



UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
MESTRADO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
KAMILLA COELHO MORAIS RODRIGUES

CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA E INVESTIGAÇÃO DAS ATIVIDADES
ANTIBACTERIANA E ANTI-INFLAMATÓRIA TÓPICA DE
***Vernonia polyanthes* LESS. (ASTERACEAE)**

JUIZ DE FORA
2013

KAMILLA COELHO MORAIS RODRIGUES

**CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA E INVESTIGAÇÃO DAS ATIVIDADES
ANTIBACTERIANA E ANTI-INFLAMATÓRIA TÓPICA DE
Vernonia polyanthes LESS. (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

ORIENTADORA: Profa. Dra. Maria Silvana Alves
COORIENTADOR: Prof. Dr. Orlando Vieira de Sousa

**JUIZ DE FORA
2013**

Ficha catalográfica elaborada através do Programa de geração automática da Biblioteca Universitária da UFJF, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Rodrigues, Kamilla Coelho Morais.

Caracterização química e investigação das atividades antibacteriana e anti-inflamatória tópica de Vernonia polyanthes LESS (Asteraceae) / Kamilla Coelho Morais Rodrigues. -- 2013.
145 f. : il.

Orientadora: Maria Silvana Alves

Coorientadora: Orlando Vieira de Sousa

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Faculdade de Farmácia e Bioquímica. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, 2013.

1. Vernonia polyanthes. 2. Plantas Medicinais. 3. Antibacterianos. 4. Inflamação. 5. Antioxidantes. I. Alves, Maria Silvana , orient. II. Sousa, Orlando Vieira de, coorient. III. Título.


"Caracterização química e investigação das atividades antibacteriana e anti-inflamatória tópica de *Vernonia polyanthes* LESS (*Asteraceae*)"

KAMILLA COELHO MORAIS RODRIGUES

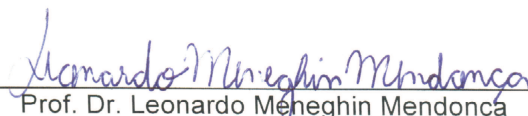
ORIENTADORA: Prof^a. Dr^a. Maria Silvana Alves

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 26/07/2013



Prof^a. Dr^a. Margareth Linde Athayde



Prof. Dr. Leonardo Meneghin Mendonça



Prof^a. Dr^a. Maria Silvana Alves

DEDICATÓRIA

Ao meu grande e eterno companheiro, meu marido, Rayner d'Almeida Rodrigues.

Aos meus pais biológicos Maria de Nazaré Morais e Antônio Coelho de Morais.

Aos meus pais científicos Maria Silvana Alves e Orlando Vieira de Sousa.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço ao meu Senhor Jesus, por ter me dado a vida e por sempre ter colocado em meu caminho oportunidades únicas. Senhor, obrigada!

À minha orientadora Dra. Maria Silvana Alves, mais que uma orientadora, uma amiga com quem pude ser eu mesma e com quem vivi muitos momentos especiais. Obrigada pela atenção, paciência, carinho e pelos conhecimentos transmitidos. Sil, você é única!

Ao meu coorientador Dr. Orlando Vieira de Sousa, pela oportunidade, confiança e orientação e pelos valiosos conhecimentos e ensinamentos durante essa caminhada. Você é um exemplo de pessoa a ser seguido. Obrigada por tudo!

Ao meu marido Rayner, que com sua enorme paciência e muito amor, esteve sempre ao meu lado tornando menores os obstáculos encontrados. Obrigada por sempre estar ao meu lado me apoiando, acreditando nas minhas convicções e sempre me incentivando. Obrigada por fazer a volta pra casa o momento mais esperado e especial de cada um dos meus dias!

A minha mãe Maria de Nazaré, que mesmo a quilômetros de distância esteve sempre tão perto me dando atenção, amor e força para continuar...

Ao meu pai Antônio, pelo apoio e carinho sempre presentes!

A minha querida irmã Katiusca, que mesmo distante torce por mim!

As minhas amigas Mestras Cíntia Elena Leite Zini, Jucélia Barbosa da Silva e Vanessa dos Santos Temponi, pessoas que sempre foram exemplos de união, coragem, amor, determinação e perseverança.

Ao meu amigo de Mestrado Lucas Apolinário Chibli, pela convivência nesses dois anos, pela paciência, ensinamentos, reflexões, indecisões e estudos. Você participou comigo de vários momentos importantes os quais superamos com determinação. Obrigada, torço por você!

As minhas companheiras “carrapatas” de mestrado e estudo, Livia e Michele pelos vários momentos de alegria, troca de conhecimento e por sempre estarem do meu lado. Obrigada!

Ao Dr. Rodrigo Luiz Fabri e ao Mestre Nicolas de Castro Campos Pinto, pelas preciosas sugestões para o engrandecimento do presente trabalho e pela paciência e ajuda de sempre.

A minha amiga, Ana Cláudia, que todas as tardes passava na minha casa apenas para dizer: “Oi!”. Obrigada por sempre estar ao meu lado e fazer meu final de tarde mais alegre com a sua companhia, da Dani e Matheus gritando “tia Kamilla”, e Estela. Amo vocês!

Aos Professores Doutores Ademar Alves da Silva Filho, Elita Scio Fontes, Fabíola Dutra Rocha e José de Jesus Ribeiro Gomes de Pinho, obrigada pelos ensinamentos e pela disponibilização de espaços e equipamentos, quando necessário.

A Profa. Dra. Luciana Chedier, pela acessibilidade e plena disposição no auxílio para o melhor entendimento dos perfis cromatográficos.

Aos queridos parceiros do Laboratório de Farmacologia de Produtos Naturais da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Juiz de Fora Bruna Celeida Silva Santos, Carolina Feres, Carolina Miranda Gasparetto, Dalyara Mendonça de Matos, Éder Luis Tostes, Jésus de Paula Sarmento, Laura Silva Fernandes, Pedro Henrique Santos de Freitas. Vocês são demais!

À Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Juiz de Fora, na pessoa de seu Coordenador Prof. Dr. Orlando Vieira de Sousa.

Ao Departamento de Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Juiz de Fora, na pessoa de seu Chefe Prof. Dr. Aílson da Luz André de Araújo.

À Direção da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Juiz de Fora, na pessoa de sua Diretora Profa. Dra. Miriam Aparecida de Oliveira Pinto.

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

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-04690-10), o que viabilizou parcialmente a realização do presente trabalho.

Finalmente, a todas as pessoas que, direta ou indiretamente, contribuíram para a concretização desse estudo.

*“As pessoas sempre culpam as circunstâncias pelo que elas são.
Não acredito em circunstâncias.
As pessoas que progridem na vida
são aquelas que acordam pela manhã e
procuram as circunstâncias que desejam,
e se não as encontram, as criam.”*

Jorge Bernard Shaw

RODRIGUES, K. C. M. Caracterização química e investigação das atividades antibacteriana e anti-inflamatória tópica de *Vernonia polyanthes* Less. 2013. 144 p. Dissertação. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, Minas Gerais.

RESUMO

Vernonia polyanthes Less., conhecida como assa-peixe, é uma espécie vegetal que tem sido utilizada na medicina tradicional como anti-inflamatório, cicatrizante e antimicrobiano. O objetivo do presente estudo foi caracterizar quimicamente e investigar as atividades antioxidante, antibacteriana e anti-inflamatória tópica de *Vernonia polyanthes* Less. Folhas secas e pulverizadas foram exaustivamente extraídas com hexano, acetato de etila e etanol por maceração estática. Foi realizada a quantificação de teores de fenóis e flavonoides totais por espectrofotometria. A atividade antioxidante foi determinada pelos métodos de DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazil), poder de redução e cooxidação do β -caroteno/ácido linoleico. A atividade antibacteriana foi estabelecida pelo método de difusão em ágar e Concentração Inibitória Mínima por microdiluição em caldo. A caracterização química foi realizada por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência e Cromatografia Gasosa/Espectrofotometria de Massas. A atividade anti-inflamatória tópica foi investigada pelos testes de edema de orelha induzido pelo óleo de cróton e pelo ácido araquidônico. Os dados foram demonstrados como média \pm erro padrão e análise de variância seguida dos testes de Newman-Keuls ou Tukey foi usada para medir o grau de significância ($p < 0,05$). Os teores de fenóis e de flavonoides totais variaram de 0,53 a 22,93 g / 100 g e de 0,18 a 8,23 g / 100 g, respectivamente. Os extratos em acetato de etila e etanólico apresentaram atividade antioxidante pelos métodos aplicados. Todos os extratos investigados (hexânico, em acetato de etila e etanólico) inibiram o crescimento das bactérias de referência testadas, de forma variável. A Cromatografia Líquida de Alta Eficiência permitiu a detecção dos seguintes constituintes nos extratos estudados, a saber: 1) hexânico: luteolina; 2) em acetato de etila: luteolina, apigenina e rutina; e 3) etanólico: luteolina e rutina. A Cromatografia Gasosa/Espectrofotometria de Massas também permitiu a detecção no extrato hexânico da presença da β -amirina e de dois triterpenos derivados do ácido ursólico. Os extratos das folhas de *Vernonia polyanthes* Less. inibiram o edema de orelha induzido pelos agentes flogísticos testados, demonstrando efeito anti-inflamatório tópico. Os resultados indicaram que *Vernonia polyanthes* Less. constitui uma fonte de substâncias bioativas, possui atividades antioxidante, antibacteriana e anti-inflamatória tópica, e pode ser uma alternativa promissora para aplicações terapêuticas.

Palavras-chave: *Vernonia polyanthes*. Plantas Medicinais. Antibacterianos. Inflamação. Antioxidantes. Cromatografia Líquida de Alta Pressão. Cromatografia Gasosa. Espectrometria de Massas.

RODRIGUES, K. C. M. Chemical characterization and investigation of antibacterial and anti-inflammatory topical activities of *Vernonia polyanthes* Less. 2013. 144 p. Dissertation (Master of Pharmaceutical Sciences). Graduate Program in Pharmaceutical Sciences. Faculty of Pharmacy, Federal University of Juiz de Fora, Juiz de Fora, Minas Gerais.

ABSTRACT

Vernonia polyanthes Less., known as assa-peixe, is a vegetable specie that has been used in traditional medicine as anti-inflammatory, healing and antimicrobial. The aim of the present study was to chemically characterize and to investigate the antioxidant, antibacterial and topical anti-inflammatory activities of *Vernonia polyanthes* Less. Dried and powdered leaves were exhaustively extracted with hexane, ethyl acetate and ethanol by static maceration. The quantification of total phenols and flavonoids contents were determined by spectrophotometry. The antioxidant activity was measured by DPPH (2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl), ferric reducing power and β -carotene bleaching. The antibacterial activity was established by diffusion method agar and the Minimum Inhibitory Concentration was determined through the broth microdilution method. The chemical characterization was conducted by High Performance Liquid Chromatography and by Gas Chromatography / Mass Spectrometry. The topical anti-inflammatory activity was investigated using the ear edema assay induced by croton oil and arachidonic acid. Data were expressed as mean \pm standard and analysis of variance followed by Newman-Keuls test or Tukey was measured the significance level ($p < 0.05$). The total phenolic and flavonoids values ranged from 0.53 to 22.93 g / 100 g and 0.18 to 8.23 g / 100 g, respectively. The extracts in ethyl acetate and ethanol showed antioxidant activity using the applied methods. All extracts (hexane, ethyl acetate and ethanol) inhibited the growth of the reference bacteria tested, variably. The High Performance Liquid Chromatography detected the constituents in the extracts as follows: 1) hexane: luteolin; 2) ethyl acetate: luteolin, apigenin and rutin; and 3) ethanol: luteolin and rutin. The Gas Chromatography / Mass Spectrometry also detected the presence of β -amyrin and two triterpenes ursolic acid derivatives in the hexane extract. The extracts of *Vernonia polyanthes* Less. leaves inhibited the ear edema induced by phlogistic agents tested, demonstrating topical anti-inflammatory. The results indicated that *Vernonia polyanthes* Less. is a source of bioactive substances, presents antioxidant, antibacterial, and topical anti-inflammatory activities, and can be use as an promising alternative for therapeutic applications.

Keywords: *Vernonia polyanthes*. Medicinal Plants. Antibacterial. Inflammation. Antioxidants. Chromatography, High Pressure Liquid. Chromatography, Gas. Mass Spectrometry.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	Distribuição geográfica dos registros de depósitos de <i>V. polyanthes</i>	9
Figura 2	Fotografia da parte aérea de <i>V. polyanthes</i>	10
Figura 3	Corte histológico representativo que mostra a lâmina foliar com a organização do mesofilo e tricoma secretor do tipo capitado na epiderme abaxial.....	10
Figura 4	Esquema representativo das rotas biossintéticas do metabolismo especial.....	15
Figura 5	Estrutura básica dos flavonoides.....	17
Figura 6	Representação das subclasses de flavonoides.....	18
Figura 7	Exemplos de flavonoides antioxidantes.....	21
Figura 8	Mecanismo de estabilização do elétron desemparelhado do flavonoide.....	22
Figura 9	Esquema simplificado das camadas da pele.....	29
Figura 10	Camada da epiderme: estrato córneo, granuloso, espinhoso e germinativo.....	30
Figura 11	Comparação entre a circulação periférica no tecido vascular normal com o que acontece na inflamação aguda.....	34
Figura 12	Eventos celulares na inflamação.....	35
Figura 13	Estrutura molecular do ácido araquidônico.....	43
Figura 14	Esquema representativo do método de extração.....	49
Figura 15	Estrutura química do radical DPPH e reação de estabilização com um antioxidante.....	52
Figura 16	Fluxograma do método da avaliação da atividade antibacteriana pelo método de difusão em ágar.....	57
Figura 17	Esquema da placa de 96 poços para determinação da CIM.....	59
Figura 18	Curva de calibração do ácido gálico.....	65
Figura 19	Curva de calibração da rutina.....	65
Figura 20	Atividade antioxidante dos extratos hexânico, em acetato de etila e	

	etanólico das folhas de <i>V. polyanthes</i> em diferentes concentrações pelo método do DPPH.....	67
Figura 21	Bioautografia dos extratos hexânico, em acetato de etila e etanólico das folhas de <i>V. polyanthes</i> em cromatografia de camada fina revelada com cloreto férrico e DPPH.....	69
Figura 22	Bioautografia dos extratos hexânico, em acetato de etila e etanólico das folhas de <i>V. polyanthes</i> em cromatografia de camada fina revelada com NP/PEG e DPPH.....	70
Figura 23	Bioautografia dos extratos hexânico, em acetato de etila e etanólico das folhas de <i>V. polyanthes</i> em cromatografia de camada fina revelada com Lieberman-Bouchard e DPPH.....	71
Figura 24	Decaimento da absorbância em função do tempo para os extratos das folhas de <i>V. polyanthes</i> pelo método da cooxidação do β -caroteno/ácido linoleico.....	73
Figura 25	Perfil cromatográfico do extrato hexânico das folhas de <i>V. polyanthes</i>	77
Figura 26	Espectros UV dos sinais 1, 2 e 3 do cromatograma do extrato hexânico das folhas de <i>V. polyanthes</i> e do padrão luteolina.....	78
Figura 27	Perfil cromatográfico do extrato em acetato de etila das folhas de <i>V. polyanthes</i>	79
Figura 28	Espectros UV dos sinais 1, 2, 3 e 4 do cromatograma do extrato em acetato de etila das folhas de <i>V. polyanthes</i> e dos padrões luteolina e rutina.....	79
Figura 29	Coinjeção do extrato em acetato de etila das folhas de <i>V. polyanthes</i> com o padrão luteolina.....	80
Figura 30	Coinjeção do extrato em acetato de etila das folhas de <i>V. polyanthes</i> com o padrão rutina.....	81
Figura 31	Coinjeção do extrato em acetato de etila das folhas de <i>V. polyanthes</i> com o padrão apigenina.....	81
Figura 32	Espectro UV das coinjeções.....	82
Figura 33	Perfil cromatográfico do extrato etanólico das folhas de <i>V. polyanthes</i>	83
Figura 34	Espectros UV dos sinais 1, 2 e 3 do cromatograma do extrato etanólico das folhas de <i>V. polyanthes</i> e dos padrões luteolina e rutina.....	83

Figura 35	Coinjeção do extrato etanólico das folhas de <i>V. polyanthes</i> com o padrão luteolina.....	84
Figura 36	Coinjeção do extrato etanólico das folhas de <i>V. polyanthes</i> com o padrão rutina.....	85
Figura 37	Espectros UV das coinjeções.....	85
Figura 38	Perfil cromatográfico do extrato hexânico das folhas de <i>V. polyanthes</i> obtido por CG/EM.....	86
Figura 39	Fragmentação sugere a presença de β -amirina.....	87
Figura 40	Fragmentação da substância com tempo de retenção 51,09 minutos..	87
Figura 41	Fragmentação da substância com tempo de retenção 51,79 minutos..	88
Figura 42	Efeito do extrato hexânico das folhas de <i>V. polyanthes</i> sobre o edema de orelha induzido por óleo de cróton em camundongos.....	89
Figura 43	Efeito do extrato em acetato de etila das folhas de <i>V. polyanthes</i> sobre o edema de orelha induzido por óleo de cróton em camundongos.....	91
Figura 44	Efeito do extrato etanólico das folhas de <i>V. polyanthes</i> sobre o edema de orelha induzido por óleo de cróton em camundongos.....	92
Figura 45	Efeito do extrato hexânico das folhas de <i>V. polyanthes</i> sobre o edema de orelha induzido por ácido araquidônico em camundongos.	93
Figura 46	Efeito do extrato em acetato de etila das folhas de <i>V. polyanthes</i> sobre o edema de orelha induzido por ácido araquidônico em camundongos.....	94
Figura 47	Efeito do extrato etanólico das folhas de <i>V. polyanthes</i> sobre o edema de orelha induzido por ácido araquidônico em camundongos.....	95
Figura 48	Imagens representativas da histologia de cortes transversais do edema de orelha induzido pelo óleo de cróton em camundongos.....	97
Figura 49	Imagens representativas da histologia de cortes transversais do edema de orelha induzido pelo óleo de cróton em camundongos dos grupos tratados com o extrato hexânico das folhas de <i>V. polyanthes</i> ..	98
Figura 50	Imagens representativas da histologia de cortes transversais do edema de orelha induzido pelo óleo de cróton em camundongos dos grupos tratados com o extrato em acetato de etila das folhas de <i>V. polyanthes</i>	100

Figura 51 Imagens representativas da histologia de cortes transversais do edema de orelha induzido pelo óleo de cróton em camundongos dos grupos tratados com o extrato etanólico das folhas de *V. polyanthes*. 101

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Classificação das substâncias fenólicas.....	16
Tabela 2	Principais subclasses dos flavonoides.....	19
Tabela 3	Padrões químicos utilizados para detecção no extrato hexânico, em acetato de etila e etanólico das folhas de <i>V. polyanthes</i> em CLAE-UV.....	60
Tabela 4	Teores de fenóis e flavonoides totais nos extratos hexânico, em acetato de etila e etanólico das folhas de <i>V. polyanthes</i>	66
Tabela 5	Atividade antioxidante do extrato hexânico, em acetato de etila e etanólico das folhas de <i>V. polyanthes</i> pelo teste de DPPH.....	67
Tabela 6	Atividade antioxidante dos extratos hexânico, em acetato de etila e etanólico das folhas de <i>V. polyanthes</i> pelo método de poder de redução do ferro.....	68
Tabela 7	Atividade antioxidante dos extratos de <i>V. polyanthes</i> pelo método de cooxidação do β -caroteno/ácido linoleico.....	72
Tabela 8	Atividade antibacteriana dos extratos das folhas de <i>V. polyanthes</i> pelo método de difusão em ágar.....	74
Tabela 9	Atividade antibacteriana dos extratos das folhas de <i>V. polyanthes</i> pelo método da Concentração Inibitória Mínima.....	75
Tabela 10	Atividades bactericida e bacteriostática dos extratos das folhas de <i>V. polyanthes</i> através do método da Concentração Bactericida Mínima.....	76
Tabela 11	Porcentagem de inibição do extrato hexânico de <i>V. polyanthes</i> sobre o edema de orelha induzido por óleo de cróton em camundongos.....	90
Tabela 12	Porcentagem de inibição do extrato em acetato de etila de <i>V. polyanthes</i> sobre o edema de orelha induzido por óleo de cróton em camundongos.....	91
Tabela 13	Porcentagem de inibição do extrato etanólico das folhas de <i>V. polyanthes</i> sobre o edema de orelha induzido por óleo de cróton em camundongos.....	92
Tabela 14	Porcentagem de inibição do extrato hexânico das folhas de <i>V. polyanthes</i> sobre o edema de orelha induzido por ácido araquidônico em camundongos.....	93
Tabela 15	Porcentagem de inibição do extrato em acetato de etila das folhas de <i>V. polyanthes</i> sobre o edema de orelha induzido por ácido araquidônico em camundongos.....	94

Tabela 16 Porcentagem de inibição do extrato etanólico das folhas de <i>V. polyanthes</i> sobre o edema de orelha induzido por ácido araquidônico em camundongos.....	95
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS

5-HT	Serotonina
5-LOX	5-lipooxigenase
Acetil-CoA	Acetil Coenzima A
ADP	Adenosina Difosfato
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
CBM	Concentração Bactericida Mínima
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
COX	Ciclooxigenase
DMSO	Dimetilsulfóxido
EAE	Extrato em acetato de etila
EE	Extrato etanólico
EHEX	Extrato hexânico
eNOS	Óxido nítrico endotelial
EROs	Espécies reativas de oxigênio
FTC β	Fator transformador de crescimento β
His	Histamina
IFN	Interferons
IL	Interleucina
IL- 1 α	Interleucina do tipo 1 α
IL-1 β	Interleucina do tipo 1 β
iNOS	Óxido Nítrico Sintase induzida
JDE	Junção dermo epidérmica
LT	Leucotrienos
LTA ₄	Leucotrieno A ₄
LTB ₄	Leucotrieno B ₄
MHB	Caldo Mueller-Hinton
nNOS	Óxido Nítrico neuronal
NO	Óxido nítrico
NOS	Óxido Nítrico Sintase
OMS	Organização Mundial da Saúde
PBS	Tampão fosfato salino

PG	Prostaglandinas
PGE ₂	Prostaglandina E ₂
PGs	Prostaglandinas
PK	Proteína quinase
PLA ₂	Enzima fosfolipase A ₂
PNPIC	Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares
SUS	Sistema Único de Saúde
TLR	Receptor do tipo Toll
TNF	Fator de Necrose Tumoral
TPA	Acetato de 13-forbol-12- <i>O</i> -tetradecanoila
UFC	Unidades formadoras de colônia
UV	Ultravioleta
WHO	World Health Organization

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	1
2.	REVISÃO DA LITERATURA	4
2.1	CONTEXTUALIZAÇÃO DA ESPÉCIE VEGETAL ESTUDADA	4
2.1.1	A Família Asteraceae.....	4
2.1.2	O Gênero <i>Vernonia</i>	5
2.1.3	A espécie <i>Vernonia polyanthes</i> Less.....	9
2.2	METABOLISMO ESPECIAL: CONCEITO, IMPORTÂNCIA E VIAS BIOSSINTÉTICAS	14
2.2.1	Constituintes Fenólicos.....	15
2.2.2	Flavonoides.....	17
2.3	ASPECTOS GERAIS DA AÇÃO ANTIOXIDANTE	20
2.4	ASPECTOS GERAIS DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DOS PRODUTOS NATURAIS	23
2.4.1	Plantas Medicinais como Alvo de Novos Antimicrobianos.....	26
2.5	ESTRUTURA E FISIOLOGIA DA PELE	29
2.5.1	Aspectos Gerais da Inflamação Cutânea.....	33
2.5.2	Mediadores Envolvidos na Inflamação.....	36
2.5.3	Agentes Flogísticos.....	39
2.5.4	Plantas Medicinais como Alvo de Novos Anti-inflamatórios Tópicos.....	43
3.	Objetivos	48
3.1	Geral.....	48
3.2	Específicos.....	48
4.	MATERIAL E MÉTODOS	49
4.1	Material Vegetal.....	49
4.2	Obtenção dos Extratos da <i>Vernonia polyanthes</i>	49
4.3	Determinação do Teor de Fenóis Totais.....	50
4.4	Determinação do Teor de Flavonoides Totais.....	50
4.5	ATIVIDADE ANTIOXIDANTE	51
4.5.1	Método do Radical 1,1-difenil-2-picrilidrazila (DPPH).....	51
4.5.2	Determinação do Poder de Redução do Ferro.....	53
4.5.3	Técnica da Bioautografia com DPPH.....	54
4.5.4	Método de Cooxidação do β -caroteno/Ácido linoleico.....	55
4.6	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA	56
4.6.1	Teste de Difusão em Ágar.....	56
4.6.2	Determinação da Concentração Inibitória Mínima.....	58
4.6.3	Determinação da Concentração Bactericida Mínima.....	59
4.7	ANÁLISE POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE)	59
4.8	ANÁLISE POR CROMATOGRAFIA GASOSA/ESPECTROMETRIA DE MASSA (CG/EM)	61
4.9	ANIMAIS	62
4.10	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA TÓPICA EM MODELO DE EDEMA DE ORELHA	62
4.10.1	Edema de Orelha Induzido Pelo Óleo de Cróton.....	63
4.10.2	Edema de Orelha Induzido Pelo Ácido Araquidônico.....	63
4.11	ANÁLISE HISTOLÓGICA	64

4.12	ANÁLISE ESTATÍSTICA	64
5	RESULTADOS	65
5.1	Teores de Fenóis Totais e Flavonoides.....	65
5.2	ATIVIDADE ANTIOXIDANTE	66
5.2.1	Ensaio do Radical 1,1-difenil-2-picrilidrazila (DPPH).....	66
5.2.2	Avaliação pelo Método Poder de Redução do Ferro.....	68
5.2.3	Avaliação pelo Método de Bioautografia.....	69
5.2.4	Avaliação da Atividade Antioxidante pelo Método de Cooxidação do β -caroteno/Ácido Linoleico.....	72
5.3	ATIVIDADE ANTIBACTERIANA	74
5.3.1	Metódo de Difusão.....	74
5.3.2	Concentração Inibitória Mínima.....	74
5.3.3	Concentração Bactericida Mínima.....	75
5.4	ANÁLISE EM CLAE	77
5.5	ANÁLISE POR CG/EM	86
5.6	ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA TÓPICA	89
5.6.1	Efeito dos Extratos de <i>V. polyanthes</i> sobre o Modelo de Edema de Orelha Induzido pelo Óleo de Cróton.....	89
5.6.2	Efeito dos Extratos de <i>V. polyanthes</i> sobre o Modelo de Edema de Orelha Induzido pelo Óleo de Cróton.....	93
5.6.3	Análise Histológica.....	96
6	DISCUSSÃO	103
7	CONCLUSÃO	111
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	112
	ANEXO A - Protocolo Aprovado na Comissão de Ética na Experimentação Animal.....	144

1. INTRODUÇÃO

Os vegetais e seus usos foram e são fundamentais para a existência e o desenvolvimento da sociedade desde os primórdios até a atualidade. Por milhares de anos, a medicina e os produtos naturais foram intimamente ligados através da utilização de medicamentos tradicionais e venenos naturais. Desde a antiguidade, as plantas medicinais fazem parte da cultura humana como restauradoras da saúde, fonte de alimentos, vestuários, combustível, bem como utensílios para manifestações religiosas e artísticas. O registro mais antigo encontrado na Medicina Chinesa foi realizado pelo herborista Shen Nong (imperador) em 2800 a.C., que descreveu o uso de centenas de espécies vegetais na cura de várias moléstias. Estes dados foram reunidos em um compêndio denominado *Livro da Medicina Interna do Imperador Amarelo* (ALMEIDA, 2000; POSSE, 2007).

Posteriormente, o médico e botânico Dioscoridis escreveu a clássica obra *De Materia Medica*, na Grécia do século I, onde esse autor descreveu cerca de 600 plantas e 125 fármacos de origens mineral (90) e animal (35). Do total de espécies vegetais descritas, cerca de 130 já apareciam no *Corpus Hippocraticum*, literatura de referência na aplicação médica. No período compreendido pelos séculos I a VIII, tornou-se comum o comércio de drogas vegetais, especialmente as chamadas especiarias, responsáveis pela criação de rotas comerciais marítimas e terrestres e pela difusão do uso de plantas medicinais como fonte de tratamento de doenças (ALLEN, POPOVICH, ANSEL, 2007; NEPOMUCENO, 2005; TOMAZZONI, NEGRELLE, CENTA, 2006).

De acordo com Almeida (2000), “toda a história da cura encontra-se profundamente ligada às plantas medicinais e aos recursos minerais”. Segundo essa autora, até 1828, quando Friedrich Wohler sintetizou a ureia a partir de uma substância inorgânica, o cianato de amônio, o homem conhecia como matéria orgânica somente vegetal, animal ou mineral. Essa panorâmica começou a sofrer transformações a partir do século XX, visto que não somente plantas, mas também fungos, bactérias e organismos marinhos constituíam importantes fontes de substâncias biologicamente ativas. Por exemplo, o ácido acetilsalicílico, cuja síntese tornou-se possível a partir da *Salix alba*; a morfina, constituinte da *Papaver somniferum*, e os antibióticos, os quais foram desenvolvidos a partir da descoberta da penicilina produzida por fungos do gênero *Penicillium*. Todos estes medicamentos estão em uso até os dias atuais (BARREIRO, BOLZANI, 2009; BUTLER, 2004).

O conhecimento da utilização e da forma de aplicação de espécies vegetais para o tratamento de uma determinada doença é passado de geração em geração e permanece durante milênios, sem nunca cair no esquecimento (RAUH, 2008). Neste sentido, estas informações direcionam a busca de novos agentes terapêuticos através de métodos de isolamento e identificação de substâncias (CLARK, 2002).

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), o custo dos produtos fitoterápicos é bem menor quando comparado com os medicamentos industrializados, e 60% a 80% da população mundial dependem, fundamentalmente, de plantas medicinais para cuidados básicos de saúde. Nos países em desenvolvimento, em especial, as plantas medicinais representam uma importante fonte para o tratamento de diferentes distúrbios (ALMEIDA et al., 2009). Dessa forma, estima-se que 25 a 30% de todas as drogas avaliadas como agentes terapêuticos sejam derivadas de produtos naturais (CALIXTO, 2005; SOUSA et al., 2008).

As potencialidades de uso das plantas medicinais encontram-se longe de estarem esgotadas. Entre essas possibilidades, existem as que são amplamente utilizadas para o tratamento de distúrbios da pele e que possuem estudos pré-clínicos e clínicos bem estabelecidos, destacando-se *Matricaria recutita* (Asteraceae), *Hamamelis officinalis virginiana* (Hamamelidaceae), *Arnica montana* (Asteraceae) e *Calendula officinalis* (Asteraceae). Em decorrência das evidências científicas que validam a eficácia e a segurança, estas espécies vegetais podem ser utilizadas em estudos de preparações farmacêuticas, principalmente formulações dermatológicas (BEDI, SHENEFELT, 2002).

Com base no exemplo acima, nota-se que a família Asteraceae corresponde a um importante objeto de pesquisa, provavelmente pelo fato de possuir distribuição cosmopolita, sendo a maior da classe Angiospermae e representando 10% da flora mundial (BREMER, 1994; SOUZA, LORENZI, 2005).

Entre os gêneros de Asteráceas, as Vernônias são fontes de lactonas, sesquiterpenos, flavonoides, esteroides e polissacarídeos (TOYANG, VERPOORTE, 2013). Espécies do gênero *Vernonia* são utilizadas na medicina popular, principalmente na África, América Central e América do Sul e têm sido objeto de vários estudos em relação às suas atividades anti-inflamatória, antipirética, antitumoral e antimalárica, entre outras (GUPTA et al., 2003; IWALEWA et al., 2003; LAMBERTINI et al., 2004; MAZUMDER et al., 2003; MUREGI et al., 2003).

Vernonia polyanthes Less., popularmente conhecida como assa-peixe, assa-peixe braço, estanca-sangue, tramanhém, mata pasto, cambará-guassu, cambará-do-branco, erva-preá e enxuga, é uma planta silvestre comum nos cerrados de Minas Gerais, São Paulo, Mato

Grosso e Goiás (ALVES, NEVES, 2003). Esta espécie é utilizada na medicina popular para o tratamento de afecções do aparelho respiratório, afecção da pele, processo inflamatório, feridas, problemas renais, fraturas, torções, contusões, luxações, dores musculares e emenagoga, tendo também funções cicatrizantes e diuréticas (ALVES, NEVES, 2003; DEL-VECHIO-VIEIRA et al., 2008; TEMPONI et al., 2012).

Considerando-se alguns aspectos científicos (ensaios *in vitro* e *in vivo*) que corroboram para a sustentação do uso terapêutico de *V. polyanthes*, os relatos encontrados na literatura são escassos e têm como foco, até o presente momento, investigações das atividades antiulcerogênica (BARBASTEFANO et al., 2007), antinociceptiva e anti-inflamatória (TEMPONI et al., 2012), anti-hipertensiva (ROMANEZI DA SILVEIRA, FOGLIO, GONTIJO, 2003), antibacteriana (SILVA et al., 2012; TEMPONI, 2012) e antifúngica (BRAGA et al., 2007).

O objetivo do presente estudo foi caracterizar quimicamente e investigar as atividades antioxidante, antibacteriana e anti-inflamatória tópica de *V. polyanthes* Less., permitindo que o somatório da vertente popular/empírica e dos conhecimentos acadêmico/científicos adquiridos possam fornecer subsídios com o intuito de corroborar com o uso popular e para o desenvolvimento de formulações e formas farmacêuticas inovadoras que poderão ser aplicadas no tratamento de diversos processos inflamatórios, infecciosos ou não.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 CONTEXTUALIZAÇÃO DA ESPÉCIE VEGETAL ESTUDADA

2.1.1 A FAMÍLIA ASTERACEAE

A família Asteraceae (Compositae) reúne cerca de 1.620 gêneros com aproximadamente 23.600 espécies amplamente distribuídas (STEVENS, 2001; <http://www.tolweb.org/asteraceae>, acessado em 19 de junho de 2013). No Brasil, segundo Barroso e outros (1991), as Asteráceas estão representadas por aproximadamente 196 gêneros e cerca de 1.900 espécies.

As Asteráceas são constituídas de ervas perenes, subarbustos e arbustos, mas ocorrem também ervas anuais, lianas e árvores (CANCELLI, EVALDT, BAUERMAN, 2007; MONDIN, 2006). Estas plantas podem ser encontradas nos mais diversos *habitats* e em diferentes condições climáticas, desde regiões tropicais, subtropicais e até temperadas, devido ao excepcional poder de adaptação ambiental por elas apresentado. Um importante fator para o sucesso biológico das mesmas deve-se à grande capacidade de dispersão das sementes dos frutos que apresentam pápus plumosos, apêndices, estruturas de aderência e metabólitos especiais (HEIDEN, 2007; VENABLE, LEVIN, 1983).

Em relação à descrição botânica, a Asteraceae é uma das famílias de maior sucesso entre as Angiospermas. Parte desse sucesso é devido à enorme diversificação das suas estratégias reprodutivas como expostas acima. Sua evolução é marcada por uma série contínua de especializações e modificações das estruturas florais. A característica mais marcante desta família é a presença de flores diminutas agrupadas em inflorescências compactas denominadas capítulos (LOB, 2007). Podem apresentar simetria radial ou zigomorfa e serem hermafroditas ou apresentarem sexo separado, estando na mesma inflorescência ou em plantas dioicas (JOLY, 1998).

Espécies de Asteráceas apresentam inúmeras propriedades farmacológicas devido à presença de metabólitos especiais tais como terpenos, flavonoides, poliacetilenos, lactonas sesquiterpênicas, ácido clorogênico, ácidos graxos, alcaloides, iridoides, taninos, triterpenos pentacíclicos, óleos essenciais, entre outros (FREIRE et al., 1996; LOPES, 1991; RAUH, 2008; <http://www.mobot.org/MOBOT/research/APweb/>, acessado em 19 de junho de 2013).

A certificação da grande fama da família Asteraceae como produtora de compostos bioativos está diretamente relacionada com a sua utilização na medicina popular, exemplificada pelo uso de *Arnica montana* (arnica verdadeira), *Baccharis trimera* (carqueja), *Cynara scolimus* (alcachofra), *Matricaria chamomilla* (camomila), *Vernonia condensata* (boldo-da-bahia) e *Vernonia polyanthes* (assa-peixe) (MAIA, TORRES, PESSOA, 2010).

Entre os mais de mil gêneros que compõem as Asteráceas, o *Vernonia* abrange uma diversidade de espécies mundialmente distribuídas. Espécies desse gênero têm sido objeto de estudos em relação as suas atividades anti-inflamatória, antipirética, antitumoral e antimalárica, entre outras, sendo utilizadas na medicina popular principalmente na África, América Central e América do Sul (GUPTA et al., 2003; IWALEWA E. , IWALEWA O., ADBOYE, 2003; MAZUMDER et al., 2003; MUREGI et al., 2003).

