinado em um grupo separado. Morfina (1 mg/kg, subcutânea), na ausência e presença de naloxona, foi usada como controle positivo dos experimentos.

#### **4.8.6- Teste de indução do sono**

O teste de indução do sono foi realizado em camundongos submetidos a fármacos indutores do sono (PIERETTI et al., 1991). Os animais (n = 8) foram divididos, separadamente, em grupos do pentobarbital, diazepam e meprobamato e receberam, por via oral, o EE nas doses de 100, 200 e 400 mg/kg e salina (grupo controle). Após uma hora de tratamento, foram administrado pentobarbital (40 mg/kg, i.p.), diazepam (3 mg/kg, i.p.) e meprobamato (100 mg/kg, i.p.). O tempo do sono foi determinado entre o intervalo da perda e recuperação dos reflexos.

#### **4.8.7- Método do edema de pata**

O edema de pata foi induzido pela injeção de 0,1 mL de carragenina (2% p/v) em salina e administrada na região subplantar da pata direita traseira de ratos Wistar machos, pesando de 180 a 240 g, uma hora após da administração do extrato por via oral (100, 200 e 400 mg/kg) (WINTER et al., 1962). Na pata esquerda traseira, usada como controle, foi injetada 0,1 mL de salina. A medida do edema foi realizada em pletismômetro nos tempos 1, 2, 3 e 4 horas após injeção de carragenina, e calculada pela diferença entre o volume deslocado da pata direita e o da esquerda. Indometacina (10 mg/kg) foi usada como controle positivo.

#### **4.8.8- Método de pleurisia**

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 a 2% em solução salina estéril (VINEGAR et al., 1973). Grupos de seis ratos foram tratados com EE (100, 200 e 400 mg/kg, v.o.), indometacina (10 mg/kg, v.o.) ou DMSO: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 eutanasiados. Uma incisão foi feita entre a terceira e quinta costela em cada lado do mediastino. O exsudato pleural foi coletado, transferido para um tubo cônico graduado e o volume foi determinado. Uma alíquota de 20  $\mu$ L do exsudato foi usada para determinar a contagem total de leucócitos em câmara de Neubauer.

#### **4.9- ANÁLISES ESTATÍSTICAS**

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

## 5- RESULTADOS

### 5.1- PESQUISA E QUANTIFICAÇÃO DE CONSTITUINTES QUÍMICOS

Os resultados da prospecção fitoquímica obtidos por meio de reações de identificação do EE, FH, FD, FA E FB obtidos a partir de folhas de *V. condensata* estão mostrados na Tabela 4. Pela análise dessa Tabela, observa-se que foi detectada a presença de taninos, flavonoides, cumarinas, triterpenos e esteroides, saponinas e alcaloides, e ausência de antraquinonas.

**Tabela 4:** Prospecção fitoquímica do extrato etanólico e frações das folhas de *Vernonia condensata*.

Classe Química	Reação de Identificação	EE	FH	FD	FA	FB
Taninos	Sais de Ferro	+	-	-	-	+
	Sais de Chumbo	+	-	+	+	+
	Acetato de Cobre	+	-	+	+	+
	Alcaloides	-	-	+	-	-
	Gelatina	-	-	-	-	-
Flavonoides	Cloreto de Alumínio	+	-	+	+	+
	Hidróxido de Sódio	+	-	-	+	-
	Shinoda	-	-	-	-	-
Cumarinas	Hidróxido de Potássio	+	+	+	-	-
Triterpenos e Esteroides	Lieberman-Buchard	+	+	+	-	+
Saponinas	Índice de Espuma	+	-	+	-	+
Alcaloides	Dragendorff	+	+	+	+	+
	Mayer	-	-	-	-	-
	Bouchardat	-	-	-	-	-
	Bertrand	-	-	-	-	-
Antraquinonas	Borntraeger	-	-	-	-	-

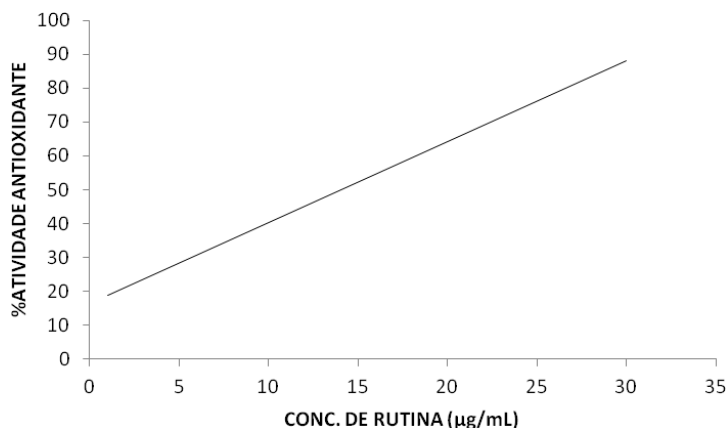
EE: Extrato etanólico; FH: Fração hexânica; FD: Fração diclorometânica; FA: Fração em acetato de etila; FB: Fração butanólica.

**Fonte:** Os Autores (2012).

Considerando-se a determinação dos flavonoides totais, a máxima absorção foi observada no comprimento de onda de 420 nm, o qual foi utilizado para obtenção da reta de calibração e conseqüente estabelecimento dos valores totais desse metabólito secundário, conforme preconizado por Sobrinho e outros (2008).

Conforme mostra a Figura 15, a partir das leituras do padrão rutina em diferentes concentrações foi obtida a reta de calibração. Os dados obtidos foram submetidos à análise de regressão linear para determinação da equação da reta e do coeficiente de determinação ( $R^2$ ), produzindo a equação da reta de calibração  $y = 0,010x + 0,059$ ,  $R^2 = 0,978$ .

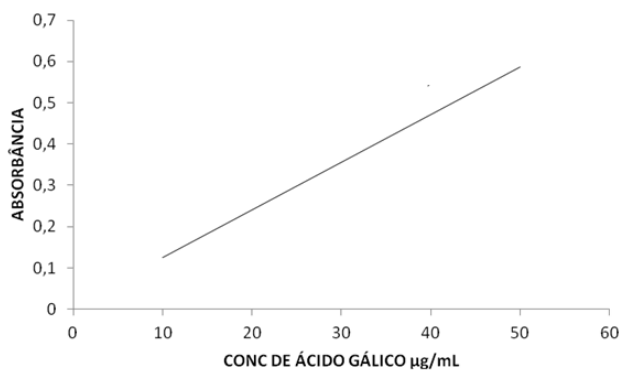
**Figura 15:** Curva de calibração da rutina.



**Fonte:** Os Autores (2012).

O espectro de absorção do ácido gálico foi obtido a partir de uma varredura espectrofotométrica entre 420 e 900 nm. O comprimento de onda onde se observou a maior absorção foi 765 nm e esse foi selecionado para a quantificação dos fenóis totais (SOUSA et al., 2007). Para tanto, traçou-se a reta de calibração do ácido gálico [ $y = 0,0115x + 0,0102$ ,  $R^2 = 0,9841$  (Figura 16)].

**Figura 16:** Curva de calibração do ácido gálico.



**Fonte:** Os Autores (2012).

Os teores de fenóis totais variaram de 0,19 a 23,11 g/100g no extrato etanólico e frações de *V. condensata* (Tabela 5). As frações em acetato de etila e butanólica apresentaram maiores teores de fenóis totais quando comparadas com as demais amostras testadas. A Tabela 5 também mostra que os teores de flavonoides totais variaram de 0,13 a 4,10 g/100 g nas amostras avaliadas. A fração em acetato de etila ( $4,10 \pm 0,03$ ) revelou maior teor de flavonoides totais em relação à rutina.

**Tabela 5:** Teores de fenóis e flavonoides totais no extrato etanólico e frações das folhas de *Vernonia condensata*.

Amostra testada	Fenóis totais (g/100g)	Flavonoides totais (g/100g)
Extrato Etanólico	$11,73 \pm 0,18$	$0,16 \pm 0,01$
Fração hexânica	$0,19 \pm 0,03$	$0,13 \pm 0,01$
Fração diclorometânica	$2,48 \pm 0,08$	$1,48 \pm 0,02$
Fração em acetato de etila	$23,11 \pm 0,90$	$4,10 \pm 0,03$
Fração butanólica	$15,14 \pm 0,07$	$0,94 \pm 0,00$

**Fonte:** Os Autores (2012).

## 5.2- ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

A capacidade antioxidante foi avaliada por meio de três métodos: 1) DPPH; 2) poder de redução do  $\text{Fe}^{+3}$ ; e 3) ácido tiobarbitúrico (TBA).

Para avaliação da atividade antioxidante pelo método de DPPH, primeiramente foi traçado o espectro de absorção desse radical entre 448 nm e 680 nm, revelando pico máximo de absorção a 520 nm. A Tabela 6 mostra os valores de  $\text{CE}_{50}$ , que corresponde à quantidade necessária da amostra para reduzir em 50% a ação oxidante do DPPH. As amostras testadas apresentaram capacidade sequestrante frente ao radical DPPH nas concentrações avaliadas. Pela análise desta Tabela, a  $\text{CE}_{50}$  variou de  $18,44 \pm 0,54$  a  $147,14 \pm 0,40$   $\mu\text{g/mL}$ . A fração em acetato de etila produziu a maior capacidade antioxidante em relação às demais frações.

A atividade antioxidante também foi avaliada pelo método do poder de redução do  $\text{Fe}^{+3}$ . Conforme mostra a Tabela 6, a  $\text{CE}_{50}$  variou de  $19,98 \pm 0,42$  a  $336,48 \pm 11,05$   $\mu\text{g/mL}$  e a fração em acetato de etila apresentou maior capacidade de redução dos íons  $\text{Fe}^{+3}$  em relação às demais, semelhante aos achados anteriores.

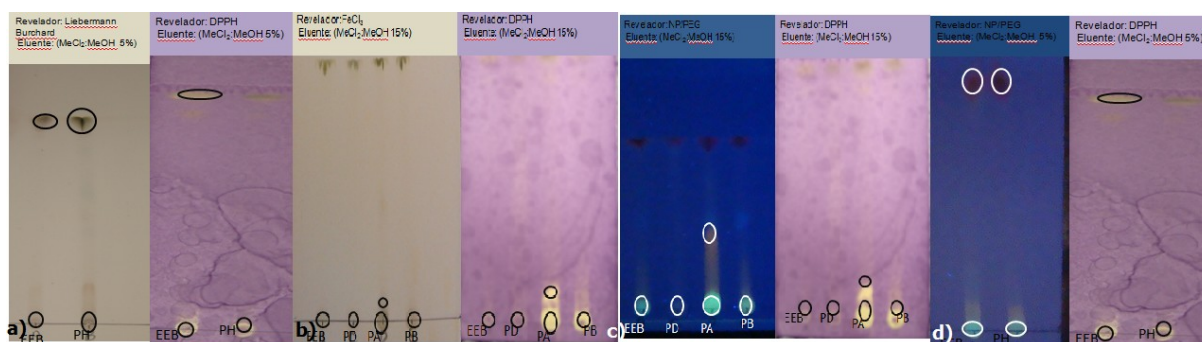
**Tabela 6:** Atividade antioxidante do extrato etanólico e das frações obtidos das folhas de *Vernonia condensata*.

Amostra testada	DPPH	Poder de Redução Fe <sup>+3</sup>
	CE <sub>50</sub> (µg/mL)	CE <sub>50</sub> (µg/mL)
Extrato etanólico	35,44 ± 0,76	54,42 ± 0,19
Fração hexânica	147,14 ± 0,40	212,45 ± 0,02
Fração diclorometânica	51,69 ± 0,44	336,48 ± 11,05
Fração em acetato de etila	18,44 ± 0,54	19,98 ± 0,42
Fração butanólica	48,45 ± 0,26	53,88 ± 0,085
Rutina	14,29 ± 0,11	8,27 ± 0,25
Ácido Ascórbico	-	1,73 ± 0,04

Fonte: Os Autores (2012).

O método de bioautografia com DPPH foi empregado com o intuito de confirmar e detectar constituintes com atividade antioxidante no extrato etanólico e frações. Após aplicação das amostras a serem investigadas (EE, FH, FD, FA e FB) em placas cromatográficas, eluídas e reveladas com DPPH, foram detectadas bandas características de substâncias que possuem atividade antioxidante (Figura 17).

**Figura 17:** Bioautografia em cromatografia em camada delgada do extrato etanólico e frações obtidas das folhas de *V. condensata*.



\* Eluição e revelação com:

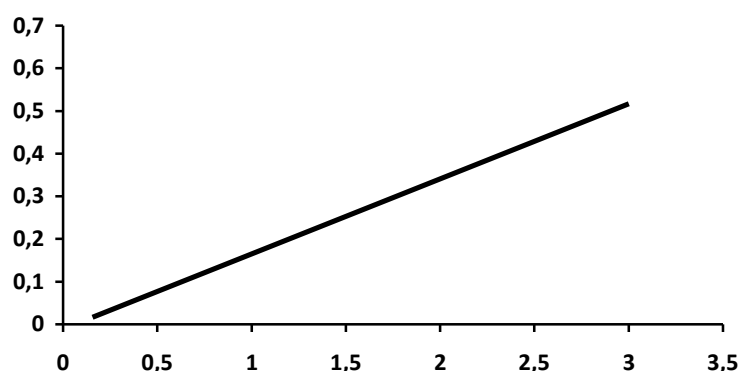
- EE e FH eluídos em diclorometano:metanol 5% e revelados com Liebermann Burchard e DPPH.
- EE, FD, FA e FB eluídos em diclorometano:metanol 15% e revelados com cloreto férrico e DPPH.
- EE e FH eluídos em diclorometano:metanol 5% e revelados com NP/PEG e DPPH.
- EE, FD, FA e FB eluídos em diclorometano:metanol 15% e revelados com NP/PEG e DPPH.

\*\* Não foi possível calcular o Rf em virtude de retenção na origem.

Fonte: Os Autores (2012).

Finalmente, a atividade antioxidante foi avaliada pelo método TBA e, a partir das leituras do padrão de malonaldeído (MDA) em diferentes concentrações, foi obtida a curva de calibração mostrada na Figura 18. Os dados obtidos foram submetidos à análise de regressão linear para determinação da equação da reta e do coeficiente de determinação ( $R^2$ ), produzindo a equação da reta de calibração  $y = 0,1758x + 0,0109$ ,  $R^2 = 0,9225$ .

**Figura 18:** Curva de calibração do malonaldeído.



**Fonte:** Os Autores (2012)

A concentração de MDA formado ao longo dos cinco (5) dias de experimento diminuiu para o homogenato tratado com o extrato etanólico e frações de *V. condensata* nas concentrações de 7,5, 15, e 30 mg/mL, assim como o controle positivo quando comparado ao controle negativo (Tabela 7). Considerando a concentração de 30 mg/mL no 5º dia de experimento, a fração em acetato de etila foi a mais ativa em inibir a formação do MDA no homogenato.



**Tabela 7:** Concentração de malonaldeído (MDA) em mMol/L obtida por meio do método do ácido tiobarbitúrico (TBA) com extrato etanólico e frações obtidas das folhas de *Vernonia condensata*.

Amostra Testada		Concentração de MDA (mMol/L)				
		Dia 0	Dia 1	Dia 2	Dia 3	Dia 4
Controle negativo		0,29±0,015	0,39±0,048	0,46±0,019	0,95±0,0057	1,33±0,005
BHT	7,5 mg	0,43±0,001***	0,68±0,030***	0,60±0,064***	0,18±0,015***	0,20±0,008***
	15 mg	0,17±0,017***	0,43±0,018	0,36±0,005	0,17±0,006***	0,17±0,005***
	30 mg	0,18±0,003	0,18±0,005***	0,20±0,002***	0,15±0,008***	0,14±0,003***
EE	7,5 mg	0,61±0,000***	0,32±0,011	0,67±0,007***	0,49±0,011***	0,45±0,008***
	15 mg	1,04±0,002***	0,56±0,03***	0,40±0,005	0,48±0,019***	0,46±0,013***
	30 mg	0,57±0,07***	0,68±0,006***	0,25±0,000***	0,42±0,04***	0,43±0,03***
FH	7,5 mg	0,17±0,01***	0,42±0,01	0,48±0,005	0,68±0,031***	0,71±0,037***
	15 mg	0,38±0,011	0,43±0,03	0,47±0,01	0,55±0,002***	0,65±0,006***
	30 mg	0,32±0,04	0,56±0,005***	0,46±0,01	0,61±0,009***	0,73±0,73***
FD	7,5 mg	0,18±0,01***	0,21±0,01***	0,37±0,003***	0,39±0,005***	0,35±0,009***
	15 mg	0,21±0,013	0,20±0,005***	0,44±0,004	0,42±0,005***	0,27±0,011***
	30 mg	0,28±0,007	0,20±0,068***	0,38±0,002	0,36±0,000***	0,38±0,004***
FA	7,5 mg	0,26±0,011	0,39±0,007	0,59±0,008***	0,18±0,01***	0,54±0,01***
	15 mg	0,26±0,002***	0,25±0,013	0,37±0,000	0,35±0,009***	0,34±0,005***
	30 mg	0,28±0	0,28±0***	0,20±0,005***	0,19±0,003***	0,18±0,003***
FB	7,5 mg	0,33±0,002***	0,75±0,002	0,46±0,018	0,57±0,003***	0,38±0,009***
	15 mg	0,34±0,01	1,21±0,008***	0,57±0,005***	0,69±0,011***	0,36±0,034***
	30 mg	0,17±0,008***	0,64±0,006***	0,52±0,009	0,64±0,015***	0,42±0,005***

n = 3; \*\*\*  $p < 0,001$  significativamente diferente do controle negativo.

BHT = 2,6-di-terc-butil-4-metilfenol.

EE: Extrato etanólico; FH: Fração Hexânica; FD: Fração Diclorometânica; FA: Fração em Acetato de Etila; FB: Fração Butanólica.

Fonte: Os Autores (2012).

### 5.3- ATIVIDADE ANTIBACTERIANA

Os resultados de triagem da atividade antibacteriana do extrato etanólico e das frações das folhas de *V. condensata* obtidos pelo método de difusão em ágar estão mostrados na Tabela 8. Pela análise desta Tabela observa-se que as frações hexânica, diclorometânica e em acetato de etila foram ativas frente à *S. aureus* ATCC 29213, hexânica e diclorometânica foram ativas frente à *E. coli* ATCC 10536, e somente a diclorometânica foi ativa frente à *Salmonella typhimurium* ATCC 13311. O extrato etanólico e as frações revelaram-se inativos frente à *P. aeruginosa* ATCC 27853. O extrato etanólico e a fração butanólica mostraram-se inativos frente a todas as cepas bacterianas testadas.

**Tabela 8:** Atividade antibacteriana do extrato etanólico e frações das folhas de *Vernonia condensata* pelo método de difusão em ágar.

Amostra testada ou antibiótico	Diâmetro de inibição do crescimento (mm)			
	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>S. typhimurium</i>
	ATCC 29213	ATCC 10536	ATCC 27853	ATCC 13311
Extrato Etanólico	0	0	0	0
Fração Hexânica	12	12	0	0
Fração Diclorometânica	20	18	0	11
Fração em Acetato de Etila	18	0	0	0
Fração Butanólica	0	0	0	0
DMSO	0	0	0	0
Cloranfenicol	18	12	0*	22
Ampicilina	37	19	0*	20

- ATCC = *American Type Culture Collection*.

- Os valores correspondem à média dos halos e a concentração da solução-estoque do extrato etanólico e das frações utilizada foi de 500 mg/mL.

- Testes realizados em triplicata.

\*Resultado de acordo com CLSI para esta amostra de referência bacteriana = controle de qualidade negativo.

**Fonte:** Os Autores (2012).

A Tabela 9 apresenta os valores da Concentração Inibitória Mínima (CIM) obtidos com o extrato etanólico e frações das folhas de *V. condensata*. O extrato e as frações revelaram valores de CIM entre 1,25 e 5,0 mg/mL. Nas concentrações testadas, todas as amostras investigadas foram capazes de inibir o crescimento das cepas bacterianas selecionadas.

**Tabela 9:** Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM) do extrato etanólico e frações das folhas de *Vernonia condensata*.

Amostra Testada ou Antibiótico	Micro-organismo	CIM (mg/mL)	CBM (mg/mL)	Efeito
EE	<i>Staphylococcus aureus</i>	2,5	>2,5	Bacteriostático
	<i>Escherichia coli</i>	>5	NR	NR
	<i>Salmonella typhimurium</i>	>5	NR	NR
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	5	>5	Bacteriostático
FH	<i>Staphylococcus aureus</i>	1,25	2,5	Bacteriostático
	<i>Escherichia coli</i>	5	>5	Bacteriostático
	<i>Salmonella typhimurium</i>	5	5	Bactericida
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	5	5	Bacteriostático
FD	<i>Staphylococcus aureus</i>	2,5	5	Bacteriostático
	<i>Escherichia coli</i>	1,25	2,5	Bacteriostático
	<i>Salmonella typhimurium</i>	2,5	>2,5	Bactericida
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	5	>5	Bactericida
FA	<i>Staphylococcus aureus</i>	1,25	1,25	Bactericida
	<i>Escherichia coli</i>	>5	NR	NR
	<i>Salmonella typhimurium</i>	5	>5	Bacteriostático
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	>5	NR	NR
FB	<i>Staphylococcus aureus</i>	>5	NR	NR
	<i>Escherichia coli</i>	>5	NR	NR
	<i>Salmonella typhimurium</i>	5	>5	Bacteriostático
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	5	>5	Bacteriostático
Cloranfenicol	<i>Staphylococcus aureus</i>	0,062		
	<i>Escherichia coli</i>	0,015		
	<i>Salmonella typhimurium</i>	0,001	NR	NR
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0,015		

- NR = Não Realizado.

- As concentrações dos extratos variaram de 5,0 a 0,039 mg/mL.

- Cloranfenicol foi usado como antibiótico de referência nas concentrações de 0,5 a 0,024 mg/mL.

\*Resultados validados por Temponi (2012) e também obtidos no presente estudo.

**Fonte:** Os Autores (2012).

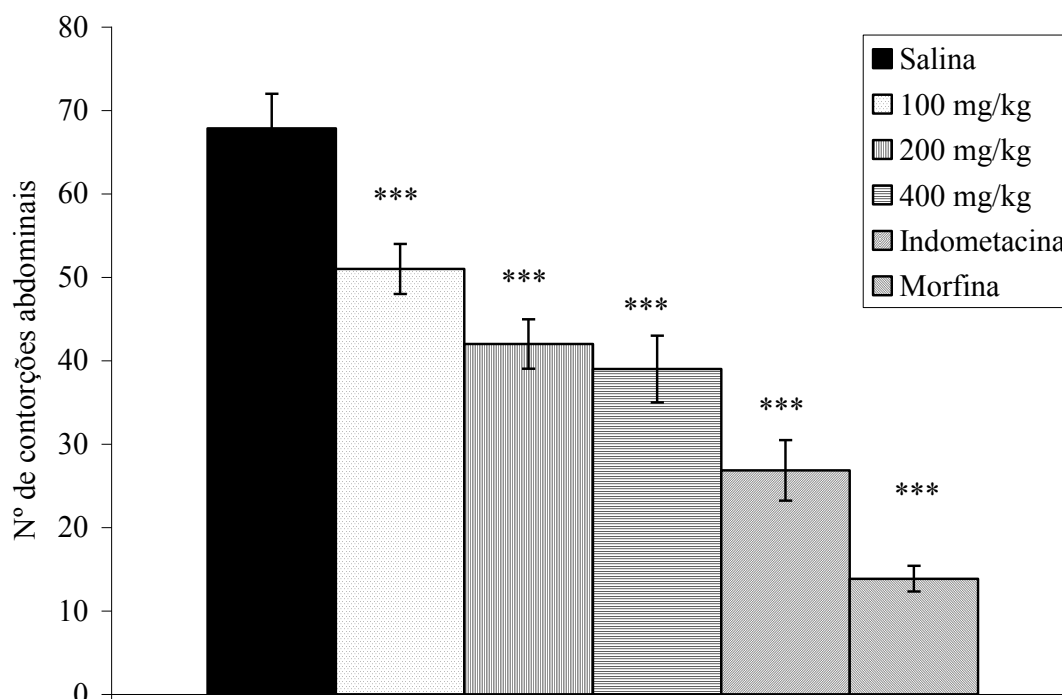
A Tabela 9 também apresenta os valores da Concentração Bactericida Mínima (CBM) do extrato etanólico e das frações das folhas de *V. condensata*. As amostras testadas que revelaram CIM superiores a 5 mg/mL não tiveram o efeito bacteriostático ou bactericida estabelecido. Pela análise desta Tabela, os valores da CBM observados com o extrato etanólico frente às cepas de *S. aureus* e *P. aeruginosa* testadas revelaram um efeito bacteriostático. O efeito bacteriostático da fração hexânica foi demonstrado para *S. aureus*, *E. coli* e *P. aeruginosa*, enquanto a

atividade bactericida foi observada para *Salmonella typhimurium*. A fração diclorometânica produziu CBM do tipo bacteriostática para *S. aureus* e *E. coli* e bactericida para *P. aeruginosa* e *Salmonella typhimurium*. O CBM bactericida para *S. aureus* e bacteriostática para *Salmonella typhimurium* foi determinada na presença da fração em acetato de etila. A fração butanólica produziu efeito bacteriostático para *Salmonella typhimurium* e *P. aeruginosa*.

#### 5.4- ATIVIDADES ANTINOCICEPTIVA E ANTI-INFLAMATÓRIA DO EXTRATO ETANÓLICO

Nas doses administradas de 100, 200 e 400 mg, o extrato etanólico das folhas de *V. condensata* não foi tóxico aos animais avaliados, apresentando uma  $DL_{50}$  acima de 3 g/kg. No entanto, foi observado que os animais mostraram-se sonolentos durante o experimento que empregou doses mais altas. Doses de 100, 200 e 400 mg/kg do extrato etanólico também reduziram significativamente ( $p < 0,001$ ) as contorções abdominais induzidas por ácido acético quando comparadas ao grupo controle (Figura 19).

**Figura 19:** Efeito do extrato etanólico das folhas de *Vernonia condensata* sobre as contorções abdominais induzidas por ácido acético em camundongos.



n = 8; \*\*\*  $p < 0,001$  significativamente diferente do grupo controle.

Fonte: Os Autores (2012).

A atividade antinociceptiva também foi avaliada por meio do teste da formalina. A Tabela 10 mostra que a injeção intraplantar de formalina promoveu uma resposta característica bifásica. O tempo da lambida da primeira fase (0-5 min) foi de  $69,37 \pm 3,63$  segundos e a segunda fase (15-30 min) foi de  $79,37 \pm 4,15$  segundos para o grupo controle. Após 60 minutos de tratamento, as doses de 200 ( $51,50 \pm 4,44$ ;  $p < 0,01$ ) e 400 mg/kg ( $48,00 \pm 4,37$ ;  $p < 0,01$ ) inibiram significativamente a primeira fase. A segunda fase foi reduzida em 45,36; 56,38 e 64,26% nas doses de 100, 200 e 400 mg/kg, respectivamente, quando comparadas ao grupo controle.

**Tabela 10:** Efeito do extrato etanólico das folhas de *Vernonia condensata* sobre a nocicepção induzida por formalina em camundongos.

Grupo	Dose (mg/kg)	Tempo de reação (s)			
		1ª fase		2ª fase	
		Média $\pm$ E.P.	Inibição (%)	Média $\pm$ E.P.	Inibição (%)
Controle	Salina	69,37 $\pm$ 3,63	-	79,37 $\pm$ 4,15	-
	100	67,7 $\pm$ 3,94	-	43,37 $\pm$ 5,15***	45,36
Extrato etanólico	200	51,50 $\pm$ 4,44**	25,14	34,62 $\pm$ 4,16***	56,38
	400	48,00 $\pm$ 4,37**	31,15	28,37 $\pm$ 3,98***	64,26
Indometacina	10	63,75 $\pm$ 2,74	8,10	31,50 $\pm$ 1,72***	60,31
Morfina	1	19,87 $\pm$ 3,91***	66,98	28,75 $\pm$ 5,64***	63,78

n = 8; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$  significativamente diferente do grupo controle.

**Fonte:** Os Autores (2012).

Conforme mostra a Tabela 11, o extrato etanólico de *V. condensata* aumentou o tempo de permanência de camundongos expostos à placa quente. No tempo zero e 30 min, não houve efeito significativo quando comparado ao grupo controle. Após 60 e 90 min de tratamento, a dose de 400 mg/kg ( $10,13 \pm 0,39$  e  $11,14 \pm 1,33$  s, respectivamente) aumentou significativamente o tempo de permanência ( $p < 0,001$ ). A naloxona, um antagonista opioide, reduziu o efeito da morfina, mas não alterou totalmente o efeito analgésico do extrato testado.

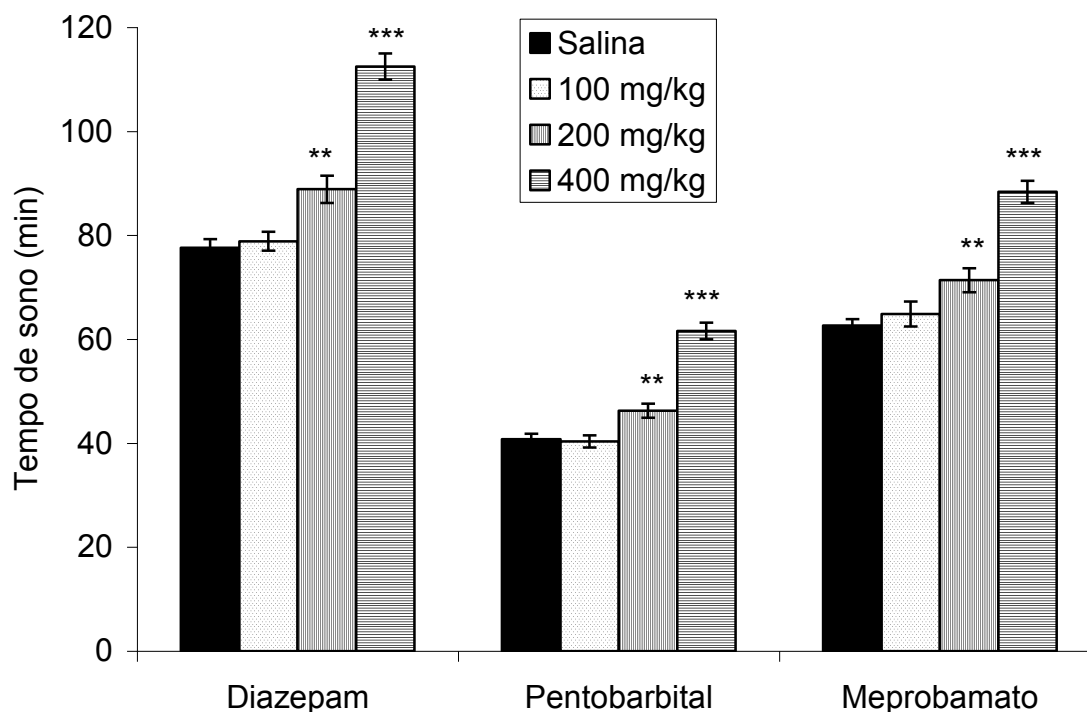
**Tabela 11:** Efeito do extrato etanólico das folhas de *Vernonia condensata* sobre o tempo de latência de camundongos expostos ao teste da placa quente.

Grupo	Dose (mg/kg)	Tempo de latência (s)			
		Tempo 0'	Tempo 30'	Tempo 60'	Tempo 90'
Controle	Salina	5,01±0,31	5,56±0,83	5,55±0,47	5,94±0,64
	100	5,03±0,46	4,88±0,84	5,71±0,40	5,94±0,87
Extrato etanólico	200	5,46±0,54	6,01±0,38	6,85±0,45	7,50±0,77
	400	5,50±0,67	7,64±0,99	10,13±0,39***	11,14±1,33***
Morfina	1	6,24±0,77	9,77±0,44***	11,82±0,39***	14,51±0,94***
Naloxona+Morfina	1+1	5,57±0,68	9,99±0,96***	8,24±0,56**	7,01±0,59
Naloxona+Extrato	1+400	5,54±0,74	8,39±0,67*	12,16±0,74***	12,03±1,05***

n = 8; \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$  significativamente diferente do grupo controle.

Fonte: Os Autores (2012).

Doses de 200 e 400 mg/kg do extrato etanólico potencializaram o tempo de sono induzido por pentobarbital, meprobamato e diazepam (Figura 20).

**Figura 20:** Efeito do extrato etanólico das folhas de *Vernonia condensata* sobre o tempo de sono induzido por diazepam, pentobarbital e meprobamato em camundongos.

n = 8; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$  significativamente diferente do grupo controle.

Fonte: Os Autores (2012).

Os resultados observados do efeito anti-inflamatório do extrato etanólico de *V. condensata* avaliado pelo método do edema de pata induzido por carragenina é mostrado na Tabela 12.

**Tabela 12:** Efeito do extrato etanólico das folhas de *Vernonia condensata* sobre o edema de pata induzido por carragenina em ratos.

Grupo	Dose (mg/kg)	Volume deslocado da pata direita (mL)			
		1 h	2 h	3 h	4 h
Controle	Salina	0,65±0,09	0,85±0,09	0,93±0,06	1,10±0,08
	100	0,42±0,02	0,72±0,03	0,73±0,07*	0,85±0,05*
Extrato etanólico	200	0,46±0,04	0,51±0,06*	0,72±0,03*	0,70±0,09**
	400	0,45±0,03	0,59±0,07*	0,63±0,04**	0,74±0,06**
Indometacina	10	0,41±0,09	0,43±0,08**	0,51±0,08***	0,55±0,06***

n = 6; \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$  significativamente diferente do grupo controle.  
Fonte: Os Autores (2012).

Os efeitos sobre a pleurisia demonstraram que as doses testadas reduziram, significativamente, o volume do exsudato e o nº de leucócitos totais (Tabela 13).

**Tabela 13:** Efeito do extrato etanólico das folhas de *Vernonia condensata* sobre o exsudato pleural e número de leucócitos na pleurisia induzida por carragenina em ratos.

Grupo	Dose (mg/kg)	Volume do exsudato (mL)	Inibição (%)	Nº de Leucócitos ( $\times 10^3$ cels/mm <sup>3</sup> )	Inibição (%)
Controle	Salina	1,85±0,06	-	13,50±0,56	-
	100	1,72±0,13	7,03	10,18±0,24***	24,60
Extrato etanólico	200	1,53±0,07**	17,30	9,47±0,10***	29,85
	400	1,20±0,08***	35,13	8,17±0,14***	39,50
Indometacina	10	0,75±0,10***	59,46	7,76±0,46***	42,52

n = 6; \* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$  significativamente diferente do grupo controle.  
Fonte: Os Autores (2012).

## 6- DISCUSSÃO

---

Os ensaios fitoquímicos e a determinação de constituintes fenólicos permitiram identificar as principais classes químicas presentes no extrato etanólico e nas frações de *V. condensata*, bem como quantificar os teores de fenóis e flavonoides totais. Assim sendo, detectou-se a presença de taninos, flavonoides, cumarinas, triterpenos e esteroides, saponinas e alcaloides nas folhas desta espécie vegetal. A maioria dessas classes foi previamente descrita em *V. condensata* (RISSO; SCARMINIO; MOREIRA, 2010). Entretanto, este é o primeiro relato de detecção de cumarinas. Uma variedade de experimentos *in vitro* e *in vivo* têm demonstrado que flavonoides, taninos, triterpenos e outros metabólitos secundários possuem propriedades antioxidante, antimicrobiana, antinociceptiva e anti-inflamatória (GARCÍA-LAFUENTE et al., 2009; SALMINEN et al., 2008; SHER, 2009; NG; LIU; WANG, 2000; VAN ACKER et al., 1996; YUAN et al., 2006).

Esta também é a primeira descrição da quantificação dos teores de fenóis e flavonoides totais no EE e frações das folhas de *V. condensata*. A FA apresentou o maior teor de fenóis e flavonoides totais. Constituintes fenólicos tais como flavonoides têm sido investigados por suas propriedades anti-inflamatória, antimicrobiana, antinociceptiva e antioxidante (CUSHNIE; LAMB, 2006; ORHAN et al., 2006; TOKER et al., 2004; VAN ACKER et al., 1996). Além disso, os flavonoides têm sido isolados e identificados em diferentes espécies de *Vernonia*, o que pode representar um importante marcador quimiotaxonômico (AHMAD; CHAUDHARY; JANBAZ, 2010; IGILE et al., 1994; MALAFRONTÉ et al., 2009).

Considerando ainda os constituintes fenólicos em espécies de *Vernonia*, estudos realizados com *V. amygdalina* demonstraram que o teor de fenóis totais foi de 0,20 a 0,27 g/100g (OBOH; AKINDAHUNSI, 2004), de 0,061 a 1,11 g/100g (ITA, 2010) e 0,24 g/100g (OLAJIRE; AZEEZ, 2011). Em *Vernonia blumeoides*, o teor de fenóis totais variou de 0,014 a 0,41 g/100g nos extratos etanólico, clorofórmico, em acetato de etila e butanólico (ALIYU et al., 2011). Os resultados obtidos no presente estudo mostraram que, em solventes de diferentes polaridades, o teor de fenóis totais variou de 0,19 a 23,11 g/100g (Tabela 5). Por suas características físico-químicas, a FA foi a fração mais efetiva na extração dos fenóis totais, o que corroborou com estudos de espécies do gênero *Vernonia* (ALIYU et al., 2011; ITA, 2010).



Na espécie *V. amygdalina*, o teor de flavonoides totais foi de 0,22 g/100g (OLAJIRE; AZEEZ, 2011) ou de 0,041 a 0,466 g/100g (ITA, 2010). Em *V. condensata*, o teor variou de 0,16 a 4,10 g/100g utilizando solventes de diferentes polaridades. Assim como na quantificação de fenóis totais, o acetato de etila produziu um maior rendimento de flavonoides e pode ser o solvente mais apropriado para a extração de substâncias dessa classe de metabólito.

Um crescente interesse pelas propriedades farmacológicas dos flavonoides e constituintes fenólicos de um modo geral tem sido observado nos últimos anos. Uma das justificativas é a atividade anti-inflamatória que apresentam. Muitos estudos têm sido realizados buscando elucidar suas propriedades antioxidantes, uma vez que a presença de radicais livres, mais apropriadamente denominados espécies reativas de oxigênio (EROs) têm sido relacionadas a certas doenças crônicas, tais como as autoimunes (artrite reumatoide, lupus eritematoso sistêmico), câncer e doença de Parkinson (CHUNG et al., 1998).

As EROs são moléculas altamente reativas originadas do metabolismo de oxigênio e são responsáveis por causar danos graves às células e aos tecidos levando à inúmeras doenças degenerativas. Entre as patologias envolvidas, destacam-se as doenças cardiovasculares, as doenças neurodegenerativas, as mutações e o câncer. Dessa forma, a busca por substâncias com potencial atividade antioxidante tornou-se alvo de incessantes pesquisas especialmente àquelas relacionadas ao estudo de produtos naturais bioativos (LEE et al., 2003).

Diversos métodos são usados para avaliar a atividade antioxidante. No presente estudo optou-se por adotar a atividade sequestrante de radicais livres (DPPH), o poder de redução dos íons  $Fe^{+3}$  e a atividade da inibição da peroxidação lipídica (método TBA). Esses métodos foram selecionados por serem fáceis, rápidos, reprodutíveis e envolverem, de um modo geral, substâncias cromogênicas de um radical simulando as EROs que, na presença de substância antioxidante, desaparecem.

Na atividade sequestrante de radicais livres, o DPPH é um cromóforo estável e, na presença de etanol, apresenta um pico de absorção máximo em 520 nm, possuindo coloração violeta intensa (MENSOR et al., 2001). À medida que o radical DPPH é reduzido por um antioxidante, o elétron desemparelhado torna-se emparelhado e a absorvidade desaparece (BRAND; CUVELIER; BERSSET, 1995).

De acordo com os resultados demonstrados na Tabela 5, a atividade antioxidante apresentada pelo EE e frações não é devida apenas a uma substância ou a uma classe de substâncias. Os flavonoides e outros constituintes fenólicos são conhecidos por possuírem atividade antioxidante (BROINIZI et al., 2007) e a presença desses compostos em *V. condensata* certamente pode contribuir para a expressão dessa propriedade. As frações FA e FB apresentaram as maiores quantidades de fenóis totais ( $23,11 \pm 0,90$  e  $15,14 \pm 0,07$  g/100g, respectivamente). Essas frações também apresentaram uma maior atividade antioxidante com  $CE_{50}$  de  $18,44 \pm 0,54$  e  $48,45 \pm 0,26$   $\mu$ g/mL, respectivamente (Tabela 5).