2.1.2 O GÊNERO *Vernonia*

O gênero *Vernonia* recebeu essa denominação em homenagem ao botânico britânico Will Vernon (TOYANG, VERPOORTE, 2013), equivalendo a um dos maiores e mais importantes da família Asteraceae, representado por aproximadamente 1.500 espécies distribuídas especialmente nas regiões tropicais e subtropicais, sendo a África e a América do Sul os principais centros de dispersão. Espécies de *Vernonia* completam a flora de plantas medicinais de toda parte do mundo, inclusive do Brasil (ERASTO, GRIERSON, AFOLAYAN, 2006; MAIA et al., 2010).

A prospecção fitoquímica de *Vernonia* revela uma diversidade de metabólitos especiais como alcaloides, taninos, carotenoides, flavonoides, esteroides, lignoides, triterpenos, mas são os terpenoides denominados lactonas sesquiterpênicas (LST) os compostos marcantes desse gênero (AWE, OLAJIDE, MAKINDE et al., 1998; BARBOSA-FILHO et al.; 2008; CARVALHO, COSTA, ABREU, 1999; ZANON et al. 2008). Essa significativa variedade de compostos químicos e a destacada presença de LST neste gênero induzem à busca de novas propriedades biológicas de suas inúmeras espécies, visando a sustentação científica e a segurança terapêutica para as novas propriedades medicinais que possam vir a serem descobertas (BOHLMANN et al., 1978; PICMAN, 1986).

Neste contexto, Jacobs, Bunbury e McLean (1986) estudaram a *Vernonia remotiflora* Rich., importante representante deste gênero na República Cooperativa da Guiana, e isolaram e identificaram a tricinaflavona.

Extratos obtidos das partes aéreas de *Vernonia mollissima* e *Vernonia squamulosa* revelaram triterpenos, acetatos de triterpenos e esteroides. De *V. mollissima* e de *V. squamulosa* foram isolados, não na forma pura, ésteres de piptocarfol, escopoletina e loliólídeo e piptocarfin A e glaucolídeo, respectivamente (CATALÁN et al., 1986).

De acordo com Fiseha e outros “*Vernonia galamensis* é um novo potencial industrial das culturas oleaginosas para as áreas semiáridas, apresentando elevado teor de ácido vernólico naturalmente epoxidado (80% do óleo)”. Em um recente estudo realizado com sementes dessa espécie por estes autores, foram isoladas duas substâncias derivadas do ácido vernólico. Vale ressaltar que culturas oleaginosas, nos dias atuais, têm um importante *link* com as discussões e estabelecimento de estratégias de pesquisa e aportes financeiros para produção de biocombustível no Brasil.

Espécies de *Vernonia* são utilizadas no tratamento de diversas doenças como malária, doenças respiratórias e distúrbios gastrintestinais (GUPTA et al., 2003). Representantes deste gênero são amplamente utilizadas na medicina tradicional no mundo, inclusive no Brasil.

Na China, utiliza-se a *Vernonia anthelmintica* no tratamento de vitiligo e câncer de mama. Entretanto, essa mesma espécie é empregada como anti-helmíntica, de onde deriva sua nomenclatura, na medicina tradicional do Paquistão, Filipinas e Índia (HORDEGER, 2003).

Na medicina tradicional Maliana (Timor-Leste, Distrito de Bobonaro, <http://timor-leste.gov.tl/?p=91&lang=pt>, acessado em 22 de junho de 2013), as raízes de *Vernonia kotschyana* são utilizadas para o tratamento de distúrbios gastrointestinais e cicatrização de feridas, sendo a decocção das raízes pulverizadas reconhecida oficialmente pelo governo de Mali constando, inclusive, da Relação Nacional de Medicamentos Essenciais (NERGARD et al., 2004). No intuito de oferecer subsídios científicos para o uso popular de *V. kotschyana* no tratamento de gastrites e úlceras gastrointestinais, Inngjerdingen e outros (2012), em parceria com o Departamento de Medicina Tradicional de Mali, reportaram, através de experimentos específicos, a atividade gastroprotetora dessa espécie vegetal.

No Brasil, várias espécies de *Vernonia* são utilizadas empiricamente pela população; por exemplo, o macerado de folhas de *Vernonia condensata* Baker, usado como analgésico, anti-ulcerogênico e para a prevenção de distúrbios do estômago e fígado (FRUTUOSO et al., 1994), *Vernonia chalybaea* Mart. empregada em problemas de vesícula e hidropsia (ALBURQUERQUE et al., 2007), *Vernonia tweediana* Baker utilizada para o tratamento de doenças respiratórias, como gripes, bronquites e tosses (ZANON et al., 2008) e *Vernonia scorpioides* aplicada no tratamento de feridas de pele (DALAZAN, 2005).

O grande desafio é agregar a aplicação popular/empírica das espécies vegetais no tratamento das diversas doenças ao conhecimento acadêmico/científico desse uso, conferindo a ele as bases sustentáveis e seguras de utilização.

Com este foco, cientistas do mundo inteiro têm aplicado as mais distintas ferramentas laboratoriais e desenhado diferentes estudos e estratégias de pesquisa para elucidar mecanismos de ação de metabólitos especiais, estabelecer efeitos de substâncias detectadas a partir de espécies da biodiversidade mundial, inclusive da brasileira, e desenvolver formulações e formas farmacêuticas inovadoras para o tratamento das mais diversas doenças.

Em Mali, *V. kotschyana* é tradicionalmente utilizada na cicatrização de feridas (NERGARD et al., 2004). A biologia deste evento é muito mais complexa do que inicialmente pensado e envolve mediadores solúveis, componentes da matriz extracelular, células residentes e circulantes do sistema imune. As células imunológicas são críticas para os resultados da cura e agentes que modulam a função imune podem ter um efeito significativo no processo de reparação (GILLITZER, GOEBELER, 2001). Nergard e outros (2005) extraíram os polissacarídeos pectina e arabinogalactona da *V. kotschyana* e descreveram que a pectina apresentou baixa atividade na fixação do complemento e influenciou na proliferação de células B e T, enquanto a arabinogalactona foi um potente ativador da fixação do complemento e indutor da atividade mitótica das células B. Esses dois polissacarídeos induziram a quimiotaxia de macrófagos em células T e NK.

No Brasil, existe registro do uso de outra espécie de *Vernonia*, a *V. scorpioides* (Piracá, Erva-de-São-Simão) sendo utilizada, por exemplo, como extrato etanólico obtido a partir de folhas frescas (extrato de Piracá) por pessoas idosas no tratamento de úlceras crônicas de pele, em função de seu poder curativo (LEITE et al., 2002). Leite e outros (2002) demonstraram que este extrato incorporado em hidrogel aumentou a regeneração e organização do novo tecido, corroborando com o uso popular de *V. scorpioides*. Posteriormente, este estudo foi complementado por Dalazen e outros (2005) por meio da modificação da formulação e forma farmacêuticas utilizadas, do modelo animal aplicado e dos parâmetros histopatológicos usados.

Em países do continente africano, a *Vernonia amygdalina* é popularmente utilizada para o tratamento de várias desordens, entre elas convulsões (Uganda), diabetes (África Ocidental, Índia e Nigéria) e doenças metabólicas associadas ao fígado (África Ocidental) (YEAP et al., 2010), podendo estar associadas à formação de radicais livres (RATNAM et al., 2006). Agentes antioxidantes surgem como opções profiláticas e terapêuticas. Estudo realizado a partir de extratos aquoso e etanólico obtidos de folhas de *V. amygdalina*

demonstrou a ação citoprotetora de células do estômago, fígado e rins dessa espécie por meio da redução da geração de grupamentos hidroxila, o que acarretou na estabilização dos radicais livres e consequente proteção das células, implicando em forte atividade antioxidante (NWANGWU et al., 2011).

Sabendo-se que a medicina tradicional é o somatório de conhecimentos, técnicas e procedimentos baseados nas teorias, crenças e experiências indígenas de diferentes culturas (OMS, 2002), os tradicionais curandeiros de Uganda e de outros países africanos utilizam espécies vegetais no tratamento de diversas doenças. Nesses locais, a infusão em água das raízes de *Vernonia auriculifera* é utilizada tradicionalmente em pacientes febris (FREIBURGHAUS et al., 1996). Classicamente, a febre pode ser gerada pela ação de substâncias exógenas ou por pirogênios endógenos, resultando em um aumento da temperatura corporal (RYAN, LEVY, 2003). Na tentativa de se investigar a possível ação de *V. auriculifera* sobre as etiologias bacterianas dos casos de febre, Kiplimo, Koorbanally e Chenia (2011) isolaram, por meio de uma investigação fitoquímica, oito triterpenos e uma amina sesquiterpênica, sendo que todas essas substâncias apresentaram moderada atividade antibacteriana, com exceção dos triterpenos sitosterol e farnesilamina.

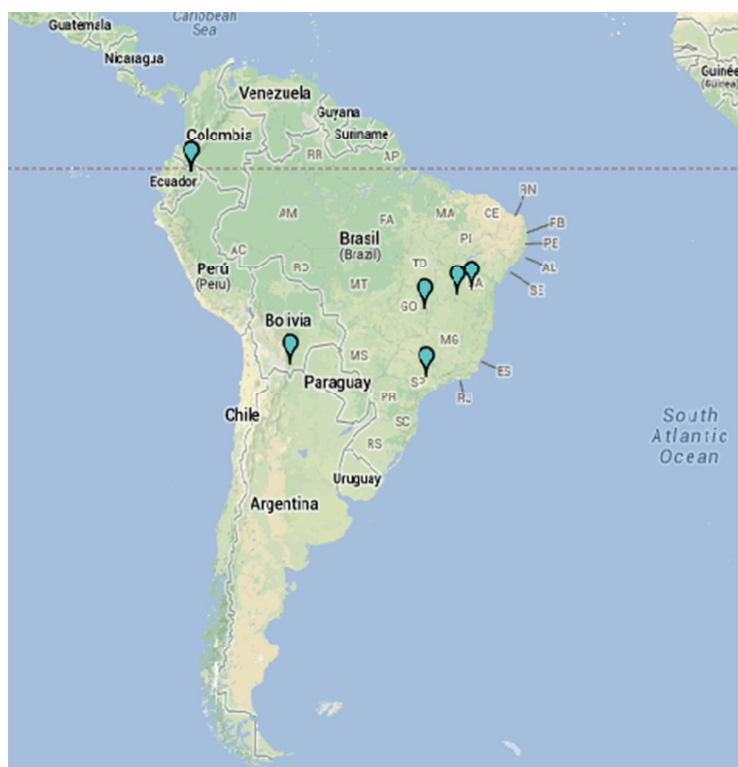
Tradicionalmente, a *V. condensata* Baker é muito utilizada no Brasil como analgésica, antianêmica, antibacteriana, antipirética, antiulcerogênica sendo usada, ainda, como anti-inflamatória (ALVES, NEVES, 2003; LORENZI, 2002; MONTEIRO, et al., 2001). Considerando-se a complexidade de conceitos relacionados a essas atividades, especificamente a inflamação ocorre durante a perturbação da homeostasia, por meio da ativação de uma complexa cascata inflamatória que envolve o sistema imunológico através dos receptores da imunidade inata que reconhecem os patógenos e o fisiológico, e alguns eventos comportamentais coordenados por citocinas (ASHLEY, WEIL, NELSON, 2012). Silva e outros (2011) realizaram experimentos *in vivo* com o extrato etanólico das folhas de *V. condensata* e os resultados obtidos por esses autores sustentaram o uso popular dessa planta como agente anti-inflamatório.

Os exemplos apresentados acima permitem a constatação do elevado potencial do gênero *Vernonia*.

2.1.3 A ESPÉCIE *Vernonia polyanthes* Less.

V. polyanthes Less. representa cerca de 10% da flora mundial (BARROSO et al., 1991), tendo sido registrada na Argentina, Bolívia, Brasil, Equador e Venezuela (Figura 1). No Brasil, esta espécie foi descrita nos estados da Bahia, Distrito Federal, Espírito Santo, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, Paraná, Rio de Janeiro e São Paulo (<http://www.tropicos.org/NamePage.aspx?nameid=2708839&tab=specimens>, acessado em 23 de junho de 2013).

Figura 1: Distribuição geográfica dos registros de depósitos de *V. polyanthes*.



Fonte: <http://www.tropicos.org/NamePage.aspx?nameid=2708839&tab=specimens>

Considerando os aspectos botânicos, esta planta é uma espécie perene, arbustiva grande ou arvoreta, ereta, pouco ramificada, rizomatosa, de caules pubescentes de coloração acinzentada, com 1 a 3 metros de altura. Suas folhas são simples, ásperas na face ventral e pilosas na dorsal, curtamente pecioladas, lanceoladas de margem serrilhada, base atenuada e ápice agudo, possuindo cerca de 10 a 24 cm de comprimento e 3 cm de largura. As flores esbranquiçadas, melíferas, reunidas em capítulos pequenos dispostos em panículas terminais (Figura 2) (LORENZI, MATOS, 2002).

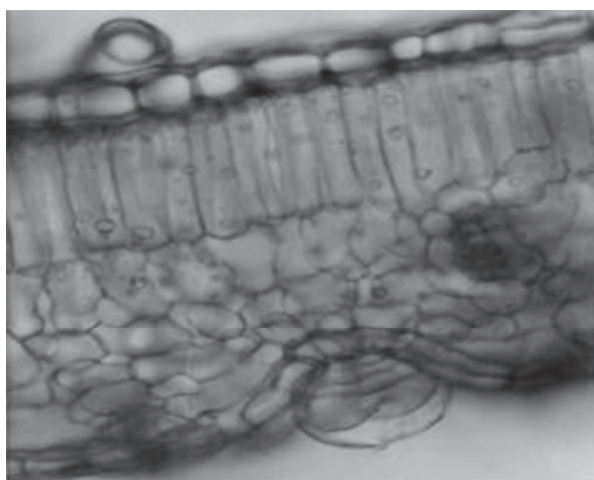
Figura 2: Fotografia da parte aérea de *V. polyanthes*.



Fonte: LORENZI, MATOS (2002).

A Figura 3 mostra as principais características morfológicas de *V. polyanthes*. Pela análise desta Figura, a lâmina foliar possui como características anatômicas ser dorsiventral, com tricomas em ambas as faces. Pela face adaxial, a epiderme é uniestratificada e nela são encontrados, junto às células fundamentais e estômatos, tricomas simples, pluricelulares, com número variável de células situadas, em geral, sobre as nervuras. Os tricomas caracterizam-se por apresentarem células com diferentes graus de espessamento (LORENZI, MATOS, 2002).

Figura 3: Corte histológico representativo que mostra a lâmina foliar com a organização do mesófilo e tricoma secretor do tipo capitado na epiderme abaxial.



Fonte: ALVES, NEVES (2003).

V. polyanthes é popularmente conhecida como assa-peixe, assa-peixe braço, estanca-sangue, tramanhém, mata-pasto, cambará-guassu, cambará-do-branco, erva-preá e enxuga. Tradicionalmente, têm sido utilizada no tratamento de distúrbios cutâneos, processos inflamatórios, feridas, fraturas, torções, contusões, luxações, dores musculares e como cicatrizante (ALVES, NEVES, 2003) é descrita como planta medicinal (PENNA, 1946).

O Brasil é muito conhecido pela exuberância e variedade de suas plantas tropicais, sendo que muitas dessas espécies vegetais são usadas como medicamentos naturais sem qualquer base científica (BRAGA et al., 2007).

Na vertente acadêmico/científica, estudos são realizados objetivando contribuir para o uso sustentável, seguro e eficaz das plantas medicinais no mundo, inclusive no Brasil.

Em um estudo realizado por Barbastefano e outros (2007), os extratos metanólico e clorofórmico obtidos das partes aéreas de *V. polyanthes* inibiram significativamente a lesão da mucosa gástrica de ratos (64% e 90%, respectivamente), indicando que ambos os extratos apresentaram efeitos gastroprotetores, o que corrobora com o uso popular dessa planta como cicatrizante.

Nos últimos anos os antioxidantes têm sido utilizados em várias doenças como, diabetes, câncer, doenças cardiovasculares, doenças autoimune, doenças neurodegenerativas e para o envelhecimento (RATNAM, 2006). Neste foco, as propriedades diuréticas e hipotensoras da infusão das folhas de *V. polyanthes* foram investigadas. Os resultados mostraram uma queda significativa na pressão arterial, bem como um aumento significativo do fluxo urinário e aumento de excreção de sódio, concluindo que esta espécie apresenta atividade hipotensora e natriurética (SILVEIRA, RÚBIO, ALVES, 2000). Um outro estudo foi realizado para avaliar o efeito do extrato hidroalcoólico de *V. polyanthes* por via oral frente à pressão exercida pelo sangue contra a parede das artérias e a excreção de sódio renal em ratos. O resultado sugere que o extrato de *V. polyanthes* é um agente vasodilatador, diminuindo assim a pressão arterial e uma redução na excreção de sódio. (ROMANEZI, FOGGIO, GONTIJO, 2003).

Com outro foco de investigação, Braga e outros (2007) reportaram que o extrato metanólico obtido das folhas de *V. polyanthes* avaliado frente à *Leishmania chagasi* e *Leishmania amazonenses*, e frente às leveduras *Candida albicans* ATCC 18804 e *Cryptococcus neoformans* ATCC 32608, demonstrou uma atividade promissora frente à *L. amazonensis* e não foi capaz de inibir as leveduras testadas.

As plantas medicinais, na forma de extratos brutos, infusões e bebidas, são amplamente usadas pela comunidade indígena Vanuïre para tratar infecções comuns,

inclusive pulmonares, o que sensibilizou Oliveira e outros (2007) a avaliarem a atividade antimicobacteriana do extrato hidroalcoólico das raízes de *V. polyanthes*, entre outros, através do ensaio cinético antimicobacteriano empregando a cepa *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv ATCC 27294. O extrato hidroalcoólico de *V. polyanthes* testado teve sua atividade antimicobacteriana confirmada.

Em uma análise da atividade antibacteriana de três representantes de Asteráceas, entre elas a *V. polyanthes*, e uma espécie de Myrtaceae, Silva e outros (2012) obtiveram extratos metanólicos e óleos essenciais, os quais foram testados frente a 16 cepas de *S. aureus* e 16 de *Escherichia coli* isoladas de espécimes clínicos humanos. Todas as plantas investigadas mostraram uma atividade antibacteriana frente às cepas testadas, tanto os extratos quanto os óleos essenciais, revelando seu potencial uso como agentes antibacterianos.

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), Temponi (2012) avaliou a atividade antibacteriana do extrato etanólico e das frações hexânica, diclorometânica, em acetato de etila e butanólica obtidas das folhas de *V. polyanthes* frente às amostras bacterianas de referência de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 10536, *Salmonella typhimurium* ATCC 13311 e *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853. Os resultados obtidos por essa autora concordaram com aqueles observados no estudo anterior de Silva e outros (2012), visto que as frações diclorometânica e butanólica foram ativas frente a *S. aureus* ATCC 25923 e *E. coli* ATCC 10536, com valores de CIM variando de 1,25 a 5,0 mg/mL. Contudo, Temponi (2012) observou o potencial antibacteriano de *V. polyanthes* frente a duas novas cepas, *Salmonella typhimurium* ATCC 13311 e *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, ainda não descrito.

Em virtude da inexistência de subsídios científicos para o uso tradicional de *V. polyanthes* no tratamento de processos inflamatórios, Temponi e outros (2012) investigaram os efeitos antinociceptivo e anti-inflamatório do extrato etanólico obtido das folhas dessa espécie vegetal por meio da utilização de modelos animais. Os resultados desse estudo sugerem que *V. polyanthes* pode ser uma fonte de substâncias ativas com atividades antinociceptiva e anti-inflamatória (TEMPONI et al., 2012).

Os exemplos descritos acima demonstram que a Fitoterapia explica, cientificamente, porque as tradicionais plantas medicinais utilizadas há milênios por todos os povos curam, completando, desta forma, o valioso conhecimento cultural sobre tão importante terapêutica natural (VIEIRA, 1992). Esta ciência mostra a relevância e as potencialidades do

conhecimento popular agregado ao científico e vice-versa, e sensibiliza pesquisadores de todo o mundo a se dedicarem à bioprospecção de produtos naturais.

Alves (1991) mostrou que o extrato etanólico das raízes de *V. polyanthes*, submetidos aos processos usuais de fracionamento e purificação, apresentou componentes tais como hidrocarbonetos ($C_{16}H_{34}$ a $C_{31}H_{64}$, exceto $C_{20}H_{42}$); acetatos de lupeila; α - e β -amirinila de taraxasterila; lupeol; sitosteróis; estigmasterol; ésteres metílicos (caprilato, perlagonato, caprato, undecanoato, laurato, tridecanoato e palmitato, isômero acetil ados do lupeol (acetatos de germanicila, de pseudo-taraterila, lupeila e saminila), lupeol, o germanicol e o pseudo-taraxasterol.

A fitoquímica realizada pelo Barbastefano e outros (2007) no extrato metanólico obtidos das partes aéreas de *V. polyanthes* apontou a presença de triterpenos e como componente majoritário detectou as lactonas sesquiterpênicas, já no extrato clorofórmico percebeu a presença flavonoides como componente majoritário.

Conforme Bohlmann (apud Barbastefano et al., 2007) foi isolado e identificado muitos triterpenos e lactonas sesquiterpênicas, sendo tridecapentainena, germacreno D, biciclogermacreno, α -humuleno, acetato de lupeol, estigmasterol e hirsutilnolideo. Muitos triterpenos, incluindo carbenoxolona, ácido oleânico, ácido ursólico e esteroides.

Outro estudo fitoquímico relevante foi o de Silva e outros (2011) que analisaram os extratos brutos e óleos essenciais das folhas de *V. polyanthes*. A identificação dos metabólitos secundários do extrato bruto detectou a presença de fenóis, taninos, chalconas, auronas, flavonoides, ácido graxos, saponinas, esteroides e quinonas. O óleo essencial foi avaliado por CG/EM detectou a presença de Germacreno D (27,79%), Cariofileno (16,2%), Germacreno B (15,01%).

2.2 METABOLISMO ESPECIAL: CONCEITO, IMPORTÂNCIA E VIAS BIOSSINTÉTICAS.

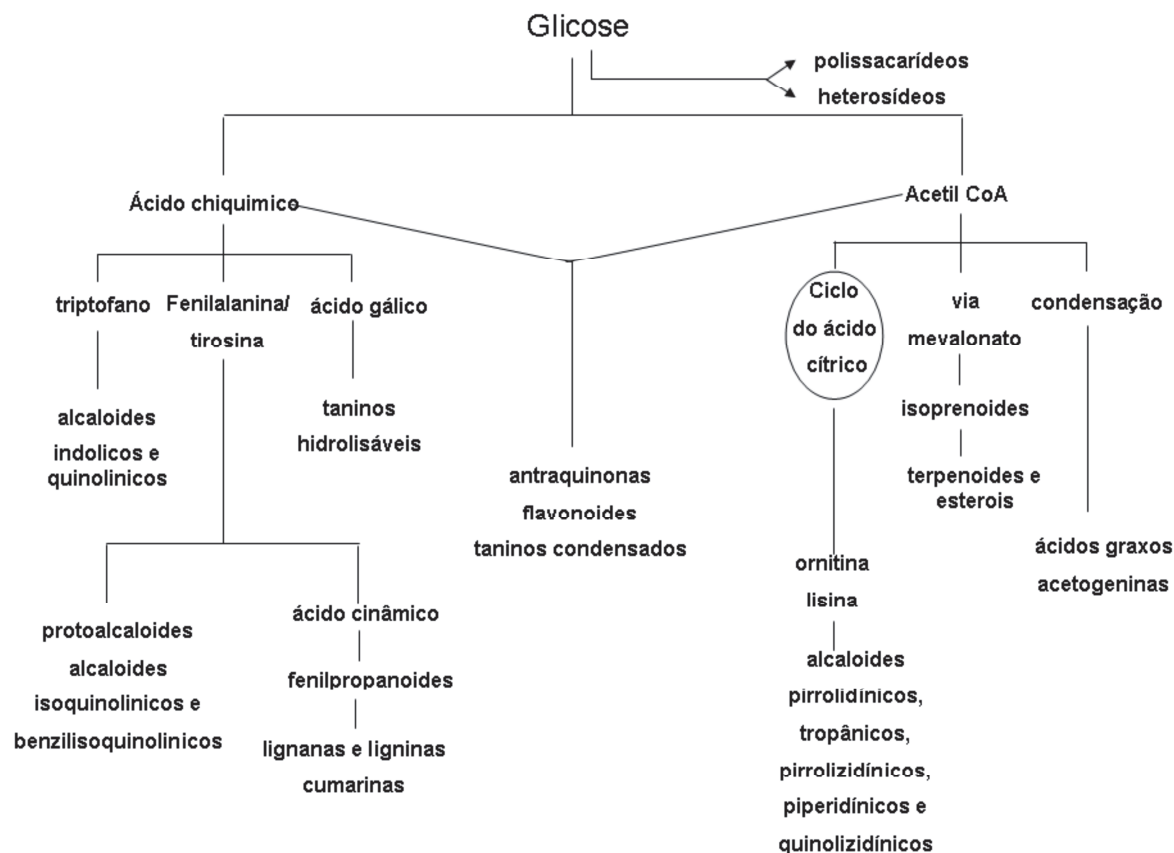
Para garantir a sua sobrevivência, todos os organismos vivos exercem uma série de reações químicas. É essencial que sejam capazes de produzir energia na forma de ATP e, no caso de seres pluricelulares, de sintetizar os próprios tecidos. As plantas utilizam-se da fotossíntese para realizar a produção de substâncias orgânicas, a partir de constituintes inorgânicos presentes no ambiente, para assegurar sua sobrevivência, crescimento e reprodução. Substâncias como carboidratos, proteínas, nucleotídeos e lipídeos são denominados metabólitos primários (DEWICK, 2009).

Os metabólitos especiais são originados do metabolismo primário que, através da fotossíntese, forma-se a glicose. Esta substância, por sua vez, é submetida a reações químicas que produzem o ácido chiquímico e a acetil coenzima A (acetil-CoA) (Figura 4). A partir desses constituintes, são biossintetizados todos os metabólitos especiais, dentre eles alcaloides, antraquinonas, taninos, flavonoides, cumarinas, lignanas, esteroides e terpenoides (SANTOS, 2007). A maioria desses metabólitos não exerce papel predominante na sobrevivência, mas são encontrados em grupos de organismos específicos e sintetizados de acordo com as particularidades de cada espécie (DEWICK, 2009).

Nas plantas, os metabólitos especiais apresentam variadas funções como atrair agentes polinizadores e dispersores de sementes, servir como constituintes tóxicos em mecanismos de defesa contra insetos fitófagos e herbívoros, garantir proteção contra infecções por micro-organismos, permitir a interação com outras plantas, desempenhando o papel de proporcionar a competição entre as espécies. Os metabólitos especiais são divididos em três grupos principais: os terpenos, as substâncias fenólicas e as substâncias nitrogenadas (PINTO et al., 2002; VICKERY M., VICKERY B., 1981).

As plantas são uma importante fonte de substâncias biologicamente ativas, sendo de grande interesse como agroquímicos, corantes, polímeros, fibras, colas, óleos, ceras, aromatizantes, perfumes e medicamentos (CROTEAU, 2000; PINTO et al., 2002). As substâncias responsáveis pelos efeitos terapêuticos de plantas medicinais e por descoberta de novos fármacos possuem sua origem no metabolismo especial (DEWICK, 2002). São conhecidas mais de 100 mil substâncias derivadas do metabolismo especial, sendo que a maioria delas ainda não foi estudada quanto ao aspecto farmacológico (OKSMAN-CALDENTY, INZE, 2004).

Figura 4: Esquema representativo das rotas biossintéticas do metabolismo especial.



Fonte: SANTOS (2007).

2.2.1 CONSTITUINTES FENÓLICOS

Os constituintes fenólicos são substâncias distribuídas amplamente na natureza, são considerados produtos do metabolismo secundário que as plantas sintetizam durante seu desenvolvimento normal e em resposta a condições de estresse como infecções, ferimentos, radiação ultravioleta, dentre outros. Esses constituintes estão presentes em várias porções das plantas, podendo agir como fitoalexinas, atraentes para polinizadores, antioxidantes e protegem contra os raios ultravioletas. Nos alimentos, os fenólicos podem contribuir para o gosto amargo, adstringência, cor, odor, sabor e estabilidade oxidativa dos produtos. (BRAVO, 1998; NACZK, SHAHIDI, 2004).

Mais de 8000 constituintes fenólicos já foram detectados em espécies vegetais. Esses constituintes agem como antioxidantes, não somente pela sua habilidade em doar hidrogênio ou elétrons, mas também em virtude de seus radicais intermediários estáveis, que impedem a oxidação principalmente de lipídios (SILVA et al., 2010).

Os constituintes fenólicos, quimicamente, são aqueles que pertencem a uma classe na qual são incluídas estruturas simples e complexas, tendo como característica principal possuir

pelo menos um anel aromático no qual, ao menos um hidrogênio é substituído por um grupo hidroxila. Essas substâncias englobam desde moléculas simples até algumas com alto grau de polimerização e contribuem para o sabor, odor e coloração de diversos vegetais, além de serem essenciais para o crescimento e reprodução (SIMÕES et al., 2007; SOARES, 2002).

Entre os compostos fenólicos que pertencem ao metabolismo secundário dos vegetais, são encontradas estruturas variadas como os ácidos fenólicos, derivados da cumarina; flavonoides, saponinas, taninos, alcaloides, entre outros (NACZK, SHAHIDI, 2004). A maioria dessas substâncias fenólicas são biossintetizadas pela rota do chiquimato ou pela rota do mevalonato (SIMÕES et al., 2007). Essas estruturas variadas podem ser classificadas segundo o tipo do esqueleto básico conforme apresentado na Tabela 1.

Tabela 1: Classificação das substâncias fenólicas de acordo com o esqueleto básico.

Esqueleto básico	Classes de substâncias fenólicas
C6	Fenóis simples, benzoquinonas
C6-C1	Ácidos fenólicos
C6-C2	Acetofenonas e ácidos fenilacéticos
C6-C3	Fenilpropanoides: ácidos cinâmicos e substâncias análogas, fenilpropenos, cumarinas, isocumarinas e cromonas
C6-C4	Naftoquinonas
C6-C1-C6	Xantonas
C6-C2-C6	Estilbenos, antraquinonas
C6-C3-C6	Flavonoides e isoflavonoides
(C6-C3) ₂	Lignanas/neolignanas
(C6-C3-C6) ₂	Biflavonoides
(C6) _n	Melaninas vegetais
(C6-C3) _n	Ligninas
(C6-C1) _{glicosídeos}	Taninos hidrolisáveis
(C6-C3-C6) _n	Taninos condensados

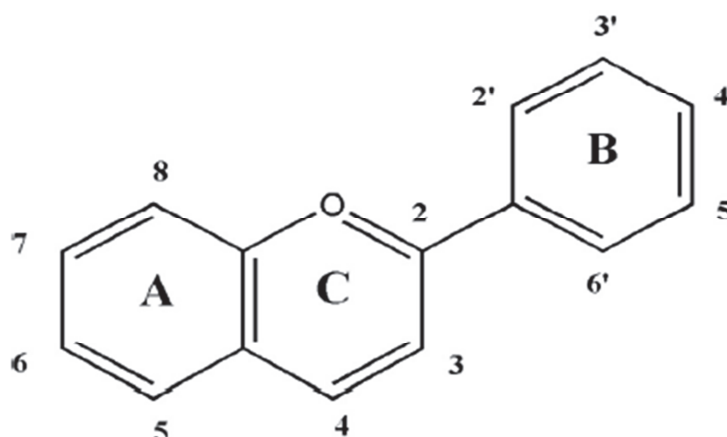
Fonte: CARVALHO et al. (2000).

A atividade de sistemas fenólicos, relacionadas com suas propriedades antioxidante e anti-inflamatória, é influenciada pelas características estruturais (ESTEVES et. al.; 2008). Entre os constituintes fenólicos que possuem atividade antioxidante, destacam-se os flavonoides (CAO et al., 2013; SOARES, 2002; TSAO, 2010) que serão descritos no item seguinte.

2.2.2 FLAVONOIDES

Os flavonoides fazem parte de um grupo de compostos naturais que pertencem à família dos polifenóis. São caracterizados quimicamente por possuírem dois anéis de benzeno ligados por uma unidade de três carbonos (CASTELLANO et al., 2013; CORCORA, MCKAY, BLUMBERG, 2012). Eles têm a C6-C3-C6, como estrutura geral, em que as duas unidades C6 são de natureza fenólica (Figura 5). Devido ao rearranjo, metilação, metoxilação, alquilação, oxidação, C e O glicosilação, e hidroxilação no Anel C os flavonoides podem formar mais de 9000 moléculas apresentando atividade antioxidante, atividade antibacteriana, antiviral e anti-câncer (LEONARD et al., 2008).

Figura 5: Estrutura básica dos flavonoides.



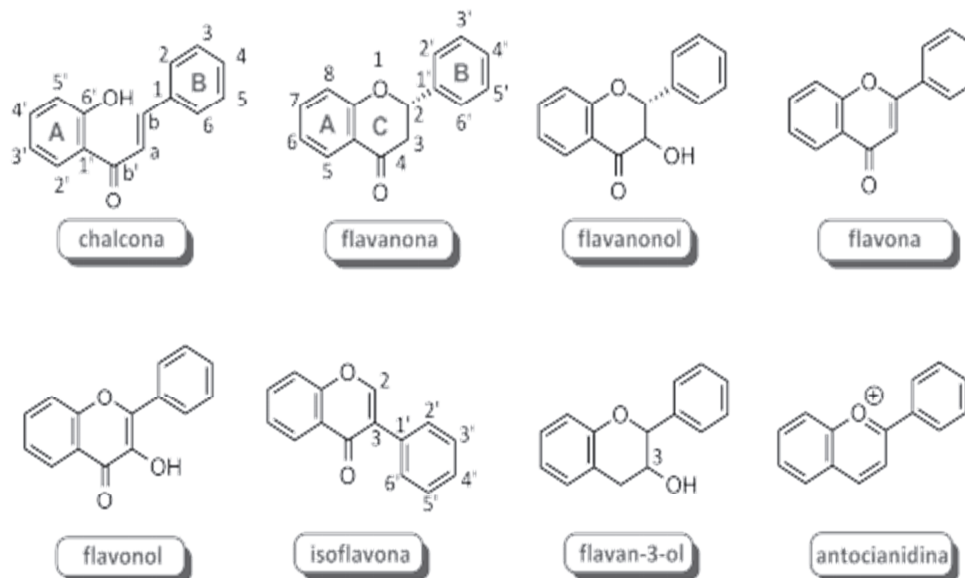
Fonte: CASTELANO et al. (2013).

Os flavonoides são amplamente existentes no reino vegetal e são de grande interesse pela sua bioatividade, como neuro-protetor, efeitos anti-inflamatório, anti-câncer, anti-gerotóxico, doença de Alzheimer e também por suas propriedades antioxidantes (CAO et al., 2013). Eles participam de importantes funções no crescimento, desenvolvimento e na defesa dos vegetais contra o ataque de patógenos (DORNAS et al., 2007).

A biossíntese dessas substâncias ocorre a partir da via mista do acetil-CoA e ácido chiquímico (ANDERSEN, MARKHAM, 2005; BUER, IMIN, DJORDJEVIC, 2010; WINKEL-SHIRLEY, 2002). Dentre as subclasses de flavonoides podemos citar as antocianinas, as antocianidinas, os flavonóis, as flavononas, as flavonas, as catequinas e as

chalconas (ANDERSEN, MARKHAM 2005; TSAO, 2010). As estruturas dos esqueletos das principais subclasses de flavonoides são mostradas na Figura 6.

Figura 6: Representação das subclasses de flavonoides.



Fonte: COUTINHO et al. (2009).

Todos os flavonoides polifenóis são metabólitos secundários que as plantas produzem para se proteger de outros organismos. A alta ingestão de frutas, legumes e grãos integrais, que são ricos em flavonoides e outros polifenóis, têm sido associados a riscos reduzidos de muitas doenças crônicas, incluindo câncer, doenças cardiovasculares, inflamação crônica e muitas outras doenças degenerativas. Uma grande parte dessas doenças tem sido associada ao stress oxidativo, que resulta na presença de espécies reativas de oxigênio (EROs) e de nitrogênio nos tecidos. O suposto mecanismo pelo qual os flavonoides podem agir para ajudar na defesa contra este estresse oxidativo é a sua capacidade de agir como potentes antioxidantes. Eles são capazes de suprimir a geração de radicais livres por inibição da formação ou desativação das espécies ativas e precursoras de radicais livres. Além disso, eles podem atuar como limpadores de radicais das reações em cadeia da peroxidação lipídica (TSAO, 2010). A Tabela 2 traz alguns exemplos de flavonoides e suas respectivas fontes alimentares.