A determinação do poder de redução indica a capacidade de uma substância de doar elétrons, e conseqüentemente, de reduzir os intermediários oxidados (OYAZU, 1986). As frações FA e FB apresentaram melhores poderes de redução, com  $CE_{50}$  de  $19,98 \pm 0,42$  e  $53,88 \pm 0,08$   $\mu$ g/mL, respectivamente. Esses resultados confirmaram aqueles obtidos pelo método DPPH anteriormente descritos.

A peroxidação lipídica, processo oxidativo, inicia-se com a reação de um radical livre com o ácido graxo insaturado, resultando na formação de hidroperóxidos lipídicos e aldeídicos (LIMA; ABDALLA, 2001). Dessa forma, o método de determinação das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA) consiste na reação desse ácido com os produtos de decomposição dos hidroperóxidos, sendo que um dos principais produtos formados é o malonaldeído (MDA). Cada molécula de MDA reage com duas moléculas de TBA, formando um complexo de cor vermelha que apresenta absorção a 532-535 nm (OSAWA; FELÍCIO; GONÇALVES, 2005). Assim, os resultados obtidos na presente investigação demonstraram que o EE e as frações das folhas de *V. condensata* reduziram a produção de MDA (Tabela 7). No entanto, após cinco (5) dias de experimento, a FA foi a mais efetiva em inibir a formação de MDA, demonstrando grande potencial para a busca de substâncias com atividade antioxidante.

Evidências de produtos naturais com ação antioxidante têm sido descritas na literatura e a mesma parece somar-se àquela do sistema antioxidante endógeno (KANTER, 1998). Assim, um grande número de trabalhos sobre plantas medicinais com potencial ação antioxidante tem sido desenvolvido nos últimos anos (NG; LIU; WANG, 2000; SCHINELLA et al., 2002). Essa ação advém da formação de constituintes do metabolismo secundário que são produzidos pelas plantas para protegê-las dos radicais livres gerados pelo estresse oxidativo imposto pela radiação

solar e outros estresses ambientais (SCARTEZZINI, 2000). Entre os constituintes fenólicos presentes nos extratos vegetais destacam-se os flavonoides, taninos, catequinas, proantocianidinas e alguns ácidos polifenólicos (ACKER et al., 1996; NG; LIU; WANG, 2000).

Com base nos resultados encontrados, pode-se afirmar que o EE e as frações FB e FA das folhas de *V. condensata* apresentam substâncias doadoras de elétrons e prótons, capazes de neutralizar radicais livres e torná-los produtos mais estáveis, além da capacidade em reduzir intermediários oxidativos dos processos de peroxidação lipídica.

Com relação ao potencial antibacteriano, as investigações de novos antimicrobianos em extratos vegetais justificam-se pela grande variedade de substâncias químicas presentes nas diferentes partes das plantas que exibem ação farmacológica (COWA, 1999; NASCIMENTO et al., 2000; SHER et al., 2009).

O método de difusão em ágar foi utilizado para a triagem da provável atividade antibacteriana do EE e frações das folhas de *V. condensata*. Os resultados obtidos revelaram que o EE e a FB não foram ativos frente às cepas bacterianas testadas. Contudo, FH, FD e FA inibiram o crescimento bacteriano. A FD foi mais ativa frente ao *S. aureus*, sendo também ativa contra as cepas de *E. coli* e *Salmonella typhimurium*, e não demonstrou atividade frente a *P. aeruginosa*. A FH mostrou-se ativa contra as cepas de *S. aureus* e *E. coli*. A FA evidenciou atividade apenas frente à *S. aureus*. A atividade demonstrada por essas frações pode ser atribuída aos metabólitos secundários detectados na etapa de prospecção fitoquímica. Segundo Cechinel Filho e Yunes (1998), a FD possui substâncias pertencentes às classes das lignanas, flavonoides metoxilados, sesquiterpenos, lactonas, triterpenos e cumarinas. A FA contém flavonoides, taninos, xantonas, ácidos triterpênicos, saponinas e substâncias fenólicas em geral. Na FH, por sua vez, é possível encontrar terpenos e esteroides. Estudos demonstraram que diferentes substâncias pertencentes às classes citadas apresentam atividade antimicrobiana (AKIYAMA et al., 2001; CUSHNIE; LAMB, 2006; MANDAL et al., 2005; SHER, 2009; SOLÍS et al., 2004).

O aumento crescente da frequência de cepas bacterianas resistentes a antibióticos, como por exemplo, *S. aureus* resistente à oxacilina, meticilina e com o provável surgimento de linhagens resistentes à vancomicina e *E. coli* resistente às tetracilinas, estreptomicinas, sulfonamidas, ampicilina e kanamicina (COSTA et al.,

2006; SADER et al., 1993), torna-se importante a busca por novos fármacos. Assim, para um melhor entendimento dos resultados preliminares obtidos no teste de difusão em ágar procedeu-se à determinação da CIM. Como não se pode correlacionar efetivamente o tamanho do halo de inibição e o potencial antimicrobiano, todas as amostras tiveram as CIMs determinadas. Uma das justificativas para essa não correlação entre os valores do halo de inibição e a CIM é a diferença no grau de difusibilidade dos produtos ativos no gel de agarose (VALGAS et al., 2007).

Os resultados da CIM para o EE e as frações ratificaram os resultados da difusão em ágar, sendo que as CIMs mais significativas foram observadas com EE (2,5 mg/mL), FH (1,25 mg/mL), FD (2,5 mg/mL) e FA (1,25 mg/mL) frente ao *S. aureus*. A FA teve ação bactericida a 1,25 mg/mL para *S. aureus*. A FD teve CIM significativa também frente às cepas de *E. coli* e de *Salmonella typhimurium*.

O estudo da toxicidade aguda demonstrou que o EE, administrado por via oral, não induziu a morte de animais no modelo experimental adotado. A DL<sub>50</sub> é utilizada como um dos principais parâmetros para avaliação da toxicidade aguda. A ausência de óbitos conferiu margem de segurança para a utilização do extrato. Entretanto, as doses administradas produziram sonolência. Esse efeito demonstrou que provavelmente o extrato possuía uma ação sobre o Sistema Nervoso Central (SNC) como indutor do sono.

Considerando que o uso de fármacos analgésicos e anti-inflamatórios disponíveis comercialmente exerce uma gama de efeitos adversos, existe um grande interesse por parte dos pesquisadores em investigar novos agentes terapêuticos a partir de produtos naturais (BOVILL, 1997; FAGUNDES et al., 2010; SOUSA et al., 2010). Nesse contexto, estudos têm sido realizados com produtos naturais em modelos de dor e inflamação com intuito de avaliar o potencial farmacológico, bem como desenvolver novas opções terapêuticas (BOVILL, 1997; FAGUNDES et al., 2010; MATTA et al., 2011; SOUSA et al., 2010; VÁZQUEZ et al., 2011; YUAN et al., 2006)

No presente estudo, o EE foi investigado usando modelos clássicos de nocicepção (contorções abdominais induzidas por ácido acético e testes da formalina e placa quente) e inflamação aguda (testes do edema de pata e pleurisia induzida por carragenina). Os resultados indicaram que o EE possui atividades

antinociceptiva e anti-inflamatória, fornecendo a base científica para explicar, em parte, o uso da espécie na medicina popular brasileira.

O teste de contorções abdominais, mesmo inespecífico, tem sido largamente usado como uma ferramenta básica para avaliar as propriedades analgésica e anti-inflamatória de produtos naturais e sintéticos com ação central e/ou periférica (LAPA et al., 2008). Segundo Collier e outros (1968), o ácido acético age indiretamente induzindo a liberação de mediadores endógenos sensíveis a fármacos anti-inflamatórios não-esteroides e opioides (FISCHER et al., 2008). Esse ácido também promove um aumento de PGE2 e PGF2, histamina, bradicinina, serotonina, substância P e algumas citocinas (IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  e IL-8) que sensibilizam os nociceptores em propagar o estímulo doloroso (BASTOS et al., 2001; DERAEDT et al., 1980; NEMIROVSKY et al., 2001; RIBEIRO et al., 2000; VERMA et al., 2005; WHITTLE, 1964). Contudo, os mediadores inflamatórios mais importantes são as prostaglandinas, pois causam a hiperalgesia ao tornar as fibras nociceptivas aferentes potencialmente mais sensíveis aos diferentes mediadores da dor e inflamação (SANTOS et al., 1998). Além disso, o resultado obtido corrobora com os estudos realizados previamente (FRUTUOSO et al., 1994; RISSO; CARMINIO; MOREIRA, 2010; VALVERDE et al., 2001).

A nocicepção induzida por formalina foi empregada no presente estudo, pois causa um dano local do tecido da pata e é indicativo de dor inflamatória localizada e tônica, possuindo significado clínico (DUBUISSON; DENNIS, 1977). Este teste exhibe duas fases distintas: a primeira fase é caracterizada por dor neurogênica causada pela estimulação química direta dos nociceptores e a segunda fase tem como característica a dor inflamatória gerada por uma combinação de estímulo, incluindo a inflamação dos tecidos periféricos e mecanismos de sensibilização central. Nesta última fase, diferentes mediadores tais como aminoácidos excitatórios, neuropeptídeos, PGE2, óxido nítrico e cininas estão envolvidos (HUNSKAAR; FASMER; HOLE, 1985; TAYLOR; PETERSON; BASBAUM, 1995). Após 60 min da injeção de formalina, o EE inibiu ambas as fases do tempo da lambida. Sugere-se que a primeira fase seja devido a uma ação central, enquanto a segunda seja decorrente de uma resposta inflamatória que pode ser inibida por fármacos anti-inflamatórios não-esteroides e corticosteroides (DUBUISSON; DENNIS, 1977; HUNSKAAR; FASMER; HOLE, 1985). Os resultados revelaram que o EE possui

constituintes ativos com ação central e periférica, sendo essa a primeira descrição na literatura dessa observação.

Para distinção dos efeitos antinociceptivos central e periférico, o EE foi avaliado pelo método da placa quente, considerado um teste sensível a substâncias com ação central e que agem na modulação da dor ao nível supraespinhal (NEMIROVSKY et al., 2001). Neste estudo, a ação antinociceptiva do EE não dependeu totalmente do sistema opioide, pois o tratamento com naloxona não reverteu completamente o efeito (SOUSA et al., 2010). Além disso, após estímulo térmico os camundongos mostraram-se letárgicos, indicando um efeito sedativo que pode explicar a atividade analgésica independente da ação opioide.

Para melhor entendimento dos sinais de sonolência e letargia observados nos experimentos de toxicidade aguda e teste da placa quente e para esclarecer a atividade analgésica independente do sistema opioide, o sono em camundongos foi induzido com diazepam, pentobarbital e meprobamato na presença do EE. Os benzodiazepínicos, como o diazepam, agem em sítios específicos ligados ao receptor do ácido  $\gamma$ -aminobutírico ( $GABA_A$ ) e potencializam a transmissão gabaérgica que pode estar relacionada à atividade sedativa (CAMPO-SORIA; CHANG; WEISS, 2006). O prolongamento do tempo do sono induzido por pentobarbital pode ser devido à ação tranquilizante, assim como a ação depressora do SNC associada aos receptores  $GABA_A$  (HO; HARRIS, 1981). Embora o mecanismo responsável pela ação sedativa do meprobamato não esteja totalmente elucidado, pode ser devido ao efeito depressor do SNC ou ao aumento da transmissão gabaérgica (HINTON; MARLEY, 1959). O EE potencializou, significativamente, a duração do sono em camundongos induzido por diazepam, pentobarbital e meprobamato sugerindo, provavelmente, uma ação tranquilizante, bem como depressora do SNC (CAMPO-SORIA; CHANG; WEISS, 2006; HINTON; MARLEY, 1959; HO; HARRIS, 1981). Entretanto, as substâncias responsáveis pelo efeito hipnótico de *V. condensata* não são claramente conhecidas e o efeito não pode ser concluído baseado nos resultados do presente estudo. Por outro lado, outras plantas que contêm substâncias tais como flavonoides, terpenos e saponinas têm demonstrado este mesmo efeito (RAKOTONIRINA et al., 2001). Portanto, pode-se especular que esses constituintes contribuem para o efeito sedativo de *V. condensata*, pois estas classes químicas foram detectadas no presente estudo. Flavonoides com atividades ansiolítica e/ou antidepressiva também têm sido

descritos em plantas usadas na medicina popular. Este efeito tem sido devido à afinidade pelos receptores dos benzodiazepínicos (RAKOTONIRINA et al., 2001). Pode-se, então, sugerir que os flavonoides detectados em *V. condensata* contribuem para os efeitos sedativos através dos receptores dos benzodiazepínicos.

O efeito anti-inflamatório observado no teste da formalina foi confirmado no edema de pata induzido por carragenina em ratos, um modelo animal largamente empregado para avaliar substâncias anti-inflamatórias. A resposta inflamatória induzida por carragenina é caracterizada pela formação de edema resultando da ação de diversos mediadores tais como histamina, serotonina e bradicinina; isto é subsequentemente sustentada pela liberação de prostaglandinas produzida pela isoformas da ciclo-oxigenase (COX-2) (DI ROSA; GIROUD; WILLOUGHBY, 1971; NANTEL et al., 1999; SEIBERT et al., 1994). No presente estudo, o tratamento oral com EE inibiu o edema de pata induzido por carragenina. A redução do edema pelo EE provavelmente é decorrente da inibição de mediadores da inflamação tais como bradicinina, histamina, substância P e fator de agregação plaquetária (DE CAMPOS et al., 1996; GILLIGAN et al., 1994; HWANG et al., 1986; STOCHLA; MASLINSKI, 1982). Esta evidência sugere que as ações anti-inflamatórias do EE estão associadas à inibição de uma ou mais vias de sinalização intracelular envolvidas nos efeitos desses mediadores.

O modelo de pleurisia induzida por carragenina foi utilizado para obter novas perspectivas sobre os efeitos anti-inflamatórios do EE. A injeção intrapleural de carragenina causou um acúmulo significativo de exsudado seguido por uma intensa migração de células inflamatórias para a cavidade pleural (AMMENDOLA; DI ROSA; SORRENTINO, 1975; COMPASSO et al., 1975; VINEGAR; TRUAX; SELPH, 1973). Este método investiga os mecanismos envolvidos na inflamação aguda e também avalia a eficácia de substâncias anti-inflamatórias (AMMENDOLA; DI ROSA; SORRENTINO, 1975; COMPASSO et al., 1975; MIYASAKA; MIKAMI, 1982; VINEGAR; TRUAX; SELPH, 1973). Os anti-inflamatórios não-esteroides como a indometacina inibem o acúmulo de exsudato e a migração leucocitária no período de 3 a 6 horas após a aplicação de carragenina (VINEGAR et al., 1973). O tratamento com EE reduziu significativamente o volume de exsudado pleural e a migração de leucócitos, confirmando a atividade anti-inflamatória observada pelo método do edema de pata.

Estudos têm atribuído as atividades antinociceptiva e anti-inflamatória de extratos vegetais às substâncias flavonoídicas e terpenoídicas (COSTA et al, 2008; KIM et al, 2004). Entre os fitoconstituintes detectados no presente estudo encontram-se os flavonoides que, segundo Olszanecki e outros (2002), são potentes inibidores da enzima óxido nítrico sintase tipo 2, responsável pela síntese do óxido nítrico (NO), que indiretamente bloqueia as vias da ciclo-oxigenase e/ou lipo-oxigenase e da proteína quinase C e L-arginina/NO (MEOTTI et al., 2005; ROBAK et al., 1998). A associação entre a liberação de NO das células endoteliais, a habilidade de flavonoides em induzir a vasodilatação e a importância desse evento fisiológico nos mecanismos antinociceptivo e anti-inflamatório têm sido descritos (NASERI; HAMIDI; HEIDARI, 2005). Além disso, os flavonoides são capazes de inibir a fosfolipase A2 e a fosfolipase C, importantes enzimas da cascata de mediadores dos processos inflamatórios (MIDDLETON; KANDASWAMI; THEOHARIDES, 2000).



## 7- CONCLUSÃO

---

Com o presente estudo verificou-se que o extrato etanólico das folhas de *V. condensata* é uma provável fonte de novos fármacos. Os resultados apresentados indicam possibilidades de diversos empregos das substâncias presentes neste extrato tais como agentes analgésicos, anti-inflamatórios, sedativos e antioxidantes para a terapia da dor e doenças inflamatórias. Os resultados obtidos podem também se correlacionarem com o uso da *V. condensata* na medicina tradicional o que requer, porém, maiores estudos clínicos e toxicológicos para comprovar a eficácia e a segurança dos extratos e das frações.

A prospecção fitoquímica permitiu a detecção da presença de taninos, flavonoides, cumarinas, triterpenos e esteroides, saponinas e substâncias fenólicas no extrato etanólico e frações das folhas de *V. condensata*.

O extrato etanólico e frações apresentaram resultados que permitiram as seguintes conclusões:

- A fração em acetato de etila e butanólica apresentaram resultados promissores para a investigação de substâncias fenólicas, especialmente flavonoides com potencial atividade antioxidante;
- Os resultados da atividade antibacteriana revelaram que o extrato etanólico e as frações das folhas de *V. condensata* foram ativos em maior ou menor grau frente às amostras de referência testadas, sendo um ponto de partida para o aprofundamento das investigações visando a busca de novos agentes antimicrobianos;
- Os resultados observados nos ensaios que avaliaram os efeitos antinociceptivo e anti-inflamatório no extrato etanólico dão ensejo para se continuar o trabalho com as demais frações;
- Os resultados apresentados abrem perspectivas para o futuro isolamento, purificação e identificação das substâncias bioativas desta espécie vegetal que possam ser utilizadas no tratamento da dor e inflamação;
- O resultado preliminar significativo do teste de indução ao sono esboça uma abordagem a ser seguida para estudos mais aprofundados com *V. condensata*.

## 8- REFERÊNCIAS

---

ACKER, S.A.B.E.; BERG, D.J.V.D.; TROMP, M.N.J.L.; GRIFFIOEN, D.H.; BENNEKOM, W.P.V.; VIJGH, W.J.F.V.D.; BAST, A. Structural aspects of antioxidant activity of flavonoids. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 20, n. 3, p. 331-342, 1996.

ADEBOYE, J.O.; ASIJE, W.; AWE, S.O. Diuretic and antidiuretic activity of the leaf extracts of *Vernonia cinerea* (Less) (fam. Compositae). **Phytotherapy Research**, v. 11, n. 6, p. 454-456, 1997.

AGUILAR, M.A.P. **Caracterização molecular da resistência aos carbapenêmicos em Enterobactérias isoladas em hospitais brasileiros**. 2009. 127f. Dissertação (Mestrado em Farmácia – Análises Clínicas) – Universidade de São Paulo, 2009.

AHMAD, I.; MEHMOOD, Z.; MOHAMMAD, F. Screening of some Indian medicinal plants for their antimicrobial properties. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 62, n. 2, p. 454-456, 1997.

AHMAD, I.; CHAUDHARY, B.A.; JANBAZ, K.H. Cinerascenone, a new flavonoid from *Vernonia cinerascens*. **Journal of the Chemistry Society of Pakistan**, v. 32, n. 1, p. 101-103, 2010.

AKINPELU, D.A. Antimicrobial activity of *Vernonia amygdalina* leaves. **Fitoterapia**, v. 70, n. 4, p. 432-434, 1999.

AKIYAMA, H.; FUJII, K.; YAMASAKI, O.; OONO, T.; IWATSUKI, K. Antibacterial action of several tannins against *Staphylococcus aureus*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 48, n. 4, p. 487-491, 2001.

ALAWA, C.B.; ADAMU, A.M.; GEFU, J.O.; AJANUSI, O.J.; ADBU, P.A.; CHIEZEY, N.P.; ALAWA, J.N.; BOWMAN, D.D. *In vitro* screening of two Nigerian medicinal plants (*Vernonia amygdalina* and *Annona senegalensis*) for anthelmintic activity. **Veterinary Parasitology**, v. 113, n. 1, p. 73-81, 2003.

ALIYU, A.B.; IBRAHIM, M.A.; MUSA, A.M.; BULUS, T.; OYEWALE, A.O. Phenolics contents and antioxidant capacity of extracts and fractions of *Vernonia blumeoides* (Asteraceae). **International Journal of Biological Chemistry**, v.5, n. 6, p. 352-359, 2011.