Tabela 2: Principais subclasses dos flavonoides.

Subclasses	Cor	Flavonoides Representativos	Fontes Alimentares
Antocianidina	Azul, Vermelho e violeta	Cianidina	Frutas e flores
Flavonol	Incolor e amarelo	Catequina, epicatequina, procianidina	Maçãs, chá, cerveja, sucos de uva e vinho
Flavanona	Incolor e amarelo	Hisperidina, Neringenina	Frutas cítricas
Flavona	Amarelo claro	Apigenina, Luteolina	Cereais, frutas, flores, vegetais
Flavonol	Amarelo claro	Miricetina, quercetina e rutina	Cebolas, maçãs, chá, tomates, trigo e sarraceno
Isoflavona	Incolor	Genisteína, diizeína	Legumes (derivados da soja)

Fonte: TEMPONI (2012).

As diferentes habilidades farmacodinâmicas dos flavonoides têm atraído grande atenção das empresas farmacêuticas para aplicações de saúde. Atualmente flavonoides, especialmente a quercetina, são utilizados como suplementos alimentares, e são intensivamente investigadas como opções de tratamento para muitas patologias crônicas, incluindo câncer e diabetes (PUTIGNANI, MASSA, ALISSI, 2013).

Possuem uma série de propriedades benéficas ao metabolismo do nosso organismo devido a sua ação antioxidante. Como exemplo, pode-se citar a prevenção da peroxidação lipídica da membrana celular e a proteção de substâncias de importante papel fisiológico, como a vitamina C e a adrenalina, do dano oxidativo das células (QUI et al., 2010; TAPAS, SARARKAR, KAKDE, 2008).

Podem atuar como antialérgicos, por inibirem a liberação de histamina e como anti-inflamatórios por inibirem a enzima lipoxigenase, que converte o ácido araquidônico nos mediadores da inflamação (NIJVELDT et al., 2001), podendo apresentar atividades anti-inflamatória e analgésica (BUER et al., 2010; NIJVELDT et al., 2001).

Evidências experimentais indicam que o consumo regular de alimentos contendo flavonoides podem exercer uma potente atividade antioxidante e atividade anti-inflamatória reduzindo o risco de várias doenças crônicas, incluindo algumas formas de câncer (PUTIGNANI, MASSA, ALISI, 2013) e doenças relacionadas à obesidade tais como a síndrome metabólica, diabetes e doença cardiovascular (PUTIGNANI, MASSA, ALISI, 2013; QUI et al., 2010).

2.3 ASPECTOS GERAIS DA AÇÃO ANTIOXIDANTE

O oxigênio (O₂) é uma molécula importante para a vida aeróbica. A vida na Terra é inconcebível sem oxigênio, entretanto, por exemplo, este pode produzir EROs com presença de elétrons desemparelhados. No corpo humano, elas podem ocorrer durante um stress ambiental e podem ser muito perigosas, podendo resultar em danos significativos às estruturas celulares, gerando doenças como aterosclerose, doenças cardíacas, envelhecimento, câncer e outras. Estas doenças surgem pela produção descontrolada de EROs que podem oxidar proteínas, lipídios ou DNA e causar um desequilíbrio no mecanismo do sistema de proteção antioxidante. A fim de diminuir os efeitos nocivos de EROs, os antioxidantes naturais obtidos a partir de plantas podem ser utilizados (BURSAL et al., 2013; MANTENA et al., 2008).

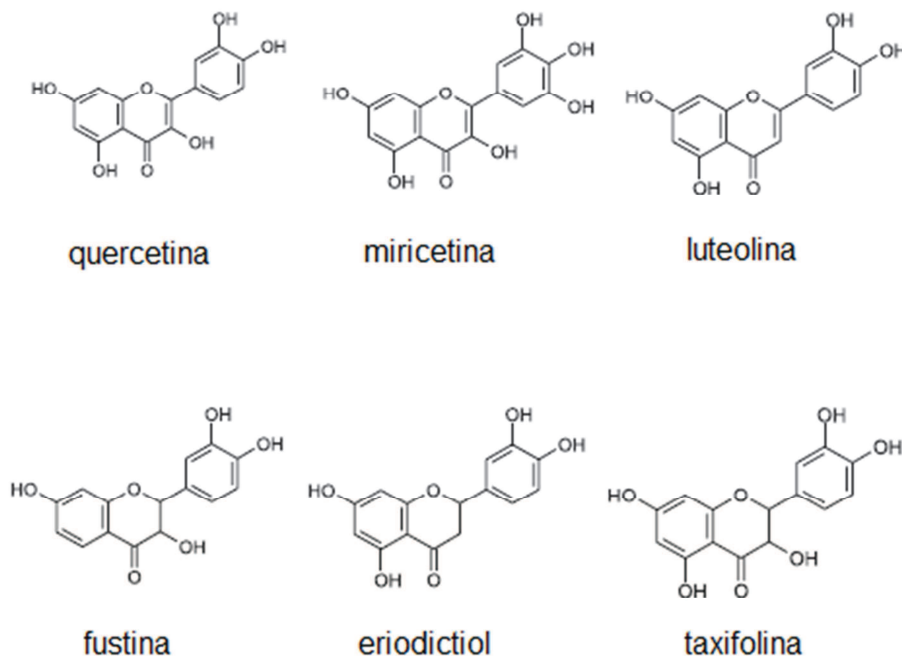
Os antioxidantes são substâncias que atuam neutralizando ou prevenindo os danos causados pelos radicais livres. Esse dano hostil provocado pelos oxidantes pode ser grandemente reduzido, antes que ocorram reações com alvos biológicos, prevenindo reações em cadeia ou prevenindo a ativação do oxigênio e seus produtos altamente reativos (RATNAM et al, 2006).

Eles podem ser classificados em dois grandes grupos, enzimáticos e não enzimáticos. Alguns dos antioxidantes são endogenamente produzidos na qual incluem enzimas, moléculas de baixo peso molecular e cofatores enzimáticos. Dentre os antioxidantes não enzimáticos, muitos são obtidos de fontes dietéticas e estes podem ser classificados em várias classes, na qual temos os polifenóis, um grande grupo em que consiste de ácidos fenólicos e flavonoides (RATNAM et al, 2006).

Os flavonoides, por exemplo, possuem uma estrutura que facilita o sequestro de radicais, tornando-os potentes antioxidantes. Sua eficácia é determinada por cinco fatores: facilidade com que doa hidrogênio e elétrons, estabilidade do radical flavanoil que irá formar reatividade frente a outros antioxidantes, capacidade de quelar metais de transição e solubilidade e interação com as membranas. Quanto maior o número de hidroxilas, maior a atividade como agente doador de hidrogênio e de elétrons (CAO, PRIOR, 1997). No entanto, flavonoides, flavonas e flavanonas monohidroxilados apresentam atividade antioxidante baixa. Dessa forma, para proteger os lisossomos e membranas contra o estresse oxidativo são necessárias no mínimo duas hidroxilas fenólicas nos flavonoides. Flavonoides polihidroxilados, como por exemplo, a miricetina, quercetina, luteolina, fustina, eriodictiol e taxifolina (Figura 7) possuem forte atividade antioxidante quando comparados aos

antioxidantes endógenos α -tocoferol, ácido ascórbico, β -caroteno, glutathiona, ácido úrico e bilirrubina (CAO, PRIOR, 1997; YANG et al., 2001).

Figura 7: Exemplos de flavonoides antioxidantes.



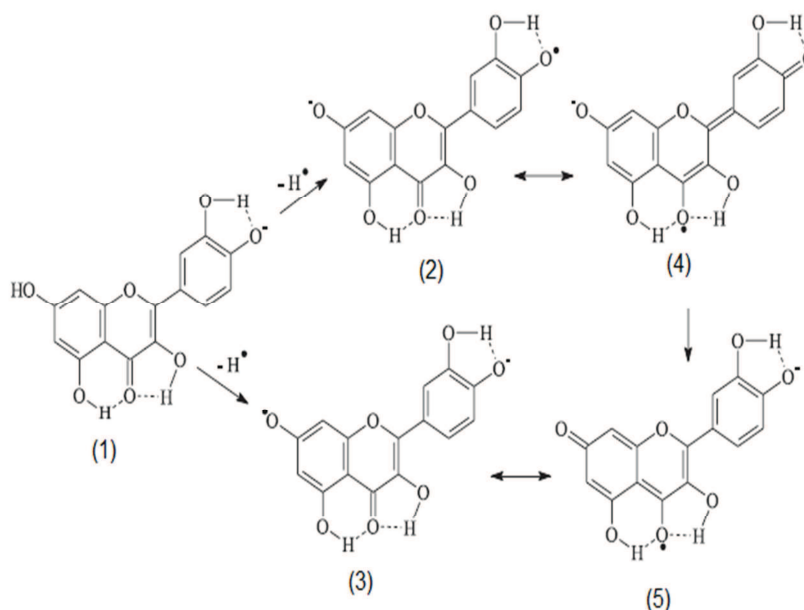
Fonte: BARREIROS, DAVID (2006).

Os metais de transição que estão livres no meio biológico catalisam reações que dão origem a radicais. Quanto maior for a capacidade do flavonoide de quelar metais de transição, maior será a sua eficiência como antioxidante (RICE-EVANS et al., 1997). Além disso, a interação dos flavonoides com as biomembranas possibilita que eles permaneçam próximos aos sítios de ataque dos radicais, evitando a difusão e ataque das EROs e das espécies reativas de nitrogênio (ERN) à membrana (VAN ACKER et al., 1996).

Para que o radical livre flavanoil formado seja estável, este tem que ser capaz de rearranjar o elétron desemparelhado. Assim, a presença de hidroxilas na posição *orto*, a presença de insaturação no anel C favorecem a estabilidade. A doação do H• ocorre mais facilmente nas hidroxilas das posições 7-OH > 4'-OH > 5-OH de acordo com as constantes de dissociação (RICE-EVANS et al., 1996).

A quercetina (1) parcialmente ionizada em C-4' (Figura 8), por exemplo, doa o H radicalar para o radical livre preferencialmente nas posições C-4' (2) e C-7 (3). Ambos os radicais formados podem ter seu elétron rearranjado na estrutura para obter maior estabilidade. As estruturas de ressonância e a resultante gerada pelas ligações de hidrogênio estabilizam os radicais (4) e (5).

Figura 8: Mecanismo de estabilização do elétron desemparelhado do flavonoide.



Fonte: BARREIROS, DAVID (2006).

Os antioxidantes, quando presente em baixas concentrações em relação aos substratos oxidáveis, inibem ou atrasam o processo de oxidação. Assim, os antioxidantes têm um papel vital na manutenção da saúde humana e na prevenção de doenças causadas por radicais livres. Devido aos benefícios dos antioxidantes, produtos alimentares e produtos farmacêuticos são normalmente enriquecidos com antioxidantes sintéticos tais como BHA (butil hidroxi-anisol) e BHT (butil hidroxitolueno). No entanto, a aplicação destes antioxidantes sintéticos pode levar efeitos tóxicos, tais como carcinógeno. Assim, existe uma tendência para substituir os antioxidantes sintéticos pelos antioxidantes naturais (AKTUMSEK et al., 2013).

2.4 ASPECTOS GERAIS DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DOS PRODUTOS NATURAIS

Desde a antiguidade, o homem tem utilizado as plantas para o tratamento de doenças infecciosas comuns. Assim sendo, espécies distintas vêm sendo aplicadas como opções terapêuticas alternativas no contexto das práticas habituais da medicina tradicional (RIOS, RÉCIO, 2005).

Embora a medicina moderna esteja bem desenvolvida na maior parte do mundo, 80% da população aplicam práticas tradicionais nos seus cuidados básicos de saúde e 85% utilizam plantas como tratamento na atenção primária. A Organização Mundial da Saúde (OMS), por sua vez, incentiva a introdução de plantas medicinais e medicamentos fitoterápicos nas Unidades de Saúde, reforçando a importância das plantas em trazer benefícios para a saúde da população (BRASIL, 2006b).

Um grande avanço no Brasil é a Portaria do Ministério da Saúde de nº 971 de 03 de maio de 2006, que aprova a Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares (PNPIC) no Sistema Único de Saúde (SUS) (BRASIL, 2006a). Essa política traz entre suas diretrizes para plantas medicinais e fitoterapia, a elaboração da Relação Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicas, bem como o provimento do acesso aos usuários do SUS. Ainda em 2006, o Decreto Federal de nº 5.813 de 22 de junho de 2006 instituiu a “Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos”, que incentiva as pesquisas e dá diretrizes para implantação de serviços em caráter nacional pelas Secretarias de Saúde dos Estados, Distrito Federal e dos Municípios (BRASIL, 2006b), considerando assim a importância do fortalecimento na política de incentivo ao uso dos fitoterápicos.

A atividade antimicrobiana de plantas medicinais tem sido pesquisada em diversas espécies principalmente em países que possuem uma flora diversificada e uma rica tradição na sua utilização como Brasil, Cuba, Índia, México e Malásia (DI STASI et al., 2002; NASCIMENTO et al., 2000). Várias pesquisas vêm sendo desenvolvidas e direcionadas no descobrimento de novos agentes antimicrobianos provenientes de extratos de plantas e outros produtos naturais, para serem aplicados em produtos farmacêuticos e cosméticos (RIOS, RECIO, VILLAR, 1988).

Entre os aspectos microbiológicos, ressalta-se a resistência aos antimicrobianos. Segundo a OMS, a resistência antimicrobiana é aquela que ocorre quando um micro-organismo resiste a um antimicrobiano a que estava anteriormente sensível. Amostras resistentes de bactérias, vírus e parasitas são, portanto, capazes de resistir a ataques por

antimicrobianos, tais como antibióticos, antivirais e antimaláricos, todos esses considerados ineficazes, gerando a persistência dessas infecções e causando a disseminação da resistência. De acordo com dados desta Organização, a resistência antimicrobiana é uma consequência, principalmente, do uso indevido desses medicamentos e se desenvolve quando um micro-organismo sofre uma mutação ou adquire um gene de resistência (WHO, 2012).

Sendo assim, a pesquisa de novos agentes antimicrobianos se faz necessária em virtude do aparecimento de micro-organismos resistentes e de infecções oportunistas fatais associadas à Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (SIDA/AIDS), quimioterapia antineoplásica e transplantes (PENNA et al., 2001). O estudo de novos antimicrobianos gera um imenso impacto, sendo ponto crucial em vários setores do campo farmacêutico. Como o Brasil detém uma grande biodiversidade, tais pesquisas contribuem significativamente para o desenvolvimento do campo da saúde, pois podem surgir substâncias mais eficazes e menos tóxicas contra micro-organismos resistentes (BARBOSA-FILHO et al., 2007; LEITÃO et al., 2006; SAÚDE-GUIMARÃES, FARIA, 2007). Nesse contexto, a emergência da resistência antimicrobiana é um problema global que tem ocorrido tanto dentro dos hospitais, bem como no cenário da comunidade (KHALILI et al., 2011).

Considerando-se especificamente os grupos bacterianos, mesmo com a disponibilização de novos antibióticos, o ritmo de desenvolvimento da resistência bacteriana nos diferentes patógenos, Gram-positivos e Gram-negativos, representa um constante desafio terapêutico. A seleção de antibióticos eficazes tem se tornado uma tarefa difícil e desafiadora (ROSSI, ANDREAZZI, 2005).

De acordo com o *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* (EUCAST), um micro-organismo é considerado resistente quando existe uma alta probabilidade de falha na terapêutica (MACGOWAN, 2008).

Em todo o mundo, principalmente no grupo dos países periféricos onde o Brasil se insere, os micro-organismos são um grande problema para a atenção à saúde. Por exemplo, os gêneros *Staphylococcus* e *Streptococcus*, dois importantes representantes de bactérias Gram-positivas, são considerados como as principais causas de morbidade e mortalidade, causando doenças como infecção respiratória e sepse (APPELBAUM, JACOBS, 2005; COELHO et al., 2004).

Atualmente, a maioria dos antibióticos disponíveis para uso é de produtos naturais ou derivados deles. A utilização de Eucalipto (*Eucalyptus* spp.) como antisséptico e em afecções das vias respiratórias, ipê-roxo (*Handroanthus impetiginosus*) para afecções da pele e bactericida, romanzeira (*Punica granatum*) em diarreias de origem bacteriana e parasitária, e

outras plantas com amplos espectros de ação, como erva-cidreira-verdadeira (*Melissa officinalis*) e alho (*Allium sativum*) constituem opções na terapêutica das infecções (ABRÃO, 2010; RIOS, RECIO, 2005).

Os principais mecanismos pelos quais os constituintes antibacterianos agem contra os micro-organismos são: a) que afetam a síntese da parede celular, causando lise e morte; b) que danificam a membrana citoplasmática, afetando o seu funcionamento e causando o extravasamento de conteúdo intracelular; c) que afetam a síntese de ácidos nucleicos por diferentes mecanismos, impedindo sua replicação; d) que afetam a função ribossômica; e e) que afetam a síntese de ácido fólico (BURT, 2004).

Diferentes ferramentas laboratoriais podem ser utilizadas na pesquisa de constituintes antimicrobianos, bem como da atividade antimicrobiana e de prováveis mecanismos de ação. Os métodos de atividade antimicrobiana, tanto para detecção da ação contra bactérias ou fungos, podem ser classificados usualmente em três grupos: método de difusão em ágar, de diluição e bioautográfico (BURT, 2004). Os ensaios de bioautografia e difusão são conhecidos como técnicas qualitativas, uma vez que essas demonstram a presença ou ausência de substâncias com atividade antimicrobiana. Já os experimentos de diluição são considerados ensaios quantitativos, por determinarem a Concentração Inibitória Mínima (CIM) (VALGAS et al., 2007).

O teste de difusão do disco é o método habitual aplicável para avaliar o padrão de susceptibilidade antimicrobiana na maioria dos serviços de rotina de laboratórios das instituições e hospitais (KHALILI et al., 2011). Entretanto, essa técnica, apesar de oferecer limitações, ainda é utilizada por pesquisadores na investigação do potencial antimicrobiano de metabólitos especiais, extratos e frações obtidas de diferentes espécies vegetais em todo mundo.

A atividade antimicrobiana de extratos vegetais pode ser também avaliada através da determinação de uma pequena quantidade da substância necessária para inibir o crescimento do micro-organismo teste, ou seja, do estabelecimento da CIM. Considerando-se os fatores que podem gerar variações nos resultados obtidos através dessa determinação, destacam-se a técnica utilizada *per se*, as características das amostras de referência e a ser testada, a origem da planta, a época da coleta, as condições de preparo dos extratos (se preparados a partir de plantas frescas ou secas), e a quantidade de extrato testada.

No teste de bioautografia utilizam-se placas de cromatografia em camada delgada. A placa pode ser pulverizada ou mergulhada em uma suspensão de bactérias ou fungos

(bioautografia direta), ou a placa pode ser recoberta com ágar inoculado com o micro-organismo (bioautografia indireta) (DIAS et al., 2006).

Dessa forma, não existe método padronizado para expressar os resultados de testes antimicrobianos de produtos naturais de forma 100% fidedigna (OSTROSKY et al., 2008).

2.4.1 PLANTAS MEDICINAIS COMO ALVO DE NOVOS ANTIMICROBIANOS

A Atividade antimicrobiana de várias plantas tem sido relatada na literatura científica (COWAN, 1999; DEWANJEE et al., 2007; YAKHLEF et al., 2011). Essas atividades estão diretamente relacionadas à presença de fitoconstituintes tais como cumarinas, flavonoides, alcaloides, taninos e triterpenoides que representam importantes oportunidades para a expansão de terapias modernas contra uma gama de micro-organismos (DEWANJEE et al., 2007; SHER, 2009). Entre os aspectos que contribuem para a verificação das atividades antimicrobianas estão os estudos etnofarmacológicos baseados no uso popular das plantas medicinais para o tratamento de infecções (CASTRO, 2000; SIMÕES et al., 2007), nos quais caminhos para a busca de novos alvos terapêuticos podem ser encontrados (LOGUERCIO et al., 2005). A seguir, apresentaremos alguns importantes relatos que exemplificam, com sustentação científica, essa perspectiva.

O extrato metanólico das flores de *Pyrostegia venusta* (Bignoniaceae) foi avaliado para atividade cicatrizante e microbiana contra doze micro-organismos. Os resultados indicaram uma potente capacidade de cicatrização e inibição antimicrobiana moderada contra os organismos: *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus pyogenes*, *Micrococcus luteus*, *Escherichia coli*, *Enterobacter aerogenes*, *Salmonella typhi*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans*, *Candida tropicalis* e *Aspergillus niger*. Todas as amostras testadas foram obtidas de coleções do Departamento de Microbiologia da Universidade Barkatullah (ROY et al., 2012).

O óleo da resina de *Copaifera multijuga* (Fabaceae) inibiu o crescimento de *S. aureus*, *E. coli* e *P. aeruginosa* (MENDONÇA, ONOFRE, 2009), enquanto o óleo essencial das folhas de *Lantana camara* (Verbenaceae) mostrou considerável atividade antibacteriana frente às linhagens de *S. aureus*, *E. coli* e *Proteus vulgaris* (COSTA et al., 2009). A partir do extrato butanólico de *Calycorectes psidiiflorus* (Myrtaceae) foi isolado o 8-hidroxicalameneno que produziu alta inibição frente a *B. subtilis* e *S. aureus* (DOMINGUES et al., 2010).

Espécies do gênero *Vernonia* (Asteraceae) têm sido estudadas quanto ao seu potencial antimicrobiano. De acordo com Silva e outros (2012), o extrato metanólico de *V. polyanthes*

foi capaz de inibir 16 amostras clínicas humanas de *S. aureus* e *E. coli* testadas, sendo que as linhagens de *S. aureus* foram mais susceptíveis do que as de *E. coli*. Temponi (2012) avaliou o extrato etanólico obtido a partir das folhas de *V. polyanthes* e as frações hexânica, diclorometânica, em acetato de etila e butanólica, e observou que as frações diclorometânica e butanólica foram capazes de inibir significativamente *S. aureus* ATCC 25923 e *E. coli* ATCC 10536. Braga e outros (2007) observaram uma ação inibitória do extrato metanólico de *V. polyanthes* sobre *L. amazonensis*. O extrato de própolis de *V. polyanthes* foi ativo contra *Paenibacillus larvae* (BASTOS et al., 2008), enquanto extratos hidroalcoólicos das raízes dessa espécie foram avaliados contra *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv, produzindo uma ação antimicobacteriana significativa (OLIVEIRA et al., 2007).

Triterpenoides isolados de *Vernonia auriculifera* apresentaram atividade antibacteriana moderada contra *B. subtilis* ATCC 6051, *S. aureus* ATCC 25923, *S. epidermidis* ATCC 14990, *Staphylococcus saprophyticus* ATCC 35552, *Enterococcus faecium* ATCC 19434, *E. coli* ATCC 25922, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603, *P. aeruginosa* ATCC 35032 e *Stenotrophomonas maltophilia* ATCC 13637. Essas substâncias demonstraram potencial para acoplamento sinérgico como agentes antimicrobianos, melhorando a eficiência terapêutica em face da crescente resistência bacteriana (KIPLIMO, KOORBANALLY, CHENIA, 2011).

Extratos etanólicos das folhas de *Hemionitis arifolia* (Pteridaceae), testados pelos métodos de difusão em ágar e diluição, apresentaram considerável atividade antibacteriana, particularmente contra bactérias Gram-negativas como a *E. coli* MTCC-739 (KAMAKAR, MUKHOPADHYAY, 2011).

Extratos hexânico, em acetato de etila e metanólico de *Solanecio manni* (Asteraceae), *Monodora myristica* (Annonaceae), *Albizia gummifera* (Leguminosae) e *Glyphaea brevis* (Malvaceae), tradicionalmente usados para o tratamento de hepatite, de parasitoses e outras doenças infecciosas, foram testados *in vitro* quanto à sua atividade antimicrobiana frente a bactérias Gram-positivas e Gram-negativas e duas espécies de *Candida*. Todos os extratos das espécies investigadas apresentaram propriedades antimicrobianas, corroborando, cientificamente, para o uso popular (MBOSSO et al., 2012).

Finalmente, os extratos hidroalcoólicos obtidos a partir das folhas de *Eugenia uniflora* (Myrtaceae), da casca do caule da *Persea americana* (Lauraceae), das cascas dos frutos do *Citrus limon* (Rutaceae) e *Sicana odorifera* (Cucurbitaceae) foram avaliados frente à *Lactobacillus casei*. Observou-se atividade antibacteriana para *Eugenia uniflora* e o extrato da *Persea americana* sobre o *Lactobacillus casei* (CASTRO et al., 2010). Também, propriedade

antimicrobiana da *Sonneratia alba* (Sonneratiaceae) foi observada contra o *S. aureus*, *Bacillus cereus* e *E. coli* (SAAD et al., 2012).

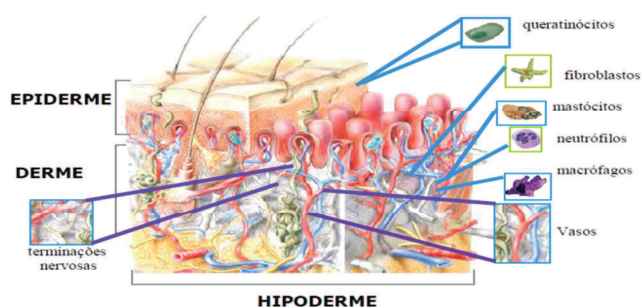
2.5 ESTRUTURA E FISIOLOGIA DA PELE

A pele é o maior órgão do corpo e da interface entre o meio ambiente e nossa biologia interna. É constituído por três camadas principais: hipoderme, que é formada principalmente de tecido adiposo; a derme, que consiste em tecido conjuntivo e contém folículos capilares, glândulas sebáceas e glândulas apócrinas; e a epiderme, que contém células escamosas e células basais. A camada superior da epiderme, o estrato córneo, são os queratinócitos que estão firmemente unidos por desmossomos numa matriz hidrofóbica celular e proporciona uma barreira física contra agentes físicos, químicos e fatores biológicos (BERNARD, GALLO, 2011; CEVC, VIERL, 2010). Além disso, a pele é formada por tecidos de origem ectodérmica e mesodérmica (KEDE, SABATOVICH, 2004), dispostas e inter-relacionadas para adequar-se de maneira harmônica ao desempenho de suas funções (HAAKE, SCOTT, HOLBROOK, 2000; ROSS, REITH, ROMRELL, 1993; SAMPAIO, 2000).

Algumas substâncias atravessam as camadas da pele, com velocidade controlada e atingem os vasos sanguíneos e a circulação geral. A aplicação tópica é uma importante via de administração, permitindo a penetração de substâncias (LOPES et al., 2006). Para compreendermos como este processo ocorre, é necessário um conhecimento básico da organização da pele (FERREIRA, 2008).

A pele desempenha várias funções no organismo, sendo sua função primária a de proteção, manutenção de fluidos biológicos, balanço eletrolíticos e como termostato na manutenção da temperatura do corpo, entre outras funções (PRISTA, 1995). É um órgão extenso e com importância funcional (Figura 9), onde a epiderme constitui a parte principal. Sob a epiderme, encontra-se a derme, que é vascularizada e fornece suporte e nutrição para as células da epiderme. A camada mais profunda é constituída pelo tecido gorduroso subcutâneo que é a hipoderme (SILVA, 2006).

Figura 9: Esquema simplificado das camadas da pele

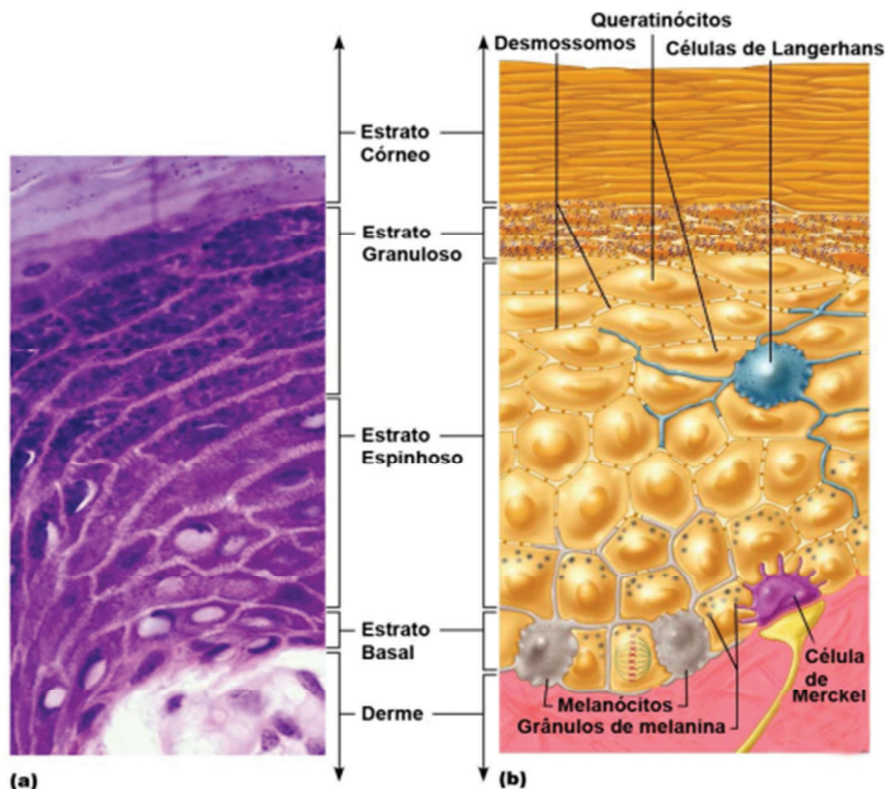


Fonte: FREINKEIL, WOODLEY (2000).

A estrutura, as propriedades e a composição da pele variam de acordo com a idade. O sistema tegumentar apresenta funções como barreira de proteção contra ataques físicos, químicos e micro-organismos; impede a perda da água; promove as sensações de dor, pressão, tato e temperatura; além de outras características peculiares que variam com sua localização e funções específicas. Desse modo, a pele é imprescindível para que haja existência de vida (ANTONIO, 2007; CHUONG et al., 2002; SHAEFER, REDELMEIER, 1996).

A camada superior da pele é a epiderme e constitui-se de múltiplos tipos celulares que possuem diferentes origens embrionárias. Aproximadamente 80 a 85% é formada de queratinócitos, 10 a 13% de melanócitos, 4% de células de Langherans e 1% de células de Merckel (KOSTER, ROOP, 2004). A espessura apresenta variações topográficas ao longo do organismo. A principal função desta camada é produzir queratina, uma proteína fibrosa maleável. A epiderme possui quatro camadas de células que vão se achatando a medida que se tornam mais superficiais cada uma apresentando uma função distinta (Figura 10) (CANDI, SCHMIDT, MELINO, 2005; KEDE, SABATOVICH, 2004; SAMPAIO, CASTRO, RIVITTI, 2000).

Figura 10: Camada da epiderme: estrato córneo, granuloso, espinhoso e germinativo.



(a) Corte histológico transversal da região da epiderme e (b) representação esquemática do corte transversal da epiderme, demonstrando as quatro camadas.

Fonte: MENDES (2009).

A camada córnea serve como proteção física e barreira química. Pode ser descrita como uma “parede de tijolos”, organizada em bicamadas e composta por ceramidas (45 a 50%), colesterol (25%), ácidos graxos (10 a 15%) e lipídios (5%) (MADISON, 2003).

O estrato granuloso é a camada que inicia o processo de cornificação, onde as células sofrem apoptose diferenciando-se em corneócitos. Os corneócitos são células alongadas e compactas e, na parte interna, são encontradas substâncias hidrofílicas de baixa massa molecular, como a queratina que fornece resistência (BOUWSTRA et al., 2003; ZATZ, 1993).

O estrato espinhoso é a camada onde os queratinócitos são responsáveis pela produção dos filamentos de queratina que, junta com os desmossomas, sintetiza agentes antioxidantes (glutathione redutase, peroxidase, catalase), citocinas, quimiocinas (HAAKE, SCOTT, HOLBROOK, 2000).

O estrato germinativo ou basal é a camada mais profunda responsável pela proliferação celular. Nela existe uma população celular mitoticamente ativa que tem a capacidade de autorrenovação tanto sob condições homeostáticas como em condições nocivas (HAAKE, SCOTT, HOLBROOK, 2000).

Para a manutenção do número de células na epiderme, é essencial o balanço entre proliferação e morte celular dos queratinócitos, diferenciação e apoptose, respectivamente. Nos queratinócitos, este controle ocorre pela comunicação parácrina e autócrina via hormônios, fatores de crescimento e citocinas, ou por comunicação intercelular via célula-célula e célula-matrix de adesão, ou ainda pela comunicação intercelular na região da “gap junction” (HAAS, HERLYN, 2005). É muito importante a regulação do processo de proliferação dos queratinócitos, pois possíveis distúrbios no crescimento podem ser responsáveis pela patogênese de diversas doenças de pele, como por exemplo, psoríase, lesões crônicas e câncer de pele (GNIADDECKI, 1998). A renovação epidérmica em condições normais exibe uma diferenciação celular progressiva, através do processo de queratinização e cornificação, a partir da camada basal em direção à superfície (CANDI, SCHMIDT, MELINO, 2005; FUCHS, RAGHAVAN, 2002).

Uma ou duas fileiras de células, situadas na base da camada germinativa ou basal são responsáveis pela atividade mitótica da epiderme. As células resultantes da divisão celular são empurradas para as camadas mais superiores, sofrem modificações da estrutura pela diferenciação celular, com alterações morfológicas nesta progressão, vindo a constituir as camadas espinhosa, granulosa e córnea. Esta última camada acaba por descamar na superfície (KEDE, 2004). Ao se aproximarem da superfície, ou seja, na camada córnea, os

queratinócitos já apresentam a morfologia totalmente alterada, já não possuem mais núcleo e assim morrem e descamam. Essa migração e diferenciação que ocorrem constantemente na epiderme a tornam uma estrutura bastante dinâmica (GARTNER, HIATT, 1999; GNIADDECKI, 1998). As propriedades estruturais e funcionais dos queratinócitos presentes na epiderme de humanos e pequenos mamíferos são semelhantes (CHAN, 2004).

A conexão entre epiderme e derme é formada por uma zona de membrana basal pela junção dermoepidérmica (JDE), fornecendo resistência contra forças externas. As JED servem como suporte para epiderme, determina a polaridade do crescimento, direcionam a organização do citoesqueleto nas células basais, desencadeiam sinais de desenvolvimento e funcionam como uma barreira semipenetrável (FITZPATRICK, 2005).

A derme, que fica localizada sob a epiderme, é um tecido conjuntivo que contém fibras proteicas, vasos sanguíneos, terminações nervosas, órgãos sensoriais e glândulas. Sua espessura é superior a da epiderme, conferindo assim elasticidade, força e resistência mecânica (BARRY, 2002; SMITH, MALBACH, SUBER, 2000). De origem mesodérmica, é dividida em dois componentes: a porção papilar, que é a camada mais próxima da epiderme, e a porção reticular, que é formada por um tecido conectivo denso e constitui a maior parte da derme (NORRIS, 2004). A derme é formada por fibras colágenas, fibras elásticas e substância amorfa, todas produzidas pelos fibroblastos (ROSS, 1993; SAMPAIO, CASTRO, RIVITTI, 2000). A derme tem como funções prover o suporte de nutrientes para a epiderme e realizar a termorregulação. Além disso, as células dessa camada têm papel fundamental em processos inflamatórios e cicatriciais (MAKRANTONAKI, ZOUBOULIS, 2007). Ocorre aumento da proliferação e da atividade de fibroblastos devido a ação de alguns mediadores pró-inflamatórios como a interleucina 1 α (IL-1 α) e interleucina 1 β (IL-1 β) durante um processo inflamatório ou de cicatrização (FREINKEL, WOODLEY, 2000).

Por fim, a camada mais interna da pele, a hipoderme, atua como isolante térmico, reduzindo o movimento de calor para dentro ou para fora do corpo; reserva energética e na proteção contra choques mecânicos. Esta camada participa ativamente do metabolismo energético (BARRY, 2002; FITZPATRICK, 2005; SMITH, MALBACH, SUBER, 2000).

A sintonia entre os diferentes tipos celulares presentes nas camadas da pele permite que este órgão responda, pronta e constantemente, a uma variedade de estímulos nocivos que ocorrem na interface do organismo com o meio externo, como a ação de toxinas, organismos patogênicos, radiação UV e extremos de temperatura, garantindo assim a manutenção da homeostasia cutânea (BURBACH, ANSEL, ARMSTRONG, 2000; WILLIAMS, KUPPER, 1996).

2.5.1 ASPECTOS GERAIS DA INFLAMAÇÃO CUTÂNEA

A pele está diretamente relacionada com o meio externo, estando sujeita a lesões e invasão tais como patógenos, agentes mecânicos, agentes químicos e resposta autoimune. Estes estímulos desencadeiam uma resposta imediata de proteção ao organismo, denominada resposta inflamatória (BECKER, 1997; FIRESTEIN, 2004). O estudo da inflamação tem uma história antiga e rica. Celsus 30 a.C. a 38 d.C., descreveu os quatro sinais da inflamação: rubor, tumor, calor e dor. John Hunter (1728 a 1793) entendia a inflamação como um processo benéfico e de proteção. Julius Cohnheim (1839 a 1884) realizou as primeiras descrições microscópicas da inflamação, a sequência dos eventos vasculares: dilatação, estase do sangue, marginalização e migração de leucócitos. Virchow (1858) relatou o quinto sinal da inflamação: perda da função (MOVAT, 1985).

A palavra inflamação significa “estado de se estar inflamado”. Inflamar denota “colocar fogo” o que implica na cor vermelha, na capacidade de aquecimento e na geração de dor (TROWBRIGDE, EMLING, 1996). A resposta inflamatória é uma resposta benéfica e fisiológica pela qual o organismo se defende e repara danos teciduais ou perda de funções (LAWRENCE, WILLOUGHBY, GILROY, 2002). Ocorre nos tecidos em resposta a lesões traumáticas, pós-isquêmicas, tóxicas, autoimunes e em processos infecciosos (MONTENEGRO, FRANCO, 2008).

Um processo inflamatório, para ser desencadeado, pode envolver múltiplas causas e de natureza variável. Os agentes biológicos (como bactérias, vírus, protozoários); químicos (como ácidos, álcalis, formaldeído, carragenina, substâncias cáusticas); físicos (frio ou calor exagerado, radiação UV e ionizante) e imunes (exposição a antígenos provocando ativação da resposta imunológica do hospedeiro) (CARVALHO, 2004; LIEW, 2003).

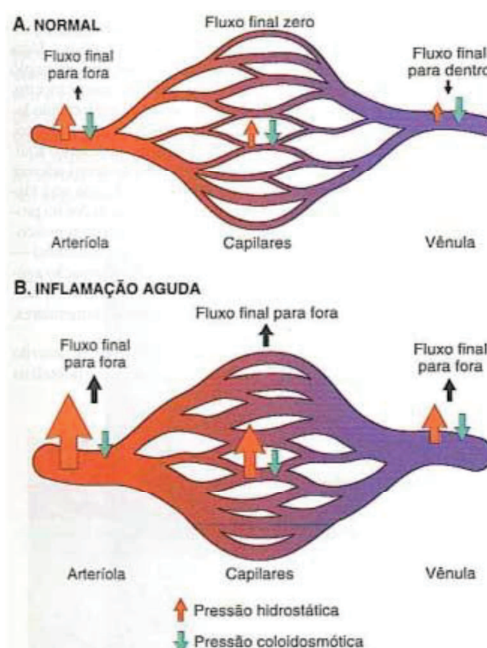
Quando se utiliza o critério temporal, o processo inflamatório se divide em duas categorias: inflamação aguda e crônica. A inflamação aguda apresenta um dos mais importantes mecanismos de defesa contra patógenos invasores. É de curta duração (horas a dias), caracterizada por vasodilatação arteriolar e venular, edema e migração de células inflamatórias, sendo primariamente os neutrófilos (CHIU et al., 2011).

A inflamação crônica é sempre precedida pela inflamação aguda e apresenta uma duração mais longa (semanas, meses ou até anos). Caracteriza-se por migração leucocitária, principalmente monócitos, linfócitos, plasmócitos, fibroblastos, proliferação de vasos e tecido conjuntivo, além de sinais de regeneração e reconstrução da matriz conjuntiva (FERGUSON, 2010).

As alterações vasculares iniciam-se imediatamente e desenvolvem-se durante as primeiras horas após o estímulo inflamatório. Elas consistem em vasodilatação, aumento do fluxo sanguíneo, aumento da permeabilidade vascular e exsudação de plasma (LIMA et al., 2007). Em condições normais, a microcirculação apresenta baixíssima permeabilidade a macromoléculas. As proteínas plasmáticas circulam muito lentamente entre sangue e tecidos, e retornam ao sangue através dos vasos linfáticos. Durante o processo inflamatório, esta situação muda drasticamente, a microcirculação torna-se permeável a macromoléculas e fluidos vindos do sangue, causando edema tecidual (Figura 11) (GILROY et al., 2004; LIMA et al., 2011). Dor e incapacidade funcional seguem-se como resultado do edema tissular e liberação de mediadores químicos (KUMAR, ABBAS, FAUSTO, 2005).

A vasodilatação e o edema formados vêm acompanhados de marginação, adesão e migração leucocitária. O processo de migração de neutrófilos do espaço intravascular para o interstício ocorre a princípio nas vênulas pós-capilares da circulação sistêmica e capilares (Figura 11). Ocorre saída das células circulantes da luz do vaso e a migração de leucócitos (principalmente neutrófilos e monócitos) para o sítio inflamatório. Todas estas etapas do processo de migração leucocitária são dependentes da expressão pelos leucócitos e pelas células endoteliais (KELLY, KWANG, KUBES, 2007).

Figura 11: Comparação entre a circulação periférica no tecido vascular normal/inflamação aguda.

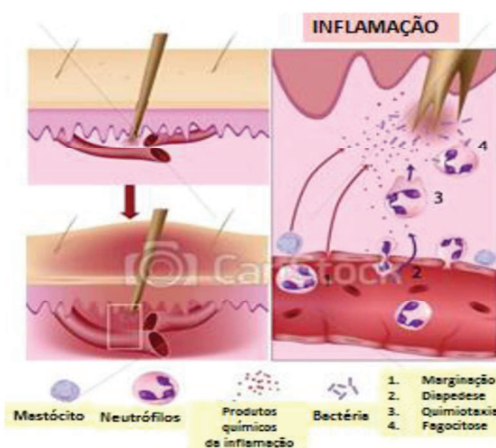


Fonte: <http://leapato.blogspot.com/>, acessado em 27 de Agosto de 2012.

Essas etapas ocorrem com aumento no tráfego de células para o local da inflamação pela expressão de moléculas de adesão nas células inflamatórias e nas células endoteliais. As células inflamatórias que chegam até o local da lesão são, principalmente, leucócitos polimorfonucleares, que eliminam e fagocitam as bactérias e os componentes danificados da matriz. Essas células são mais atuantes nos estágios iniciais da inflamação. As células mononucleares, como os monócitos, que se transformam em macrófagos no local da lesão, são mais atuantes na resolução da inflamação. Os macrófagos estão entre as células reguladoras mais importantes da inflamação, fagocitando, digerindo e eliminando organismos patogênicos, além de remover os restos teciduais e destruir os neutrófilos remanescentes. (LI CHEN, 2007; SINGE, CLARK, 1999).

Tanto os macrófagos e os mastócitos teciduais desempenham função de sinalizadores primários, agem como sentinelas no tecido. Ao sofrerem ativação e degranulação, essas células liberam uma gama de mediadores inflamatórios incluindo citocinas, quimiocinas, mediadores lipídicos assim como aminas vasoativas. Esses mediadores, ao exercerem suas funções, promovem a atração e ativação de células inflamatórias e também a formação de edema. Entre as substâncias liberadas estão histamina, eicosanoides e triptases que são os principais responsáveis pela geração da resposta vasomotora local (ANDRADE et al., 2011; LAWRENCE, WILLOUGHBY, GILROY, 2007; NATHAN, 2002). As respostas dos mastócitos aos alérgenos são reguladas por uma variedade de fatores endógenos e exógenos (ANDRADE et al., 2011). A mudança da permeabilidade celular ocorre para facilitar a disponibilidade de células e mediadores inflamatórios para os locais de lesão (ALLER et al., 2006).

Figura 12: Eventos celulares na inflamação.



Fonte: <http://www.canstockphoto.com/inflammationresponse-6235012.html>, acessado em 28 de Agosto de 2012.

Uma célula residente na epiderme são os queratinócitos que também desempenha um papel ativo na resposta imune inata por secretar uma variedade de citocinas e quimiocinas. Estes armazenam grande quantidade de IL-1 em seu citoplasma, podendo liberá-la quando danificados, iniciando uma cascata inflamatória. A liberação de citocinas pró-inflamatórias é necessária para ativar a resposta imune (DONNARUMMA et al., 2011). Em resposta, os queratinócitos vizinhos liberam mais IL-1 α , assim como IL-1 β , fator de necrose tumoral (TNF- α) e IL-6, amplificando o sinal inicial. Simultaneamente, os queratinócitos produzem quimiocinas, incluindo IL-8 e fatores de crescimento, como IL-7 e IL-15, que facilitam sua sobrevivência e induzem à ativação de leucócitos em resposta às quimiocinas (SPELLBERG, 2000). Entretanto, entre todas as citocinas produzidas pelos queratinócitos, somente as primárias (IL-1 α , IL-1- β e TNF- α) ativam um número suficiente de mecanismos efetores capazes de desencadear uma resposta inflamatória cutânea (KUPPER, 1990).

Em resposta à invasão microbiana, os queratinócitos montam eficazes defesas da imunidade inata, através da ativação de uma grande variedade de receptores de tipo Toll (TLR) (MCINTURFF, MODLIN, KIM, 2005; POTAPOVICH et al., 2011). Além dos queratinócitos, outras células residentes na epiderme e derme, como fibroblastos, células endoteliais, melanócitos também produzem diversas citocinas mediante um estímulo (BURBACH, ANSEL, ARMSTRONG, 2000). A exposição da pele a uma variedade de estímulos, tais como citocinas (interferon- γ , fator de necrose tumoral-alfa), radiação UV e acetato de 13-forbol-12-*O*-tetradecanoila (TPA) leva à produção excessiva de espécies reativas de oxigênio (ROS), direta ou indiretamente, as quais desempenham um papel crítico no desenvolvimento de várias doenças inflamatórias da pele, tais como a dermatite atópica (OTUKI et al., 2011).

A função coordenada da população celular presente na derme e epiderme permite que ocorra uma resposta rápida e efetiva frente à variedade de estímulos que ocorrem na interface entre o organismo e o meio externo (WILLIAMS, KUPPER, 1996).

2.5.2 MEDIADORES ENVOLVIDOS NA INFLAMAÇÃO

Os mediadores pró-inflamatórios liberados durante o processo inflamatório, tanto pelas células residentes do tecido cutâneo quanto pelas células transientes (neutrófilos, linfócitos, monócitos), aminas vasoativas (histamina (His), serotonina (5-HT)), metabólitos do ácido araquidônico (Prostaglandinas (PGs), tromboxano e leucotrienos), citocinas (interferons (IFN)), óxido nítrico (NO), numerosas interleucinas (IL), o fator de necrose tumoral (TNF),

EROs, entre outros (HOFSETH, 2008; SIMMONS, 2006), segue abaixo informações sobre alguns mediadores:

Aminas vasoativas: Histamina e Serotonina

A His e a 5-HT são especificamente importantes porque estão disponíveis em reservas pré-formadas e estão entre os primeiros mediadores a serem liberados durante a inflamação (MACGLASHAN, 2003).

A His desempenha uma ação importante durante o processo inflamatório cutâneo, pois ela atua em muitos processos fisiológicos celulares, mas também intervêm nas reações alérgicas e na inflamação, sendo esse um dos principais motivos dos mastócitos estarem estrategicamente localizados na microvasculatura dos tecidos que estão em contato com o meio externo como a pele, os pulmões e intestinos. A liberação da His ocorre pelo processo de exocitose durante as reações inflamatórias ou alérgicas, através da interação de fatores do sistema complemento e de antígenos com anticorpos IgE fixados nos mastócitos. Após a degranulação dos mastócitos, a His atua em receptores específicos (receptores histaminérgicos), promovendo a constrição do músculo liso, vasodilatação e aumento da permeabilidade vascular (SCHARAMM, THORLACIUS, 2004; SHERWOOD, TOLIVER-KINSKY, 2004; SILVA, CARVALHO, 2004).

A 5-HT é o segundo mediador vasoativo pré-formado com ações semelhantes da His. Está presente nas plaquetas e nos mastócitos, promove o aumento da permeabilidade e vasoconstrição. A liberação de 5-HT das plaquetas é estimulada quando ocorre à agregação plaquetária após contato com colágeno, adenosina difosfato (ADP) e complexos antígeno-anticorpo (GOADSBY, LIPTON, FERRARI, 2002).

Derivados do Ácido Araquidônico

O Ácido Araquidônico (AA) é liberado pelos fosfolípidios das membranas celulares através de alguns estímulos (químicos, inflamatórios, traumáticos e miogênicos) e/ou por mediadores, a partir da ativação da enzima fosfolipase A2 (PLA2), sendo o que irá gerar vários eicosanoides. Existem duas vias que o AA pode seguir simultaneamente após ser sintetizado: via ciclooxigenases 1, 2 e 3 (COX-1, COX-2 e COX-3) e via das lipoxigenases (HILÁRIO, TERRERI, LEN, 2006; YEDGAR et al., 2007).

Na pele normal, a COX-1 está distribuída em toda a epiderme, enquanto a COX-2 se localiza principalmente nos queratinócitos supra-basais, sendo rapidamente induzida frente a um estímulo inflamatório (LEE et al., 2003; SHERWOOD, TOLIVER-KINSKY, 2004).

As lipoxigenases, que estão presentes principalmente no citosol, são encontradas nos pulmões, plaquetas, mastócitos e leucócitos. A principal enzima do grupo é a 5-lipoxigenase (5-LOX), que atua sobre o AA, produzindo o ácido 5- hidroperoxieicosatetraenóico, que é convertido em leucotrieno A4 (LTA4). O LTA4 pode ser convertido em leucotrieno B4 (LTB4) ou em uma série de cisteinil leucotrienos (LTC4, LTD4 e LTE4). O LTB4 é produzido principalmente por neutrófilos e macrófagos (MURI, SPOSITO, METSAVAH, 2009), enquanto os cisteinil leucotrienos, principalmente por eosinófilos, mastócitos, basófilos e macrófagos (BELCH, HILL, 2000).

A prostaglandina E2 (PGE2) é a principal prostaglandina presente no tecido cutâneo e é responsável pela modulação de vários eventos inflamatórios, como o aumento da permeabilidade vascular e vasodilatação, contribuindo para formação do edema e na adesão e diapedese dos neutrófilos e monócitos (LEE et al., 2003; SHERWOOD, TOLIVER-KINSKY, 2004).

Óxido Nítrico

O NO é produzido a partir da L-arginina, através da ação do óxido nítrico sintase (NOS) (CHIU et al., 2011; VALLANCE, CHAN, 2001). É uma molécula de sinalização envolvida em vários processos fisiológicos e patológicos. O NO é sintetizado por um dos três tipos de NO sintase (NOS), NOS neuronal (nNOS), NOS endotelial (eNOS), e NOS induzível (iNOS), todas as quais são expressas na pele (CALSGRIERSON, ORMEROD, 2004; MENDES et al., 2012). Na pele, o NO tem numerosas funções homeostáticas, incluindo a proliferação de queratinócitos, melanogênese, a angiogênese, a cura de feridas, o fluxo de sangue, a regulação do tônus vascular, neurotransmissão, a agregação de plaquetas, o aquecimento e outros mecanismos homeostáticos. O NO também está envolvido em condições patológicas, como doenças imuno-mediadas, pele e outras doenças inflamatórias, incluindo as queimaduras solares, necrose, psoríase e lúpus eritematoso cutâneo (MENDES et al., 2012).

Citocinas

As citocinas são polipeptídeos ou glicoproteínas extracelulares, liberadas localmente durante a inflamação pelos queratinócitos (NIU, RO, 2011). Algumas citocinas podem ter ações pró ou anti-inflamatória de acordo com o microambiente no qual estão localizadas. As citocinas pró-inflamatórias são as interleucinas IL-1, IL-2, IL-6, IL7 e o TNF. As citocinas anti-inflamatórias são IL-4, IL-10, IL-13 e fator transformador de crescimento β (FTC β). Não

é possível classificar as citocinas quanto à célula de origem ou quanto à função biológica, elas foram agrupadas em IL 1 a IL 35 sequencialmente, TNF, quimiocinas (citocinas quimiotáticas), interferons (IFN) e fatores de crescimento mesenquimal (OLIVEIRA et al., 2011).

As citocinas também podem diretamente sensibilizar nociceptores e aumentar a sensibilidade neuronal ao calor, estímulos mecânicos e químicos. As citocinas inflamatórias, tais como o fator de necrose de interleucina (IL-1 β) e tumoral (TNF- α), contribuem para a dor e hiperalgesia indiretamente através da indução da produção de agentes inflamatórios que sensibilizam os nociceptores. Além disso, as citocinas inflamatórias são potentes moduladores da expressão dos receptores envolvidos na dor e analgesia (NIU, RO, 2011). As respostas imune e inflamatória são reguladas pelas citocinas, de forma autócrina e parácrina, através da interação com receptores específicos presentes nos queratinócitos, fibroblastos, células de Langerhans, células endoteliais e linfócitos T infiltrados, promovendo a mobilização de leucócitos a partir do sangue e a ativação de outras células do tecido cutâneo (RANG et al., 2007; UCHI et al., 2000).

Todos esses eventos são dinâmicos, culminando na resolução o que caracteriza o processo agudo. Entretanto, em certas ocasiões, o processo se perpetua passando a inflamação a deixar de ser um processo de proteção, mudando para agressão ao organismo como acontece com doenças inflamatórias autoimunes (SHIRASAKI, KANAIZUMI, HIMI, 2009).

2.5.3 AGENTES FLOGÍSTICOS

Óleo de Croton

Óleo de Cróton é um composto natural proveniente das sementes do arbusto *Croton tiglium* (Euphorbaceae), cultivado na Índia e no Arquipélago Indonésio. O composto é um líquido viscoso com sabor ácido, coloração amarelo-pálida a castanha e transparente. Antigamente, era usado como um purgante potente na medicina humana e veterinária, mas devido a sua toxicidade o uso medicinal foi desconsiderado e atualmente é utilizado como padrão farmacológico para indução de inflamações (MARSON et al., 2011).

Ele age como agente flogístico induzindo processo inflamatório com edema intracelular, proliferação e infiltração celular, dermatite tópica e irritação vascular com infiltração leucocitária de polimorfonucleares. O modelo de aplicação tópica de óleo de cróton

para indução do edema de orelha é vantajoso por ter bom prognóstico para a triagem da atividade antiinflamatória tópica e a sensibilidade por drogas esteroidais (LIMA, 2008; OLIVEIRA, VERDE, PINHEIRO, 2009).

O TPA é um dos principais ésteres de forbol presentes no óleo de cróton, a aplicação tópica desse agente está associada com resposta inflamatória, estresse oxidativo, proliferação e ativação de oncogenes nucleares, gerando uma resposta inflamatória aguda que apresenta vasodilatação, infiltração de leucócitos polimorfonucleares para o tecido e formação de edema (GARBOR, 2000; GARG, RAMCHANDANI, MARU, 2008). Segundo Lima (2008), ocorre degranulação de mastócitos na fase inicial da inflamação, e nos roedores esses grânulos têm mediadores inflamatórios com predominância de serotonina.

De acordo com estudos que buscam elucidar o mecanismo de ação do TPA na pele de camundongos, a aplicação deste agente promove alteração de diversos processos incluindo crescimento, diferenciação e morte celular, além da resposta inflamatória. Todos esses efeitos parecem ser provenientes da ativação direta da proteína quinase C (PKC). Embora uma variedade de cascatas de sinalização intracelulares seja ativada em resposta ao TPA, parece que o primeiro local de ação desse éster de forbol é a membrana celular onde ativa a PKC por mimetizar seu ativador natural, o diacilglicerol, ligando-se em sítios específicos de seu domínio regulatório (GARG et al., 2008).

Assim, a indução da inflamação com TPA promove o aumento da atividade da PKC e sua ativação gera conseqüentemente um aumento na atividade da enzima PLA₂, aumentando a liberação de AA dos fosfolipídios de membrana, o que leva ao subsequente aumento de seus metabólitos como leucotrienos e prostaglandinas (GARG, RAMCHANDANI, MARU, 2008). Esses metabólitos são conhecidos por agirem como mediadores das vias inflamatórias desencadeadas pela atividade das enzimas COX e LOX. Produtos do metabolismo do AA como prostaciclina e leucotrieno B₄ (LTB₄) agem de forma a aumentar a permeabilidade vascular, o que sustenta a formação de edema durante o processo inflamatório (BRALLEY et al., 2007; GARBOR, 2000). Portanto, nesse modelo o edema está intimamente associado com o aumento no conteúdo de eicosanóides como PG e LTB₄. Assim, não só os inibidores de COX e LOX, mas também os antagonistas de LTB₄ são capazes de inibir o edema induzido por TPA. Isso sugere que os eicosanóides possuem importante função na inflamação de pele induzida por TPA (MURAKAWA et al., 2006).

Além da indução da produção de eicosanóide, o TPA induz também, a expressão de citocinas inflamatórias, como IL-1 β e TNF- α , as quais participam ativamente no processo inflamatório cutâneo como peças centrais (LEE et al., 2009; MURAKAWA et al., 2006). A

IL-1 β ativa uma via que irá resultar na transcrição de uma série de genes que levarão a expressão de diversas moléculas importantes para o processo inflamatório como moléculas de adesão, quimiocinas, citocinas secundárias, a enzima óxido nítrico sintase e ciclooxigenase (OTUKI et al., 2005). O TNF- α também é responsável pela indução da expressão de diversos genes que irão sustentar a resposta inflamatória cutânea. Além disso, o TNF- α ativa a via de sinalização de transdução que irá ativar o NF- κ B, o que leva um “feedback” pró-inflamatório positivo (AMIGÓ et al., 2007).

O TPA também promove o aumento da expressão da enzima COX-2 a qual é responsável por catalisar a biossíntese das PG. A expressão de COX-2 induzida pela aplicação de TPA é regulada por diferentes fatores de transcrição incluindo NF- κ B e AP-1. Estudos demonstram que a aplicação tópica de TPA facilita a translocação nuclear e a ligação ao DNA do NF- κ B, através da fosforilação do I κ B. Essa fosforilação, por sua vez, é mediada por proteínas quinases como I κ B quinase (IKK), quinase reguladora de sinal extracelular (ERK) 1/2 ou p38 MAPK (KUNDU et al., 2009). A transcrição de citocinas como IL-1 β e TNF- α e muitos outros efetores como moléculas de adesão e enzimas, é regulada pelo fator de transcrição NF- κ B (DE VRYS et al., 2005). A atividade transcricional do NF- κ B é regulada por uma série de eventos de transdução e sinalização intracelular, bastante elaborados, sendo que p38 MAPK e ERK parecem ser as principais quinases reguladoras da ativação do NF- κ B (PARK et al., 2008). Assim, compostos capazes de inibir a atividade das enzimas PLA₂, COX e LOX, antagonizar os efeitos dos eicosanóides, bloquear a ativação de fatores de transcrição como NF- κ B ou modular a atividade de quinases como MAPK e ERK1/2, podem ser identificados nesse modelo, uma vez que são capazes de diminuir ou inibir o processo inflamatório induzido por TPA (KUNDU et al., 2009). Ao inibir o edema, o extrato está provavelmente interagindo especificamente com alguma dessas vias acima descritas e pode, portanto, ser um interessante alvo para o desenvolvimento de novos agentes terapêuticos anti-inflamatórios (GARBOR, 2000).

Ácido Araquidônico

O ácido araquidônico é um constituinte dos fosfolípidos de membrana e, por isso, a síntese dos eicosanóides inicia-se com a liberação desse ácido graxo, através de hidrólise, catalisada por fosfolipases específicas (GUYTON, HALL, 1997; LEHNINGER, NELSON, COX, 1995). Todas as células são capazes de liberar ácido araquidônico, mas os produtos enzimáticos, predominantes e assim formados, são altamente específicos no nível celular

(MARZZOC, TORRES, 1999). Em resposta a um estímulo hormonal, ou a outros, uma fosfolipase específica, presente na maioria dos tipos celulares de mamíferos, hidrolisa os fosfolípidos de membrana, liberando o ácido araquidônico (WYNGAARDEN, SMITH, BENETT, 1993). A fosfolipase A2 e a fosfolipase C, e, possivelmente, a diacilglicerolipase estão envolvidas na liberação de ácido araquidônico. As fosfolipases são de relevância particular para a formação de eicosanóides, porque os ácidos graxos precisam estar na forma livre para serem utilizados como substratos da ciclooxigenase e lipoxigenase (WYNGAARDEN, SMITH, BENETT, 1993).

Um grupo de enzimas, presentes no retículo endoplasmático liso, converte o ácido araquidônico em prostaglandinas, em um processo que se inicia com a formação de um endoperóxido, o PGH_2 , precursor imediato de muitas outras prostaglandinas e tromboxanos. A enzima da sintase de tromboxano, presente nas plaquetas sangüíneas, converte PGH_2 em tromboxano A2 e dela outros tromboxanos são derivados. Os tromboxanos induzem à constrição dos vasos sangüíneos e à agregação das plaquetas, os primeiros passos, na coagulação do sangue (WYNGAARDEN, SMITH, BENETT, 1993).

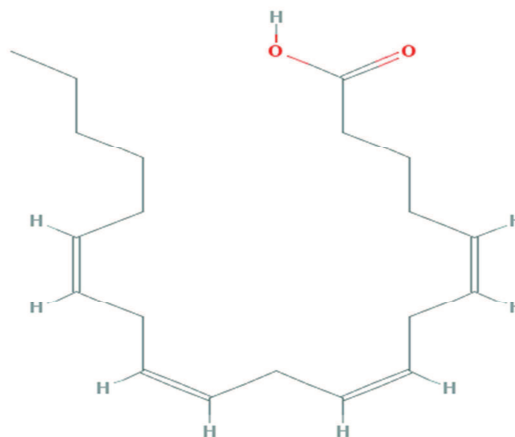
A prostaciclina (PGI_2), produto predominante do ácido araquidônico através da ação da ciclooxigenase, é formada pelo endotélio vascular e também pelo subendotélio. Esta inibe a aderência das plaquetas e dos neutrófilos a superfícies estranhas e ao endotélio lesado, e dilata tanto a musculatura lisa, brônquica quanto a vascular (MARZZOCO, TORRES, 1999).

O ácido araquidônico também está amplamente sujeito a reações de lipoxigenação, o que leva à formação de compostos denominados leucotrienos. O primeiro passo na formação dos leucotrienos é a clivagem do ácido araquidônico dos fosfolípidos de membrana. A síntese dos leucotrienos começa com a ação de várias lipoxigenases, que catalisam a incorporação de oxigênio molecular no ácido araquidônico. Essas enzimas são encontradas nos leucócitos, coração, cérebro, pulmão e baço (PETERSDORF et al., 1984). O primeiro leucotrieno a ser formado é o A4 que, por sua vez, é metabolizado ou a leucotrieno B4 (LT B4) ou leucotrieno C4 (LTC4). O LTC4 produz grande broncoconstrição pulmonar (KINSELLA, 1991).

Então, o ácido araquidônico é um importante ácido graxo que serve como precursor de prostaglandinas, prostaciclina, tromboxanos e leucotrienos, os quais são potentes mediadores intracelulares, que controlam uma variedade de processos complexos no organismo. No passo intermediário da formação desses compostos, prostaglandina endoperóxidos (PGH_2 e PGG são formados pela ação da enzima prostaglandina endoperóxido sintetase, uma enzima com atividade de ciclooxigenase - produzindo PGG_2 a partir de ácido araquidônico). Durante a

atividade de peroxidase, radicais livres e orgânicos são produzidos, os quais dão origem à formação de intermediários reativos de oxigênio e peroxidação lipídica patológica.

Figura 13: Estrutura molecular do Ácido Áraquidônico



Fonte: <http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/summary/summary.cgi?cid=444899>, acessado em 27 de maio de 2013.

2.5.4 PLANTAS MEDICINAIS COMO ALVO DE NOVOS ANTI-INFLAMATÓRIOS TÓPICOS

O Brasil apresenta uma vasta biodiversidade, possibilitando a população brasileira o uso da fitoterapia na terapêutica dos processos inflamatórios. Na maioria das vezes, o uso de plantas como tratamento ocorre de forma empírica. Como exemplos, são citadas 35 espécies utilizadas pela população no nordeste brasileiro para processos inflamatórios ou para o tratamento de outras doenças, sendo que somente 12 delas apresentam comprovação científica através de ensaios pré-clínicos (OLIVEIRA GISELE, OLIVEIRA, ANDRADE, 2010). Em 2005, foi lançado o primeiro fitoterápico brasileiro utilizado como anti-inflamatório em forma de creme: o Acheflan® obtido da *Cordia verbenacea* (Boraginaceae) (PASSOS et al., 2007).

Diante disso, vários grupos de pesquisas brasileiros vêm se dedicando ao estudo de plantas medicinais e inúmeras plantas utilizadas na medicina tradicional demonstraram promover a inibição da resposta inflamatória tópica in vivo, sendo que algumas delas já tiveram os compostos responsáveis por tal atividade isolados e caracterizados.

De acordo com os resultados de Rauh e outros (2011), o extrato etanólico de *Vernonia scorpioides* (Asteraceae) é eficaz para o processo inflamatório agudo e crônico da pele, bem como reação de hipersensibilidade retardada e hiperproliferação de queratinócitos. Estudos demonstram que os constituintes fenólicos como o eugenol, o timol, o carvanol podem agir

como análogos estruturais dos derivados salicílicos, sendo seu mecanismo anti-inflamatório provável a inibição da ciclooxigenase (CARVALHO, 2004).

A atividade inibitória do extrato em acetato de etila de *Garcinia hanburyi* (Clusiaceae) sobre a inflamação aguda foi verificada em modelo de edema de orelha induzido por etilfenilpropiolato de etila (EPP) em ratos. A aplicação tópica de 1mg/orelha desse extrato inibiu o edema em 93% após 30 minutos da indução do processo. Sugeriu-se esse efeito à inibição da biossíntese das prostaglandinas (PANTHONG et al., 2007).

Os inventores da patente 7803409 desenvolveram técnicas para crescimento e colheita das sementes de *Vernonia galamensis* (Asteraceae) e descobriram que o óleo e a cera recuperados a partir das sementes, podem ser utilizados no tratamento de várias doenças de pele. A administração tópica do óleo de *V. galamensis* pode tratar vários tipos de lesões como: feridas, úlcera de pele, infecção bacteriana, viral ou fúngica (psoríase, dermatite, eczema). Este óleo pode ser utilizado para tratamento profilático, de forma a reduzir ou prevenir a recorrência de uma lesão na pele (MCCLORY, ATKINSON, 2010).

O óleo resina de *Copaifera duckei* (Caesalpiniaceae), cuja composição terpenoidal é bem caracterizada, apresentou atividade anti-inflamatória quando aplicado topicamente em modelo de dermatite induzida por óleo de cróton, onde há participação de mediadores obtidos pela via das cicloxigenases. A redução do edema foi dose-dependente, com inibição de 52%, 58% e 62% nas doses utilizadas, sendo semelhante ao efeito produzido pela dexametasona (CARVALHO et al., 2005). Utilizando esse mesmo modelo, os óleos das sementes de *Helianthus annuus* (girassol) e *Vitis vinífera* (uva), ricos em ácidos graxos insaturados ômega-6 (linoleico), apresentaram efeito antiedematogênico tópico, sendo esse efeito potencializado quando se associou esses óleos vegetais aos triglicerídeos de cadeia curta, ácidos cáprico e caprílico (NABAS et al., 2009)

Há um grande interesse nos polifenóis de plantas para proteção da pele no tratamento de processos inflamatórios, mesmo não conhecendo os mecanismos pelos quais estes produtos naturais exercem os seus efeitos benéficos. Os benefícios da pele através dos polifenóis de plantas têm sido amplamente atribuídos à sua atividade antioxidante (KORKINA et al., 2009).

A atividade de *Chrysanthemum indicum* (Asteraceae) sobre a resposta inflamatória aguda e crônica foi avaliada em modelo de edema de orelha induzido por TPA. A aplicação tópica do extrato etanólico das flores dessa planta inibiu o edema através da redução da espessura e peso das orelhas tratadas, bem como do infiltrado inflamatório e outros indicadores histológicos, semelhante aos efeitos produzidos pela indometacina. Além disso, houve redução significativa dos níveis de IL-1 β e TNF- α , bem como da atividade da

mieloperoxidase. Esses resultados sugerem *C. indicum* como agente anti-inflamatório em potencial (LEE et al., 2009).

Extratos ou substâncias isoladas de plantas utilizadas na medicina tradicional tais como *Achillea millefolium* (Asteraceae), *Echinacea angustifolia* (Asteraceae), *Echinacea purpurea* (Asteraceae), *Hamamelis virginiana* (Hamamelidaceae), *Juniperus communis* (Cupressaceae), *Ledum palustre* (Ericaceae), *Polygonum aviculare* (Polygonaceae), *Sanguinaria canadensis* (Papaveraceae) e *Tanacetum vulgare* (Asteraceae) demonstraram promover a inibição da COX e/ou 5-LOX (BORCHERS et al., 2000). A *Arnica montana* (Asteraceae), por sua vez, inibe um alvo central do processo inflamatório, o fator de transcrição NF-κB, que suprime a transcrição gênica de alguns mediadores pró-inflamatórios (MERFORT, 2003).

A aplicação tópica do extrato hidroalcolico e frações de *Serjania erecta* (Sapindaceae) revelaram atividade significativa sobre o processo inflamatório, causando uma redução dose-dependente do edema de orelha induzido por óleo de cróton. Além disso, houve diminuição da atividade da mieloperoxidase tissular, parâmetro indicativo do influxo de polimorfonucleares. As frações diclorometano, acetato de etila e hexânica demonstraram inibição máxima de 81%, 78% e 83% para o edema de orelha e 56%, 52% e 69% para atividade da mieloperoxidase, respectivamente (GOMIG et al., 2008).

Miricitrina, um flavonóide do subgrupo flavonol, tem sido descrita pela sua ação antioxidante, anti-inflamatória, “lixeiro” de radicais livres, antitumoral e anti-hipercolesterolêmica (EDENHARDER, GRUNHAGE, 2003). Além disso, a miricitrina é capaz de inibir proteínas quinases, inibe a ativação do NF-κB, diminui a produção de NO e a superexpressão da enzima iNOS (CHEN, YANG, LEE, 2000).

O efeito do extrato hidroalcolico obtido das partes aéreas *Solidago chilensis* (Asteraceae) sobre a inflamação aguda foram verificados através do edema de orelha induzido pela fração clorofórmica do extrato-látex de *Euphorbia milii* (Euphorbiaceae) em ratos. A administração tópica ou intraperitoneal do extrato de *S. chilensis* reduziu a formação do edema, entretanto a via tópica foi mais efetiva, produzindo efeito similar à dexametasona. Por outro lado, as doses testadas (12,5 - 50 mg/kg) não inibiram a formação do edema quando o extrato foi administrado oralmente, sendo equivalente ao edema do grupo controle negativo tratado com salina. Sugeriu-se a inibição da interação leucócito-endotélio como importante mecanismo de ação do extrato (TAMURA et al., 2009).

Calendula officinalis (Asteraceae), tem seu uso medicinal registrado desde o século 12 como antipirético, anti-inflamatório e reguladora do ciclo menstrual (CARVALHO, 2004).

Dados publicados conferem sua atividade anti-inflamatória sistêmica e tópica, produzida pelos triterpênicos presentes na planta (NEUKIRCH et al., 2005). Segundo Zanella (2005), o creme contendo o extrato hidroalcoólico de *Mandevilla illustris* (Apocynaceae) gerou uma inibição do edema de forma dose-dependente e a adição de adjuvantes de permeação na composição do creme não aumentou o efeito farmacológico. Como observado, o mesmo perfil farmacológico obtido com o creme foi verificado quando se trocou a base farmacotécnica para gel.

O extrato acetato de etila obtido das folhas de *Memecylon edule* (Memecylaceae), apresentou maior estimulação da produção de IL-10 *in vitro*, e redução do edema de orelha induzido por EPP em camundongos, o qual foi dose-dependente. As concentrações de 1mg/orelha (47,8%) e 2 mg/orelha (50,2%) promoveram inibição similar àquela produzida pela indometacina (62,4%) e dexametasona (70%) após 4 horas da aplicação dos extratos (NUALKAEW et al., 2009).

As propriedades anti-inflamatórias dos flavonoides obtidos do extrato butanólico de *Cayaponia tayuya* (Cucurbitaceae) foram avaliadas, utilizando-se modelo de edema de orelha induzido por dose única (inflamação aguda) ou múltiplas (inflamação subcrônica) de TPA, com ênfase na indução de enzimas pró-inflamatórias e mediadores peptídicos. Os flavonoides dessa planta inibiram o edema agudo em 66%, enquanto no modelo subcrônico essa inibição foi de 37%. Em testes *in vitro* com macrófagos, a produção de óxido nítrico foi reduzida (42%), mas não houve efeitos sobre a produção de TNF- α . Além disso, houve inibição da expressão de iNOS e COX-2 em 98% e 42%, respectivamente (AQUILA et al., 2009).