ALMEIDA, M.G. Cultura Ecológica e Biodiversidade. **Mercator – Revista de Geografia da UFC**, ano 2, n. 3, p. 71-82, 2003.

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.

ANDREO, G.; JORGE, N. Antioxidantes naturais: técnicas de extração. **Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, v. 24, n. 2, p. 319-336, 2006.

ARAÚJO, P.W.B.; QUINTANS JÚNIOR, L.J.; VASCONCELOS, H.D.; ALMEIDA, J.R. G.S. Flavonoides e hipertensão. **Revista Brasileira de Hipertensão**, v. 12, n. 3, p. 188-189, 2005.

AURICCHIO, M.T.; BACCHI, E.M. Folhas de *Eugenia uniflora* L. (pitanga): propriedades farmacobotânicas, químicas e farmacológicas. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 62, n. 1, p. 55-61, 2003.

AWE, S.O.; MAKINDE, J.M.; OLAJIDE, O.A. Effects of *Allium sativum* and *Vernonia amygdalina* on thrombosis in mice. **Phytoterapy Research**, v. 12, n. 1, p. 57-58, 1998.

AWE, S.O.; MAKINDE, J.M.; OLAJIDE, O.A. Cathartic effect of the leaf extract of *Vernonia amygdalina*. **Fitoterapia**, v. 70, n. 2, p. 161-165, 1999.

BASTOS, J.K.; CARVALHO, J.C.T.; SOUZA, G.H.B.; PEDRAZZI, A.H.P.; SARTI, S.J. Anti-inflammatory activity of cubebin, a lignan from the leaves of *Zanthoxylum naranjillo* Griseb. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 75, n. 2, p. 279-282, 2001.

BENZIE, I.F.F., STRAIN, J.J. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of antioxidant power: The FRAP assay. **Analytical Biochemistry**, v. 239, n.1, p. 70-76. 1996.

BIANCHI, M.L.P.; ANTUNES, L.M.G. Radicais livres e os principios antioxidantes da dieta. **Revista de Nutrição**, v. 12, n. 2, p. 123-130, 1999.

BLUMENTHAL, M. **Herbal medicines**. Austin: Integrative Medicine Communications, 2000. 519 p.

BORCHERS, A.T.; KEEN, C.L.; STERN, J.D.; GERSHWIN, E. Inflammation and native American medicine: the role of botanicals. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 72, n. 2, p. 339-347, 2000.

BOVILL, J.G. Mechanisms of actions of opioids and non-steroidal anti-inflammatory drugs. **European Journal of Anaesthesiology**, v. 15, n. X, p. 9S-15S, 1997.

BOUCHER, H.W.; TALBOT, G.H.; BRADLEY, J.S.; EDWARDS, J.E.; GILBERT, D.; RICE, L.B.; SCHELD, M.; SPELLBERG, B.; BARTLETT, J. Bad bugs, no drugs: no ESCAPE! **An update from the Infectious Diseases Society of America. Clinical and Infectious Diseases**, v. 48, n. 1, p. 1-12, 2009.

BOUZADA, M.; FABRI, R.; NOGUEIRA, M.; KONNO, T.; DUARTE, G.; SCIO, E. Antibacterial, cytotoxic and phytochemical screening of some traditional medicinal plants in Brazil. **Pharmaceutical Biology**, v. 47, n. 1, p. 44-52, 2009.

BRAND, W.; CUVELIER, M.E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **LWT – Food Science and Technology**, v. 28, n. 1, p. 25-30. 1995.

BRASILEIRO, B.G.; PIZZILO, V.R.; RASLAN, D.S.; JAMAL, C.M.; SILVEIRA, D. Antimicrobial and cytotoxic activities screening of some Brazilian medicinal plants used in Governador Valadares district. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 42, n. 2, p. 195-202, 2006.

BREMER, K. **Asteraceae. Cladistics and Classification**. Oregon: Timber Press, Portland, 1994. 752 p.

BROINIZI, P.R.B.; ANDRADE-WARTHA, E.R.S.; SILVA, A.M.O.; NOVOA, A.J.V.; TORRES, R.P.; AZEREDO, H.M.C. Avaliação da atividade antioxidante dos compostos fenólicos naturalmente presentes em subprodutos do pseudofruto de caju (*Anacardium occidentale* L.). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 27, n. 4, p. 902-908, 2007.

BRUNE, K. Persistence of NSAIDs at effect sites and rapid disappearance from side-effect compartments contributes to tolerability. **Current Medical Research and Opinion**, v. 23, n. 12, p. 2985-2995, 2007.

BRUNE, K.; FURST, D.E. Combining enzyme specificity and tissue selectivity of cyclooxygenase inhibitors: towards better tolerability? **Rheumatology**, v. 46, n. 6, p.911–919, 2007.

BUEGE, J.A.; AUST, S.D. Microsomal lipid peroxidation. **Methods in Enzimology**, v. 52, n. X, p. 302-310, 1978.

CABRERA, A.L.; KLEIN, R.M. Compostas. Tribo Vernonieae. In.: REITZ, P. R. (Ed.) **Flora Ilustrada Catarinense**, Itajaí: Herbário Barbosa Rodrigues, 1980. p. 224-226.

CAMPO-SORIA, C.; CHANG, Y.; WEISS, D.S. Mechanism of action of benzodiazepines on GABA<sub>A</sub> receptors. **British Journal of Pharmacology**, v. 148, n. 7, p.984–990, 2006.

CANCELLI, R.R.; EVALDT, A.C.P.; BAUERMANN, S.G. Contribuição à morfologia polínica da família Asteraceae Martinov. no Rio grande do Sul – parte 1. **Pesquisas Botânica**, v. X, n. 58, p. 347-374, 2007.

CARVALHO, W.A.; LEMÔNICA, L. Mecanismos celulares e moleculares da dor inflamatória. Modulação periférica e avanços terapêuticos. **Revista Brasileira de Anestesiologia**, v. 48, n. 2, p. 137-158, 1998a.

CARVALHO, W.A.; LEMÔNICA, L. Mecanismos Centrais de Transmissão e de Modulação da dor. Atualização Terapêutica. **Revista Brasileira de Anestesiologia** v. 48, n. 3, p. 221-240, 1998b.

CARVALHO, J.C.T. **Fitoterápicos Anti-Inflamatórios: Aspectos Químicos, Farmacológicos e Aplicações Terapêuticas**. Ribeirão Preto: ed. Tecmed, 2004. 408 p.

CASTRO, D.M. **Plantas medicinais**. Viçosa: Editora UFV, 2000. 220 p.

CASTRO, M.S.; PILGERA, D.; FERREIRA, M.B.C.; KOPITKEA, L. Tendências na utilização de antimicrobianos em um hospital universitário 1990-1996. **Revista de Saúde Pública**, v. 36, n. 5, p. 553-558, 2002.

CAVIN, A; POTTERAT, O; WOLFENDER, J.L.; HOSTETTMAN, K.; DYATMYKO, W. Use of on-flow LC/H-1 NMR for the study of an antioxidant fraction from *Orophea enneandra* and isolation of a polyacetylene, lignans, and a tocopherol derivative. **Journal of Natural Products**, v. 61, n. 12, p.1497-1501, 1998.

CECHINEL FILHO, V.; YUNES, R.A. Estratégias para a obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais. Conceitos sobre modificação estrutural para otimização da atividade. **Química Nova**, v. 21, n. 1, p. 99-105, 1998.

CHIARI, E.; DUARTE, D.S.; RASLAN, D.S.; SAÚDE, D.A.; PERRY, K.S.P.; BOAVENTURA, M.A.D.; GRANDI, T.S.M.; STEHMANN, J.R.; ANJOS, A.M.G.; OLIVEIRA, A.B. In vitro screening of Asteraceae plant species against *Trypanosoma cruzi*. **Phytotherapy Research**, v. 10, n. 7, p. 636-638, 1996.

CHUNG, K.T.; WONG, T.Y.; HUANG, Y.W.; LIN, Y. Tannins and human health: a review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 38, n. 6, p. 421-464, 1998.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. **Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically**; Approved Standard – Eight Edition. CLSI document M07-A8. Wayne, PA, 2009a.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. **Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests**; Approved Standard – Tenth Edition. CLSI document M2-A10. Wayne, PA, 2009b.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. **Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing**; Twenty first informational supplement. CLSI Document M100-S21, 2011.

COATES, A.R.M; HU, Y. Novel approaches to developing new antibiotics for bacterial infections. **British Journal of Pharmacology**, v. 152, n. 8, p. 1147-1154, 2007.

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.

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

COSTA, F.J.; BANDEIRA, P.N.; ALBUQUERQUE, M.R.J.R.; PESSOA, O.D.L.; SILVEIRA, E.R.; BRAZ-FILHO, R. Constituintes químicos de *Vernonia chalybaea* Mart. **Química Nova**, v. 31, n. 7, p.1691-1695, 2008.

COSTA, M.M. da; Silva, M.S.; Spricigo, D.A.; WITT, N.M.; MARCHIORO, S.B.; KOLLING, L.; VARGAS, A.P.C. Caracterização epidemiológica, molecular e perfil de resistência aos antimicrobianos de *Escherichia coli* isoladas de criatórios suínos do sul do Brasil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 26, n.1, p. 5-8, 2006.

COWAN, M.M. Plants products as antimicrobial agents. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 12, n. 4, p. 564-582, 1999.

CUNICO, M.M.; CARVALHO, J.L.S.; KERBER, V.A.; HIGASKINO, C.E.K.; CRUZ ALMEIDA, S.C.; MIGUEL, M.D.; MIGUEL, O.G. Atividade antimicrobiana do extrato bruto etanólico de raízes e partes aéreas de *Ottonia martiana* Miq. (Piperaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 14, n. 2, p. 97-103, 2004.

CUSHNIE, T.P.; LAMB, A.J. Antimicrobial activity of flavonoids. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 26, n. 5, p. 343-56, 2006.

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 B<sub>2</sub> receptor antagonist. **European Journal of Pharmacology**, v. 316, n. 2-3, p. 277-286, 1996.

DEL-VECHIO-VIEIRA, G.; SOUZA, O. V.; YAMAMOTO, C.H.; KAPLAN, M.A.C. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oils of *Ageratum fastigiatum* (Asteraceae). **Record of Natural Products**, v. 3, n. 1, p. 52-57, 2009.

DEMAIN, A.L. Prescription for an ailing pharmaceutical industry. **Nature Biotechnology**. v. 20, n. X, p.331, 2001.

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

DEVIENNE, K.F.; RADDI, M.S.G.; POZETTI, G.L. Das plantas medicinais aos fitofármacos. **Revista Brasileira de Plantas medicinais**, v. 6, n. 3, p.11-14, 2004.

DEWEY, L. W.; BRASE, D.; WELCH, S. P. Controle da dor com analgésicos opioides. In: BRODY, T.M. et al. **Farmacologia humana: da molecular à clínica**. 2ª ed. Missouri: Guanabara Koogan,1994. p. 229-343.

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

DI STASI, L. C. Arte, Ciência e Magia. In: DI STASI, L.C. (Org.). Plantas medicinais: arte e ciência. **Um guia de estudo interdisciplinar**. São Paulo: Editora UNESP, 1996. p. 15-21.

DICKESON, A.H.; KIEFFER, B. Opiates: basic mechanism. In: McMahon SB and Klotzenburg M. (Eds). **Wall and Melzack's. Textbook of pain**. 5ª ed., Endinburg: Churchill Livingstone, cap. 27, 2006. p. 427-457.

DIETRICH, L. A new approach to practical acute toxicity testing. **Archives of Toxicology**, v. 54, n. 4, p. 275-287, 1983.

DONATINI, R. S.; ISHIKAWA, T.; BARROS, S. B. M.; BACCHI, E. M. Atividades antiúlcera e antioxidante do extrato de folhas de *Syzygium jambos* (L.) Alston (Myrtaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 19, n. 1, p. 89-94, 2009.

DORNAS, W.C.; OLIVEIRA, T.T.; RODRIGUES-DAS-DORES, R.G.; SANTOS, A.F.; NAGEM, T.J. Flavonoides: potencial terapêutico no estresse oxidativo. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 28, n. 3, p. 241-249, 2007.

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.

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

ELOFF, J.N. Quantifying the bioactivity of plant extracts during screening and bioassay-guided fractionation. **Phytomedicine**, v.11, n. X, p. 370-371, 2004.

ERASTO, P.; GRIERSON, D.S.; AFOLAYAN, A.J. Bioactive sesquiterpene lactones from the leaves of *Vernonia amygdalina*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 106, n. 1, p.117-120, 2006.

ESTERBAUER, H.; LANG, J.; ZADRAVEC, S.; SLATER, T.F. Detection of malonaldehyde high performance liquid chromatography. **Methods in Enzimology**, v. 105, n. X, p. 319-328, 1984.

FAGUNDES, L.L.; DEL-VECHIO-VIEIRA, G.; PINHO, J.J.R.G.; YAMAMOTO, C.H.; ALVES, M.S.; STRINGHETA, P.C.; SOUSA, O.V. Pharmacological proprieties of the ethanol extract of *Muehlenbeckia platyclada* (F. Muell.) Meisn. leaves. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 11, n. 10, p. 3942-3953, 2010.

FALAGAS, M.E.; BLIZIOTIS, I.A. Pandrug-resistant Gram-negative bacteria: the dawn of the post-antibiotic era? **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 29, n. 6, p. 630-636, 2007.

FARNSWORTH, N. R. Screening plants for new medicines. In: Wilson EO, editor. **Biodiversity**. Washington: National Academy Press, 1989. p. 83-97.

FERNANDES, P. Antibacterial discovery and development – the failure of success. **Nature Biotechnology**, v. 24, n. X, p. 1497-1503, 2006.

FISCHER, L.G.; SANTOS, D.; SERAFIN, C.; MALHEIROS, A.; DELLE MONACHE, F.; DELLE MONACHE, G.; CECHINEL FILHO, V.; SOUZA, M.M. Further antinociceptive properties of extracts and phenolic compounds from *Plinia glomerata* (Myrtaceae) leaves. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 31, n. 2, p. 235-239, 2008.

FRANKEL, E.N.; MEYER, A.S. The problem of using onedimensional methods to evaluate multifunctional food and biological antioxidants. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 80, n. 13, p.1925-1941, 2000.

FREI, C.R.; BURGESS, D.S. Continuous infusion  $\beta$ -lactamic for intensive care unit pulmonary infections. **Clinical Microbiology and Infection**. v. 11, n. 5, p. 418-421, 2005.

FRIES, D.S. Analgesics. In: Foye, W.O; Lemke, TL; Williams, D.A. Eds. **Medicinal Chemistry**. Baltimore: Ed. Williams e Wilkins, 1995. p. 247-269.

FRUTUOSO, V.S.; GURIAO, M.R.; CORDEIRO, R.S.; MARTINS, M.A. Analgesic and anti-ulcerogenic effects of a polar extract from leaves of *Vernonia condensata*. **Planta Medica**, v. 60, n. 1, p. 21-25, 1994.

FURLONG, E.B.; COLLA, E.; BORTOLATO, D.S.; BAISCH, A.L.M.; SOUZA-SOARES, L.A. Avaliação do potencial de compostos fenólicos em tecidos vegetais. **Revista Veter**, v. 13, n. 1, p. 105-114, 2003.

GARCÍA-LAFUENTE, A.; GUILLAMÓN, E.; VILLARES, A.; ROSTAGNO, M.A.; MARTÍNEZ, J.A. Flavonoids as anti-inflammatory agents: implications in cancer and cardiovascular disease. **Inflammation Research**, v. 58, n. 9, p. 537–552, 2009.

GANDRA, P.G.; ALVES, A.A.; MACEDO, D.V.; KUBOTA, L.T. Determinação eletroquímica da capacidade antioxidante para avaliação do exercício físico. **Química Nova**, v. 27, n. 6, p. 980-985, 2004.

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, n. 3, p. 285-292, 1994.

GONZÁLEZ-GALLEGO, J.; SÁNCHEZ-CAMPOS, S.; TUÑÓN, M.J. Anti-inflammatory properties of dietary flavonoids. **Nutrición Hospitalaria**, v. 22, n. 3, p. 287-293, 2007.



GUIMARAES, D. O.; MOMESSO, L.S.; PUPO, M.T. Antibióticos: importância terapêutica e perspectivas para a descoberta e desenvolvimento de novos agentes. **Química Nova**, v. 33, n. 3, p. 667-679, 2010.

GUPTA, M.; MAZUNDER, U.K.; MANIKANDAN, L.; HALDAR, P.K.; BHATTACHARYA, S.; KANDAR, C.C. Antibacterial activity of *Vernonia cinerea*. **Fitoterapia**, v. 74, n. 1-2, p. 148-150, 2003.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. **Free radicals in Biology and Medicine**. Oxford: Clarendon Press, 1989. 543 p.

HARMAN, D. Aging – A theory based on free-radical and radiation-chemistry. **Journal of Gerontology**, v.11, n. X, p. 298-300, 1956.

HINTON, J.M.; MARLEY, E. The effects of meprobamate and pentobarbitone sodium on sleep and motility during sleep: A controlled trial with psychiatric patients. **Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry**, v. 22, n. 2, p.137-140, 1959.

HIRAMATSU, K.; ARITAKA, N.; HANAOKI, H.; KAWASAKI, S.; HOSODA, Y.; HORI, S. Methicilin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical strain with reduced vancomycin susceptibility. **The Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 35, n. 9, p.1670-1673, 1997.

HO, I.K.; HARRIS, R.A. Mechanism of action of barbiturates. **Annual Reviews of Pharmacology and Toxicology**, v. 21, n. X, p. 83-111, 1981.

HODGSON, E. **A Textbook of Modern Toxicology**. 3<sup>rd</sup> ed. New Jersey: Wiley-Interscience, 2004. 582p.

HUO, J.; YANG, S.P.; XIE, B.J.; LIAO, S.G.; LIN, L.P.; DING, J.; YUE, J.M. Cytotoxic sesquiterpenoids from *Vernonia bockiana*. **Journal of Asian Natural Products Research**, v. 10, n. 5-6, p. 571-575, 2008.

HUNSKAAR, S.; FASMER, O.B.; HOLE, K. Formalin test in mice, a useful technique for evaluating mild analgesics. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 14, n. 1, p. 69-79, 1985.

HUNSKAAR, S.; HOLE, K. The formalin test in mice: dissociation between inflammatory and non-inflammatory pain. **Pain**, v. 30, n. 1, p.103-114, 1987.

HWANG, S.B.; LAM, M.H.; LI, C.L.; SHEN, T.Y. Release of platelet activation factor and its involvement in the first phase of carrageenin-induced rat foot edema. **European Journal of Pharmacology**, v. 120, n. 1, p. 33-41, 1986.

IGILE, G.O.; OLESZEK, W.; JURZYSTA, M.; BURDA, S.; FAFUNSO, M.; FASANMADE, A.A. Flavonoids from *Vernonia amygdalina* and their antioxidant activities. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 42, n. 11, p. 2445-2448, 1994.

ITA, B.N. Evaluation of the role of solvents on the extractable contents of total phenolics and flavonoids in Nigerian fruits/vegetables. **Nigerian Journal of Agriculture, Food and Environment**, v. 6, n. 1-2, p. 29-32, 2010.

JOLY, A.B. **Botânica: Introdução à taxonomia vegetal**. 12<sup>a</sup> ed. São Paulo: Companhia Editora Nacional, 1998. 777 p.

KANTER, M. Free radicals, exercise and antioxidant supplementation. **Proceeding Nutrition Society**, v. 57, n. X, p. 9-13, 1998.

KAPPUS, H. Lipid peroxidation: mechanisms, analysis, enzymology and biological relevance. In: Sies H, editor. **Oxidative stress**. London: Academic Press, 1985. p. 273-310.

KELMANSON, J.E.; JÄGER, A.K.; van STADEN, J. Zulu medicinal plants with antibacterial activity. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 69, n. 3, p. 241-246, 2000.

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

KOSTER, R., ANDERSON, M.; DE BEER, E.J. Acetic acid for analgesic screening. **Federation Proceedings**, v. 18, n. X, p. 412-416, 1959.

KUMAR, M.; BERWAL, J.S. Sensitivity of food pathogens to garlic (*Allium sativum*). **Journal of Applied Microbiology**, v. 84, n. 2, p. 213-215, 1998.