Dentre as frações do extrato etanólico de *Egiron multiradiatus*, que possui flavonoides como principais componentes, a fração butanólica mostrou ser mais efetiva contra o processo inflamatório. Essa fração quando administrada oralmente na dose de 400mg/kg, em modelo de edema de orelha induzido por xileno em camundongos, produziu uma maior inibição da resposta inflamatória (52,94%) quando comparada à dexametasona (44,12%) (LUO et al., 2008).

Os efeitos anti-inflamatórios tópicos de *Heliopsis longipese* (Asteraceae) e seus principais constituintes bioativos foram avaliados pela primeira vez, utilizando-se modelos de inflamação de orelha induzido por ácido araquidônico e acetato de forbol mirístico. O extrato etanólico da raiz dessa planta aplicado topicamente reduziu o edema de orelha de maneira dose-dependente, sendo o efeito anti-inflamatório máximo observado na concentração de 3mg/orelha. Esta inibição foi de 91,3% e 80,3% nos modelos do AA e PMA, respectivamente.

Resultados similares foram observados para os constituintes afinina e isobutil-decanamida (HERNÁNDEZ et al., 2009).

No Brasil, uma das estratégias de tratamento de infecções prevê a utilização de plantas. Podemos exemplificar essa conduta com a recomendação feita pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), através da RENISUS (Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS), da aplicação de *V. polyanthes*. Essa espécie é indicada, terapeuticamente, para uso interno na forma de infusão no tratamento de bronquite e tosse persistente e, externamente, no caso de dores musculares.

O Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos foi instituído pela crescente recorrência do uso de produto de origem natural pelo Ministério da Saúde do Brasil e outros nove ministérios através da Portaria interministerial nº 2.960/2008. Com o objetivo que visa a garantir à população brasileira o acesso seguro e o uso racional de plantas medicinal e fitoterápico, promovendo o desenvolvimento da indústria nacional (BRASIL, 2008a). O Ministério da Saúde do Brasil, em Janeiro de 2009, divulgou uma lista com 71 plantas que podem ser utilizadas como medicamento fitoterápico e nesta lista consta a planta em estudo, a *V. polyanthes*.

Estes resultados demonstram possibilidades da utilização de plantas medicinais e seus metabólitos secundários como agentes anti-inflamatórios tópicos.

3. OBJETIVOS

3.1 GERAL

O presente estudo teve como objetivo geral realizar a caracterização química e avaliar as atividades antioxidante, antibacteriana e anti-inflamatória tópica dos extratos hexânico, em acetato de etila e etanólico obtidos das folhas de *Vernonia polyanthes* Less. (Asteraceae), com o intuito de corroborar com o uso popular e oferecer subsídio científico para uma nova opção de terapêutica medicinal.

3.2. ESPECÍFICOS

A partir dos extratos hexânico, em acetato de etila e etanólico obtido das folhas de *V. polyanthes* Less.:

- Quantificar os teores de fenóis totais e flavonoides totais;
- Avaliar o potencial antioxidante por meio dos ensaios de DPPH, poder de redução do ferro, β -caroteno/ácido linoleico;
- Caracterizar quimicamente os constituintes;
- Avaliar a atividade antibacteriana 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);
- Avaliar a atividade anti-inflamatória tópica usando modelos de edema de orelha induzido em camundongos;
- Avaliar os parâmetros de inflamação (edema) através da análise histológica das orelhas obtidas do modelo de edema de orelha induzido pela aplicação tópica de óleo de crotón.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 MATERIAL VEGETAL

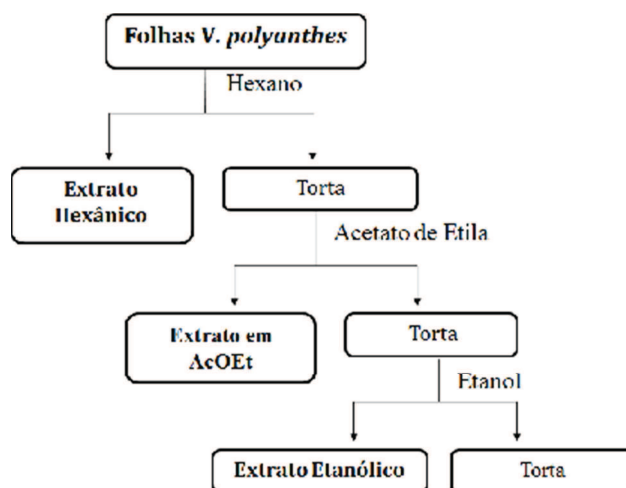
Folhas de *V. polyanthes* foram coletadas da planta cultivada no Horto Medicinal da Faculdade de Farmácia de Juiz de Fora (UFJF), Juiz de Fora, Minas Gerais. Uma exsicata (CESJ nº 10.329) encontra-se depositada no Herbário Leopoldo Krieger (CESJ), Instituto de Ciências Biológicas, UFJF.

A coleta foi realizada pela manhã, entre as 08h00min e 09h00min, no dia 29 de Março de 2012. As folhas foram separadas dos galhos, pesadas e colocadas para secagem em estufa sob ventilação forçada até perda de 90 a 95% da umidade. Após secagem, o material foi triturado em liquidificador industrial e peneirado em tamise nº 18 para preparo dos extratos.

4.2 OBTENÇÃO DOS EXTRATOS DA *Vernonia polyanthes*

O material pulverizado (hum quilo) foi submetido à extração com hexano P.A. por maceração estática a temperatura ambiente até exaustão (três meses). O extrato foi filtrado e concentrado a pressão reduzida utilizando-se evaporador rotatório para obtenção do extrato hexânico (EHEX). O material resultante foi submetido à nova extração com acetato de etila nas mesmas condições, obtendo-se o extrato em acetato de etila (EAE). Um novo procedimento extrativo foi repetido utilizando etanol como solvente e adquirindo-se o extrato etanólico (EE).

Figura 14: Esquema representativo do método de extração.



Fonte: Os Autores (2013).

4.3 DETERMINAÇÃO DO TEOR DE FENÓIS TOTAIS

A determinação dos teores de derivados fenólicos pode ser realizada por diversas técnicas, todavia, a que utiliza o reagente de Folin-Ciocalteu é a mais citada na literatura (BONOLI et al., 2004; ROGINSKY, LISSI, 2005). O reagente consiste da mistura dos ácidos fosfomolibdídico e fosfotungstúico, no qual o molibdênio e o tungstênio encontram-se no estado de oxidação 6 que na presença de substâncias redutoras, como as substâncias fenólicas, formam-se os chamados molibdênio azul e tungstênio azul. A média do estado de oxidação dos metais está entre 5 e 6 cuja coloração permite a determinação da concentração das substâncias redutoras (IKAWA et al., 2003; NACZK, SHAHIDI, 2004).

Os teores de fenóis totais foram determinados por espectrofotometria na região do visível utilizando o método de Folin–Ciocalteu (SOUSA et al., 2007). Para a elaboração da curva de calibração utilizou-se o ácido gálico como padrão. Uma solução-estoque de ácido gálico 1 mg/mL em água foi preparada seguida de diluições com concentrações entre 2 a 7,6 µg/mL ácido gálico, sendo colocadas em tubo de ensaio em triplicata. A cada tubo foram adicionados 500 µL de Folin-Ciocalteu com 6 mL de água destilada e agitado por 1 minuto em vortex. Em seguida, 2 mL de carbonato de sódio a 15% (Na₂CO₃) foram adicionados à mistura e agitada por 30 segundos, acertando o volume para 10 mL com água destilada. Após duas horas, a varredura espectrofotométrica foi realizada entre os comprimentos de ondas de 600 a 900 nm, obtendo-se o espectro com o pico máximo de absorção em 783 nm. As absorvâncias das soluções de ácido gálico foram determinadas para montagem da curva de calibração e por meio de análise de regressão linear pelo método dos mínimos quadrados obteve-se a equação da reta e o coeficiente de determinação (R²).

A quantificação dos fenóis totais nos extratos EHEX, EAE e EE foi feita usando o mesmo procedimento analítico. Para cada extrato as medidas foram realizadas em triplicata. A absorvância obtida de cada solução foi substituída na equação da reta do padrão e a concentração foi ajustada em teor de fenóis totais.

4.4 DETERMINAÇÃO DO TEOR DE FLAVONOIDES TOTAIS

Os teores de flavonoides totais foram determinados por método espectrofotométrico na região do visível (LEITE, 2002; SOBRINHO et al., 2008), com pequenas modificações.

Para obtenção da curva de calibração utilizou-se a rutina como padrão, preparando uma solução-estoque de 0,5 mg/mL em etanol. Soluções diluídas entre 2 a 60 µg/mL foram

obtidas a partir da solução-estoque, sendo colocadas em tubo de ensaio em triplicata. Em cada tubo foi adicionado 0,4 mL de etanol, 0,12 mL de ácido acético, 2 mL de piridina a 20% em etanol e 0,5 mL de cloreto de alumínio a 8% em etanol, completando para 5 mL com água destilada. Após 30 minutos de reação, um espectro de absorção, obtido por varredura espectrofotométrica entre 300 a 600 nm, apresentou um pico de absorção em 407 nm. As absorbâncias das soluções de rutina foram determinadas e através de análise de regressão linear pelo método dos mínimos quadrados, a reta de calibração e o coeficiente de determinação (R^2) foram obtidos.

Soluções-estoque de 1 mg/mL dos extratos EHEX, EAE, EE foram preparadas em etanol para análises das amostras. As soluções-estoque (5 mL) foram submetidas à semipurificação com hexano (adiciona-se 2 mL de hexano e 3 mL de água destilada) que após homogeneização, foram centrifugadas por 2 minutos, até completa separação de fases. Em seguida, a camada superior foi retirada com auxílio de uma pipeta de *Pasteur* e alíquotas de 0,4 mL, em triplicata, da fase hidroalcolica foram transferidas para tubos de ensaio, para a realização da reação e leitura das mesmas conforme descrita para o padrão.

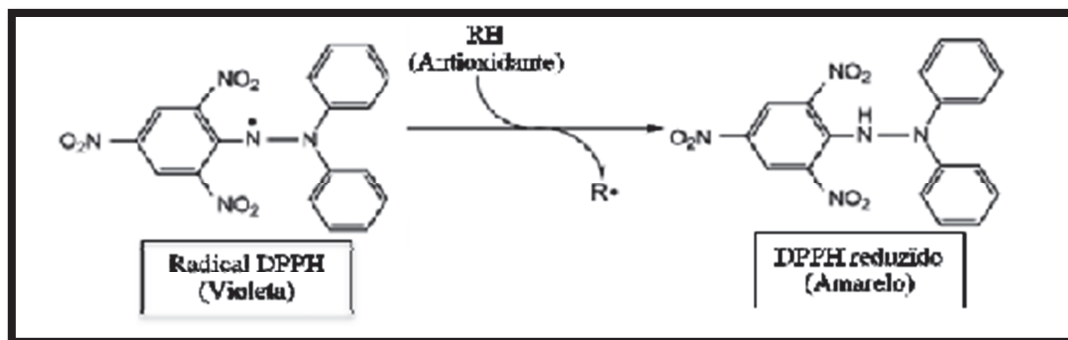
As amostras foram analisadas em triplicata no comprimento de onda 407 nm. As absorbâncias de cada solução foram substituídas na equação da reta do padrão e a concentração foi ajustada em teor de flavonoides totais em equivalência de rutina.

4.5 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

4.5.1 MÉTODO DO RADICAL 1,1-DIFENIL-2-PICRILIDRAZILA

Por ser um método rápido e altamente sensível, o ensaio do 1,1-difenil-2-picrilidrazila (DPPH) tem sido frequentemente utilizado no estudo dos antioxidantes naturais, sendo baseado na teoria de que um doador de hidrogênio é um antioxidante. O princípio do método é a redução do radical livre estável orgânico de nitrogênio (2,2-difenil-1-picrilidrazil), o qual apresenta o máximo de absorção entre 515 a 520 nm na coloração violeta. Ao retirar um radical hidrogênio do antioxidante, observa-se uma diminuição da absorbância e da coloração passando da cor violeta para o amarelo (Figura 15) (MOLYNEUX, 2003).

Figura 15: Estrutura química do radical DPPH e reação de estabilização com um antioxidante.



Fonte: MOON, SHIBAMOTO (2009).

O DPPH, quando em solução, tem uma coloração violeta com forte absorção em torno de 515 a 517 nm e apresenta paramagnetismo conferido pelo elétron não emparelhado. Assim, ao receber um elétron, passa a ser pareado, tornando-se uma molécula diamagnética e a absorção característica desaparece. A descoloração resultante está relacionada estequiometricamente com o número de elétrons aceitos e, assim, a atividade antioxidante pode ser expressa em função da sua capacidade de provocar um decréscimo na absorção (BRAND-WILLIAMS, CUVELIER, BERSET, 1995).

Para o ensaio da atividade antioxidante dos extratos das folhas de *V. polyanthes* usando o DPPH, foi preparada uma solução de cada extrato na concentração 1 mg/mL em etanol (MENSOR et al., 2001). A partir desta solução inicial foram preparadas soluções em concentrações finais variadas. Para a amostra do EHEX foram preparadas soluções nas concentrações de 25, 50, 125, 250, 500, 700 e 1000 µg/mL. Para os extratos EAE e EE foram preparadas soluções nas concentrações de 5, 10, 25, 50, 125 µg/mL. O controle positivo foi feito com rutina a partir de soluções nas concentrações de 1, 3, 5, 10, 15 e 30 µg/mL. Além disso, uma solução de DPPH (PM = 394,32g/mol) a 0,3 mM em etanol, protegida da luz, foi preparada e posteriormente usada como reagente.

Alíquotas de 2,5 mL de cada uma das soluções dos extratos foram transferidas para tubos de ensaio protegidos da incidência de luz, em triplicata, e adicionado 1 mL da solução de DPPH 0,3 mM.

O controle do ensaio foi preparado com 1 mL da solução de DPPH 0,3 mM a 2,5 mL de etanol, enquanto os brancos de cada solução da amostra foram acrescidos de 1 mL de etanol sem DPPH.

Em seguida, os tubos foram mantidos ao abrigo da luz por 30 minutos e, então, foram feitas as leituras das absorbâncias em 515 nm.

A partir das leituras das absorvâncias das amostras, determinou-se a porcentagem de atividade antioxidante (% AA) que corresponde à quantidade de DPPH reduzida pelas mesmas utilizando a seguinte fórmula:

$$\% AA = 100 - \{[Abs_{controle} - (Abs_{amostra} - Abs_{branco})] \times 100\} / Abs_{controle}$$

Onde: $Abs_{controle}$ corresponde à absorvância de 2,5 mL de etanol + 1 mL da solução de DPPH; $Abs_{amostra}$ corresponde à absorvância de 2,5 mL da solução do extrato + 1 mL da solução DPPH e Abs_{branco} correspondem à absorvância de 2,5 mL da solução do extrato + 1 mL de etanol.

Após obtenção da atividade antioxidante, a concentração efetiva 50% (CE_{50}) dos extratos foi obtida através da análise de regressão linear pelo método dos mínimos quadrados, obtendo-se a equação da reta e o coeficiente de determinação (R^2). A abscissa do gráfico correspondeu à concentração do extrato testado e a ordenada à porcentagem da atividade antioxidante. Assim, quanto maior a redução do DPPH por uma amostra, menor a concentração efetiva 50% (CE_{50}) e maior a atividade antioxidante.

4.5.2 DETERMINAÇÃO DO PODER DE REDUÇÃO DO FERRO

O poder de redução dos extratos EHEX, EAE e EE foi determinado pelo método descrito por Oyaizu (1986). Soluções-estoque a 1 mg/mL em água destilada de cada extrato, seguida por diluições com concentrações variadas, foram preparadas. Diluições do EHEX nas concentrações de 50, 150, 300, 450, 600, 750, 900 e 1000 $\mu\text{g/mL}$, foram feitas para a realização do teste. O EAE foi diluído para obter concentrações de 25, 50, 100, 150, 250, 350, 450, 550 e 700 $\mu\text{g/mL}$, enquanto que para o EE preparou-se soluções nas concentrações de 1, 25, 50, 75, 100, 125, 150, 200, 250, 300, 350, 400 $\mu\text{g/mL}$. O controle positivo foi realizado com rutina, com soluções nas concentrações de 75, 100, 125, 200, 250, 300, 400 e 500 $\mu\text{g/mL}$. Todas as soluções foram feitas em água destilada.

Além disso, uma solução tampão fosfato de potássio 200 μM , pH 6,6 foi preparada com fosfato monobásico de potássio (PM = 136,09 g/mol) e fosfato dibásico de potássio (PM = 174,18 g/mol), corrigindo o pH com solução de hidróxido de sódio a 0,1 M.

Aos tubos Falcon, foram adicionados 2,5 mL do tampão fosfato de potássio e 2,5 mL de ferrocianeto de potássio a 1% [$\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$], sendo mantidos a 50 °C por 20 minutos. Em seguida, foram adicionados 2,5 mL de ácido tricloroacético 10% seguida de centrifugação a 4000 rpm por 8 minutos. Retirou-se 2,5 mL da camada superior transferindo para tubos de

ensaio e adicionou-se 2,5 mL de água destilada e 0,5 mL de cloreto férrico (FeCl_3). O branco foi realizado sem cloreto férrico, com 0,5 mL de água destilada. A absorbância foi medida a 700 nm em espectrofotômetro. Todas as leituras foram realizadas em triplicata.

A concentração efetiva 50% (CE_{50}) foi calculada a partir da curva absorbância *versus* concentração por regressão linear, obtendo a equação da reta e o coeficiente de determinação (R^2).

4.5.3 TÉCNICA DA BIOAUTOGRAFIA COM DPPH

A atividade antioxidante dos extratos EHEX, EAE e EE foi também avaliada em cromatoplasas em camada delgada, em gel de sílica, utilizando DPPH (2,2'-difenil-1-picrilhidrazila) como reagente. Foi preparada uma solução estoque das amostras a uma concentração de 10 mg/mL e aplicados 10 μL nas cromatoplasas. As placas do EHEX foram eluídas com hexano:acetato de etila (6:4), enquanto para o EAE utilizou-se diclorometano:metanol (9:1) e o EE foi eluído com butanol:água:ácido acético (6:3:1). Após a eluição e evaporação do solvente, as placas foram nebulizadas com DPPH a 2,54 mM. Decorridos 30 minutos, foi realizada a leitura da placa, em que halos brancos ou amarelados no ponto de aplicação, sobre o fundo violeta, foram considerados presença de substâncias antioxidantes (CAVIN et al., 1998).

Cromatoplasas de referência foram desenvolvidas em sílica gel, com as mesmas fases móveis de acordo com a amostra a fim de se identificar quais as classes de constituintes bioativos estavam presentes. Foram utilizados os seguintes reveladores: ácido sulfúrico: vanilina, como revelador universal; KOH 10% (reativo de Borntrager), para identificação de cumarinas; NP/PEG, para flavonoides; Liebermann-Burchard, para esteroides e triterpenos e cloreto férrico, para compostos fenólicos. O fator de retenção (R_f) foi calculado para cada banda que apresentou zonas brancas ou amareladas, isto é, que reagiram com o DPPH.

4.5.4 MÉTODO DE COOXIDAÇÃO DO β -CAROTENO/ÁCIDO LINOLEICO

O método de oxidação do β -caroteno/ácido linoleico avalia a atividade de inibição de radicais livres gerados durante a peroxidação do ácido linoleico. O método está fundamentado em medidas espectrofotométricas da descoloração (oxidação) do β -caroteno induzida pelos produtos de degradação oxidativa do ácido linoleico. Este método determina a atividade de uma amostra ou substância de proteger um substrato lipídico da oxidação (DUARTE-ALMEIDA et al., 2006).

A atividade antioxidante dos extratos EHEX, EAE e EE foi determinada pelo método de cooxidação do β -caroteno/ácido linoleico descrito por Koleva e outros (2002). Preparou-se uma solução de β -caroteno a 0,2 mg/mL em clorofórmio e 1 mL dessa solução foi adicionada a um balão, contendo ácido linoleico (25 μ L) e Tween 40 (200 mg) e submetido à rotaevaporação em banho de água a 40° C, durante 15 minutos, para remoção do clorofórmio. Em seguida, 50 mL de água destilada, oxigenada por borbulhamento através de uma bomba de ar, foram adicionadas ao balão lentamente e sob agitação constante, para formação de uma emulsão. Paralelamente ao preparo da emulsão, foram feitas soluções dos extratos a 25 μ g/mL em etanol e dos controles positivos (BHT, rutina e quercetina) a 250 μ g/mL. Alíquotas de 30 μ L das soluções das amostras e dos controles positivos foram adicionadas nos poços da microplaca, em triplicata, seguido da adição de 250 μ L da emulsão. Esse procedimento foi realizado rapidamente, para evitar a evaporação do etanol e a oxidação prévia do β -caroteno. O controle negativo também foi realizado em triplicata, adicionando-se aos poços 30 μ L de etanol e 250 μ L da emulsão. O branco constituiu-se de 280 μ L de etanol.

A primeira leitura (t_0) das absorbâncias foi feita imediatamente após a adição das alíquotas de emulsão na microplaca e em seguida, a microplaca foi incubada em estufa a 50° C por 15 minutos. Após incubação, foi realizada a segunda leitura (t_{15}) e esse procedimento repetiu-se por mais seis vezes obtendo-se ao final oito leituras (t_0 , t_{15} , t_{30} , t_{45} , t_{60} , t_{75} , t_{90} e t_{105}), para monitoramento da oxidação do β -caroteno, que resulta no clareamento e conseqüentemente na redução gradual da absorbância das soluções. As medidas das absorbâncias foram realizadas em leitor de microplacas (Thermoplate®, TP-READER) a 492 nm (definido através de varredura espectrofotométrica da emulsão de β -caroteno e ácido linoleico entre 200 e 600 nm).

As absorbâncias obtidas em t_0 , t_{15} , t_{30} , t_{45} , t_{60} , t_{75} , t_{90} e t_{105} , foram usadas para montar o gráfico de decaimento da absorbância (média \pm erro padrão) em função do tempo e

determinar a porcentagem de inibição da oxidação do β -caroteno (% I), utilizando a seguinte fórmula:

$$\% I = \left(\frac{A \text{ controle} - A \text{ amostra}}{A \text{ controle}} \right) \times 100$$

Onde: $A \text{ controle} = Abs \ t0 - Abs \ t105$ e $A \text{ amostra} = Abs \ t0 - Abs \ t105$, sendo que $A \text{ controle}$: controle negativo e $A \text{ amostra}$: extratos e controles positivos (BHT, rutina e quercetina).

4.6 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; 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, 2012).

Para os experimentos microbiológicos foram utilizadas as seguintes amostras de referência, representativas de grupos bacterianos Gram-positivos e Gram-negativos: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 10536, *Salmonella typhimurium* ATCC 13311 e *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.

4.6.1 TESTE DE DIFUSÃO EM AGAR

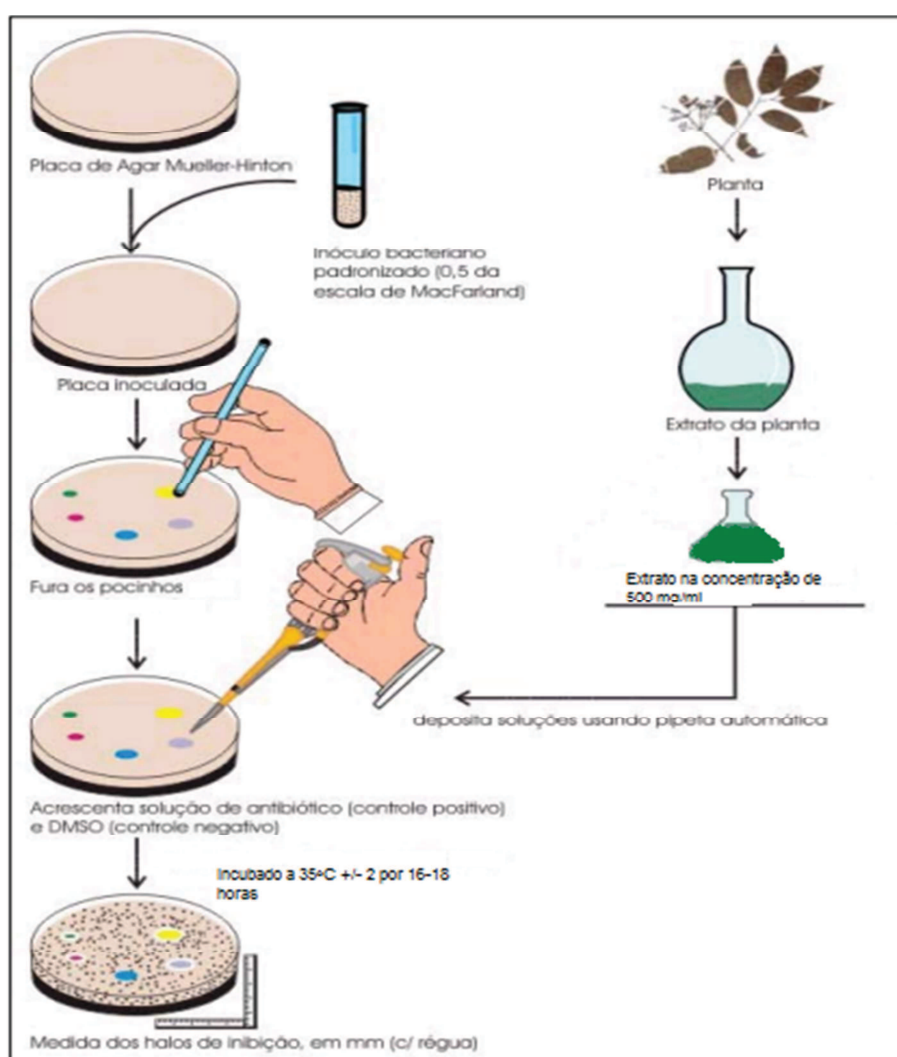
Para a triagem da avaliação da atividade antibacteriana, foram utilizados os extratos EHEX, EAE e EE. As soluções-teste foram preparadas a partir dos extratos, dissolvendo-os em dimetilsulfóxido (DMSO) até obter-se uma solução com concentração final de 500 mg/mL.

Suspensões bacterianas das amostras de referência a serem investigadas previamente ativadas (cepas de bactérias cultivadas em ágar Müeller-Hinton, 16-18 horas, a 35 ± 2 °C, em aerobiose), foram preparadas a partir de cinco Unidades Formadoras de Colônias (UFC) em 4 mL de solução salina esterilizada (0,9% de NaCl), comparadas e ajustadas à escala padrão 0,5 de McFarland. Em seguida, com auxílio de um *swab* esterilizado, foram inoculadas em superfície de uma placa de Petri contendo ágar Müeller-Hinton em três sentidos (diagonal,

vertical e horizontal), para obtenção de crescimento homogêneo. Após as inoculações, 20 μ L das soluções de antibióticos-controle e dos extratos foram aplicadas em poços de 6 mm. As placas foram incubadas em estufa a 35 ± 2 °C por 16-18 horas em aerobiose.

Após o período de incubação, as zonas de inibição de crescimento bacteriano foram medidas com auxílio de halômetro e registradas em milímetros de diâmetro. Como controles positivos foram utilizados soluções de cloranfenicol 30 μ g e ampicilina 10 μ g e como controle negativo DMSO. Todos os testes foram realizados em triplicata.

Figura 16: Fluxograma do método da avaliação da atividade antibacteriana pelo método de difusão em ágar.



Fonte: TEMPONI (2012).

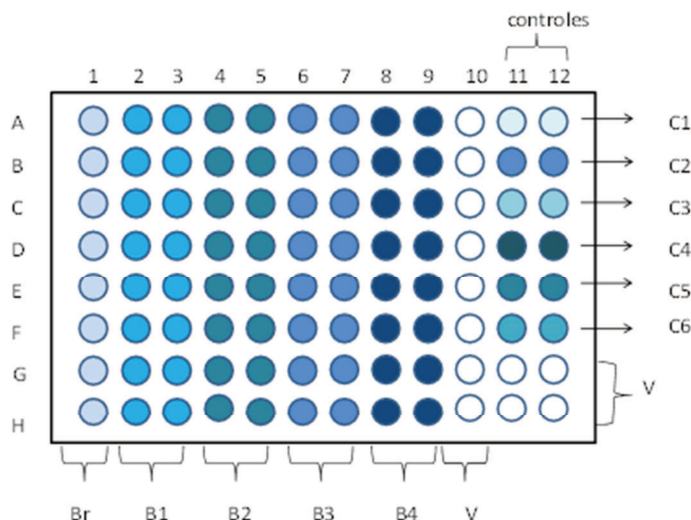
4.6.2. DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA

Para a determinação da CIM foi utilizado o método de microdiluição em caldo conforme preconizado pelo CLSI (CLSI, 2009b). Todos os testes foram realizados empregando caldo Müeller-Hinton (CMH). A partir de soluções-estoque de 12,5 mg/mL em DMSO 1% foram preparadas diluições sucessivas de 5,0 a 0,0025 mg/mL dos extratos EHEX, EAE e EE em microplacas de 96 poços (Figura 17). Para isso, foram transferidos 160 µl dessas 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, 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 Müeller-Hinton, 16-18 horas, a 35 ± 2 °C, em aerobiose) foram preparadas a partir de cinco Unidades Formadoras de Colônias (UFC) em 4 mL de solução salina esterilizada (0,9% de NaCl), comparadas e ajustadas à escala padrão 0,5 de McFarland. Finalmente, as placas foram incubadas por 16-20 horas, a 35 ± 2 °C, em aerobiose.

Os testes controles foram realizados simultaneamente, sendo que o cloranfenicol foi utilizado como composto de referência em concentrações de 500 a 0,24 µg/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. Essa solução foi aplicada 10 µl sobre cada poço das placas e, após incubação, foram observados poços com coloração avermelhada indicativa de crescimento bacteriano, e poços que mantiveram a cor original, ou seja, sem crescimento.

Figura 17: Esquema da placa de 96 poços para determinação da CIM.



Br: Branco (Caldo Mueller-Hinton + extrato); B1: (Caldo MHB + extrato + *S.aureus*); B2: (MHB + extrato + *P. aeruginosa*); B3 (MHB + extrato + *S. typhimurium*); B4 (MHB + extrato + *E.coli*); V: (poço vazio); C1: MHB; C2: MHB + DMSO; C3: MHB + DMSO + *S.aureus*; C4: MHB + DMSO + *P. aeruginosa*; C5: MBH + DMSO + *S. typhimurium*; C6: MBH + DMSO + *E. coli*.

Fonte: TEMPONI (2012).

4.6.3 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO BACTERICIDA MÍNIMA

A determinação da concentração bactericida mínima (CBM) foi realizada em placa de Petri contendo ágar Müeller-Hinton. A placa de Petri contendo o meio de cultura foi previamente demarcada de acordo com as posições das diluições dos extratos na placa de microdiluição. Uma alíquota do conteúdo dos poços da placa de microdiluição foi transferida com o auxílio de uma alça estéril para o local correspondente na placa de Petri. A placa foi incubada em estufa a 35 ± 2 °C de 16 a 18 horas. Foi determinada como CBM a menor concentração do extrato que não permitiu o desenvolvimento dos micro-organismos.

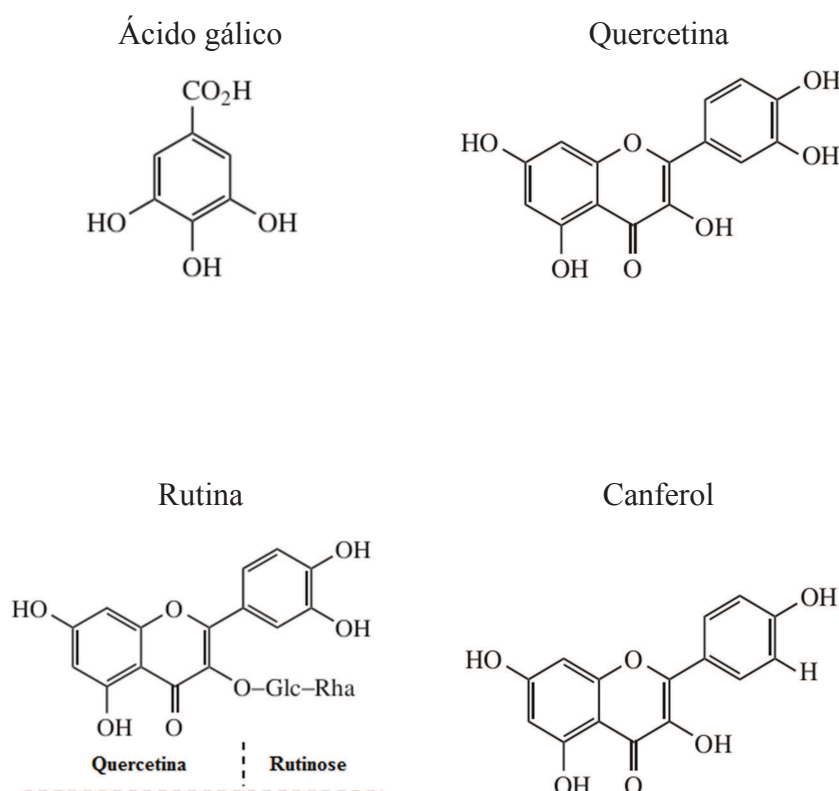
4.7 ANÁLISE POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE)

Os extratos EHEX, EAE e EE, foram avaliados por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) (Agilent[®], 1200 series) com detector UV DAD. As análises foram realizadas em coluna de fase reversa C₁₈ (25 cm x 4,6 cm x 5 µm); eluição em modo isocrático, fluxo de 0,6 mL/min, de fase móvel composta pela mistura de água:acetonitrila (8:2) acidificada com ácido fosfórico (H₃PO₄) 0,5%; concentração das amostras de 1 mg/mL,

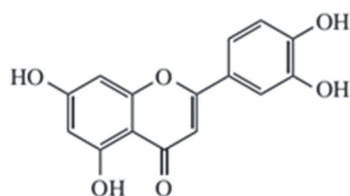
volume de injeção de 50 μ L e temperatura da coluna de 25 $^{\circ}$ C. A análise de cada amostra teve duração de 30 min, com *post time* de 2 min entre as amostras. Os cromatogramas foram obtidos nos comprimentos de onda de 210, 230, 254, 280 e 330 nm e os espectros UV foram obtidos por varredura entre 190 a 400 nm.

Para a detecção de substâncias nos extratos das folhas de *V. polyanthes* Less., foram utilizados os padrões químicos (Sigma-Aldrich[®]): ácido gálico, rutina, quercetina, canferol, luteolina, luteolina 7-O- β -D-glicosídeo e apigenina 7-O- β -D-glicosídeo. Nas análises dos padrões foram empregadas as mesmas condições cromatográficas, incluindo a obtenção dos espectros por varredura no UV (190 a 400 nm). Após obtenção dos cromatogramas e espectros UV, a detecção das substâncias foi realizada por análise e comparação dos tempos de retenção (t_r) dos cromatogramas e dos espectros UV.

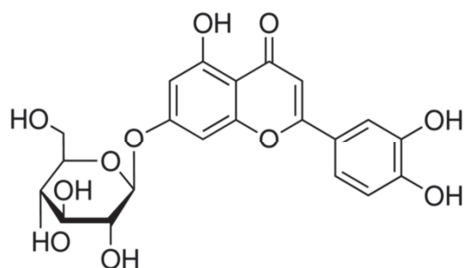
Tabela 3: Padrões químicos utilizados para detecção no extrato hexânico, em acetato de etila e etanólico das folhas de *V. polyanthes* em CLAE-UV.



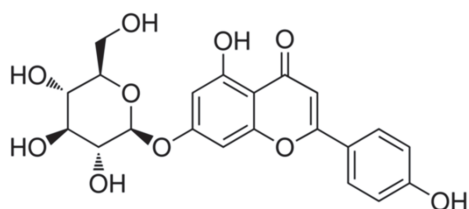
Luteolina



Luteolina 7-O-β-D-glicosídeo



Apigenina 7-O-β-D-glicosídeo



Fonte: Os Autores (2013).

4.8 ANÁLISE POR CROMATOGRAFIA GASOSA/ESPECTROMETRIA DE MASSA (CG/EM)

O extrato EHEX foi adicionalmente submetido à análises de cromatografia com fase gasosa acoplada ao espectrômetro de massas (CG/EM), foram realizadas na Plataforma Analítica de Farmanguinhos, Fiocruz, utilizando-se um cromatógrafo com fase gasosa Hewlett Packard 6890 e MS HP5972, munido de um banco de dados WILEY 7n.1. Foi usada uma coluna capilar do tipo HP5MS com 0,25 μm de espessura do filme, de 30 m de comprimento e 250 μm de diâmetro interno. O gás de arraste foi hélio (1 mL/min) e as separações foram realizadas com injetor a 250 °C, detector a 280 °C e a seguinte programação de temperatura: 70 °C aumentando 2 °C por minuto até 290 °C. Os parâmetros da operação de EM foram 70 eV, fonte iônica 250 °C, impacto de elétrons.

4.9 ANIMAIS

Foram utilizados camundongos Swiss (25-30 g), provenientes do Centro de Biologia da Reprodução da Universidade Federal de Juiz de Fora. Os animais foram mantidos em gaiolas de polipropileno (47 x 34 x 18 cm), com ração e água *ad libitum* em temperatura ambiente (22 ± 2 °C), durante 3 dias no ciclo claro/escuro de 12 horas (claro de 06:00 às 18:00h).

Os animais não foram privados de alimentação antes da realização dos experimentos. Conforme as normas internacionais para estudos com animais de laboratório, o número de animais por grupo experimental foi o mínimo ($n = 8$) necessário para se obter resultados estatísticos (ZIMERMANN, 1983). O protocolo utilizado foi aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal (CEEA) desta Instituição (nº 106/2012) (ANEXO A).

Todos os experimentos foram complementados por grupos controle, nos quais os animais foram submetidos exatamente aos mesmos procedimentos que os grupos tratados.

4.10 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA TÓPICA EM MODELO DE EDEMA DE ORELHA

O modelo de edema de orelha é bastante útil na avaliação da atividade anti-inflamatória tópica, uma vez que é uma metodologia bastante simples e que permite verificar a atividade de substâncias no edema induzido por diferentes agentes irritantes, e ainda identificar substâncias que tenham a capacidade de penetrar na pele (GARBOR, 2000; WINYARD, 2003).

A atividade anti-inflamatória tópica dos extratos EHEX, EAC e EE foi avaliada pelo modelo de edema de orelha em camundongos. Os agentes flogísticos, extratos, dexametasona e indometacina foram dissolvidos em um volume de 20 µL de acetona e aplicados topicamente na parte interna da orelha direita de cada animal. Na orelha esquerda, foi aplicado 20 µL de acetona (veículo). Cada ensaio foi constituído por cinco grupos, todos com 8 indivíduos ($n = 8$): controle negativo (sem tratamento), controle positivo (dexametasona ou indometacina) e os extratos (0,1 mg/orelha, 0,5 mg/orelha e 1,0 mg/orelha).

O edema foi avaliado quanto ao aumento da massa (mg) da orelha dos camundongos. Após determinado tempo da indução do processo inflamatório, os animais foram anestesiados e eutanasiados por deslocamento cervical, e discos de 6 mm de diâmetro de ambas as orelhas foram coletados através de um *punch* e pesados em balança analítica (SHIMADZU®/AUY).

O aumento da massa da orelha foi obtido pela diferença entre as massas das orelhas direita e esquerda. Para minimizar variações referentes às técnicas, os experimentos foram realizados sempre pelo mesmo experimentador.

4.10.1 EDEMA DE ORELHA INDUZIDO POR ÓLEO DE CRÓTON

A atividade anti-inflamatória tópica dos extratos EHEX, EAE e EE foi avaliada pelo método do edema de orelha induzido por óleo de cróton descrito por Schiantarelli e outros (1982). Aplicou-se topicamente 20 μ L de solução de óleo de cróton 2,5% (v/v) em acetona na parte interna da orelha direita de cada camundongo. Após este procedimento, os animais receberam tratamento tópico para a avaliação dos extratos nas seguintes concentrações 0,1 mg, 0,5 mg e 1,0 mg em 20 μ L de acetona/orelha. O mesmo volume de dexametasona (0,1 mg em 20 μ L de acetona/orelha) e acetona (20 μ L/orelha) foram utilizados como controle positivo e controle negativo (veículo) respectivamente. Quatro horas após o desafio com o agente flogístico, os animais foram anestesiados e eutanasiados por deslocamento cervical e o edema avaliado quanto ao aumento da massa (mg) da orelha dos camundongos, conforme descrito no item 4.10. Amostras das orelhas dos camundongos (discos de 6 mm de tecido), após avaliação do edema, foram conservadas em formol e submetidas à análise histológica.

4.10.2 EDEMA DE ORELHA INDUZIDO POR ÁCIDO ARAQUIDÔNICO

O Ácido Araquidônico (AA) e seus metabólitos estão envolvidos na patogênese de muitas doenças inflamatórias da pele, como verificada na dermatite atópica e psoríase (GABOR, 2000). Quando aplicado topicamente, o AA é metabolizado em vários mediadores como prostaglandinas e leucotrienos, que promovem a formação do edema, consequência do processo inflamatório instalado (HUMES, OPAS, BONNEY, 1986). Assim, substâncias que inibem o metabolismo do AA são identificadas neste modelo.

A atividade anti-inflamatória tópica dos extratos EHEX, EAE e EE foi avaliada pelo método do edema de orelha induzido por AA descrito por Gábor (2003). O AA (2 mg/orelha solubilizado em 20 μ L de acetona) foi administrado topicamente, na parte interna da orelha direita de cada camundongo. Em seguida, foram aplicados topicamente os extratos (0,1 mg, 0,5 mg e 1,0 mg em 20 μ L de acetona/orelha). O controle positivo foi a indometacina (2 mg/orelha) também dissolvidos em 20 μ L de acetona e a acetona como controle negativo (veículo). Após 1 hora do desafio com o agente flogístico, os animais foram anestesiados e

eutanasiados por deslocamento cervical e o edema avaliado quanto ao aumento da massa (mg) da orelha dos camundongos, conforme descrito no item 4.10 (CRUMMEY et al., 1987; YOUNG et al., 1984).

4.11 ANÁLISE HISTOLÓGICA

As amostras dos tecidos das orelhas (discos de 6 mm) foram coletadas dos camundongos submetidos ao modelo de edema de orelha induzido pelo óleo de cróton. Os tecidos foram conservados em solução de formol 10%. Para o preparo das lâminas histológicas, as amostras foram fixadas em solução ALFAC (85 mL de álcool 80%, 10 mL de formol 40% e 5 mL de ácido acético glacial) em um período de 16 horas, e em seguida conservadas em álcool 70% até início do processo de desidratação. Os materiais histológicos foram posteriormente desidratados, emblocados em parafina, seccionados em cortes de 5 μ m em um micrótomo e corados com hematoxilina e eosina. O edema (espessura do corte histológico), infiltração de leucócitos, vasodilatação e espessura da epiderme e derme foram avaliadas em áreas representativas com aumento de 10x e 20x. Nesses mesmos aumentos, foram realizadas fotografias dos cortes histológicos utilizando microscópio (Olympus BX41) acoplado a câmera fotográfica digital utilizando o *software* Image Pro-Plus 4.5 (Media Cybernetics).

4.12. ANÁLISES ESTATÍSTICAS

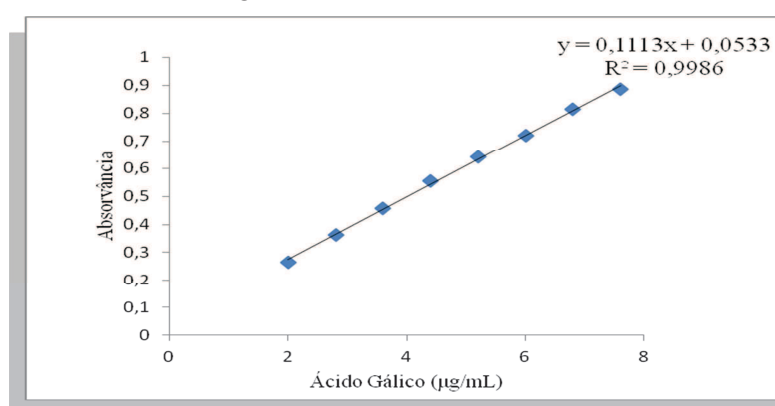
Os resultados foram apresentados como média \pm erro padrão da média (EPM). Análise de variância (ANOVA), seguida do teste de Student Newman-Keuls ou Tukey, foi utilizada para medir o grau de significância para $p < 0,05$. Os cálculos foram realizados utilizando os *softwares* estatísticos GraphPad Prism e o Sigma-Plot.

5. RESULTADOS

5.1 TEORES DE FENÓIS TOTAIS E FLAVONOIDES

Para expressar os resultados obtidos na quantificação dos derivados fenólicos do EHEX, EAE e EE em equivalente em ácido gálico (g EAG/100g amostra) foi construída uma curva de calibração do ácido gálico em 783 nm (Figura 18). A equação da reta utilizada foi $y = 0,1113x + 0,0533$, onde os valores das absorvâncias das amostras foram adicionados em y para obtenção da concentração inicial (x).

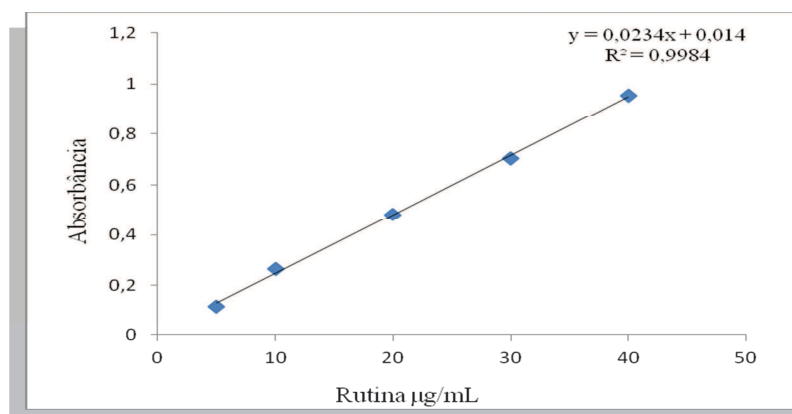
Figura 18: Curva de calibração do ácido gálico.



Fonte: Os Autores (2013).

O comprimento de onda em 407 nm foi utilizado para obtenção da reta de calibração e determinação dos flavonoides totais (Figura 19). A equação da reta utilizada foi $y = 0,0234x + 0,014$, onde os valores das absorvâncias das amostras foram adicionados em y para obtenção da concentração inicial (x).

Figura 19: Curva de calibração da rutina.



Fonte: Os Autores (2013).

Na Tabela 3 estão representados os teores de fenóis e flavonoides totais equivalentes ao ácido gálico e à rutina, respectivamente. Os teores de fenóis totais variaram de 0,53 a 22,93 g/100g. Os extratos apresentaram teores de flavonoides totais entre 0,18 a 8,23 g/100g. É observado também que o extrato EE apresentou maior quantidade de fenóis totais e flavonoides.

Tabela 4: Teores de fenóis e flavonoides totais no extrato hexânico, em acetato de etila e etanólico das folhas de *V. polyanthes*.

Extrato	Teor (g/100 g)	
	Fenóis totais	Flavonoides totais
Extrato hexânico	0,53 ± 0,02	0,18 ± 0,005
Extrato em acetato de etila	18,16 ± 0,05	6,94 ± 0,01
Extrato etanólico	22,93 ± 0,04	8,23 ± 0,01

Os valores correspondem à média ± E.P.M. As médias são diferentes entre si após aplicação da ANOVA seguida de teste de Tukey para $p < 0,001$.

Fonte: Os Autores (2003).

5.2 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

5.2.1 ENSAIO DO RADICAL 1,1-DIFENIL-2-PICRILIDRAZILA (DPPH)

A atividade antioxidante dos extratos EHEX, EAE e EE frente ao radical DPPH, demonstrada pela concentração efetiva 50% (CE₅₀), encontra-se apresentada na Tabela 5. Pela análise desta Tabela observa-se que o EHEX, com CE₅₀ acima de 1000 µg/mL, não demonstrou atividade antioxidante nas concentrações testadas. Os valores de CE₅₀ dos extratos EAE e EE foram 2,29 ± 0,07 e 3,12 ± 0,01 µg/mL, respectivamente, sendo cerca de três a quatro vezes mais ativos que a rutina, controle positivo, com CE₅₀ igual a 9,15 ± 0,01 µg/mL. A Figura 20 apresenta os valores da porcentagem de inibição do DPPH dos extratos EHEX, EAE e EE nas diferentes concentrações investigadas. É observado que, a partir da concentração de 25 µg/mL, o extrato etanólico foi capaz de inibir o DPPH cerca de 70%, demonstrando possuir um potente efeito antioxidante. Quanto maior o consumo de DPPH pela amostra, menor será a sua CE₅₀ e maior a sua atividade antioxidante.

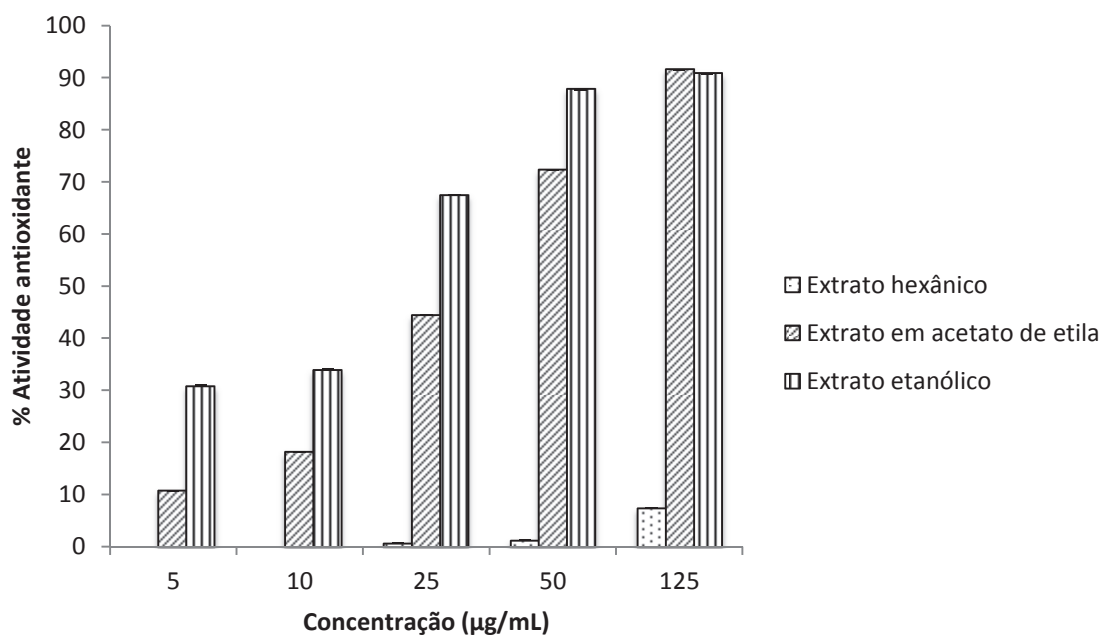
Tabela 5: Atividade antioxidante do extrato hexânico, em acetato de etila e etanólico das folhas de *V. polyanthes* pelo teste de DPPH.

Extrato	CE ₅₀ (µg/mL)
Extrato hexânico	> 1000
Extrato em acetato de etila	3,12 ± 0,01
Extrato etanólico	2,29 ± 0,07
Rutina	9,15 ± 0,01

Os valores correspondem à média ± E.P.M. As médias são diferentes entre si após aplicação da ANOVA seguida de teste de Tukey para $p < 0,001$.

Fonte: Os Autores (2013).

Figura 20: Atividade antioxidante dos extratos hexânico, em acetato de etila e etanólico das folhas de *V. polyanthes* em diferentes concentrações pelo método do DPPH.



Os valores correspondem à média ± E.P.M. As médias são diferentes entre si após aplicação da ANOVA seguida de teste de Tukey para $p < 0,001$.

Fonte: Os Autores (2013).

5.2.2 AVALIAÇÃO PELO MÉTODO PODER DE REDUÇÃO DO FERRO

Na Tabela 6 é mostrada a atividade antioxidante dos extratos pelo teste de poder de redução do ferro. A concentração efetiva 50% (CE₅₀) variou de 31,20 ± 0,01 a 499,96 ± 1,15 µg/mL. É observado que o extrato EE foi o mais efetivo na capacidade de redução do Fe⁺³. Este extrato foi tão potente quanto a rutina (controle positivo).

Tabela 6: Atividade antioxidante do extrato hexânico, em acetato de etila e etanólico das folhas de *V. polyanthes* pelo método de Poder de Redução do Ferro.

Extrato	CE ₅₀ (µg/mL)
Extrato hexânico	499,96 ± 1,15
Extrato em acetato de etila	45,39 ± 0,01 ^a
Extrato etanólico	31,20 ± 0,01
Rutina	44,38 ± 0,02 ^a

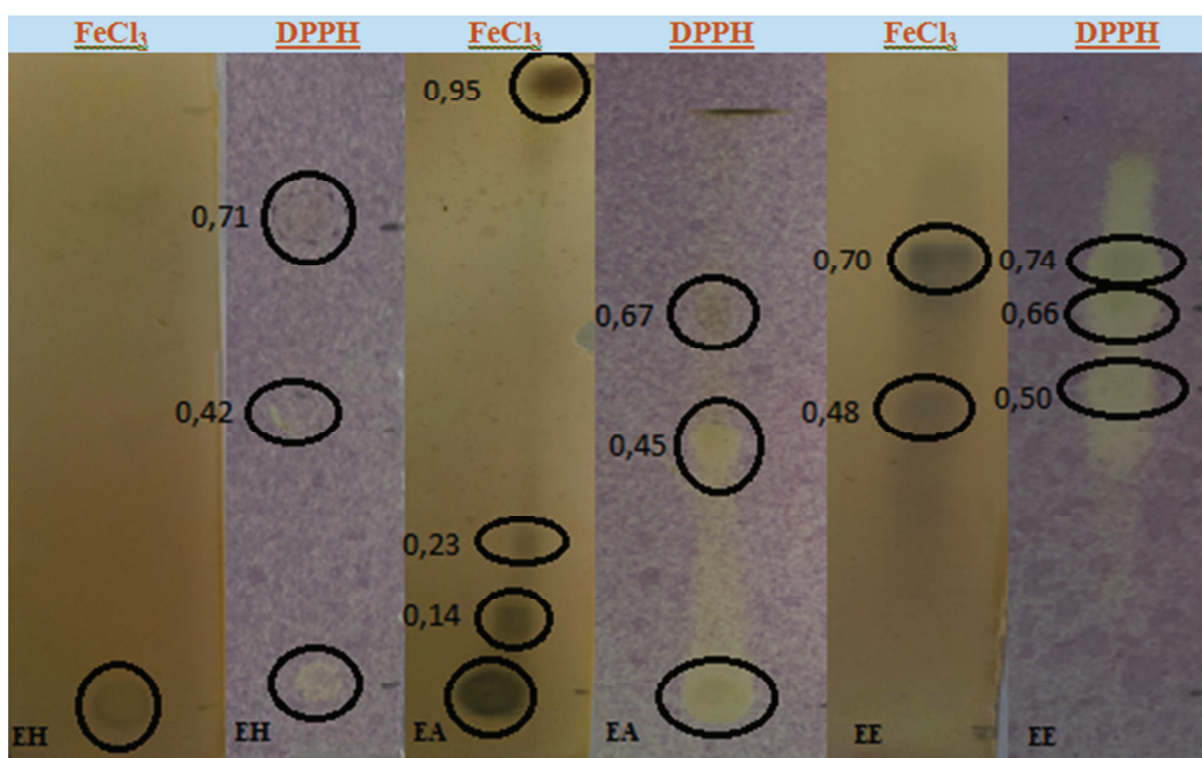
Os valores correspondem à média ± E.P.M. Letras iguais na mesma coluna associam resultados amostras/controles cujas médias não foram diferentes entre si após análise de variância seguida do teste de Tukey para $p < 0,05$.

Fonte: Os Autores (2013).

5.2.3 AVALIAÇÃO PELO MÉTODO DE BIOAUTOGRAFIA

Na Figura 21, são mostradas placas de cromatografia em camada delgada, contendo as amostras dos extratos, reveladas com cloreto férrico e DPPH. As bandas escuras circuladas, reveladas pelo cloreto férrico, são indicativas de constituintes fenólicos, enquanto as bandas amareladas, reveladas com DPPH, são sugestivas de substâncias antioxidantes pertencentes aos constituintes fenólicos. Os extratos EAE e EE evidenciaram quantidades mais expressivas de constituintes fenólicos e substâncias antioxidantes como pode ser observado.

Figura 21: Bioautografia dos extratos hexânico, em acetato de etila e etanólico das folhas de *V. polyanthes* em cromatografia em camada delgada revelada com cloreto férrico e DPPH.

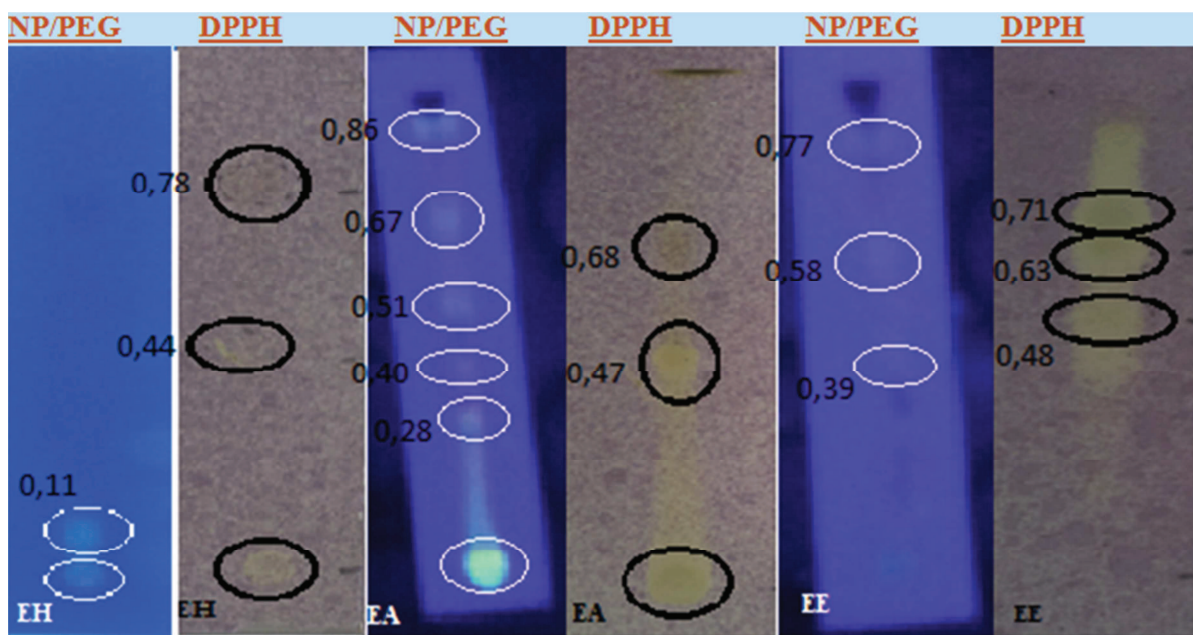


EH: extrato hexânico, EA: extrato em acetato de etila e EE: extrato etanólico.

Fonte: Os Autores (2013).

As amostras também foram reveladas com NP/PEG frente à luz UV 365 nm com bandas nas cores amarela e laranja indicativas da presença de flavonoides. A presença de flavonoides foi mais expressiva no extrato EAE e no EE conforme observado na Figura 22. As bandas reveladas com NP/PEG correspondem às bandas reveladas com DPPH, sugerindo atividade antioxidante dos constituintes das amostras analisadas.

Figura 22: Bioautografia do extrato hexânico, acetato de etila e etanólico das folhas de *V. polyanthes* em cromatografia em camada delgada revelada com NP/PEG e DPPH.

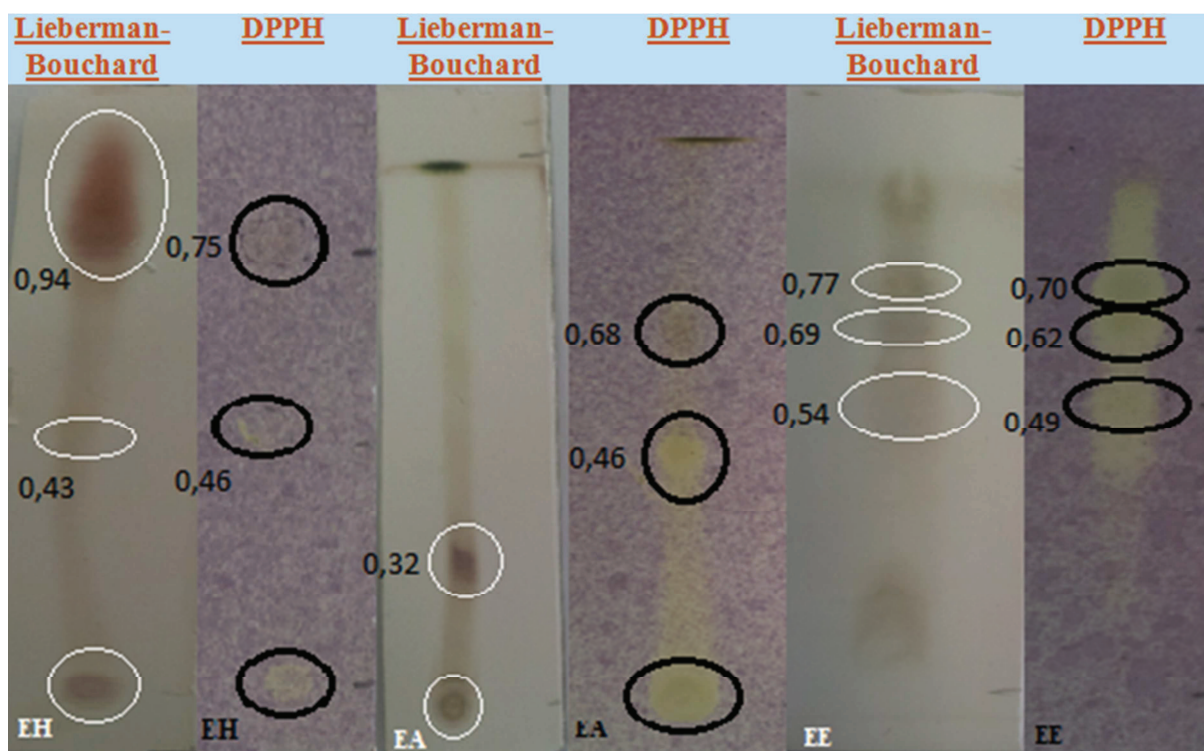


EH: extrato hexânico, EA: extrato em acetato de etila e EE: extrato etanólico.

Fonte: Os Autores (2013).

Na Figura 23 são mostradas a bioautografia dos extratos EHEX, EAE e EE com reagente de Lieberman-Bouchard e DPPH. O reagente Lieberman-Bouchard indica a presença de terpenoides e esteroides com bandas violeta e castanho-esverdeada. No extrato EHEX é observado que os constituintes terpenoídicos e esteroidícos ficaram retidos no final da placa, entretanto, produzindo baixa atividade antioxidante após revelação com DPPH. Os extratos EAE e EE revelaram a presença de terpenoides e esteroides com pequena intensidade.

Figura 23: Bioautografia do extrato hexânico, em acetato de etila e etanólico das folhas de *V. polyanthes* em cromatografia em camada delgada revelada com Lieberman-Bouchard e DPPH.



EH: extrato hexânico, EA: extrato em acetato de etila e EE: extrato etanólico.

Fonte: Os Autores (2013).

5.2.4 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE PELO MÉTODO DE COOXIDAÇÃO DO B-CAROTENO/ÁCIDO LINOLEICO

A ação antioxidante dos extratos EHEX, EAE e EE pelo sistema β -caroteno/ácido linoleico variaram de 19,69 a 22,68%, como mostrado na Tabela 7. Este método avalia o poder de inibição que um antioxidante exerce sobre os radicais formados durante a peroxidação do ácido linoleico. A atividade antioxidante por este método é muito útil especialmente na investigação de antioxidantes lipofílicos (DUARTE-ALMEIDA et al., 2006).

Tabela 7: Atividade antioxidante dos extratos de *V. polyanthes* pelo método de cooxidação do β -caroteno/ácido linoleico.

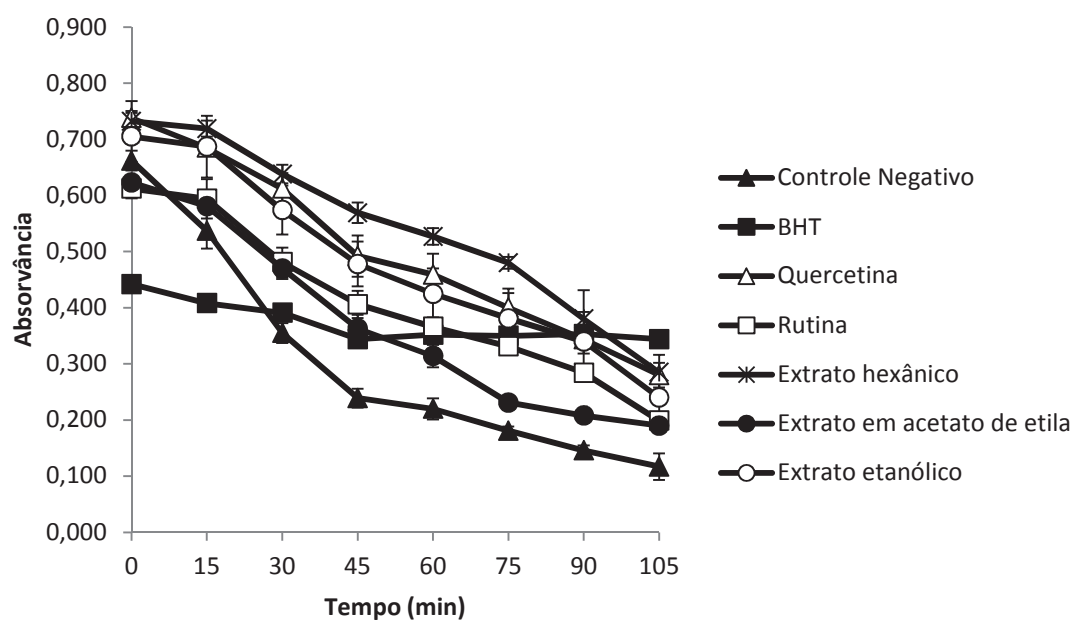
Extrato/Controle	% Inibição da peroxidação lipídica
Extrato hexânico	19,69 \pm 2,25 ^a
Extrato em acetato de etila	20,52 \pm 0,34 ^a
Extrato etanólico	22,68 \pm 4,01 ^a
BHT	61,29 \pm 0,99
Quercetina	24,40 \pm 2,27 ^a
Rutina	17,04 \pm 0,53 ^a

Os valores correspondem à média \pm E.P.M. Letras iguais na mesma coluna associam amostras/controles cujas médias não foram diferentes entre si após análise de variância seguida do teste de Tukey para $p < 0,05$.

Fonte: Os Autores (2013).

Na Figura 24, são mostradas as leituras obtidas das absorbâncias nos tempos t_0 , t_{15} , t_{30} , t_{45} , t_{60} , t_{75} , t_{90} e t_{105} dos extratos e dos controles (BHT, rutina e quercetina). É observado o decaimento das absorbâncias em função do tempo em decorrência da oxidação do β -caroteno. Quanto menor o decaimento, maior a inibição da peroxidação lipídica e conseqüentemente da oxidação do β -caroteno. Os extratos apresentaram menor variação no decaimento, demonstrando maior inibição da peroxidação lipídica. Entre os controles positivos testados, o BHT foi mais ativo, produzindo um menor decaimento das absorbâncias.

Figura 24: Decaimento da absorvância em função do tempo para os extratos das folhas de *V. polyanthes* pelo método da cooxidação do β -caroteno/ácido linoleico.



Os valores correspondem à média \pm E.P.M. As médias diferem em relação ao controle negativo após análise de variância seguida do teste de Tukey para $p < 0,05$.

Fonte: Os Autores (2013).

5.3 ATIVIDADE ANTIBACTERIANA

5.3.1 MÉTODO DE DIFUSÃO

A Tabela 8 apresenta os resultados preliminares da atividade antibacteriana obtida por meio do método de difusão em ágar. Pela análise desta Tabela, observa-se que os extratos EAE e EE foram ativos frente a *S. aureus* ATCC 25923. Considerando-se as cepas *E. coli* ATCC 10536, *S. typhimurium* ATCC 13311 e *P. aeruginosa* ATCC 27853, os extratos mostraram-se inativos.

Tabela 8: Atividade antibacteriana dos extratos das folhas de *Vernonia polyanthes* pelo método de difusão em ágar.

Amostra testada	Diâmetro de inibição do crescimento (mm)			
	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>S. typhimurium</i>
	ATCC 25923	ATCC 10536	ATCC 27853	ATCC 13311
Extrato hexânico	-	-	-	-
Extrato em acetato de etila	16	-	-	-
Extrato etanólico	10	-	-	-
Cloranfenicol	23	27	-*	31
Ampicilina	36	26	-*	34
DMSO	-	-	-	-

Os valores correspondem à média dos halos e a concentração da solução estoque dos extratos utilizada foi de 500mg/mL. *: Resultado de acordo com CLSI para esta amostra de referência bacteriana - Controle de qualidade negativo

Fonte: Os Autores (2013).

5.3.2 CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA

Os dados obtidos da Concentração Inibitória Mínima (CIM) estão apresentados na Tabela 9. Os extratos EHEX, EAE e EE revelaram valores de CIM que variaram de 1,25 a 2,5 mg/mL. Nas concentrações testadas, todos os três extratos inibiram o crescimento das bactérias avaliadas.

Tabela 9: Atividade antibacteriana dos extratos das folhas de *V. polyanthes* pelo método da Concentração Inibitória Mínima.

Amostra testada	Concentração Inibitória Mínima			
	<i>S. aureus</i> ATCC 25923	<i>E. coli</i> ATCC 10536	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	<i>S. typhimurium</i> ATCC 13311
Extrato hexânico	1,25	1,25	1,25	1,25
Extrato em acetato de etila	2,5	2,5	1,25	2,5
Extrato etanólico	2,5	1,25	1,25	1,25
Cloranfenicol*	0,062	0,015	0,015	0,001

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

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

*Resultados validados por Temponi (2012), Silva (2012) e foram também obtidos no presente estudo.

Fonte: Os Autores (2013).

5.3.3 CONCENTRAÇÃO BACTERICIDA MÍNIMA

A partir dos resultados da CIM, foi avaliada a Concentração Bactericida Mínima (CBM) dos extratos EHEX, EAE e EE sendo descrita como atividades bactericida e/ou bacteriostática (Tabela 10). Considerando os dados da Tabela 10, o EHEX apresentou atividade bactericida frente a *P. aeruginosa* ATCC 27853, produzindo CBM igual a 2,5 mg/mL, enquanto a atividade bacteriostática foi observada para todas as outras cepas bacterianas testadas com CBM de 1,25 mg/mL. Os valores de CBM variaram de 1,25 a 5,00 mg/mL para o extrato EAE que apresentou atividade bactericida contra *S. aureus* ATCC 25923, *E.coli* ATCC 10536 e *S. typhimurium* ATCC 13311. A atividade bactericida do extrato EE foi determinada para *E.coli* ATCC 10536 e *P. aeruginosa* ATCC 27853, enquanto a atividade bacteriostática foi revelada para *S. aureus* ATCC 25923, *S. typhimurium* ATCC 13311 e *P. aeruginosa* ATCC 27853 que produziu CBM variando de 1,25 a 2,50 mg/mL.

Tabela 10: Atividades bactericida e bacteriostática dos extratos das folhas de *Vernonia polyanthes* através do método da Concentração Bactericida Mínima.