LATHA, R.M.; GEETHA, T.; VARALAKSHMI, P. Effect of *Vernonia cinerea* Less flower extract in adjuvant-induced arthritis. **General Pharmacology**, v. 31, n. 4, p. 601-606, 1998.

LE BARS, D.; GOZARIU, M.; CADDEN, S.W. Animal Models of nociception **Pharmacological Reviews**, v. 53, n. 4, p. 597-652. 2001.

LEE, S.E.; HWANG, H.J.; HA, J.S.; JEONG, H.S.; KIM, J.H. Screening of medicinal plant extracts for antioxidant activity. **Life Sciences**, v. 73, n. X, p. 167-179, 2003.

LEVY, C.S.; KOGULAN, P. ; GILL, V.J.; CROXTON, M.B.; KANE, J.G.; LUCEY, D.R. Endocarditis caused by penicillin-resistant *Viridans Streptococci*: 2 cases and controversies in therapy. **Clinical Infections Diseases**, v. 33, n. 4, p. 577-579, 2001.

LIMA, E.S.; ABDALLA, D.S.P. Peroxidação lipídica: mecanismos e avaliação em amostras biológicas. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 37, n. 3, p. 293-303, 2001.

LITCHFIELD, J.T.; WILCOXON, F.A. A simplified method of evaluating dose-effect experiments. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 96, n. 2, p. 99-113, 1949.

LIU, J.; LIU, Y.; SI, Y.; YU, S.; QU, J.; XU, S.; HU, Y.; MA, S. New vernocuminosides from the stem barks of *Vernonia cumingiana* Benth. **Steroids**, v. 74, n. 1, p. 51-61, 2009.

LOESER, J.D.; EGAN, K.J. **Managing the Chronic Pain Patient – Theory and Practice at the University of Washington Multidisciplinary Pain Center**. Washington: Raven Press, 1989. 253p.

LOGUERCIO, A.P.; BATTISTIN, A.; VARGAS, A.C.; HENZEL, A.; WITT, N.M. Atividade antibacteriana de extrato hidro-alcoólico de folhas de jambolão (*Syzygium cumini* (L.) Skells). **Ciência Rural**, v. 35, n. 2, p. 374-376, 2005.

LOLIS, M.I.G.A.; MILANEZE-GUTIERRE, M.A. Morfo-anatomia das folhas de *Vernonia condensata* Baker (Asteraceae), o "figatil". **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 13, n. 1, p. 68-71, 2003.

LOUREIRO, A.P.M.; DI MASCIO, P.; MEDEIROS, M.H.G. Formação de adutos exocíclicos com bases de DNA: implicações em mutagênese e carcinogênese. **Química Nova**, v. 25, n. 5, p. 777-782, 2002.

LORENZI, H.; MATOS, F.J.A. **Plantas Medicinais no Brasil – Nativas e Exóticas**. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2002. 544 p.

MACIEL, M.A.M.; PINTO, A.C.; VEIGA, J.R.; GRYNBERG, V.F.; ECHEVARRIA, A. Plantas medicinais a necessidade de estudos multidisciplinares. **Química Nova**, v. 25, n. 3, p. 429-438, 2002.

MADAPPA, T. *Escherichia coli* infections. **Medscape Reference**. Disponível em <http://emedicine.medscape.com/article/217485-overview>. Março de 2009. Site acessado em 24/06/2011.

MAIA, A.I.V.; TORRES, M.C.M.; PESSOA, O.D.L.; MENEZES, J.E.S.A.; COSTA, S.M.O.; NOGUEIRA, V.L.R.; MELO, V.M.M.; SOUZA, E.B.; CAVALCANTE, M.G.B.; ALBUQUERQUE, M.R.J.R. Óleos essenciais das folhas de *Vernonia remotiflora* e *Vernonia brasiliensis*: composição química e atividade biológica. **Química Nova**, v. 33, n. 3, p. 584-586, 2010.

MALAFRONTA, N.; PESCA, M.S.; BISIO, A.; MORALES ESCOBAR, L.; DE TOMMASI, N. New flavonoid glycosides from *Vernonia ferruginea*. **Natural Product Communications**, v. 4, n. 12, p. 1639-1642, 2009.

MANDAL, P.; SINHA BABU, S.P.; MANDAL, N.C. Antimicrobial activity of saponins from *Acacia auriculiformis*. **Fitoterapia**, v. 76, n. 5, p. 462-465, 2005.

MATTA, C.B.B.; SOUZA, É.T.; QUEIROZ, A.C.; LIRA, D.P.; ARAÚJO, M.V.; CAVALCANTE-SILVA, L.H.A.; MIRANDA, G.E.C.; ARAÚJO-JÚNIOR, J.X.; BARBOSA-FILHO, J.M.; SANTOS, B.V.O.; ALEXANDRE-MOREIRA, M.S. Antinociceptive and anti-inflammatory activity from algae of the genus *Caulerpa*. **Marine Drugs**, v. 9, n. X, p. 307-318, 2011.

MATA, A.T.; PROENÇA, C.; FERREIRA, A.R.; SERRALHEIRO, M.L.M.; NOGUEIRA, J.M.F.; ARAÚJO, M.E.M. Antioxidant and antiacetylcholinesterase activities of five plants used as Portuguese food spices. **Food Chemistry**, v. 103, n. 3, p. 778-786, 2007.

MATOS, F.J. **Introdução à fitoquímica experimental**. 2. ed., Fortaleza: Edições UFC, 1997. 150 p.

MENSOR, L.L.; MENEZES, F.S.; LEITÃO, G.G.; REIS, A.S.; DOS SANTOS, T.C., COUBE, C.S.; LEITÃO, S.G. Screening of Brazilian plant extracts for antioxidant activity by the use of DPPH free radical method. **Phytotherapy Research**, v. 15, n. 2, p. 127-130, 2001.

MEOTTI, F.C.; LUIZ, A.P.; PIZZOLATTI, M.G.; KASSUYA, C.A.L.; CALIXTO, J.B.; SANTOS, A.R.S. Analysis of the antinociceptive effect of the flavonoid myricitrin. Evidence for a role of the L-argininenitric oxide and protein kinase C pathways. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 316, n. 2, p. 789-796, 2005.

MERSKEY, H. Logic, truth and language in concepts of pain. **Quality of Life Research**, v. 3, n. 1, p. S69-76, 1994.

MICHALAK, A. Phenolic compounds and their antioxidant activity in plants growing under heavy metal stress. **Polish Journal of Environmental Studies**, v. 15, n. 4, p. 523-530, 2006.

MIDDLETON, E. Jr.; 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.

MISEREZ, F.; POTTERAT, O.; MARSTON, A.; MUNGAI, G.M.; HOSTETTMANN, K. Flavonol glycosides from *Vernonia galamensis* ssp. *nairobiensis*. **Phytochemistry**, v. 43, n. 1, p. 283-286, 1996.

MIYASAKA, K.; MIKAMI, T. Comparison of the anti-inflammatory effects of dexamethasone, indomethacin and BW755C on carrageenin-induced pleurisy in rats. **European Journal of Pharmacology**, v. 77, n. 4, p. 229-236, 1982.

MOELLERING, R.C. Jr.; GRAYBILL, J.R.; MCGOWAN, J.E. Jr.; COREY, L. Antimicrobial resistance prevention initiative – an update: proceedings of an expert panel on resistance. **The American Journal of Medicine**, v. 120, n. 7, p. S4-S25, 2007.

MONTEIRO, M.H.; GOMES-CARNEIRO, M.R.; FELZENSWALB, I.; CHAHOUD, I.; PAUMGARTEN, F.J. Toxicological evaluation of a tea from leaves of *Vernonia condensata*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 74, n. 2, p. 149-157, 2001.

MONTEIRO, W. O Brasil, as políticas nacionais e a conservação da diversidade biológica. In: **II Congresso Brasileiro de Unidades de Conservação 2**, 2000, Campo Grande, Anais. Campo Grande: Fundação Boticário de Proteção à Natureza, 2000, p. 97-103, v.1.

MORAES, M.D.; MONTEIRO, R. A família Asteraceae na planície litorânea de Picinguaba, Ubatuba, São Paulo. **Hoehnea**, v. 33, n. 1, p. 41-78, 2006.

MULEY, B.P.; KHADABADI, S.S.; BANARESE, N.B. Phytochemical constituents and pharmacological activities of *Calendula officinalis* Linn (Asteraceae): a review. **Tropical Journal of Pharmaceutical Research**, v. 8, n. 5, p. 455-465, 2009.

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.

NASCIMENTO, G.G.F.; LOCATELLI, J.; FRETAS, P.C.; SILVA, G.L. Antibacterial activity of plant extracts and phytochemicals on antibiotic-resistant bacteria. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 31, n. 4, p. 247-456, 2000.

NASERI, M.K.G.; HAMIDI, M.N.; HEIDARI, A. Vasorelaxatory effect of *Vitis vinifera* extract on rat aorta. **Iranian Journal of Pharmacological Sciences**, v. 2, n. X, p. 93-99, 2005.

NEGUS, S.S.; VANDERAH, T.W.; BRANDT, M.R.; BILSKY, E.J.; BECERRA, L.; BORSOOK, D. Preclinical assessment of candidate analgesic drugs: Recent advances and future challenges. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 319, n. 2, p. 507-514, 2006.

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, n. 1, p. 197-203, 2001.

NG, T.B.; LIU, F.; WANG, Z.T. Antioxidative activity of natural products from plants. **Life Sciences**, v. 66, n. 8, p. 709-723, 2000.

OBOH, G.; AKINDAHUNSI, A.A. Change in the ascorbic acid, total phenol and antioxidant activity of sun-dried commonly consumed green leafy vegetables in Nigeria. **Nutrition and Health**, v. 18, n. 1, p. 29-36, 2004.

ORHAN, D.D.; KÜPELI, E.; YESILADA, E.; ERGUN, F. Anti-inflammatory and antinociceptive activity of flavonoids isolated from *Viscum album* ssp. *album*. **Zeitschrift für Naturforschung C**, v. 61, n. 1-2, p. 26-30, 2006.

OKETCH-RABAH, H.A.; BROGGER, C.S.; FRYDENVANQ, K.; DOSSAJI, S.F.; THEANDER, T.G.; CORNETT, C.; WATKINS, W.M.; KHARAZMI, A.; LEMMICH, E. Antiprotozoal properties of 16,17 dihydrobrachycalixolide from *Vernonia brachycalyx*. **Planta Medica**, v. 64, n. 6, p. 559-562, 1998.

OLAJIRE, A.A; AZEEZ, L. Total antioxidant activity, phenolic, flavonoid and ascorbic acid contents of Nigerian vegetables. **African Journal of Food Science and Technology**, v. 2, n. 2, p. 022-029, 2011.

OLIVEIRA, C.C.; MAUGIN, C.; OLIVEIRA, E.C.F.; MELO, F.D.P.; SILVA, F.C.A. A dor e o controle do sofrimento (II). **Revista de Psicofisiologia**, v. 1, n. 2, p. 1-26, 1997.

OLSZANECKI, R.; GĘBSKA, A.; KOZLOVSKI, V. I.; GRYGLEWSKI, R. J. Flavonoids and nitric oxide synthase. **Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 53, n. 1, p. 571-584, 2002.

ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD. **Pautas generales para las metodologías de investigación y evaluación de la medicina tradicional**. Ginebra, 2002.

OSAWA, C.C; FELÍCIO, P.E.; GONÇALVES, L.A.G. Teste de TBA aplicado a carnes e derivados: métodos tradicionais, modificados e alternativos. **Química Nova**, v. 28, n. 4, p. 655-663, 2005.

OSKAY, M.; SARI, D. Antimicrobial screening of some Turkish medicinal plants. **Pharmaceutical Biology**, v. 45, n. 3, p.176-181, 2007.

OZYIGIT, I. Phenolic changes during *in vitro* organogenesis of cotton (*Gossypium hirsutum* L.) shoot tips. **African Journal of Biotechnology**, v. 7, n. 8, p. 1145-1150, 2008.

OYAIZU, M. Studies on product of browning reaction – Antioxidative activities of products of browning reaction prepared from glucosamine. **Japanese Journal of Nutrition**, v. 44, n. 6, p. 307-315, 1986.

PAYNE, D.J.; GWYNN, M.N.; HOLMES, D.J.; POMPLIANO, D.L. Drugs for bad bugs: confronting the challenges of antibacterial discovery. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 152, n. 8, p. 1147-1154, 2007.

PARKER A.G.; PERAZA, G.G.; SENA J.; SINNOT-SILVA, E.; FLORES-SOARES, M.C.; CESAR-VAZ, M.R.; FURLONG, E.B.; MUCCILLO-BAISCH, A.L. Antinociceptive effects of the aqueous extract of *Brugmansia suaveolens* flowers in mice. **Biological Research for Nursing**, v. 8, n. 3, p. 1-6, 2007.

PERRON, N.R.; BRUMAGHIM, J.L. A review of the antioxidant mechanisms of polyphenol compounds related to iron binding. **Cell Biochemistry Biophysics**, v. 53, n. 2, p. 75-100, 2009.

PIERETTI, S.; CAPASSO, A.; DI GIANNUARIO, A.; LOIZZO, A.; SORRENTINO, L. The interaction of peripherally and centrally administered dexamethasone and RU 38486 on morphine analgesia in mice. **General Pharmacology**, v. 22, n. 5, p. 929-933, 1991.

PILLAY, P.; VLEGGAAR, R.; MAHARAJ, V.J.; SMITH, P.J.; LATEGAN, C.A.; CHOUTEAU, F.; CHIBALE, K. Antiplasmodial hirsutinolides from *Vernonia staeheleinoides* and their utilization towards a simplified pharmacophore. **Phytochemistry**, v. 68, n. 8, p. 1200-1205, 2007.

POZETTI, G.L.; PIZSOLLITO, A.C.; MANCINI, B.; LOSHCHAGIN, E.; MACHADO, A.C. Determinação da atividade antimicrobiana de plantas brasileiras. **Revista da Faculdade de Farmácia e Odontologia**, v. 6, n. X, p. 29-33, 1972.

PRATTES, M.V.; BLOCH-JUNIOR, C. Peptídeos antimicrobianos. **Biociência, Ciência e Desenvolvimento**, ano 3, n. 17, p. 30-36, 2001.

PRIOR, R.L.; HOANG, H.; GU, L.; WU, X.; BACCHIOCCA, M.; HOWARD, L.; HAMPSCH-WOODILL, M.; HUANG, D.; OU, B.; JACOB, R. Assays for hydrophilic and lipophilic antioxidant capacity (oxygen radical absorbance capacity (ORACFL) of plasma and biological and food samples. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, n. 11, p. 3273-3279, 2003.

RABE, T.; MULLHOLLAND, D.; van STADEN, J. Isolation and identification of antibacterial compounds from *Vernonia colorata* leaves. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 80, n. 1, p. 91-94, 2002.

RAKOTONIRINA, V.S.; BUM, E.N.; RAKOTONIRINA, A.; BOPELET, M. Sedative properties of the decoction of the rhizome of *Cyperus articulatus*. **Fitoterapia**, v. 72, n. 1, p. 22-29, 2001.

RANG, H.P.; DALE, M.M.; RITTER, J.M. **Farmacologia**. 3ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1997. 692 p.

RAVEN, P.H.; EVERT, R.F.; EICHHORN, S.E. **Biologia Vegetal**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001. 906 p.

REGISTRY OF TOXIC EFFECTS OF CHEMICAL SUBSTANCES. RTECS - Comprehensive guide to the RTECS - US. **Department of Health and Human Services – Public Health Service Centers for Disease Control and Prevention** National Institute for Occupational Safety and Health, 1997.

RIBEIRO, R.A.; VALE, M.L.; THOMAZZI, S.M.; PASCHOALATO, A.B.P.; POOLE, S.; FERREIRA, S.H.; CUNHA, F.Q. Involvement of resident macrophages and mast cells in the writhing nociceptive response induced by zymosan and acetic acid in mice. **European Journal of Pharmacology**, v. 387, n. 1, p. 111-118, 2000.

RIBEIRO, S.M.R.; QUEIROZ, J.H.; PELÚZO, M.C.G.; COSTA, N.M.B.; MATTA, S.L.P.; QUEIROZ, M.E.L.R. A formação e os efeitos das espécies reativas de oxigênio no meio biológico. **Bioscience Journal**, v. 21, n. 3, p. 133-149, 2005.

RIOS, J.L.; RECIO, M.C.; VILLAR, A. Screening methods for natural products with antimicrobial activity: a review of the literature. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 23, n. 2-3, p. 127-149, 1988.

RISSO, W.E.; SCARMINIO, I.S.; MOREIRA, E.G. Antinociceptive and Toxicity Evaluation of *Vernonia condensata* Leaves **Indian Journal of Experimental Biology**, v. 48, n. 8, p. 811- 816, 2010.

RIVERO, F.; FALLARERO, A.; CASTAÑEDA, O.; DAJAS, F.; MANTA, E. Antioxidant activity in vivo and in vitro of *Halimeda incrassata* aqueous extracts. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 23, n. 2, p. 256-263, 2003.

ROBAK, J.; SHRIDI, F.; WOLBIS, M.; KROLIKOWSKA, M. Screening of the influence of flavonoids on lipoxygenase and cyclooxygenase activity, as well as on nonenzymic lipid oxidation. **Polish Journal of Pharmacology and Pharmacy**, v. 40, n. X, p. 451-458, 1998.

ROESLER, R.; MALTA, L.G.; CARRASCO, L.C.; HOLANDA, R.B.; SOUSA, C.A.S.; PASTORE, G. M. Atividade antioxidante de frutas do cerrado. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 27, n. 1, p. 53-60, 2007.

ROGINSKY, V.; LISSI, E.A. review of methods to determine chain-braking antioxidante activity in food. **Food Chemistry**, v. 92, n. 2, p. 235-254, 2005.

SADER, H.S.; PIGNATARI, A.C.; HOLLINS, R.J.; LEME, I.; JONES, R.N. Oxacilin and quinolone resistant *Staphylococcus aureus* in São Paulo, Brazil: a multicenter molecular epidemiology study. **Infection Control and Hospital Epidemiology**, v. 14, n. 5, p. 260-264, 1993.

SALMINEN, A.; LEHTONEN, M.; SUURONENA, T.; KAARNIRANTAD, K.; HUUSKONEN, J. Terpenoids: natural inhibitors of NF-kappaB signaling with anti-inflammatory and anticancer potential. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 65, n. 19, p. 2979-2999, 2008.

SANT'ANA, P.J.P.; ASSAD, A.L. O contexto brasileiro para a bioprospecção: a competência científico-tecnológica brasileira. **Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento**, ano 5, n. 29, p. 32-37, 2002.

SANTOS, A.R.S.; VEDANA, E.M.A.; FREITAS, G.A.G. Antinociceptive effects of meloxicam, in neurogenic and inflammatory nociceptive models in mice. **Inflammation Research**, v. 47, n. 7, p. 302-307, 1998.

SCALBERT, A. Antimicrobial properties of tannins. **Phytochemistry**, v. 30, n. 12, p. 3875-3883, 1991.



SCARTEZZINI, P.; SPERONI, E. Review on some plants of Indian traditional medicine with antioxidant activity. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 71, n. 1 p. 23-43, 2000.

SCHAFER, M. Physiology and pathophysiology of pain. **Ther Umsch**, v. 56, n. 8, p. 426-430, 1999.

SCHINELLA, G.R.; TOURNIER, H.A.; PRIETO, J.M.; MORDUJOVICH DE BUSCHIAZZO P.; RIOS., J.L. Antioxidant activity of anti-inflammatory plant extracts. **Life Sciences**, v. 70, n. 9, p. 1023-1033, 2002.

SCHUG, S.A.; GANDHAM, N. Opiates: clinical use. In: McMahon SB and Klotzenburg M. (Eds). Wall and Melzack's. **Textbook of pain**, 5a Ed. Endinburg: Churchill Livingstone, cap. 43, 2006, p. 653-667.

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 USA**, v. 91, n. 25, p. 12013-12017, 1994.

SHER, A. Antimicrobial activity of natural products from medicinal plants. **Gomal Journal of Medical Science**, v. 7, n. 1, p.72-78, 2009.

SILVA, F.A.M.; BORGES, F.M.; FERREIRA, M.A. Métodos para avaliação do grau de oxidação lipídica e da capacidade antioxidante. **Química Nova**, v. 22, n. 1, p. 94-103, 1999.