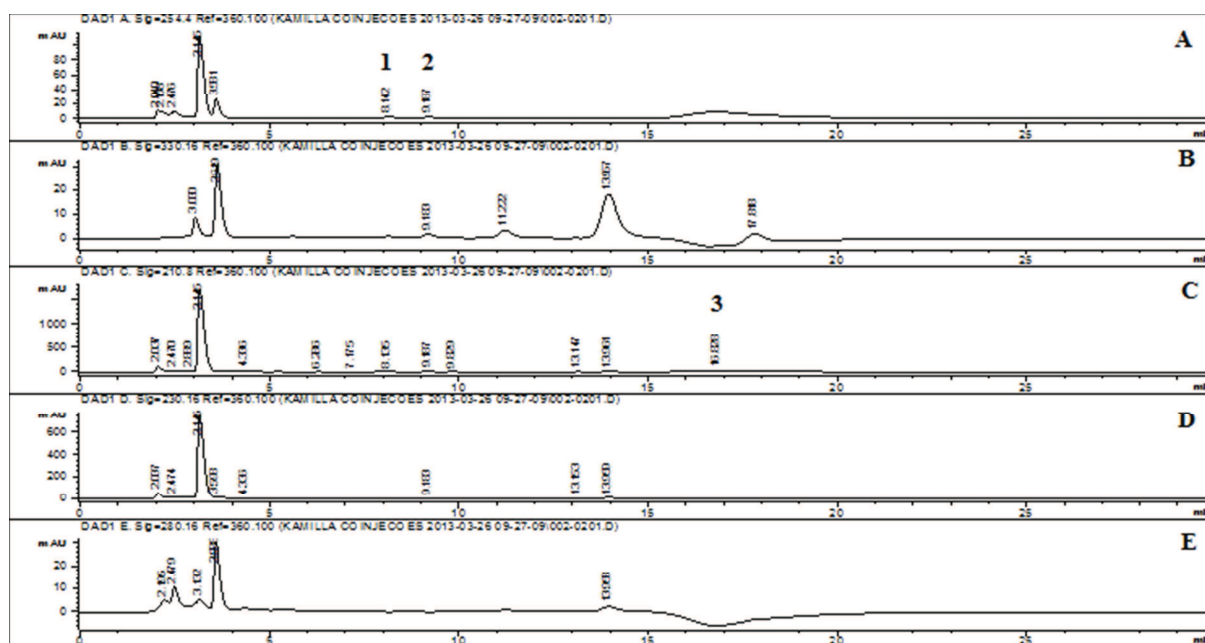
Amostra testada	Cepa Testada	CBM (mg/mL)	Atividade
Extrato hexânico	<i>S. aureus</i>	1,25	Bacteriostático
	<i>P. aeruginosa</i>	1,25	Bacteriostático
		2,5	Bactericida
	<i>S. typhimurium</i>	1,25	Bacteriostático
	<i>E. coli</i>	1,25	Bacteriostático
Extrato em acetato de etila		5,00	Bactericida
	<i>S. aureus</i>	2,50	Bacteriostático
	<i>P. aeruginosa</i>	1,25	Bacteriostático
		2,50	Bactericida
	<i>S. typhimurium</i>	2,50	Bactericida
	<i>E. coli</i>	2,50	Bacteriostático
		5,00	Bactericida
Extrato etanólico	<i>S. aureus</i>	2,50	Bacteriostático
	<i>P. aeruginosa</i>	1,25	Bacteriostático
		2,50	Bactericida
	<i>S. typhimurium</i>	1,25	Bacteriostático
	<i>E. coli</i>	1,25	Bactericida

Fonte: Os Autores (2013).

5.4 ANÁLISES EM CLAE

A Figura 25 mostra os cromatogramas em CLAE do extrato EHEX nos comprimentos de onda de 254 nm (A), 330 nm (B), 210 nm (C), 230 nm (D) e 280 nm (E). O sinal 1 em 254 nm é a luteolina, identificada com base na comparação de injeção de padrão, com semelhantes tempo de retenção ($t_r = 8,86$) e espectro UV (Figura 26). O sinal 2 em 254 nm e o sinal 3, em 210 nm pela observação do espectro de UV é sugestivo de ser flavonoides (Figura 26).

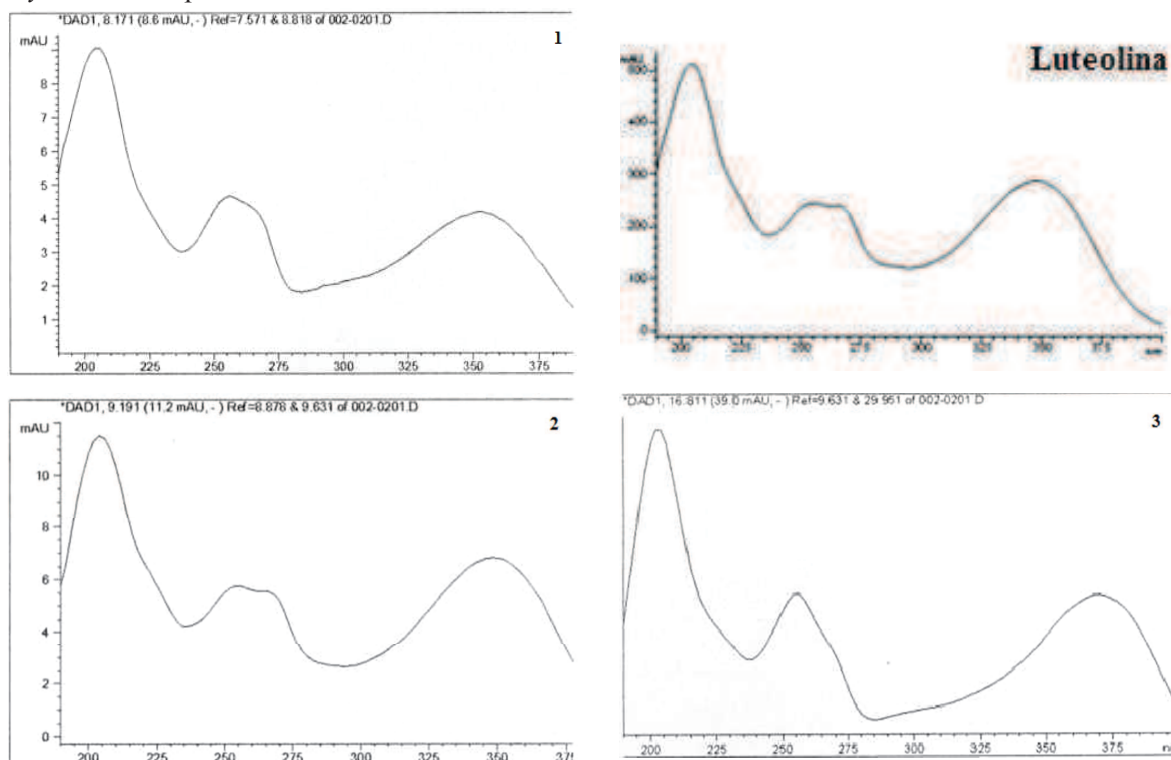
Figura 25: Perfil cromatográfico do extrato hexânico das folhas de *V. polyanthes*.



Perfil cromatográfico em coluna de fase reversa C_{18} (25 cm x 4,6 cm x 5 μ m); eluição em modo isocrático, fluxo de 0,6 mL/min, de fase móvel composta pela mistura de água:acetonitrila (8:2) acidificada com ácido fosfórico (H_3PO_4) 0,5%; concentração da amostra de 1 mg/mL, volume de injeção de 50 μ L e temperatura da coluna de 25°C.

Fonte: Os Autores (2013).

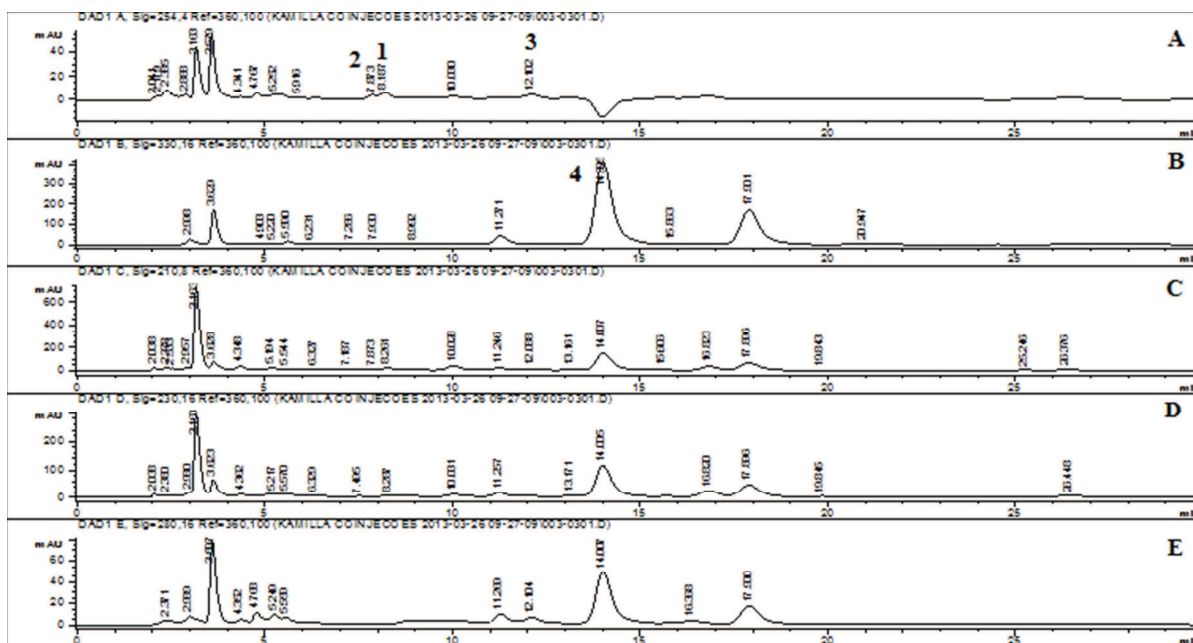
Figura 26: Espectros UV dos sinais 1, 2 e 3 do cromatograma do extrato hexânico das folhas de *V. polyanthes* e do padrão luteolina.



Fonte: Os Autores (2013).

Na Figura 27 estão representados os cromatogramas do extrato EAE nos comprimentos de onda de 254 nm (A), 330 nm (B), 210 nm (C), 230 nm (D) e 280 nm (E). O sinal 1 em 254 nm é a luteolina, identificada com base na comparação de injeção de padrão, com semelhante tempo de retenção ($t_r = 8,86$) e espectro UV (Figura 28) e através da coinjeção do EAE com a luteolina (Figura 29). O sinal 2 em 254 nm, é a rutina, identificada com base na comparação de injeção de padrão, com semelhante tempo de retenção ($t_r = 6,28$) e espectro UV (Figura 28) e através da coinjeção do extrato EAE com o este padrão (figura 30). O sinal 4 em 330 nm, é a apigenina, identificada com base na comparação de injeção de padrão, com semelhante tempo de de retenção ($t_r = 14,72$) e espectro UV (Figura 28) e através da coinjeção do EAE com a apigenina (Figura 31). Os espectros de UV das coinjeção estão demonstrados na Figura 32, respectivamente. O sinal 3 em 254 nm pelo espectro de UV é sugestivo de ser um flavonoide (Figura 28).

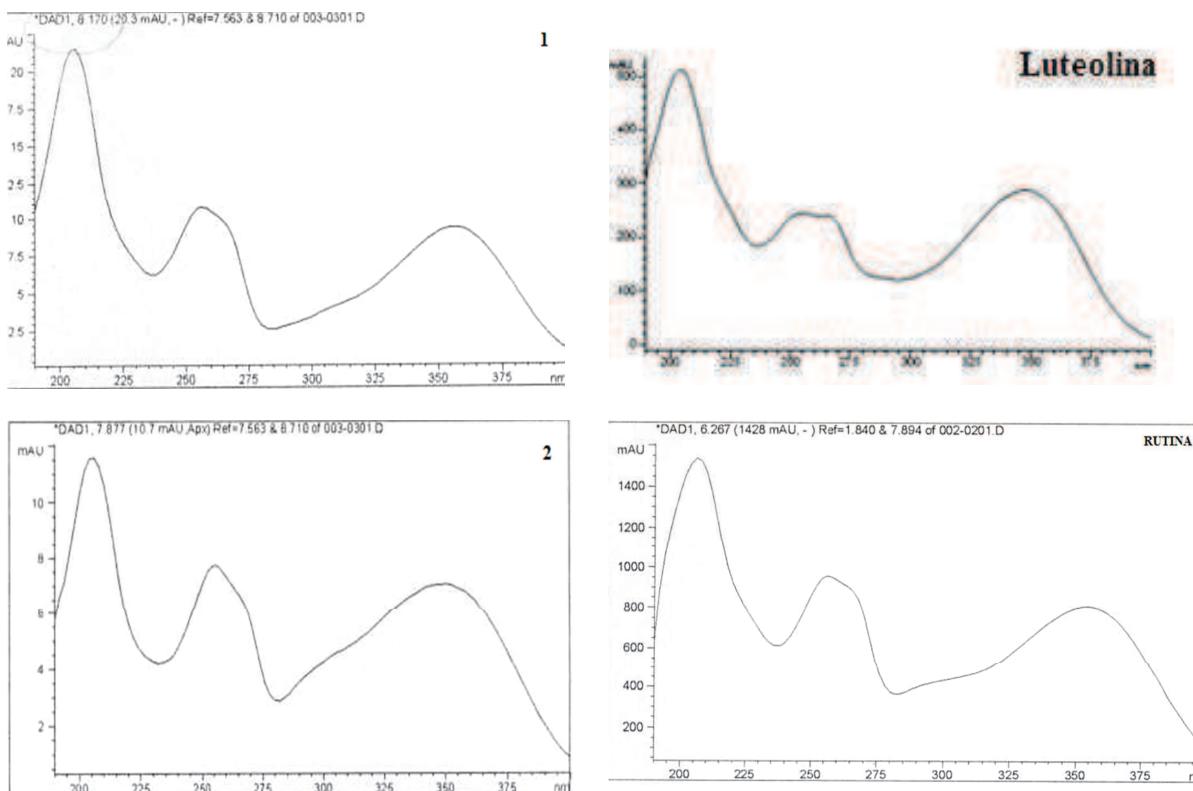
Figura 27: Perfil cromatográfico do extrato em acetato de etila das folhas de *V. polyanthes*.

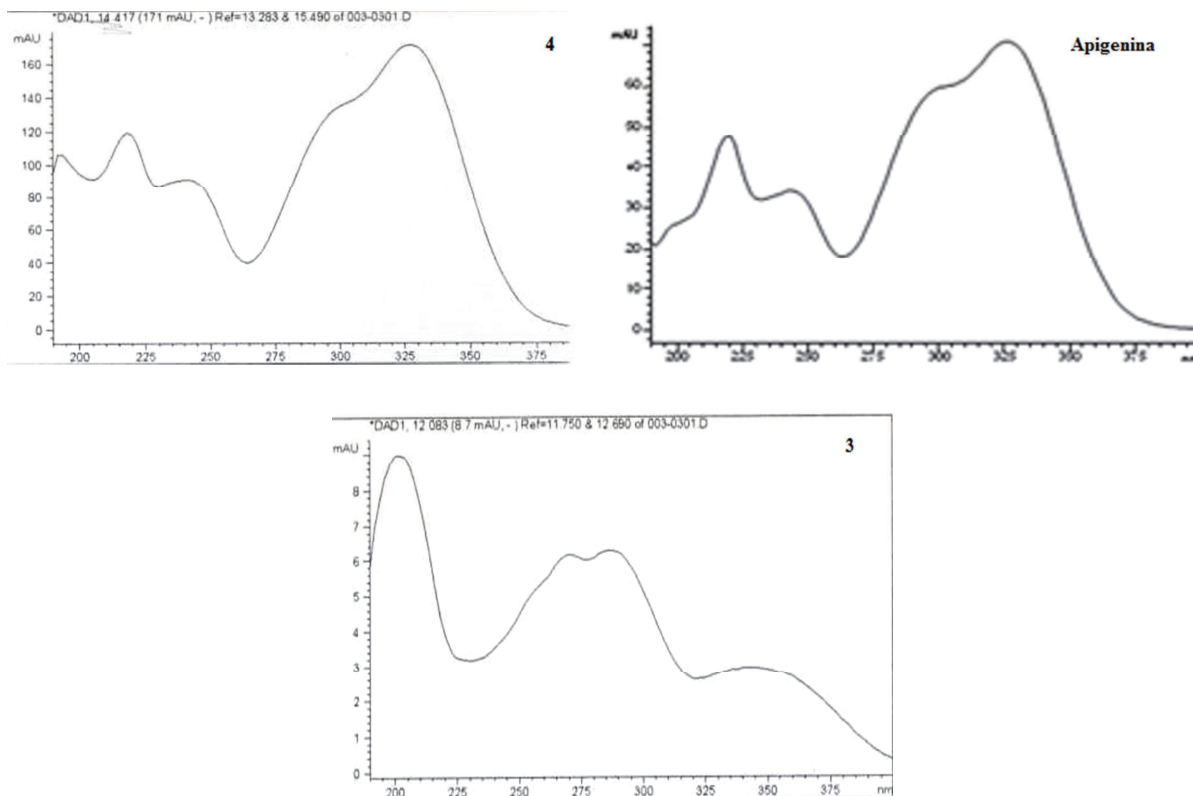


Perfil cromatográfico em coluna de fase reversa C₁₈ (25 cm x 4,6 cm x 5 μm); eluição em modo isocrático, fluxo de 0,6 mL/min, de fase móvel composta pela mistura de água:acetonitrila (8:2) acidificada com ácido fosfórico (H₃PO₄) 0,5%; concentração da amostra de 1 mg/mL, volume de injeção de 50 μL e temperatura da coluna de 25°C.

Fonte: Os Autores (2013).

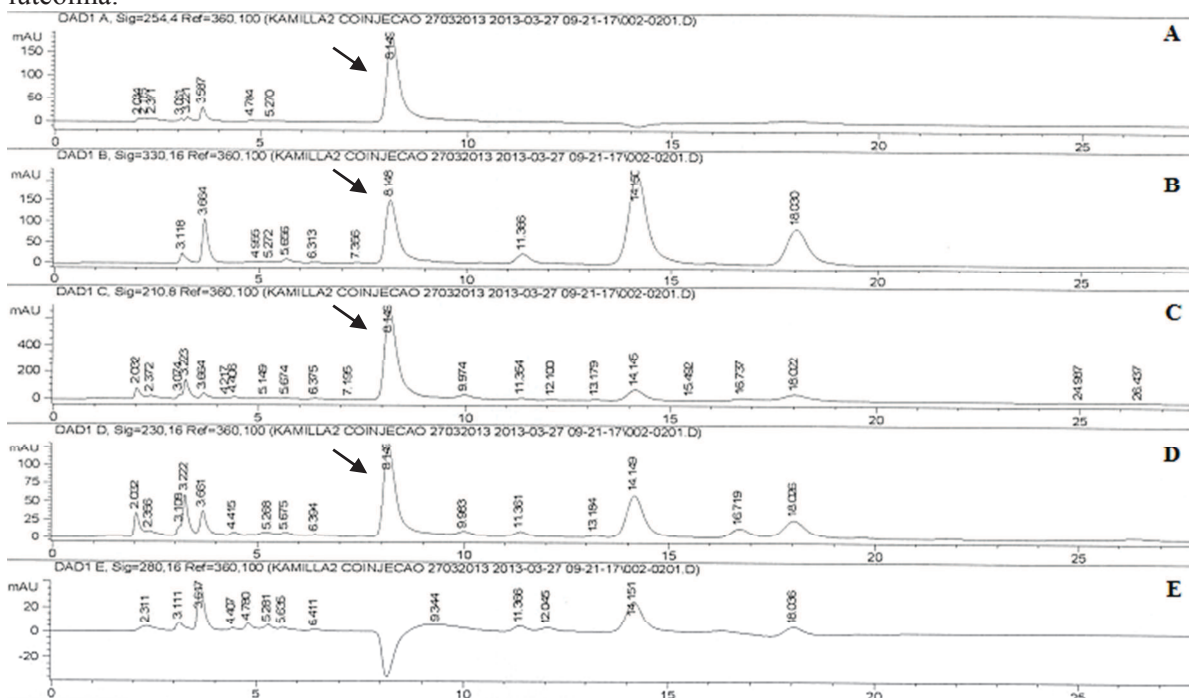
Figura 28: Espectros UV dos sinais 1, 2, 3 e 4 do cromatograma do extrato em acetato de etila das folhas de *V. polyanthes* e dos padrões luteolina, rutina e apigenina.





Fonte: Os Autores (2013).

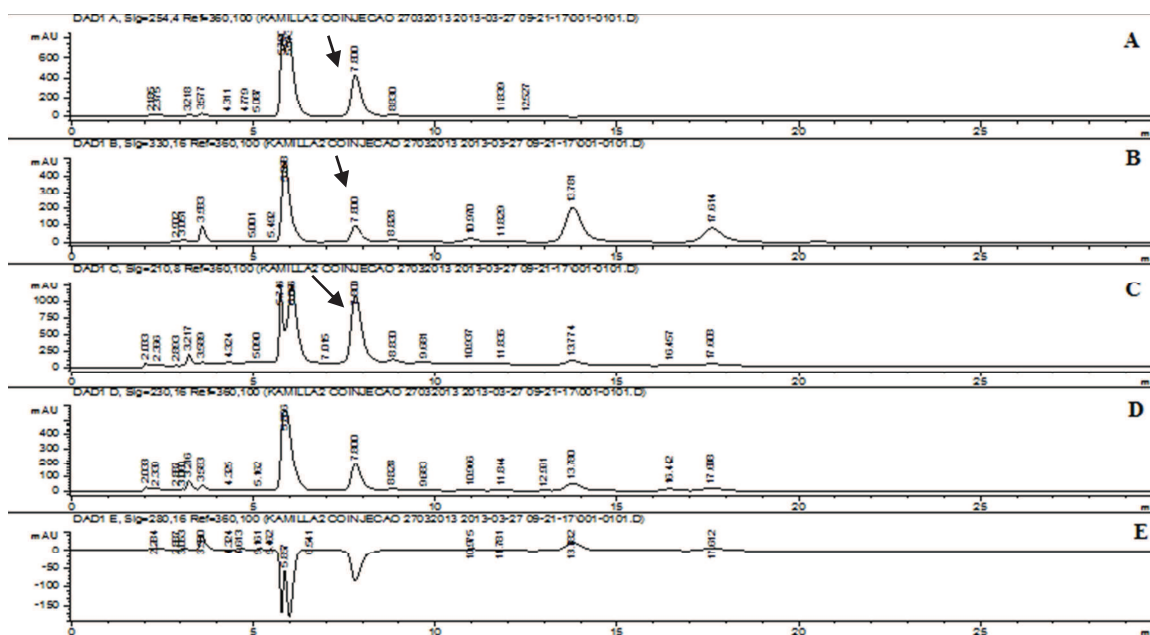
Figura 29: Coinjeção do extrato em acetato de etila das folhas de *V. polyanthes* com o padrão luteolina.



Perfil cromatográfico em coluna de fase reversa C_{18} (25 cm x 4,6 cm x 5 μ m); eluição em modo isocrático, fluxo de 0,6 mL/min, de fase móvel composta pela mistura de água:acetonitrila (8:2) acidificada com ácido fosfórico (H_3PO_4) 0,5%, volume de injeção de 50 μ L e temperatura da coluna de 25°C. A seta mostra um aumento no sinal referente à coinjeção do padrão de luteolina.

Fonte: Os Autores (2013).

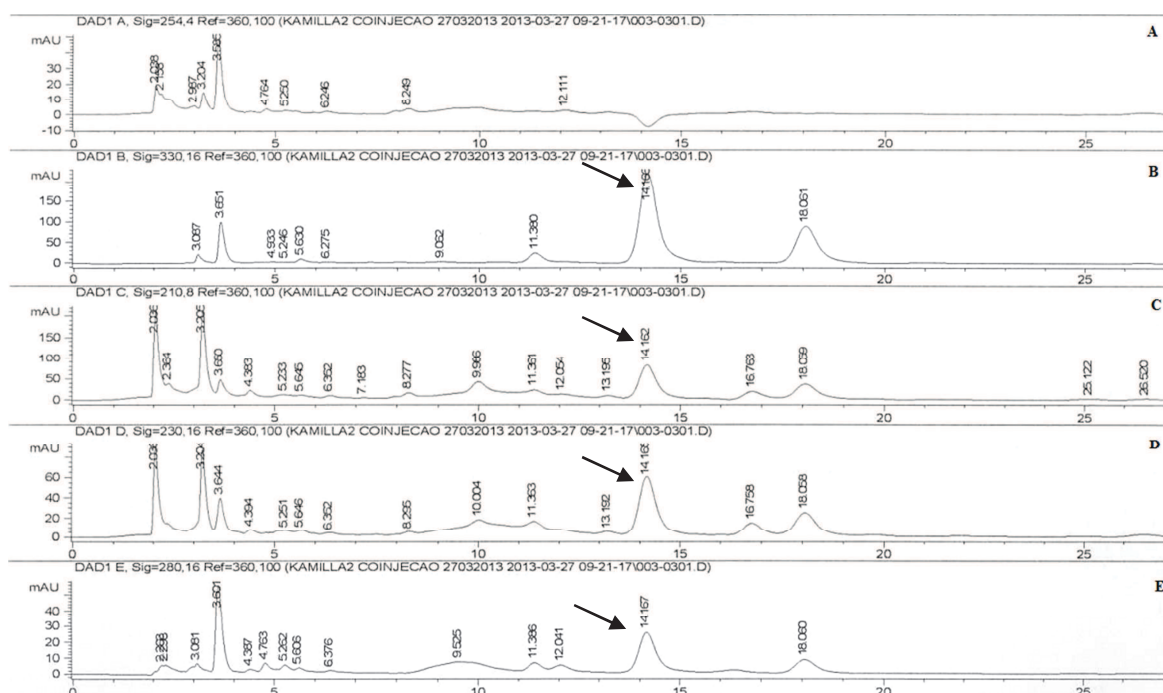
Figura 30: Coinjeção do extrato em acetato de etila das folhas de *V. polyanthes* com o padrão rutina.



Perfil cromatográfico em coluna de fase reversa C_{18} (25 cm x 4,6 cm x 5 μ m); eluição em modo isocrático, fluxo de 0,6 mL/min, de fase móvel composta pela mistura de água:acetonitrila (8:2) acidificada com ácido fosfórico (H_3PO_4) 0,5%, volume de injeção de 50 μ L e temperatura da coluna de 25°C. A seta mostra um aumento no sinal referente à coinjeção do padrão de rutina.

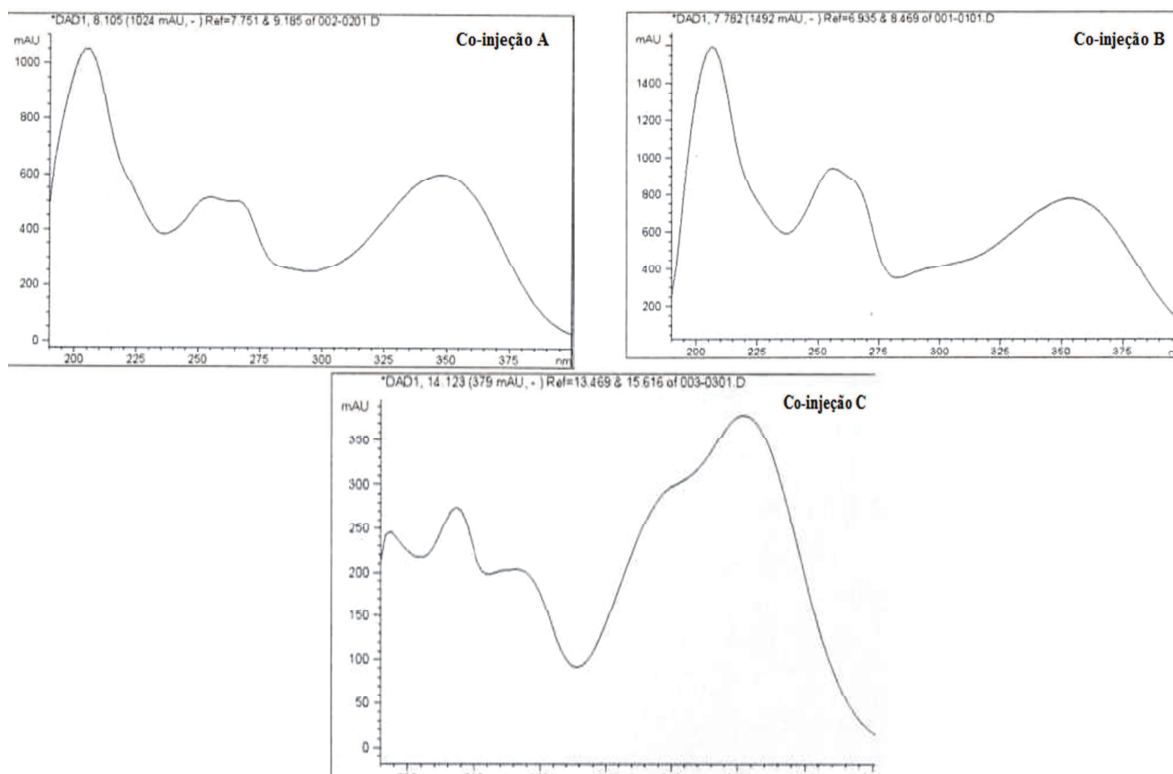
Fonte: Os Autores (2013).

Figura 31: Coinjeção do extrato em acetato de etila das folhas de *V. polyanthes* com o padrão apigenina.



Perfil cromatográfico em coluna de fase reversa C_{18} (25 cm x 4,6 cm x 5 μ m); eluição em modo isocrático, fluxo de 0,6 mL/min, de fase móvel composta pela mistura de água:acetonitrila (8:2) acidificada com ácido fosfórico (H_3PO_4) 0,5%, volume de injeção de 50 μ L e temperatura da coluna de 25°C. A seta mostra um aumento no sinal referente à coinjeção do padrão de apigenina.

Fonte: Os Autores (2013).

Figura 32: Espectro UV das coinjeções.

A: Espectro UV do sinal representado pela seta do extrato em acetato de etila com o padrão luteolina.

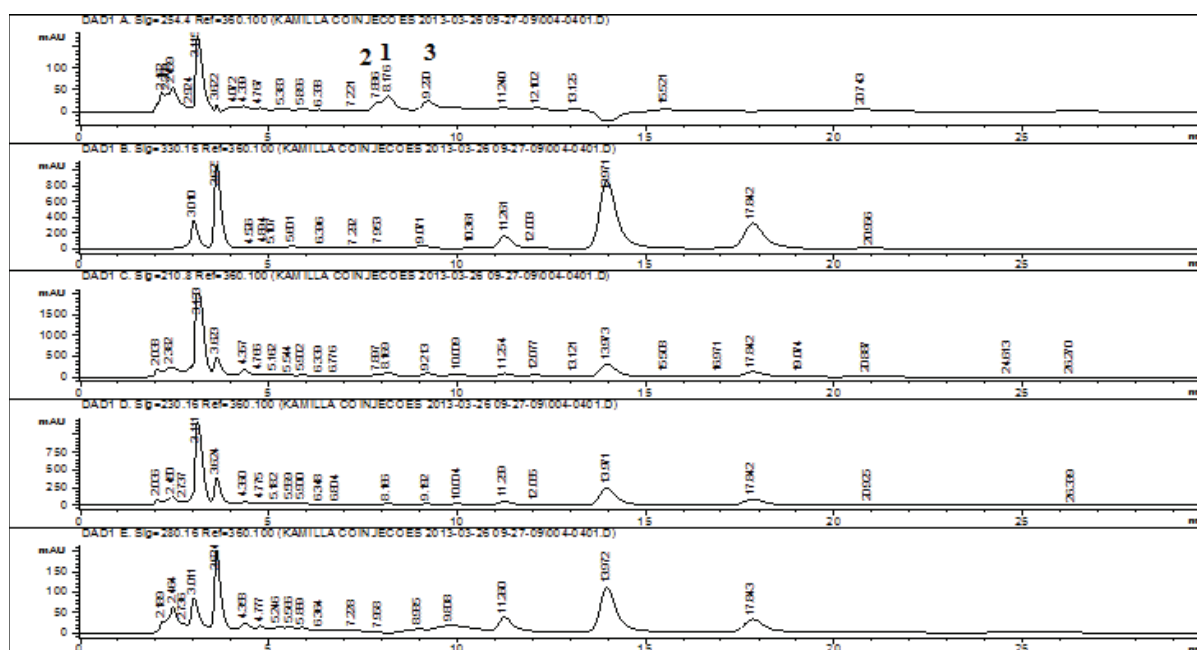
B: Espectro UV do sinal representado pela seta do extrato em acetato de etila com o padrão rutina.

C: espectro UV do sinal representado pela seta do extrato em acetato de etila com o padrão apigenina.

Fonte: Os Autores (2013).

Na Figura 33, estão representados os cromatogramas em CLAE do extrato EE nos comprimentos de onda de 254 nm (A), 330 nm (B), 210 nm (C), 230 nm (D) e 280 nm (E). O sinal 1 em 254 nm é a luteolina, identificada com base na comparação de injeção de padrão, com semelhante tempo de retenção ($t_r = 8,86$) e espectro UV (Figura 34) e através da coinjeção do extrato EE com a luteolina (Figura 35). O sinal 2 em 254nm é a rutina, identificada com base na comparação de injeção de padrão, com semelhatas tempo de retenção ($t_r = 6,28$) e espectro UV (Figura 34) e através da coinjeção do EE com o padrão de rutina (Figura 36). Os espectros das coinjeções estão demonstrados na Figura 37, respectivamente. O sinal 3 em 254 nm pelo espectro de UV é sugestivo de ser um flavonoide (Figura 34).

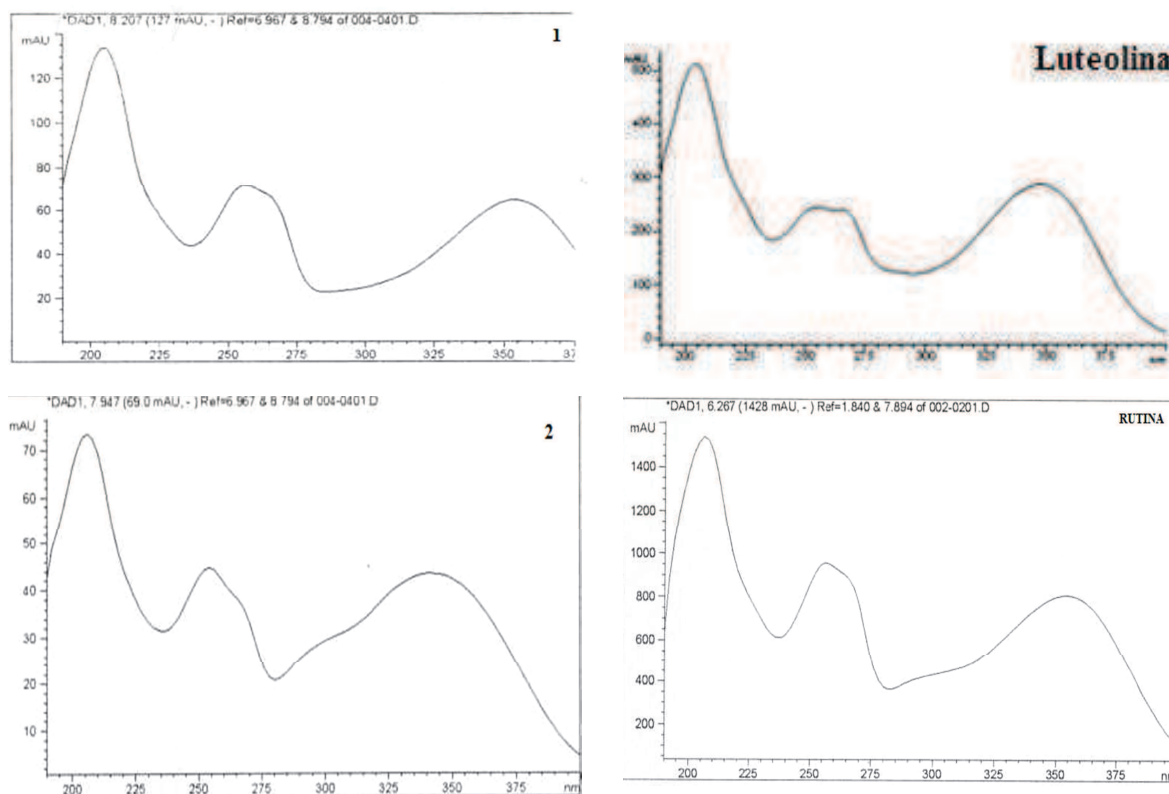
Figura 33: Perfil cromatográfico do extrato etanólico das folhas de *V. polyanthes*.



Perfil cromatográfico em coluna de fase reversa C_{18} (25 cm x 4,6 cm x 5 μ m); eluição em modo isocrático, fluxo de 0,6 mL/min, de fase móvel composta pela mistura de água:acetonitrila (8:2) acidificada com ácido fosfórico (H_3PO_4) 0,5%; concentração da amostra de 1 mg/mL, volume de injeção de 50 μ L e temperatura da coluna de 25°C.

Fonte: Os Autores (2013).

Figura 34: Espectros UV dos sinais 1, 2 e 3 do cromatograma do extrato etanólico das folhas de *V. polyanthes* e dos padrões luteolina e rutina.