SILVEIRA, L.M.S.; OLEA, R.S.G.; MESQUITA, J.S.; DA CRUZ, A.L.N.; MENDES, J.C. Metodologias de atividade antimicrobiana aplicadas a extratos de plantas: comparação entre duas técnicas de ágar difusão. **Revista Brasileira Farmacognosia**, v. 90, n. 2, p. 124-128. 2009.

SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6ª ed. Porto Alegre/Florianópolis: Ed. Universidade/UFRGS/ Ed. UFSC, 2007. 1102 p.

SINGH, K.V.; SHUKLA, N.P. Activity on multiple resistant bacteria of garlic (*Allium sativum*) extract. **Fitoterapia**, v. 55, n. X, p. 313-315, 1984.

SOARES, S.E. Ácidos fenólicos como antioxidantes. **Revista de Nutrição**, v.15, n. 1, p. 71-81, 2002.

SOBRINHO, T.J.S.P.; SILVA, C.H.T.P.; NASCIMENTO, J.E.; MONTEIRO, J.M.; ALBUQUERQUE, U.P.; AMORIM, E.L.C. Validação de metodologia espectrofotométrica para quantificação dos flavonoides de *Bauhinia cheilantha* (Bongard) Steudel. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 44, n. 4, p. 683-689, 2008.

SOLÍS, C.; BECERRA, J.; FLORES, C.; ROBLEDO, J.; SILVA, M. Antibacterial and antifungal terpenes from *Pilgerodendron uviferum* (D. DON) Florin. **Journal of the Chilean Chemical Society**, v. 49, n. 2, p. 157-161, 2004.

SOUSA, C.M.M.; SILVA, H.R.; VIEIRA-JUNIOR, G.M.; AYRES, C.L.S.C.; ARAUJO, D.S.; CAVALCANTE, L.C.D.; BARROS, E.D.S.; ARAUJO, P.B.M.; BRANDAO, M.S.; CHAVES, M.H. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 351-355, 2007.

SOUSA, A.M.; FRANCO, P.A.B; ASHMAWI, H.A.; POSSO, I.P. Efeito analgésico local do tramadol em modelo de dor provocada por formalina em ratos. **Revista Brasileira de Anestesiologia**, v. 58, n. 4, p. 371-379, 2008.

SOUSA, O.V.; DEL-VECHIO-VIEIRA, G.; PINHO, J.J.R.G.; YAMAMOTO, C.H.; ALVES, M.S. Antinociceptive and anti-inflammatory activities of the ethanol extract of *Annona muricata* L. leaves in animal models. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 11, n. 5, p. 2067-2078, 2010.

SOUZA, V.C.; LORENZI, H. **Botânica Sistemática – Guia ilustrado para identificação das famílias de angiospermas da flora brasileira, baseado em APG II**. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2005. 640 p.

STERN, J.L.; HAGERMAN, A.E.; STEINBERG, P.D.; MASON, P.K. Phlorotannin-protein interactions. **Journal of Chemical Ecology**, v. 22, n. X, p. 1887-1899, 1996.

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

SURALKAR, A.A.; SARDA, P.S.; GHASIAS, M.M.; THAKARE, V.N. In vivo animal models for evaluations of anti-inflammatory activity. **Pharmaceutical Reviews**. Disponível em [www.phamainfo.net](http://www.phamainfo.net). Site acessado em julho/2011.

TAYLOR, B.K.; PETERSON, M.A.; BASBAUM, A.I. Persistent cardiovascular and behavioural nociceptive responses to subcutaneous formalin require peripheral nerve input. **The Journal Neuroscience**, v. 15, n. 11, p. 7575-7584, 1995.

TAVARES, W. **Manual de antibióticos e quimioterápicos antiinfeciosos**. 3<sup>a</sup> ed. São Paulo: Editora Atheneu, 2001. 792 p.

TEIXEIRA, F.A.; SILVA, C.G. **Química Nova Interativa** [www.qnint.sbq.org](http://www.qnint.sbq.org) Site acessado em 17/05/2011.

TEIXEIRA, M.J.; FIGUEIRÓ, J.A.B. **Dor: epidemiologia e evolução histórica da dor**. São Paulo: Moreira Jr., cap. 1, 2001. p.3-9.

TEIXEIRA, M.J. **Dor, Manual para o Clínico**. 1<sup>a</sup> ed. São Paulo: Atheneu, v.1, 2006. 562p.

TERRAS, F.R.G.; SCHOOF, H.M.E.; THEVISSSEN, H.M.E.; BROEKAERT, W.F. Synergistic enhancement of the antifungal activity of wheat and barley thionins by radish and oilseed rape 2S albumins and by barley trypsin inhibitors. **Plant Physiology**, v. 103, n. 4, p.1311-1319, 1993.

THE PLANT LIST. Version 1 de 2010. Publicado na web: <http://www.theplantlist.org>  
Site acessado em 19 de dezembro de 2011.

TODAR, K. *Staphylococcus aureus* and Staphylococcal Disease. On Line Textbook of Bacteriology. Disponível em [www.textbookofbacteriology.net](http://www.textbookofbacteriology.net). Site acessado em junho/2011.

TOKER, G.; KÜPELI, E.; MEMISOĞLU, M.; YESILADA, E. Flavonoids with antinociceptive and anti-inflammatory activities from the leaves of *Tilia argentea* (silver linden). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 95, n. 2-3, p. 393-397, 2004.

TONA, L. *In vitro* antiplasmodial activity of extracts and fractions from seven medicinal plants used in Democratic Republic of Congo. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 93, n. 1, p. 27-32, 2004.

TORSSEL, B.G. **Natural product chemistry: a mechanistic and biosynthetic approach to secondary metabolism**. New York: John Willey, 1989. 401p.

VAGIONAS, K.; NGASSAPA, O.; RUNYORO, D.; GRAIKOU, K.; GORTZI, O.; CHINO, I. Chemical analysis of edible aromatic plants growing in Tanzania. **Food Chemistry**, v. 105, n. x, p.1711-1717, 2007.

VAN ACKER, S.A.B.E.; GROOT, M.J.; VAN DEN BERG, D.-J.; TROMP, M.N.J.L.; DEN Kelder, G.D.-O.; VAN DER VIJGH, W.J.F.; BAST, A. A Quantum chemical explanation of the antioxidant activity of flavonoids. **Chemical Research in Toxicology**, v. 9, n. 8, p. 1305-1312, 1996.

VALVERDE, A.L. Analgesic and antiinflammatory activities of vernonioside B2 from *Vernonia condensata*. **Phytotherapy Research**, v. 15, n. 3, p.263-264, 2001.

VALGAS, C.; SOUZA, S.M.; SMÂNIA, E.F.A.; SMÂNIA Jr., A. Screening methods to determine antibacterial activity of natural products. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 38, n. 2, p. 369-380, 2007.

VANDEN BERGHE, D.A.; VLIETINCK, A.J. Screening methods for antibacterial and antiviral agents from higher plants. In: DEY, P.M.; HARBONE, J.D. **Methods in Plant Biochemistry**. London: Academic Press, 1991. p. 47-69.

VASCONCELOS, S.M.L.; GOULART, M. O.F.; MOURA, J.B.F.; MANFREDINI, V.; BENFATO, M.S.; KUBOTA, L.T. Espécies reativas de oxigênio e de Nitrogênio, antioxidantes e Marcadores de dano oxidativo em sangue humano: Principais métodos analíticos para sua determinação. **Química Nova**, v. 30, n. 5, p. 1323-1338, 2007.

VÁZQUEZ, A.I.F.; SÁNCHEZ, C.M.D.; DELGADO, N.G.; ALFONSO, A.M.S.; ORTEGA, Y.S.; SÁNCHEZ, H.C. Anti-inflammatory and analgesic activities of red seaweed *Dichotomaria obtusata*. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 47, n. 1, p. 111-118, 2011.

VEIGA JUNIOR, V. F.; PINTO, A. C.; MACIEL, M. A. M. Plantas medicinais: cura segura? **Química Nova**, v. 28, n. 3, p. 519-528, 2005.

VENNAT, B.; GROSS, D.; POURRAT, H. *Hamamelis virginiana*: identification and assay of proanthocyanidins, phenolic acids and flavonoids in leaf extracts. **Pharmaceutica Acta Helvetiae**, v. 67, n. 1, p. 11-14, 1992.

VERDI, L.G.; BRIGHENTE, I.M.C.; PIZZOLATTI, M.G. Gênero *Baccharis* (Asteraceae): aspectos químicos, econômicos e biológicos. **Química Nova**, v. 28, n. 1, p. 85-94, 2005.

VERMA, P.R.; JOHARAPURKAR, A.A.; CHATPALLIWAR, V.A.; ASNANI, A.J. Antinociceptive activity of alcoholic extract of *Hemidesmus indicus* R. Br. in mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 102, n. 2, p. 298-301, 2005.

VICENTE, M.A.A.; ALMEIDA, W.A.B.; CARVALHO, Z.S. Multiplicação *in vitro* e aclimação de *Vernonia condensata* Baker. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v. 11, n. X, p. 176-183, 2009.

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.

VINEGAR, R.; SCHREIBER, W.; HUGO, R. Biphasic development of carrageenan edema in rats. **Journal of Pharmacological Experimental Therapeutics**, v. 166, n. 1, p. 96-103, 1973.

VINSON, J.A.V.; SU, X.; ZUBIK, L.; BOSE, P. Phenol antioxidant quantity and quality in foods: fruits. **Journal of Agricultural Food Chemistry**, v. 49, n. 11, p. 5319-5321, 2001.

WAGNER, H.; BLADT, S. **Plant Drug Analysis - A Thin Layer Chromatography Atlas**. 2nd ed. Heidelberg: Springer, 1996. 384p.

WALSH, C. Where will new antibiotics come from? **Nature Reviews Microbiology** v.1, n. X, p. 65-70, 2003.

WINN JR., W.C.; ALLEN, S.D.; JANDA, W.M.; KONEMAN, E.W.; PROCOP, G.; SCHRECKENBERGER, P.C.; WOODS, G.L. 2006. **Koneman's Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology**. 6th ed., Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 1535 p.

WINKEL-SHIRLEY, B. Flavonoid biosynthesis: a colorful model for genetics, biochemistry, cell biology, and biotechnology. **Plant Physiology**, v. 126, n. X, p. 485-493, 2001.

WINKEL-SHIRLEY, B. Biosynthesis of flavonoids and effects of stress. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 5, n. 3, p. 218-223, 2002.

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, n. X, p. 544-547, 1962.

WHITTLE, B. A. Release of kinin by intraperitoneal injection of chemical agents in mice. **International Journal of Neuropharmacology**, v. 3, n. X, p. 369-378, 1964.

WONG, D.W.S. **Química de los alimentos: mecanismos y teoría**. 3. ed. Zaragoza: Acríbia, 1995, 476p.

WOOLF, C.J.; MANNION, R.J. Neuropathic pain: aetiology, symptoms, mechanisms, and management. **Lancet**, v. 353, n. 9168, p.1959-1964, 1999.

WOODCOCK, J.; WITTER, J.; DIONNE, R.A. Stimulating the development of mechanism-based, individualized pain therapies. **Nature Reviews Drug Discovering**, v. 6, n. 9, p. 703-710, 2007.

WOODFORK, K.A.; DYKE, K.V. Agentes anti-inflamatórios e antirreumáticos. In: CRAIG, C.R.; STITZEL, R.E. **Farmacologia moderna com aplicações clínicas**. 6ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 2004. 815 p.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Summary of WHO guidelines for the assessment of herbal medicines. **Herbal Gram**, v. 28, n. X, p.13-14, 1993.

YUAN, G.; WAHLGVIST, M.L.; HE, G.; YANG, M.; LI, D. Natural products and anti-inflammatory activity. **Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition**, v. 15, n. 2, p. 143-152, 2006.

ZHANG, Z.; ELSOHLY, H.N.; JACOB, M.R.; PASCO, D.S.; WALKER, L.A.; CLARK, A.M. Natural products inhibiting *Candida albicans* secreting aspartic proteases from *Tovomita krukovii*. **Planta Médica**, v. 68, n. 1, p. 49-54, 2002.

ZHANG, Y.; LEWIS, K. F abatins: new antimicrobial plant peptides. **FEMS Microbiological Letters**, v. 149, n. 1, p. 59-64 1997.

ANEXO A – Artigo original intitulado "New approaches to clarify antinociceptive and anti-inflammatory effects of the ethanol extract from *Vernonia condensata* leaves", publicado no periódico **International Journal of Molecular Sciences**, v. 12, n. 12, p. 8993-9008, 2011.

Article

## New Approaches to Clarify Antinociceptive and Anti-Inflammatory Effects of the Ethanol Extract from *Vernonia condensata* Leaves

Jucélia Barbosa da Silva <sup>1</sup>, Vanessa dos Santos Temponi <sup>1</sup>, Felipe Valente Fernandes <sup>1</sup>,  
Geórgia de Assis Dias Alves <sup>1</sup>, Dalyara Mendonça de Matos <sup>1</sup>, Carolina Miranda Gasparetto <sup>1</sup>,  
Antônia Ribeiro <sup>2</sup>, José de Jesus R. G. de Pinho <sup>1</sup>, Maria Silvana Alves <sup>1</sup> and  
Orlando Vieira de Sousa <sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup> Department of Pharmaceutical Sciences, Faculty of Pharmacy, Federal University of Juiz de Fora, Campus Universitário, Juiz de Fora, Minas Gerais 36036-330, Brazil; E-Mails: juceliabs@yahoo.com.br (J.B.S.); vanessatemponi@hotmail.com (V.S.T.); felipevf\_mg@hotmail.com (F.V.F.); georgia.assis@gmail.com (G.A.D.A.); dalyaramatos@yahoo.com.br (D.M.M.); carolina.gasporetto@ufjf.edu.br (C.M.G.); jose.pinho@ufjf.edu.br (J.J.R.G.P.); alves\_ms2005@yahoo.com.br (M.S.A.)

<sup>2</sup> Department of Biochemistry, Institute of Biological Sciences, Federal University of Juiz de Fora, Campus Universitário, Juiz de Fora, Minas Gerais 36036-330, Brazil; E-Mail: antonia.ribeiro@ufjf.edu.br

\* Author to whom correspondence should be addressed; E-Mail: orlando.sousa@ufjf.edu.br; Tel.: +55-32-2102-3808; Fax: +55-32-2102-3812.

Received: 14 October 2011; in revised form: 8 November 2011 / Accepted: 23 November 2011 / Published: 7 December 2011

---

**Abstract:** The present study was aimed at evaluating the antinociceptive and anti-inflammatory effects of the ethanol extract from *Vernonia condensata* leaves in animal models, in order to afford a better understanding of these properties. The extract reduced the number of abdominal contortions at doses of 100 (51.00 ± 3.00), 200 (42.00 ± 2.98) and 400 mg/kg (39.00 ± 4.00). In formalin tests, a significant reduction in the licking time ( $p < 0.01$ ) was observed in the first phase by 25.14 (200 mg/kg = 51.50 ± 4.44) and 31.15% (400 mg/kg = 48.00 ± 4.37). The doses of 100 (43.37 ± 5.15), 200 (34.62 ± 4.16) and 400 mg/kg (28.37 ± 3.98) inhibited ( $p < 0.001$ ) the second phase. After 60 and 90 min of treatment, a dose of 400 mg/kg (10.13 ± 0.39 and 11.14 ± 1.33, respectively) increased the latency time. Doses of 200 and 400 mg/kg potentiated the sleeping time induced by

diazepam, pentobarbital and meprobamate. The extracts (100, 200 and 400 mg/kg) showed anti-inflammatory effects by a decrease in paw edema. The extracts also reduced the exudate volume at the doses of 200 and 400 mg/kg. The leukocyte migration had significant effect ( $p < 0.001$ ) at doses of 100, 200 and 400 mg/kg. The completion of additional experiments in the investigation of the antinociceptive and anti-inflammatory activities of *V. condensata* allowed a better understanding of the central and peripheral mechanisms involved.

**Keywords:** *Vernonia condensata*; antinociceptive activity; sedative effect; anti-inflammatory activity

---

## 1. Introduction

Pain is considered to be one of the most important symptoms associated with inflammatory diseases [1,2] and affects a large portion of the population, diminishing their quality of life [3,4]. The use of anti-inflammatory drugs has been required to inhibit the mediators of the inflammation, preventing the acute response and the development of the chronic process [5]. Therefore, based on traditional medicine, search for new natural products from medicinal plants with analgesic and anti-inflammatory properties have been encouraged [6–8].

Plants of the genus *Vernonia* (Asteraceae), having approximately 1000 species, are widely distributed in most tropical and subtropical countries, and have long been popularly used to treat several types of diseases [9]. *Vernonia* has been used to treat a number of disorders including inflammation, malaria, fever, worms, pain, diuresis, cancer, abortion, and various gastro-intestinal problems [10,11]. In addition, species of this genus have been studied and their pharmacological properties established. For example, *V. glabra* showed hypotensive effect [12], *V. patens* demonstrated phototoxic, antibacterial and anti-inflammatory activities [13] and *V. kotschyana* presented immunomodulatory activity [14]. *V. amygdalina* revealed anti-histaminic effect [15] but was not hepatotoxic in rats [16]. These activities can be attributed to compounds such as polysaccharides from *V. kotschyana* [14], vernolepin found in *V. amygdalina* [15] and hesperidin, 3'-methylhesperetin, homoesperetin-7-O-rutinoside, sitosterol and stigmasterol identified in *V. diffusa* [17].

*Vernonia condensata* Baker, one Asteraceae family member, commonly known as figatil or necroton, has been traditionally used as analgesic, anti-inflammatory, anti-thermal, antianemics, antibacterial, liver tonic, liver toxicity and antiulcerogenic agents [10,11]. Analgesic, anti-inflammatory and antiulcerogenic activities of *V. condensata*, as well as toxicity have been investigated [18–21]. In these studies, vernonioside B2 demonstrated antinociceptive and anti-inflammatory effect [20]. Furthermore, constituents such as saponins, tannins, alkaloids, phenolic compounds and flavonoids were detected in the extracts from *V. condensata* [21].

Although antinociceptive and anti-inflammatory activities from *V. condensata* have been described, new essential investigations have been encouraged in order to confirm these evidences and to establish the involved mechanisms by methods not yet applied. In this sense, in the present study we investigated



the antinociceptive, anti-inflammatory and sedative properties of the ethanol extract from *V. condensata* leaves, using appropriate experimental animal models.

## 2. Results and Discussion

### 2.1. Phytochemistry Screening

The phytochemical screening results of the ethanol extract from *V. condensata* leaves showed the presence of different types of active constituents such as flavonoids, terpenoids, sterols, coumarins, tannins, saponins and volatile oils.

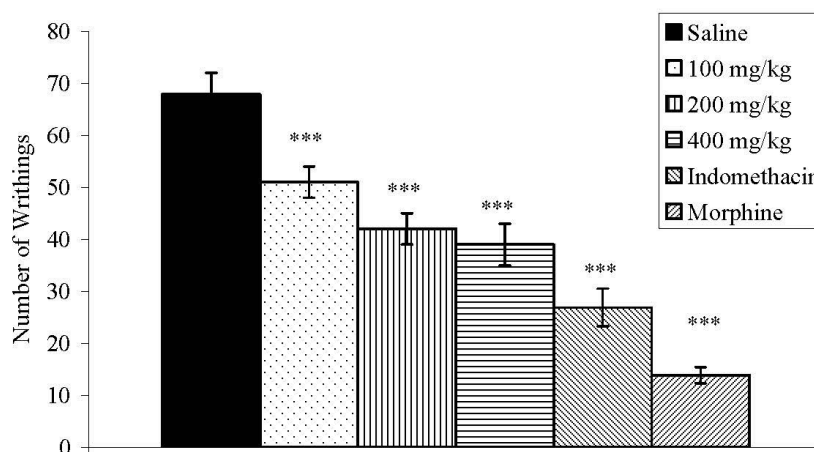
### 2.2. Acute Toxicity

At the doses administered per oral route (p.o.), the ethanol extract from *V. condensata* leaves was not toxic to animals, presenting LD<sub>50</sub> up to 3 g/kg. During this experiment, an important feature was observed that the mice presented somnolence. The dosage definition in the experiments of pharmacological activities was based on the LD<sub>50</sub> value.

### 2.3. Writhing Response Induced by Acetic Acid in Mice

Doses of 100 (51.00 ± 3.46; 24.86%), 200 (42.00 ± 2.98; 38.12%) and 400 mg/kg (39.00 ± 4.00; 42.54%) of *V. condensata* ethanol extract significantly ( $p < 0.001$ ) reduced the abdominal contortions induced by acetic acid when compared to the control group (67.87 ± 4.14) (Figure 1).

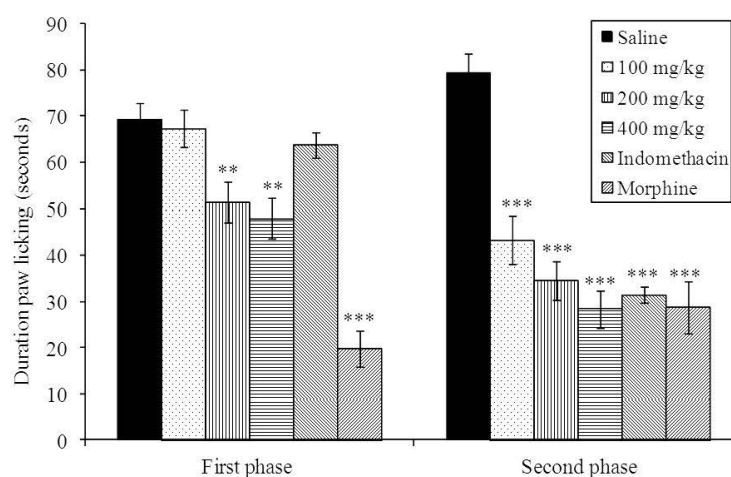
**Figure 1.** Effects of the ethanol extract from *V. condensata* leaves on acetic acid induced writhing in mice. Data are mean ± S.E.M. of eight mice. \*\*\* $P < 0.001$  vs. control group.



#### 2.4. Effects on Formalin-Induced Nociception in Mice

The intraplantar injection of formalin promoted a biphasic characteristic response (Figure 2). The time spent licking in the first phase (0–5 min) was  $66.62 \pm 4.76$  s and in the second phase (15–30 min) was  $79.37 \pm 4.15$  s for the control group. After 60 min of treatment, a significant reduction in the licking time ( $p < 0.01$ ) was observed during the first phase after formalin administration (neurogenic) by 25.14 and 31.15% with 200 and 400 mg/kg of extract, respectively (Figure 2). In the second phase, the doses of 100, 200 and 400 mg/kg of extract inhibited significantly ( $p < 0.001$ ) at 45.36, 56.38 and 64.26%, respectively, when compared to the control. As expected, morphine (1 mg/kg, s.c.) significantly reduced the formalin response in both phases. The indomethacin inhibitory effect was observed in the second phase.

**Figure 2.** Effects of the ethanol extract from *V. condensata* leaves on formalin-induced nociception in mice. First phase = 0–5 min after formalin injection; second phase = 15–30 min. Data are mean  $\pm$  S.E.M. of eight mice. \*\* $P < 0.01$ ; \*\*\* $P < 0.001$  vs. control group.



#### 2.5. Effects on Hot-Plate Latency Assay in Mice

The *V. condensata* ethanol extract increased the latency time of mice exposed to the hot plate test (Table 1). After 60 and 90 min of treatment, dose of 400 mg/kg (82.52 and 87.54%, respectively) increased significantly ( $p < 0.001$ ) the latency time in the respective control group. Morphine proved to be a potent analgesic, increasing the latency time within the evaluation periods. Naloxone, an opioid antagonist, blocked the morphine action but did not alter the antinociceptive effect of the tested extract, increasing the latency time at 102.52%. In this assay, we also observed that mice became lethargic.

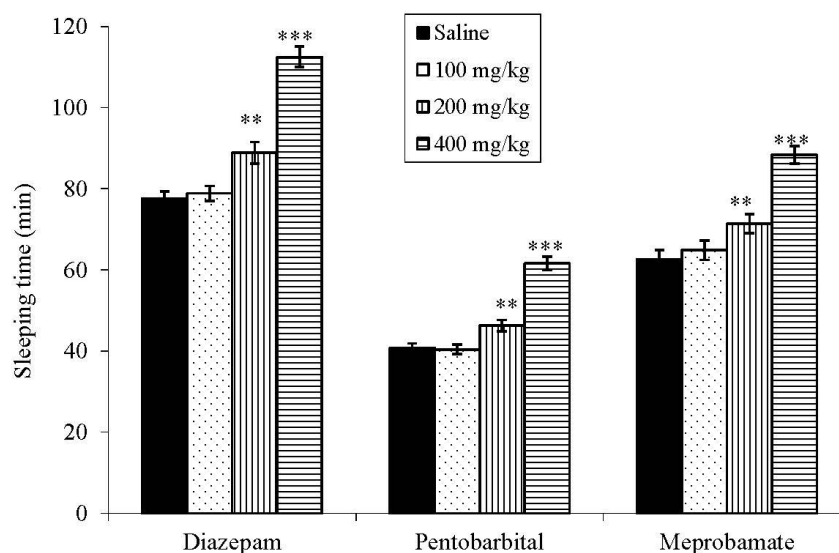
**Table 1.** Effects of the ethanol extract from *V. condensata* leaves on the latency time of mice exposed to the hot plate test.

Group	Dose (mg/kg)	Time after drug administration (seconds)			
		0 min	30 min	60 min	90 min
Control	Saline	5.01 ± 0.31	5.56 ± 0.83	5.55 ± 0.47	5.94 ± 0.64
	100	5.03 ± 0.46	4.88 ± 0.84	5.71 ± 0.40	5.94 ± 0.87
Ethanol extract	200	5.46 ± 0.54	6.01 ± 0.38	6.85 ± 0.45	7.50 ± 0.77
	400	5.50 ± 0.67	7.64 ± 0.99	10.13 ± 0.39***	11.14 ± 1.33***
Morphine	1	6.24 ± 0.77	9.77 ± 0.44***	11.82 ± 0.39***	14.51 ± 0.94***
Naloxone + Morphine	1 + 1	5.57 ± 0.68	9.99 ± 0.96***	8.24 ± 0.56**	7.01 ± 0.59
Naloxone + Extract	1 + 400	5.54 ± 0.74	8.39 ± 0.67*	12.16 ± 0.74***	12.03 ± 1.05***

Each value represents the mean ± S.E.M. of 8 mice. \* $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.01$ ; \*\*\* $P < 0.001$  significantly different from the control group.

### 2.6. Effect on Sleeping Time

The doses of 200 and 400 mg/kg of ethanol extract from *V. condensata* potentiated the sleeping time induced by diazepam (57.7%, 98%, and 156.4%, respectively), pentobarbital (75.4%, 122.9%, and 192.6%, respectively) and meprobamate (56.1%, 89.6%, and 124.4%, respectively) (Figure 3).

**Figure 3.** Effect of the ethanol extract from *V. condensata* leaves on sleeping time (min) induced by diazepam, pentobarbital and meprobamate in mice. Data are mean ± S.E.M. of eight mice. \*\* $P < 0.01$ ; \*\*\* $P < 0.001$  vs. control group.

### 2.7. Effects on Carrageenan-Induced Edema in Rats

The *V. condensata* ethanol extract anti-inflammatory effect evaluated by the paw edema method induced by carrageenan is shown in Table 2. Based on the presented data, the edema inhibition was observed 2 h after carrageenan application of doses of 200 ( $0.51 \pm 0.06$ ; 40.00%;  $p < 0.05$ ) and 400 mg/kg ( $0.59 \pm 0.07$ ; 30.59%;  $p < 0.05$ ). Three hours after carrageenan injections, the doses of 100 ( $0.73 \pm 0.07$ ;  $p < 0.05$ ), 200 ( $0.72 \pm 0.03$ ;  $p < 0.05$ ) and 400 mg/kg ( $0.63 \pm 0.04$ ;  $p < 0.01$ ) reduced the respective paw edema (21.50, 22.58 and 32.26%). The paw edema was also inhibited at the doses 100, 200 and 400 mg/kg 4 h after carrageenan application. In this time, indomethacin reduced the paw edema at 50.00%.

**Table 2.** Effects of the ethanol extract from *V. condensata* leaves on the rat paw edema induced by carrageenan.

Group	Dose (mg/kg)	Volume of hind paw (mL)			
		1 h	2 h	3 h	4 h
Control	Saline	$0.65 \pm 0.09$	$0.85 \pm 0.09$	$0.93 \pm 0.06$	$1.10 \pm 0.08$
	100	$0.42 \pm 0.02$	$0.72 \pm 0.03$	$0.73 \pm 0.07^*$	$0.85 \pm 0.05^*$
Ethanol extract	200	$0.46 \pm 0.04$	$0.51 \pm 0.06^*$	$0.72 \pm 0.03^*$	$0.70 \pm 0.09^{**}$
	400	$0.45 \pm 0.03$	$0.59 \pm 0.07^*$	$0.63 \pm 0.04^{**}$	$0.74 \pm 0.06^{**}$
Indomethacin	10	$0.41 \pm 0.09$	$0.43 \pm 0.08^{**}$	$0.51 \pm 0.08^{***}$	$0.55 \pm 0.06^{***}$

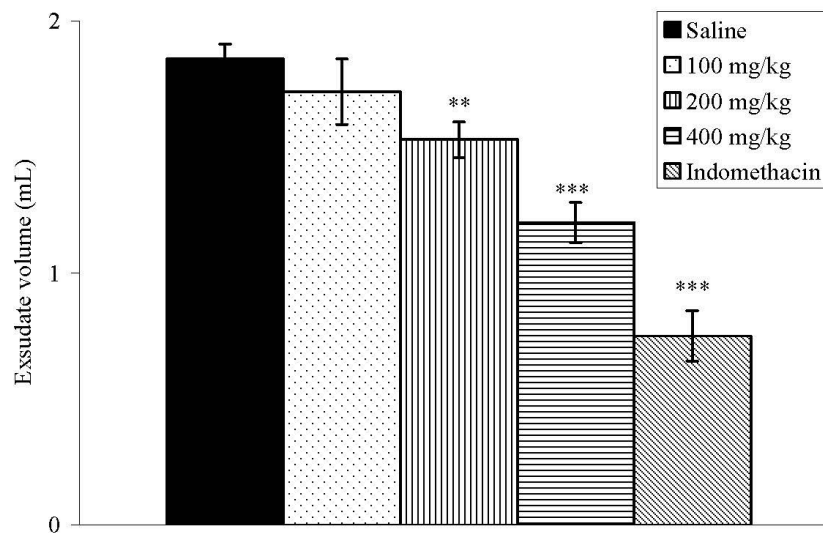
Each value represents the mean  $\pm$  S.E.M. of 6 rats. \*  $P < 0.05$ ; \*\*  $P < 0.01$ ; \*\*\*  $P < 0.001$  significantly different from the control group.

### 2.8. Effects on Carrageenan-Induced Pleurisy in Rats

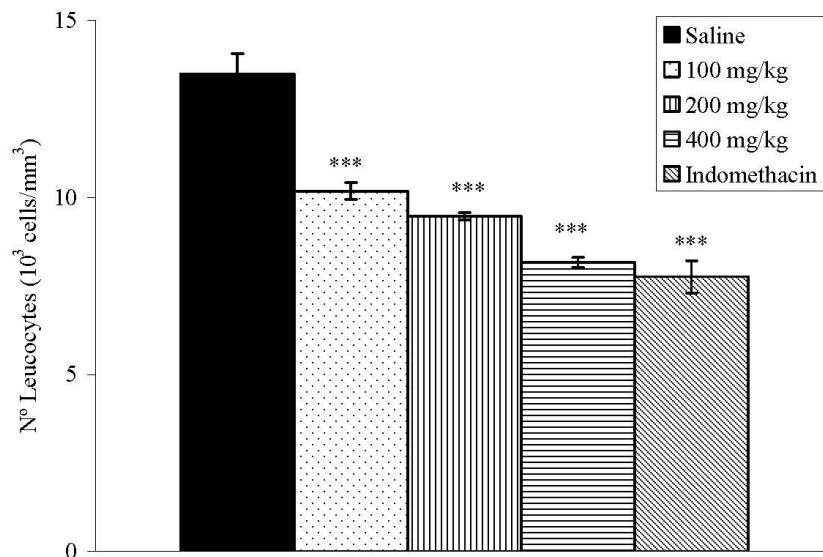
The anti-inflammatory effect of the *V. condensata* ethanol extract was confirmed by a decrease in exudate volume and leukocyte migration to the pleural cavity of rats. The pleurisy effects demonstrated that doses of 200 ( $1.53 \pm 0.07$ ;  $p < 0.01$ ) and 400 mg/kg ( $1.20 \pm 0.08$ ;  $p < 0.001$ ) of the extract significantly reduced the exudate volume by 17.30 and 35.13%, respectively, when compared to the control group (Figure 4). The number of total leukocytes was inhibited significantly ( $p < 0.001$ ) at the doses of 100 ( $10.18 \pm 0.24 \times 10^3$  cells/mm<sup>3</sup>), 200 ( $9.47 \pm 0.10 \times 10^3$  cells/mm<sup>3</sup>) and 400 mg/kg ( $8.17 \pm 0.14 \times 10^3$  cells/mm<sup>3</sup>) (Figure 5). Indomethacin reduced the exudate volume and the leukocyte migration.

Considering that the use of commercially available analgesic and anti-inflammatory drugs (opioids and non-steroidal anti-inflammatory drugs) exerts a wide range of side effects [5], there is currently a strong interest in developing new therapeutic agents from natural products [6–8]. Agents that inhibit different mediators that are involved in the evolution of inflammatory processes, including pain, are especially relevant [2,5]. In this context, studies have been carried out with natural products in models of pain and inflammation in order to assess their pharmacological potential, as well as developing new therapeutic options [6–8,22,23].

**Figure 4.** Effects of the ethanol extract from *V. condensata* leaves on pleural exudation in carrageenan-induced pleurisy in rats. Data are mean  $\pm$  S.E.M. of six rats. \*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*  $P < 0.001$  vs. control group.



**Figure 5.** Effects of the ethanol extract from *V. condensata* leaves on number of leucocytes in carrageenan-induced pleurisy in rats. Data are mean  $\pm$  S.E.M. of six rats. \*\*\*  $P < 0.001$  vs. control group.



The phytochemical analyses revealed the presence of flavonoids, tannins, coumarins, saponins, alkaloids, glycosides, tannins, triterpenoids and steroidal nucleus. Despite previous descriptions of most of these constituents [21], in the present study coumarins and glycosides were detected for the first time. A variety of *in vitro* and *in vivo* experiments have shown that flavonoids, tannins, triterpenoids and other secondary plant metabolites possess analgesic and anti-inflammatory properties [23–25]. Vernonioid B2, for example, identified in this plant, may contribute to the observed anti-inflammatory and antinociceptive effects of *V. condensata* [20].

The acute toxicity test showed that the *V. condensata* leaves' ethanol extract doses determined were not toxic to mice, confirming results of earlier studies [19,21]. It is important to mention that the largest dose administered (400 mg/kg) is less than the lowest dose applied for determination of the LD<sub>50</sub> (0.5 g/kg or 500 mg/kg). During the experiment, it was observed that the mice presented somnolence, demonstrating a probable sedative effect.

In this study, we investigated an ethanol extract from *V. condensata* by classical nociception and acute inflammation models. This study demonstrated that ethanol extract produces antinociceptive and anti-inflammatory effects in models of nociception (acetic acid-induced abdominal writhing, formalin test and hot plate test) and inflammation (paw edema and pleurisy tests), providing a scientific basis to explain, in part, the popular use of *V. condensata* in Brazilian folk medicine. It also suggests that the ethanol extract contains bioactive constituents that could be responsible for the observed activities.

The acetic acid-induced writhing reaction has been largely used as a screening tool for the assessment of analgesic or anti-inflammatory properties. According to Collier *et al.* [26], acetic acid acts indirectly by inducing the release of endogenous mediators sensitive to nonsteroidal anti-inflammatory drugs and opioids. This substance also promotes an increase in exudates levels of PGE<sub>2</sub> and PGF<sub>2</sub> (mediators of inflammation), bradykinin, substance P and some cytokines (IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , and IL-8) [27]. For this experiment, ethanol extract from *V. condensata* pretreated animals modified the nociceptive response induced by acetic acid in a dose-dependent manner. This fact suggests that probably the antinociceptive action of extract occurs peripherally, and it also inhibits the release of mediators in response to acetic acid. Therefore, the result corroborates previously studies [18,20,21].

Formalin-induced nociception was another essential test employed in this study and this classical animal model was not applied in the reports made before with *V. condensata*. It is considered the most predictive of acute pain because it causes a local tissue injury to the paw and is also indicative of tonic and localized inflammation pain [28]. This test exhibits two distinct phases of the licking response: the first phase is characterized by neurogenic pain caused by a direct chemical stimulation of nociceptors, and the second phase is characterized by inflammatory pain generated by a combination of stimuli, including inflammation of the peripheral tissues and mechanisms of central sensitization. In this last phase, different chemical mediators are involved, such as excitatory amino acids, neuropeptides, PGE<sub>2</sub>, nitric oxide, and kinins [29]. We observed that when ethanol extract from *V. condensata* was injected 60 min prior to formalin, a significant inhibition of the formalin response was seen during the second phase (inflammatory). It is suggested that the early phase is due to a direct effect on nociceptors and prostaglandins that do not play an important role during this phase. In contrast, the late phase seems to be an inflammatory response that can be inhibited by nonsteroidal anti-inflammatory drugs and corticosteroids [28,29]. Taken together, these results revealed a probably similar action to the nonsteroidal anti-inflammatory drugs.

To distinguish between central and peripheral antinociceptive actions, we extended our studies to the hot-plate test because this technique has not been used in previous studies with *V. condensata*. This test is considered to be sensitive to drugs acting at the supraspinal modulation level of the pain response [27], suggesting at least a modulatory effect of the extract. In this study, antinociceptive action did not depend entirely on the opioid system, because the treatment with naloxone did not completely reverse the produced effect [6]. Furthermore, after thermal stimulus, mice showed lethargy, indicating a sedative effect, which could explain the analgesic activity independent of opioid action.

To better understand the somnolence and lethargy by observing signals in the experiments of acute toxicity and hot plate test, and to clarify the analgesic activity independent of opioid system activity, diazepam, pentobarbital and meprobamate were used to induce sleep in the animals. Benzodiazepines act at specific binding sites that are closely linked to  $\gamma$ -aminobutyric acid (GABA<sub>A</sub>) receptor and enhancing the GABA-ergic transmission which might be related to its sedative activity [30]. Prolongation of pentobarbital-induced sleeping time might be due to the tranquilizing action as well as CNS depressant action related to GABA<sub>A</sub> receptors [31]. Although the exact mechanism responsible for the sedation action of meprobamate is not fully clear, it might be due to CNS depressant action or also due to enhancement of GABA-ergic transmission [32]. The ethanol extract from *V. condensata* significantly potentiated the duration of diazepam-, pentobarbital- and meprobamate-induced sleep in mice, suggesting probable tranquilizing action as well as CNS depressant action [30–32]. However, the responsible compound(s) for the hypnotic effect of *V. condensata* is not clearly known and could not be concluded based on the results of the present study. On the other hand, other plants containing compounds such as flavonoids, terpenes and saponins have been found to have hypnotic effects [33]. Therefore, we can speculate that these constituents might be responsible for the sedative effect of *V. condensata* since these chemical classes were detected in the present study. Flavonoids with anxiolytic and/or antidepressant activities have also been described in numerous plant species used in folk medicine to depress the CNS. This effect has been described by their affinity for the central benzodiazepine receptors [34]. It could be suggested that flavonoids of the *V. condensata* contribute to the sedative effect of this plant through benzodiazepine receptors.

The anti-inflammatory effect observed in the formalin test was confirmed in carrageenan-induced paw edema in rats, an animal model widely employed for the screening of anti-inflammatory compounds. The inflammatory response induced by carrageenan is characterized by the formation of marked edema resulting from the release of several mediators such as histamine, serotonin and bradykinin; this is subsequently sustained by release of prostaglandins produced by inducible isoforms of cyclooxygenase (COX-2) [35–37]. In the present study, oral treatment with the ethanol extract from *V. condensata* inhibited carrageenan-induced paw edema in rats. This treatment consistently attenuated the paw edema induced by carrageenan, as well as by several inflammatory mediators known to participate in the carrageenan response, such as bradykinin, histamine, substance P and platelet-activating factor [38–41]. This evidence suggests that the anti-inflammatory actions of the ethanol extract from *V. condensata* are related to the inhibition of one or more intracellular signaling pathways involved in the effects of these mediators.

The inflammation model of carrageenan-induced pleurisy was used to gain further insights into the anti-inflammatory effects of the ethanol extract from *V. condensata* [42–44]. Carrageenan-induced pleurisy has been used to investigate the mechanisms involved in acute inflammation and also to assess

the effectiveness of anti-inflammatory drugs [42,45]. As expected, in our experiments intrapleural injection of carrageenan caused a marked accumulation of pleural exudate, followed by intense migration of inflammatory cells into the pleural cavity. Treatment of rats with the ethanol extract significantly reduced the volume of pleural exudate accumulated in response to carrageenan injection and also inhibited the migration of leucocytes.

### 3. Experimental Section

#### 3.1. Plant Material and Extraction

Specimens of *Vernonia condensata* Baker used in this study were cultivated and collected at the Medicinal Garden of the Faculty of Pharmacy, Federal University of Juiz de Fora, in Juiz de Fora, State of Minas Gerais, Brazil, in August 2010. The species was identified by Dr. Fátima Regina Gonçalves Salimena and a voucher specimen (CESJ number 52943) was deposited in the Herbarium of the Federal University of Juiz de Fora, Brazil. Dried and powdered mature leaves (465 g) were exhaustively extracted in 95% ethanol (2.5 L) by static maceration for 3 weeks at room temperature with renewal of solvent every 2 days. The ethanol extract was filtered and evaporated under a rotary evaporator at controlled temperature (50–60 °C). This material was placed in a desiccator with silica to yield 27 g. The dried extract was dissolved using 1% DMSO in normal saline for pharmacological studies.

#### 3.2. Chemicals

Drugs and reagents used in this study (and their sources) were as follows: acetic acid (Vetec Química Farm Ltda, Rio de Janeiro, RJ, Brazil), formaldehyde (Reagen Quimibrás Ind. Química S.A., Rio de Janeiro, RJ, Brazil), diazepam (União Química Farmacêutica Nacional S/A, Embu-Guaçu, SP, Brazil), pentobarbital (Syntec, Cotia, SP, Brazil), morphine hydrochloride (Merck Inc., Whitehouse Station, NJ, USA), meprobamate, naloxone and indomethacin (Sigma Chemical Co, St Louis, MI, USA).

#### 3.3. Phytochemical Screening of the Ethanol Extract

The screening of chemical constituents was carried out with the ethanol extracts using chemical methods and thin-layer chromatography (TLC), according to the methodology suggested by Matos [46], including flavonoids, tannins, coumarins, alkaloids, saponins, terpenoids, steroids and volatile oils.

#### 3.4. Animals

Male Wistar rats (90–110 days) weighing 200–240 g and male Swiss albino mice (50–70 days) weighing 25–30 g were used in the experiments. The animals were provided by the Central Biotery of the Federal University of Juiz de Fora. The animals were divided into groups and kept in plastic under a 12 h light/12 h dark cycle at room temperature ( $22 \pm 2$  °C), with free cages (47 × 34 × 18 cm) access to Purina® rations and water. Animal care and the experimental protocol followed the principles and international guidelines suggested by the Brazilian College of Animal Experimentation (COBEA) and were approved by the local ethical committee (protocol number 036/2010).



### 3.5. Acute Toxicity

Groups of ten mice received oral doses of 0.5, 1, 1.5, 2 and 3 g/kg of ethanol extract from *V. condensata*, while the control group received the vehicle (saline). The groups were observed for 48 h and 50% lethal dose (LD<sub>50</sub>) was mortality at end of this period was recorded for each group [47]. The LD<sub>50</sub> determined by probit test using a log plot of percentage death *versus* dose [48].

### 3.6. Acetic Acid-Induced Writhing Test

The acetic-acid writhing test is used for the evaluation of analgesic activity [26]. Mice (n = 8 per group) were injected (i.p.) with 0.6% acetic acid (10 mL/kg body weight), and the intensity of nociception was quantified by counting the total number of writhes that occurred between 10 and 30 min after injection. Animals received ethanol extract (100, 200 or 400 mg/kg, p.o.) or sterile saline (control group, 0.9%, w/v) 60 min before acetic acid injection. Indomethacin (10 mg/kg, p.o.) and morphine (1 mg/kg, s.c.) were administered 60 min before acetic acid as reference compounds.

### 3.7. Formalin Test

Twenty microliters of 1% formalin was administered i.pl. in the mouse's right paw. The licking time was then recorded from 0 to 5 min (phase 1, neurogenic) and from 20 to 25 min (phase 2, inflammatory) after formalin administration [29,49]. Mice were then treated (p.o.) with extract (100, 200 or 400 mg/kg) or sterile saline (0.9%) 60 min before formalin injection. Indomethacin (10 mg/kg, p.o.) and morphine (1 mg/kg, s.c.) were also administered 60 min before the formalin injection and used as reference compounds.

### 3.8. Hot Plate Test

Animals were placed on a hot-plate (Model LE 7406, Letica Scientific Instruments, Barcelona, Spain) heated at  $55 \pm 1$  °C [50]. Three groups of mice (n = 8) were treated p.o. with ethanol extract (100, 200 or 400 mg/kg; 0.1 mL per 10 g body weight); the control group received sterile saline (10 mL/kg). Measurements were performed at time 0, 30, 60 and 90 min after drug administration, with a cut-off time of 40 s to avoid lesions to the animals' paws. The effect of pretreatment with naloxone (1 mg/kg, subcutaneously) on the analgesia produced by the ethanol extract (400 mg/kg) was determined in a separate group of animals. Morphine (1 mg/kg, subcutaneously), in the absence and presence of naloxone treatment, was used as a reference.

### 3.9. Effect on Sleeping Time in Mice

Mice were divided into 4 groups, each group containing 8 animals. The animals of group I served as the control (normal saline, 0.9 % (w/v) NaCl, 5 mL/kg); groups II, III, and IV received ethanol extract at the doses (100 mg/kg, 200 mg/kg and 400 mg/kg, respectively). Normal saline and the extracts were applied orally 60 min prior to the administration of pentobarbital sodium (40 mg/kg, i.p.), diazepam (3 mg/kg, i.p.) and meprobamate (100 mg/kg, i.p.). The sleeping time was noted by recording the interval between the losses and regaining of righting reflex [51].

### 3.10. Carrageenan-Induced Rat Paw Edema

Anti-inflammatory activity was assessed on the basis of inhibition of paw edema induced by the injection of 0.1 mL of 2% carrageenan (an edematogenic agent) into the subplantar region of the right hind paw of the rat [52]. Male Wistar rats were divided into groups of six animals which received p.o. doses of extract (100, 200 and 400 mg/kg; 0.1 mL per 10 g body weight), saline or indomethacin (10 mg/kg) 1 h before the injection of carrageenan. In the left paw, used as a control, 0.1 mL of sterile saline was injected. 1, 2, 3 and 4 h after injection of carrageenan, the measure of edema was made by the difference between the volume displaced by the right paw and the left paw using a plethysmometer (model LE 7500, Leticia Scientific Instruments, Barcelona, Spain).

### 3.11. Carrageenan-Induced Pleurisy in Rats

Pleurisy was induced in male Wistar rats by intrapleural administration of 0.5 mL 2% carrageenan suspension in saline solution between the third and fifth ribs on the right side of the mediastinum [42]. Extract (100, 200 and 400 mg/kg), saline or indomethacin (10 mg/kg) p.o. were given 60 min before injection of the irritant. Animals were killed 4 h after carrageenan injection, and the skin and pectoral muscles were retracted. A longitudinal incision was made between the third and fifth ribs on each side of the mediastinum. The exudate was collected and transferred to a 15 mL conical centrifuge tube and the total volume determined. A 20  $\mu$ L aliquot of the exudate was used to determine the total leucocyte count in Neubauer chambers.

### 3.12. Calculus and Statistical Analysis

Data are expressed as mean  $\pm$  S.E.M. Statistical significance was determined by one-way analysis of variance followed by the Student–Newman–Keuls test. *P* values below 0.05 were considered significant. The percentage of inhibition was calculated by using

$$100 - T \times 100/C(\%) \text{ or } T \times 100/C - 100(\%)$$

where C and T indicate non-treated (vehicle) and drug-treated, respectively.

## 4. Conclusions

The present study demonstrated that the completion of additional experiments in the investigation of the antinociceptive and anti-inflammatory activities of *V. condensata* allowed a better understanding of the central and peripheral mechanisms involved. The results support the popular use of this plant, but phytochemical studies together with pharmacological and toxicological investigations have proven essential for the complete understanding of their medicinal application.

## Acknowledgments

This study was supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), and Pró-Reitorias de Pesquisa and

Pós-Graduação of the Federal University of Juiz de Fora. We are grateful to Fátima Maria Gonçalves Salimena for plant identification.

### References

1. White, F.A.; Bhangoo, S.K.; Miller, R.J. Chemokines: Integrators of pain and inflammation. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2005**, *4*, 834–844.
2. Cunha, T.M.; Verri, W.A., Jr.; Schivo, I.R.; Napimoga, M.H.; Parada, C.A.; Poole, S.; Teixeira, M.M.; Ferreira, S.H.; Cunha, F.Q. Crucial role of neutrophils in the development of mechanical inflammatory hypernociception. *J. Leukoc. Biol.* **2008**, *83*, 824–832.
3. Kaye, A.D.; Baluch, A.; Scott, J. Pain management in the elderly population: A review. *Ochsner J.* **2010**, *10*, 179–187.
4. Macfarlane, T.V.; Glenny, A.-M.; Worthington, H.V. Systematic review of population-based epidemiological studies of oro-facial pain. *J. Dentist.* **2001**, *29*, 451–467.
5. Bovill, J.G. Mechanisms of actions of opioids and non-steroidal anti-inflammatory drugs. *Eur. J. Anaesthesiol.* **1997**, *15*, 9S–15S.
6. Sousa, O.V.; Del-Vechio-Vieira, G.; Pinho, J.J.R.G.; Yamamoto, C.H.; Alves, M.S. Antinociceptive and anti-inflammatory activities of the ethanol extract of *Annona muricata* L. leaves in animal models. *Int. J. Mol. Sci.* **2010**, *11*, 2067–2078.
7. Fagundes, L.L.; Del-Vechio-Vieira, G.; Pinho, J.J.R.G.; Yamamoto, C.H.; Alves, M.S.; Stringheta, P.C.; Sousa, O.V. Pharmacological proprieties of the ethanol extract of *Muehlenbeckia platyclada* (F. Muell.) Meisn. leaves. *Int. J. Mol. Sci.* **2010**, *11*, 3942–3953.
8. Vázquez, A.I.F.; Sánchez, C.M.D.; Delgado, N.G.; Alfonso, A.M.S.; Ortega, Y.S.; Sánchez, H.C. Anti-inflammatory and analgesic activities of red seaweed *Dichotomaria obtusata*. *Braz. J. Pharm. Sci.* **2011**, *47*, 111–118.
9. King, B.L.; Jones, S.B. Chemosystematics of *Vernonia* series *flexuosae* (Vernonieae: Compositae). *Bull. Torrey Bot. Club* **1982**, *109*, 279–286.
10. Lorenzi, H.; Matos, F.J.A. *Plantas Medicinais no Brasil: Nativas e Exóticas*, 2nd ed.; Instituto Plantarum: Nova Odessa, Brazil, 2008; pp. 165–166.
11. Alves, V.F.G.; Neves, L.J. Anatomia foliar de *Vernonia polyanthes* Less (Asteraceae). *Rev. Univ. Rural Sér. Ciên. da Vida* **2003**, *22*, 1–8.
12. Achola, K.J.; Mwangi, J.W.; Munenge, R.W.; Mwaura, A.M. Pharmacological activities of *Vernonia glabra*. *Pharm. Biol.* **1996**, *34*, 141–144.
13. Pérez-Amador, M.C.; Ocotero, V.M.; Benitez, S.P.; Jiménez, F.G. *Vernonia patens* Kunth, an Asteraceae species with phototoxic and pharmacological activity. *Phyton* **2008**, *77*, 275–282.
14. Nergard, C.S.; Diallo, D.; Michaelsen, T.E.; Malterud, K.E.; Kiyohara, H.; Matsumoto, T.; Yamada, H.; Paulsen, B.S. Isolation, partial characterisation and immunomodulating activities of polysaccharides from *Vernonia kotschyana* Sch. Bip. ex Walp. *J. Ethnopharmacol.* **2004**, *91*, 141–152.
15. Laekeman, G.M.; Mertens, J.; Totté, J.; Bult, H.; Vlietinck, A.J.; Herman, A.G. Isolation and pharmacological characterization of vernolepin. *J. Nat. Prod.* **1983**, *46*, 161–169.

16. Ojiako, O.A.; Nwanjo, H.U. Is *Vernonia amygdalina* hepatotoxic or hepatoprotective? Response from biochemical and toxicity studies in rats. *Afr. J. Biotechnol.* **2006**, *5*, 1648–1651.
17. Carvalho, M.G.; Costa, P.M.; Abreu, H.S. Flavanones from *Vernonia diffusa*. *J. Braz. Chem. Soc.* **1999**, *10*, 163–166.
18. Frutuoso, V.S.; Gurjão, M.R.R.; Cordeiro, R.S.B.; Martins, M.A. Analgesic and anti-ulcerogenic effects of a polar extract from leaves of *Vernonia condensata*. *Planta Med.* **1994**, *60*, 21–25.
19. Monteiro, M.H.; Gomes-Carneiro, M.R.; Felzenszwalb, I.; Chahoud, I.; Paumgartten, F.J. Toxicological evaluation of a tea from leaves of *Vernonia condensata*. *J. Ethnopharmacol.* **2001**, *74*, 149–157.
20. Valverde, A.L.; Cardoso, G.L.C.; Pereira, N.A.; Silva, A.J.R.; Kuster, R.M. Analgesic and antiinflammatory activities of vernonioside B2 from *Vernonia condensata*. *Phytother. Res.* **2001**, *15*, 263–264.
21. Risso, W.E.; Scarminio, I.S.; Moreira, E.G. Antinociceptive and acute toxicity evaluation of *Vernonia condensata* Baker leaves extracted with different solvents and their mixtures. *Indian J. Exp. Biol.* **2010**, *48*, 811–816.
22. Matta, C.B.B.; Souza, É.T.; Queiroz, A.C.; Lira, D.P.; Araújo, M.V.; Cavalcante-Silva, L.H.A.; Miranda, G.E.C.; Araújo-Júnior, J.X.; Barbosa-Filho, J.M.; Santos, B.V.O.; *et al.* Antinociceptive and anti-inflammatory activity from algae of the Genus *Caulerpa*. *Mar. Drugs* **2011**, *9*, 307–318.
23. Yuan, G.; Wahlgvist, M.L.; He, G.; Yang, M.; Li, D. Natural products and anti-inflammatory activity. *Asia Pac. J. Clin. Nutr.* **2006**, *15*, 143–152.
24. Salminen, A.; Lehtonen, M.; Suuronen, T.; Kaarnirantad, K.; Huuskonen, J. Terpenoids: Natural inhibitors of NF- $\kappa$ B signaling with anti-inflammatory and anticancer potential. *Cell. Mol. Life Sci.* **2008**, *65*, 2979–2999.
25. García-Lafuente, A.; Guillamón, E.; Villares, A.; Rostagno, M.A.; Martínez, J.A. Flavonoids as anti-inflammatory agents: Implications in cancer and cardiovascular disease. *Inflamm. Res.* **2009**, *58*, 537–552.
26. Collier, H.D.J.; Dinnin, L.C.; Johnson, C.A.; Schneider, C. The abdominal response and its suppression by analgesic drugs in the mouse. *Brit. J. Pharm.* **1968**, *32*, 295–310.
27. Nemirovsky, A.; Chen, L.; Zelma, V.; Jurna, I. The antinociceptive effect of the combination of spinal morphine with systemic morphine or buprenorphine. *Anesth. Analg.* **2001**, *93*, 197–203.
28. 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* **1977**, *21*, 161–174.
29. Hunskaar, S.; Fasmer, O.B.; Hole, K. Formalin test in mice, a useful technique for evaluating mild analgesics. *J. Neurosci. Meth.* **1985**, *14*, 69–79.
30. Campo-Soria, C.; Chang, Y.; Weiss, D.S. Mechanism of action of benzodiazepines on GABA<sub>A</sub> receptors. *Br. J. Pharmacol.* **2006**, *148*, 984–990.
31. Ho, I.K.; Harris, R.A. Mechanism of action of barbiturates. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **1981**, *21*, 83–111.
32. Hinton, J.M.; Marley, E. The effects of meprobamate and pentobarbitone sodium on sleep and motility during sleep: A controlled trial with psychiatric patients. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* **1959**, *22*, 137–140.

33. Rakotonirina, V.S.; Bum, E.N.; Rakotonirina, A.; Bopelet, M. Sedative properties of the decoction of the rhizome of *Cyperus articulatus*. *Fitoterapia* **2001**, *72*, 22–29.
34. Rocha, F.F.; Lapa, A.J.; DeLima, T.C. Evaluation of the anxiolytic-like effects of *Cecropia glazioui* Sneth in mice. *Pharmacol. Biochem. Behav.* **2002**, *71*, 183–190.
35. Di Rosa, M.; Giroud, P.P.; Willoughby, D.A. Studies on the mediators of the acute inflammatory response induced in rats in different sites by carrageenan and turpentine. *J. Pathol.* **1971**, *104*, 15–29.
36. 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. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1994**, *54*, 7–10.
37. 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. *Br. J. Pharmacol.* **1999**, *128*, 853–859.
38. Stochla, K.; Maslinski, S. Carrageenan-induced oedema in the rat paw-histamine participation. *Agents Actions* **1982**, *12*, 201–202.
39. Hwang, S.B.; Lam, M.H.; Li, C.L.; Shen, T.Y. Release of platelet activation factor and its involvement in the first phase of carrageenin-induced rat foot edema. *Eur. J. Pharmacol.* **1986**, *120*, 33–41.
40. 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 B<sub>2</sub> receptor antagonist. *Eur. J. Pharmacol.* **1996**, *316*, 277–286.
41. Gilligan, J.P.; Lovato, S.J.; Erion, M.D.; Jeng, A.Y. Modulation of carrageenan-induced hind paw edema by substance P. *Inflammation* **1994**, *18*, 285–292.
42. Vinegar, R.; Truax, J.F.; Selph, J.L. Some quantitative temporal characteristics of carrageenin-induced pleurisy in the rat. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **1973**, *143*, 711–714.
43. Ammendola, G.; Di Rosa, G.M.; Sorrentino, L. Leucocyte migration and lysosomal enzymes release in rat carrageenin pleurisy. *Agents Actions* **1975**, *5*, 250–255.
44. Compasso, F.; Dunn, C.J.; Yamamoto, S.; Willoughby, D.A.; Giroud, J.P. Further studies on carrageenan-induced pleurisy in rats. *J. Pathol.* **1975**, *116*, 117–124.
45. Miyasaka, K.; Mikami, T. Comparison of the anti-inflammatory effects of dexamethasone, indomethacin and BW755C on carrageenin-induced pleurisy in rats. *Eur. J. Pharmacol.* **1982**, *77*, 229–236.
46. Matos, F.J.A. *Introdução à Fitoquímica Experimental*, 2nd ed.; Edições UFC: Fortaleza, Brazil, 1997; pp. 41–75.
47. Dietrich, L. A new approach to practical acute toxicity testing. *Arch. Toxicol.* **1983**, *54*, 275–287.
48. Litchfield, J.T.; Wilcoxon, F. A simplified method of evaluating dose-effect experiments. *J. Pharmacol. Exp. Therap.* **1949**, *96*, 99–113.
49. Hunskaar, S.; Hole, K. The formalin test in mice: Dissociation between inflammatory and non-inflammatory pain. *Pain* **1987**, *30*, 103–114.
50. Eddy, N.B.; Leimbach, D. Synthetic analgesics. II. Dithienylbutenyl and dithienylbutylamines. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1953**, *107*, 385–393.

51. Fujimori, H. Potentiation of barbitol hypnosis as an evaluation method for central nervous system depressants. *Psychopharmacologia* **1965**, *7*, 374–378.
52. Winter, C.A.; Risley, E.A.; Nuss, G.W. Carrageenin-induced edema in hind paw of the rat as an assay for anti-inflammatory drugs. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **1962**, *111*, 544–547.

© 2011 by the authors; licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution license (<http://creativecommons.org/licenses/by/3.0/>).