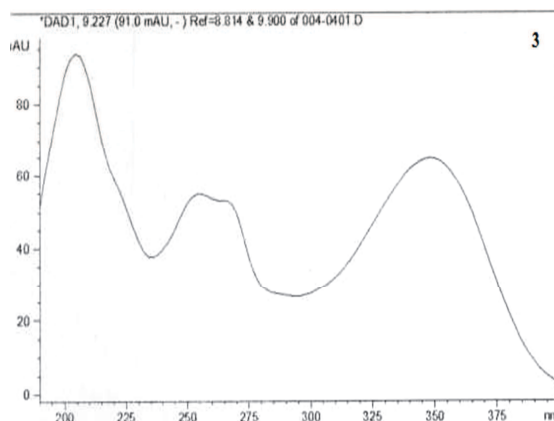
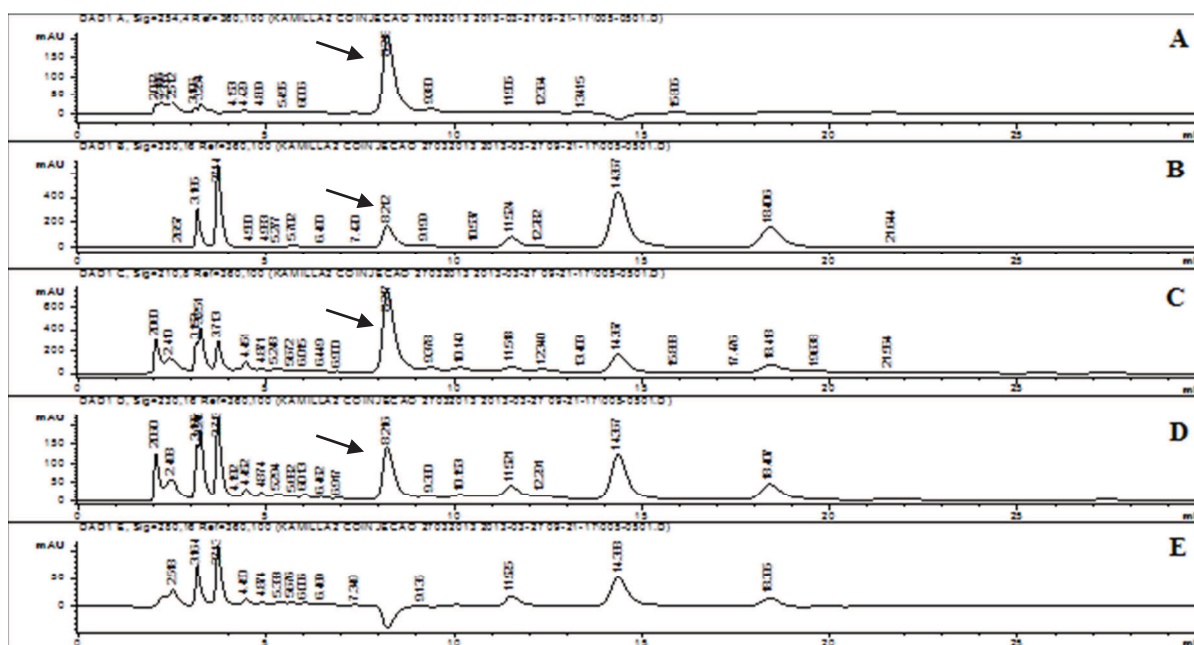


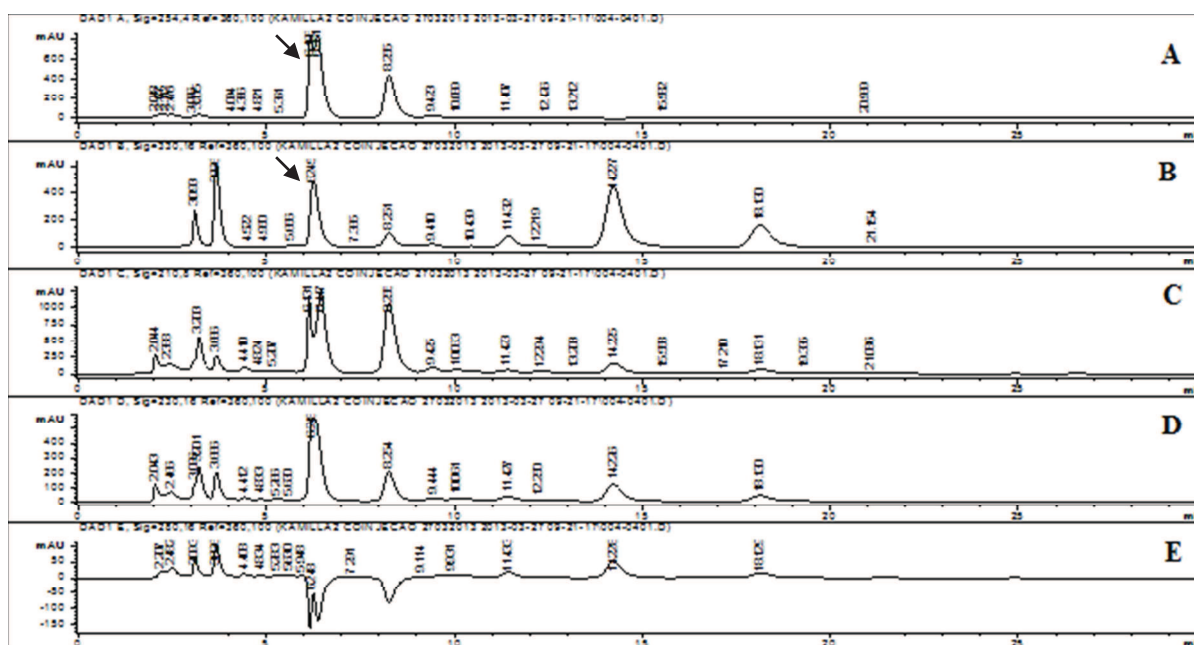
Figura 35: Coinjeção do extrato etanólico das folhas de *V. polyanthes* com o padrão luteolina.



Perfil cromatográfico em coluna de fase reversa C_{18} (25 cm x 4,6 cm x 5 μ m); eluição em modo isocrático, fluxo de 0,6 mL/min, de fase móvel composta pela mistura de água:acetonitrila (8:2) acidificada com ácido fosfórico (H_3PO_4) 0,5%, volume de injeção de 50 μ L e temperatura da coluna de 25°C. A seta mostra um aumento no sinal referente à coinjeção do padrão de luteolina.

Fonte: Os Autores (2013).

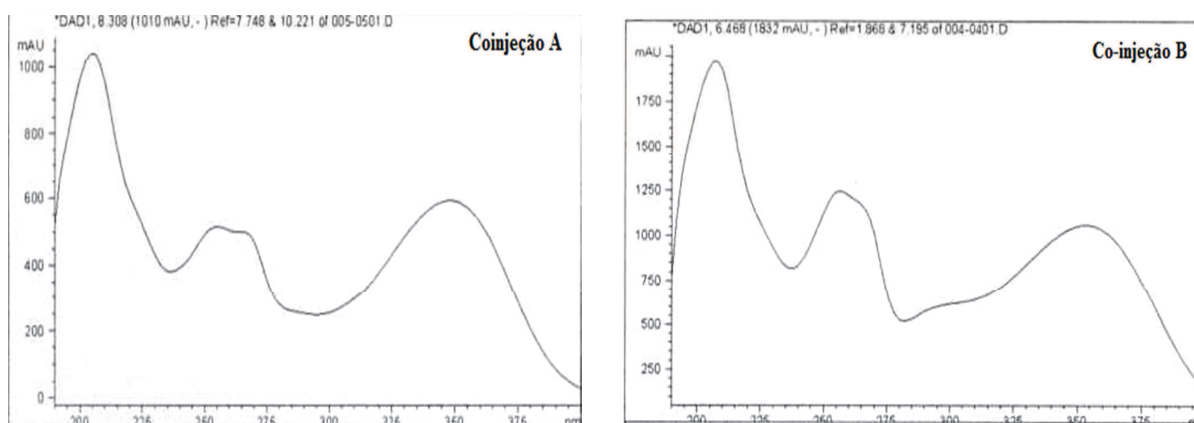
Figura 36: Coinjeção do extrato etanólico das folhas de *V. polyanthes* com o padrão rutina.



Perfil cromatográfico em coluna de fase reversa C_{18} (25 cm x 4,6 cm x 5 μ m); eluição em modo isocrático, fluxo de 0,6 mL/min, de fase móvel composta pela mistura de água:acetonitrila (8:2) acidificada com ácido fosfórico (H_3PO_4) 0,5%, volume de injeção de 50 μ L e temperatura da coluna de 25°C. A seta mostra um aumento no sinal referente à coinjeção do padrão de rutina.

Fonte: Os Autores (2013).

Figura 37: Espectros UV das coinjeções.



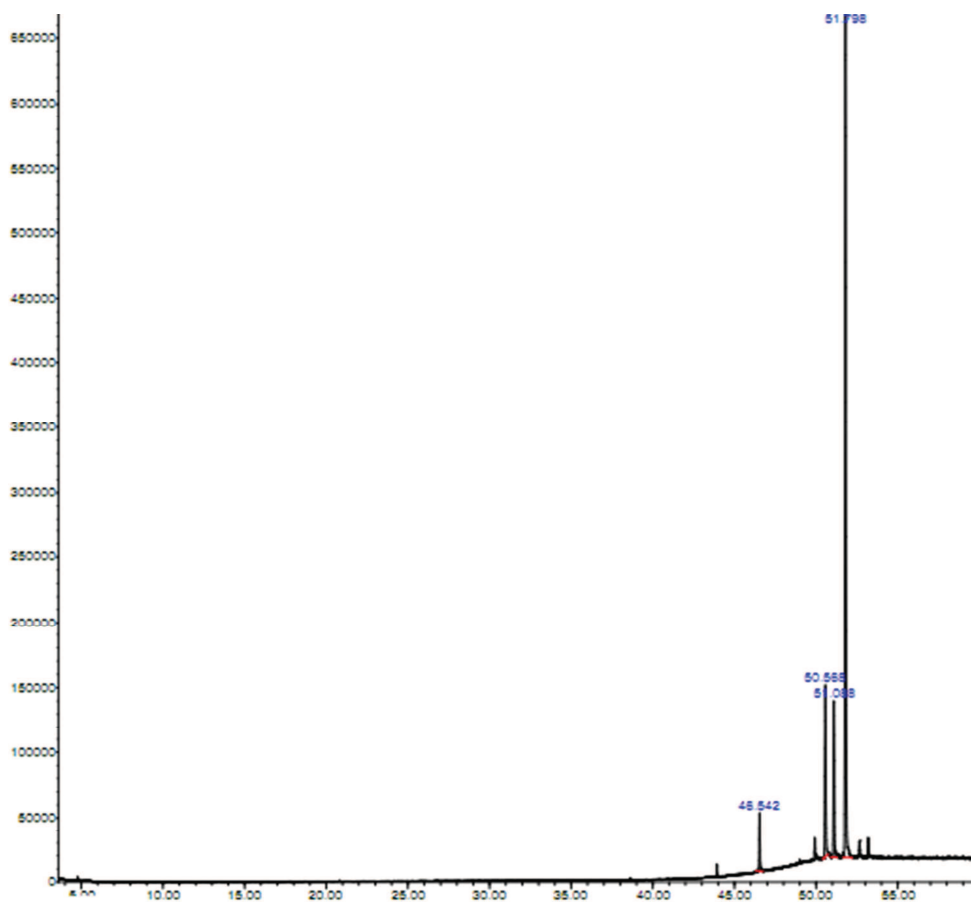
A: Espectro UV do sinal representado pela seta do extrato em acetato de etila com o padrão luteolina.
 B: Espectro UV do sinal representado pela seta do extrato em acetato de etila com o padrão rutina.

Fonte: Os Autores (2013).

5.5 ANÁLISE POR CG/EM

O extrato EHEX foi analisado por CG/EM. O cromatograma obtido mostra três sinais majoritários (96,31% de área do cromatograma) que, pela análise de espectrometria de massas, sugere a presença de três triterpenos, além de hidrocarbonetos minoritários (Figura 38). O sinal em 50,57 minutos, com 14,12% de área do cromatograma, apresenta 426 u.m.a., m/z 408, e sua fragmentação sugere a presença do triterpeno β -amirina (Figura 39). O sinal em 51,09 minutos, com 13,01% de área do cromatograma e o sinal em 51,79 minutos, 69,18% de área do cromatograma, ambos com 468 u.m.a., m/z 453, indicam a presença de dois triterpenos derivados do ácido ursólico (Figura 40 e 41).

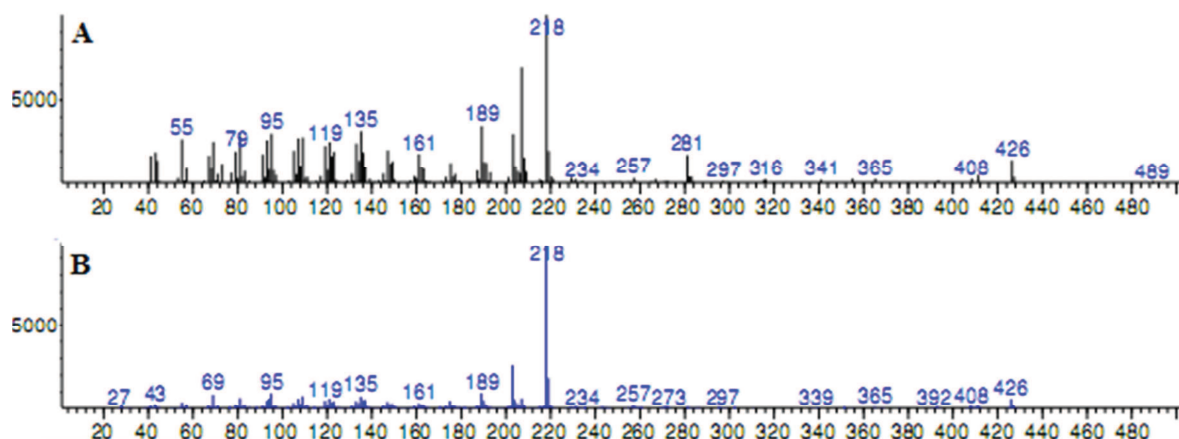
Figura 38: Perfil cromatográfico do extrato hexânico das folhas de *V. polyanthes* obtido por CG/EM.



Cromatógrafo com fase gasosa Hewlett Packard 6890 e MS HP5972, munido de um banco de dados WILEY 7n.1. Coluna capilar do tipo HP5MS com 0,25 μ m de espessura do filme, de 30 m de comprimento e 250 μ m de diâmetro interno. O gás de arraste foi hélio (1 mL/min) e as separações foram realizadas com injetor a 250 °C, detector a 280 °C e a seguinte programação de temperatura: 70 °C aumentando 2 °C por minuto até 290 °C. Os parâmetros da operação de EM foram 70eV, fonte iônica 250 °C, impacto de elétrons.

Fonte: Os Autores (2013).

Figura 39: Fragmentação sugere a presença de β -amirina.

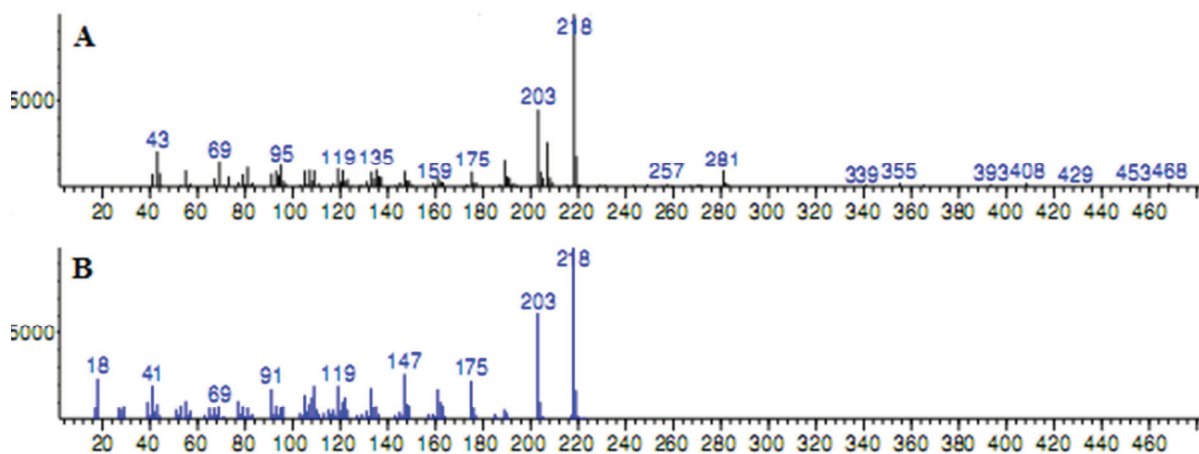


A: Fragmentação da substância com tempo de retenção 50,57 min., do extrato hexânico sugerindo a presença do triterpeno β -amirina.

B: Fragmentação de β -amirina sugerida pelo banco de dados WILEY 7n.1 .

Fonte: Os Autores (2013).

Figura 40: Fragmentação da substância com tempo de retenção 51,09 minutos.

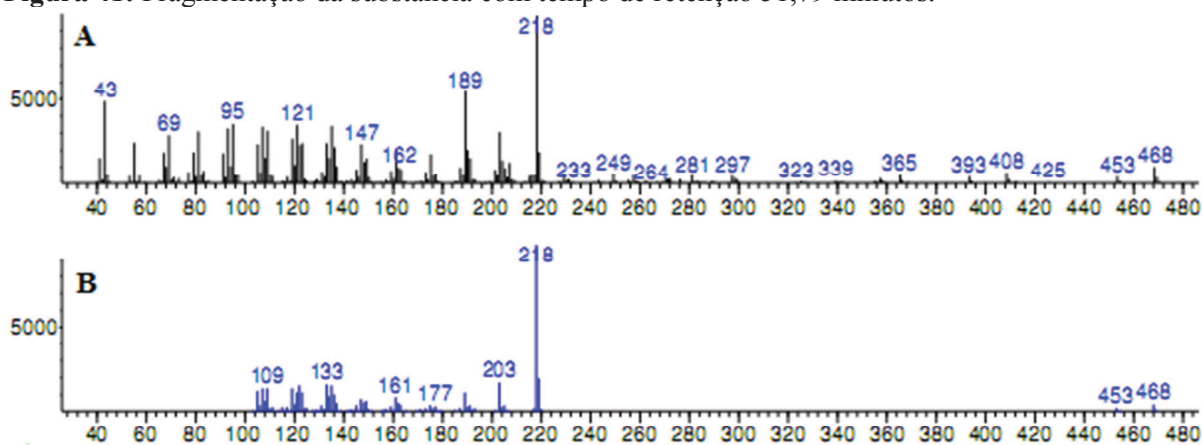


A: Fragmentação da substância com tempo de retenção 51,09 min., do extrato hexânico sugerindo a presença de um triterpeno com esqueleto do tipo ursólico.

B: Fragmentação de triterpeno sugerida pelo banco de dados WILEY 7n.1.

Fonte: Os Autores (2013).

Figura 41: Fragmentação da substância com tempo de retenção 51,79 minutos.



A: Fragmentação da substância com tempo de retenção 51,79, do extrato hexânico sugerindo a presença de um triterpeno com esqueleto do tipo ursólico.

B: Fragmentação de triterpeno sugerida pelo banco de dados WILEY 7n.1.

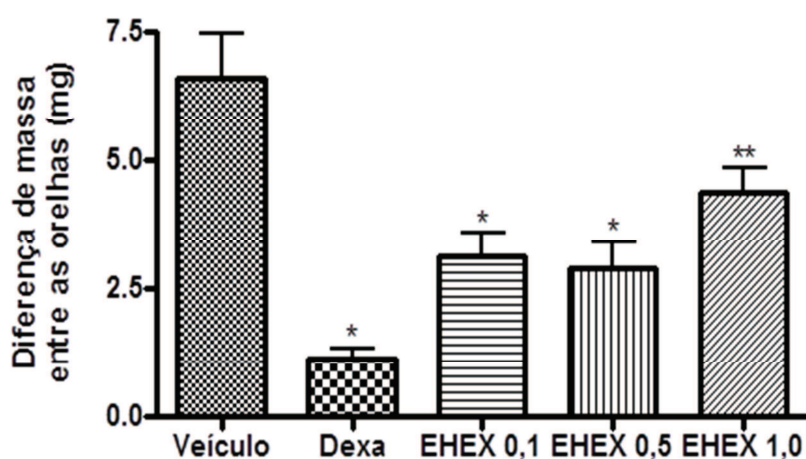
Fonte: Os Autores (2013).

5.6 ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA TÓPICA

5.6.1 EFEITO DOS EXTRATOS DE *V. polyanthes* SOBRE O MODELO DE EDEMA DE ORELHA INDUZIDO PELO ÓLEO DE CRÓTON

A aplicação tópica do óleo de cróton na orelha dos camundongos promoveu um aumento significativo da massa da orelha após a quarta hora do desafio com esse agente flogístico (Figura 42). Esse aumento foi significativamente reduzido pela aplicação tópica do EHEX nas concentrações de 0,1 mg/orelha, 0,5 mg/orelha e 1,0 mg/orelha. Na concentração de 0,5 mg do EHEX o edema foi inibido em 56% ($p < 0,001$), enquanto a concentração de 0,1 mg/orelha reduziu em 52,6% ($p < 0,001$). O edema de orelha foi diminuído em 34% após aplicação de 1,0 mg deste extrato ($p < 0,01$). A dexametasona, controle positivo, inibiu o edema em 83% ($p < 0,001$) (Tabela 11).

Figura 42: Efeito do extrato hexânico das folhas de *V. polyanthes* sobre o edema de orelha induzido por óleo de cróton em camundongos.



Os valores correspondem à média \pm E.P.M. da diferença de massa entre as orelhas (mg). As médias diferem em relação ao controle negativo após análise de variância seguida do teste de Newman-Keuls. Valores significativos: * $p < 0,001$, ** $p < 0,01$ vs grupo controle negativo (veículo).

Fonte: Os Autores (2013).

Tabela 11: Porcentagem de inibição do extrato hexânico de *V. polyanthes* sobre o edema de orelha induzido por óleo de cróton em camundongos.

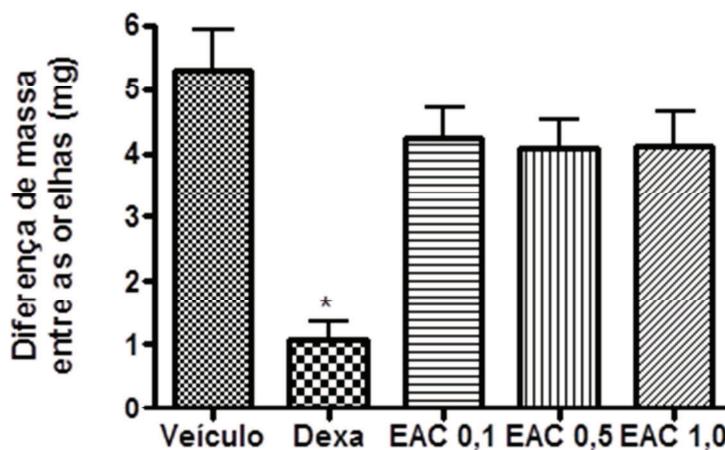
Grupo	Dose	Massa do edema (mg)	Inibição do edema (%)
Veículo (acetona)	20 µL/orelha	6,61 ± 0,76	0%
	0,1 mg/orelha	3,13 ± 0,46*	52,6%
Extrato hexânico	0,5 mg/orelha	2,90 ± 0,49*	56%
	1,0 mg/orelha	4,36 ± 0,46**	34%
Dexametasona	0,1 mg/orelha	1,12 ± 0,85*	83%

Os valores correspondem à média ± E.P.M. da diferença de massa entre as orelhas (mg). * $p < 0,001$, ** $p < 0,01$, diferente do grupo controle após análise de variância seguida do teste de Newman-Keuls.

Fonte: Os Autores (2013).

O extrato EAC não apresentou efeito anti-inflamatório nas concentrações testadas (0,1; 0,5 e 1,0 mg/orelha) (Figura 43). Neste modelo, apenas o controle positivo, dexametasona 0,1 mg/orelha, demonstrou redução significativa quando comparado com o veículo, com efeito inibitório de 79,5% ($p < 0,001$) (Tabela 12).

Figura 43: Efeito do extrato em acetato de etila das folhas de *V. polyanthes* sobre o edema de orelha induzido por óleo de cróton em camundongos.



Os valores correspondem à média \pm E.P.M. da diferença de massa entre as orelhas (mg). As médias dos tratamentos com o extrato não diferem em relação ao controle negativo após análise de variância seguida do teste de Newman-Keuls. Valores significativos: * $p < 0,001$, vs grupo controle negativo (veículo).

Fonte: Os Autores (2013).

Tabela 12: Porcentagem de inibição do extrato em acetato de etila de *V. polyanthes* sobre o edema de orelha induzido por óleo de cróton em camundongos.

Grupo	Dose	Massa do edema (mg)	Inibição do edema (%)
Veículo (acetona)	20 μ L/orelha	5,31 \pm 0,62	0%
	0,1 mg/orelha	4,25 \pm 0,46	19,9%
Extrato acetato de etila	0,5 mg/orelha	4,11 \pm 0,42	22,82%
	1,0 mg/orelha	4,12 \pm 0,53	22,35%
Dexametasona	0,1 mg/orelha	1,08 \pm 0,28*	79,5%

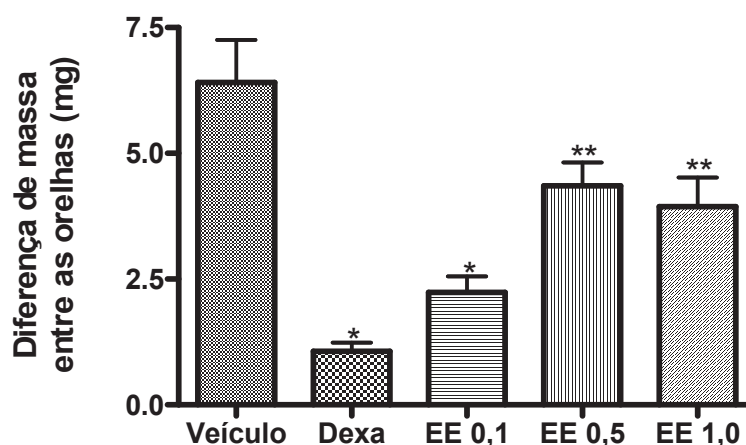
Os valores correspondem à média \pm E.P.M. da diferença de massa entre as orelhas (mg);

* $p < 0,001$, diferente do grupo controle após análise de variância seguida do teste de Newman-Keuls.

Fonte: Os Autores (2013).

Na Figura 44 estão representados os resultados obtidos com o EE no modelo de edema de orelha induzido pelo óleo de cróton. O edema foi efetivamente reduzido pela aplicação tópica do extrato EE nas concentrações testadas (0,1; 0,5 e 1,0 mg/orelha). Na concentração de 0,1 mg/orelha o EE foi bastante efetivo reduzindo o edema em 55,3% ($p < 0,001$). O EE inibiu o edema de orelha em 42% ($p < 0,01$) e 32% ($p < 0,01$) nas concentrações de 1,0 mg e 0,5 mg/orelha, respectivamente. É observado que a dexamentasona reduziu o edema em 83,4% ($p < 0,001$) (Tabela 13).

Figura 44: Efeito do extrato etanólico das folhas de *V. polyanthes* sobre o edema de orelha induzido por óleo de cróton em camundongos.



Os valores correspondem à média \pm E.P.M. da diferença de massa entre as orelhas (mg). As médias diferem em relação ao controle negativo após análise de variância seguida do teste de Newman-Keuls. Valores significativos: * $p < 0,001$, ** $p < 0,01$, vs grupo controle negativo (veículo).

Fonte: Os Autores (2013).

Tabela 13: Porcentagem de inibição do extrato etanólico das folhas de *V. polyanthes* sobre o edema de orelha induzido por óleo de cróton em camundongos.

Grupo	Dose	Massa do edema (mg)	Inibição do edema (%)
Veículo (acetona)	20 μ L/orelha	6,41 \pm 0,84	0%
	0,1 mg/orelha	2,61 \pm 0,52*	55,36%
Extrato etanólico	0,5 mg/orelha	4,35 \pm 0,46**	32,16%
	1,0 mg/orelha	3,71 \pm 0,52*	42,10%
Dexametasona	0,1 mg/orelha	1,06 \pm 0,17*	83,4%

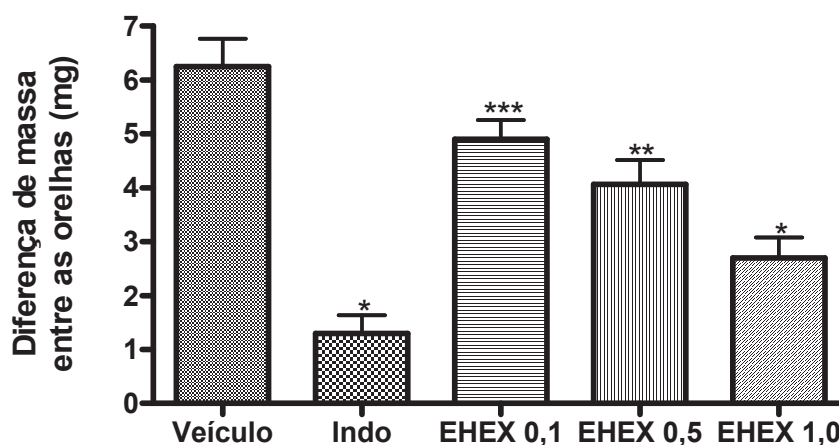
Os valores correspondem à média \pm E.P.M. da diferença de massa entre as orelhas (mg); * $p < 0,001$, ** $p < 0,01$, diferente do grupo controle após análise de variância seguida do teste de Newman-Keuls.

Fonte: Os Autores (2013).

5.6.2 EFEITO DOS EXTRATOS DE *V. polyanthes* SOBRE O EDEMA DE ORELHA INDUZIDO PELO ÁCIDO ARAQUIDÔNICO

Neste modelo, o EHEX nas concentrações testadas (0,1; 0,5 e 1,0 mg/orelha) reduziu significativamente o edema de orelha (Figura 45). O efeito inibitório deste extrato pode ser considerado dose-dependente, pois a concentração de 1,0 mg/orelha foi a mais efetiva com 56,8% ($p < 0,001$) na redução do edema. Seguida da concentração de 0,5 mg/orelha, o edema foi diminuído em 35% ($p < 0,01$), enquanto em 0,1 mg/orelha reduziu o edema em 21,6% ($p < 0,05$). A indometacina apresentou uma potente atividade anti-inflamatória com 80,2% ($p < 0,001$) de inibição do edema.

Figura 45: Efeito do extrato hexânico das folhas de *V. polyanthes* sobre o edema de orelha induzido por ácido araquidônico em camundongos.



Os valores correspondem à média \pm E.P.M. da diferença de massa entre as orelhas (mg). As médias diferem em relação ao controle negativo após análise de variância seguida do teste de Newman-Keuls. Valores significativos: * $p < 0,001$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,05$ vs grupo controle negativo (veículo).

Fonte: Os Autores (2013).

Tabela 14: Porcentagem de inibição do extrato hexânico das folhas de *V. polyanthes* sobre o edema de orelha induzido por ácido araquidônico em camundongos.

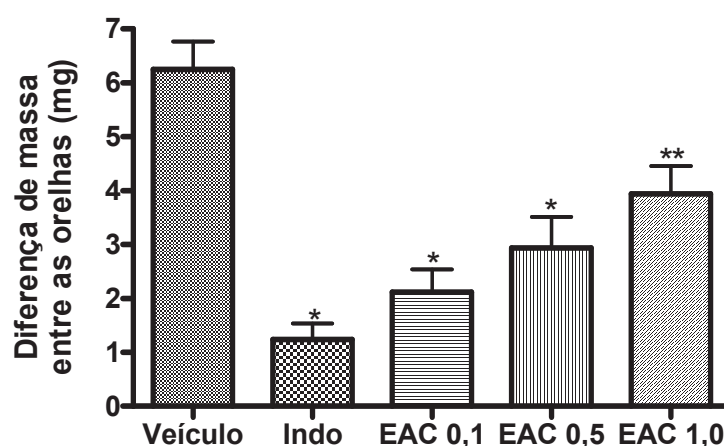
Grupo	Dose	Massa do edema (mg)	Inibição do edema (%)
Veículo (acetona)	20 μ L/orelha	6,25 \pm 0,51	0%
	0,1 mg/orelha	4,9 \pm 0,36***	21,6%
Extrato hexânico	0,5 mg/orelha	4,06 \pm 0,44**	35%
	1,0 mg/orelha	2,7 \pm 0,37*	56,8%
Indometacina	0,1 mg/orelha	1,23 \pm 0,30*	80,2%

Os valores correspondem à média \pm E.P.M. da diferença de massa entre as orelhas (mg). * $p < 0,001$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,05$ diferente do grupo controle após análise de variância seguida do teste de Newman-Keuls.

Fonte: Os Autores (2013).

O extrato EAC demonstrou redução significativa no edema de orelha após 1 hora da aplicação do ácido araquidônico, quando comparados ao grupo controle (veículo) (Figura 46). A concentração de 0,1 mg/orelha do extrato reduziu o edema em 66,2% ($p < 0,001$). Enquanto em 0,5 mg/orelha produziu efeito inibitório de 53% ($p < 0,001$), na concentração de 1,0 mg/orelha, também causou efeito significativo 37% ($p < 0,01$). A indometacina reduziu o edema em 80,2% ($p < 0,001$).

Figura 46: Efeito do extrato em acetato de etila das folhas de *V. polyanthes* sobre o edema de orelha induzido por ácido araquidônico em camundongos.



Os valores correspondem à média \pm E.P.M. da diferença de massa entre as orelhas (mg). As médias diferem em relação ao controle negativo após análise de variância seguida do teste de Newman-Keuls. Valores significativos: * $p < 0,001$, ** $p < 0,01$ vs grupo controle negativo (veículo).

Fonte: Os Autores (2013).

Tabela 15: Porcentagem de inibição do extrato em acetato de etila das folhas de *V. polyanthes* sobre o edema de orelha induzido por ácido araquidônico em camundongos.

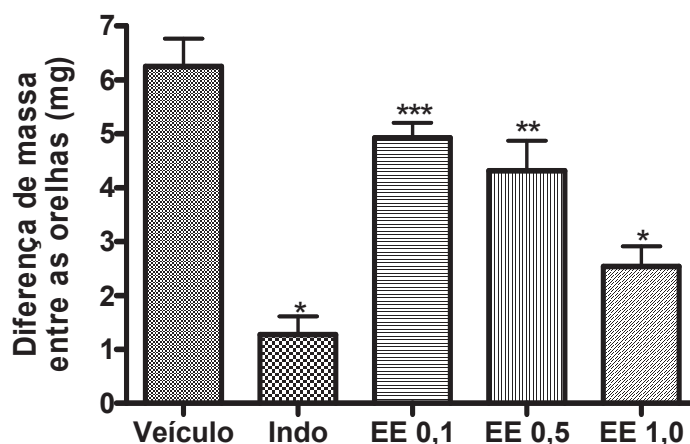
Grupo	Dose	Massa do edema (mg)	Inibição do edema (%)
Controle (acetona)	20 μ L/orelha	6,45 \pm 0,61	0%
Extrato acetato de etila	0,1 mg/orelha	2,11 \pm 0,42*	66,2%
	0,5 mg/orelha	2,93 \pm 0,57*	53%
	1,0 mg/orelha	3,93 \pm 0,51**	37%
Indometacina	0,1 mg/orelha	1,23 \pm 0,30*	80,2%

Os valores correspondem à média \pm E.P.M. da diferença de massa entre as orelhas (mg). * $p < 0,001$, ** $p < 0,01$, diferente do grupo controle após análise de variância seguida do teste de Newman-Keuls.

Fonte: Os Autores (2013).

A Figura 47 mostra os resultados obtidos com o extrato EE no modelo de edema induzido pelo ácido araquidônico. O edema de orelha foi efetivamente reduzido pela aplicação tópica do EE se comparado com o controle negativo (veículo). Sendo que o extrato na concentração de 1,0 mg/orelha foi o mais efetivo, reduzindo o edema em 60,6% ($p < 0,001$), seguido da concentração de 0,5 mg/orelha que reduziu o edema em 31% ($p < 0,01$) e pela concentração de 0,1 mg/orelha reduzindo o edema em 21,2% ($p < 0,05$). Já a indometacina reduziu o edema em 80,2% ($p < 0,001$). Por ser um anti-inflamatório não-esteróide a indometacina apresentou um potente efeito com redução do edema em 80,2% ($p < 0,001$) (Tabela 16).

Figura 47: Efeito do extrato etanólico das folhas de *V. polyanthes* sobre o edema de orelha induzido por ácido araquidônico em camundongos.



Os valores correspondem à média ± E.P.M. da diferença de massa entre as orelhas (mg). As médias diferem em relação ao controle negativo após análise de variância seguida do teste de Newman-Keuls. Valores significativos: * $p < 0,001$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,05$ vs grupo controle negativo (veículo).

Fonte: Os Autores (2013).

Tabela 16: Porcentagem de inibição do extrato etanólico das folhas de *V. polyanthes* sobre o edema de orelha induzido por ácido araquidônico em camundongos.

Grupo	Dose	Massa do edema (mg)	Inibição do edema (%)
Controle (acetona)	20 µL/orelha	6,98 ± 0,63	0%
	0,1 mg/orelha	4,92 ± 0,27***	21,2%
Extrato etanólico	0,5 mg/orelha	4,31 ± 0,56**	31%
	1,0 mg/orelha	2,46 ± 0,37*	60,6%
Indometacina	0,1 mg/orelha	1,23 ± 0,33*	80,2%

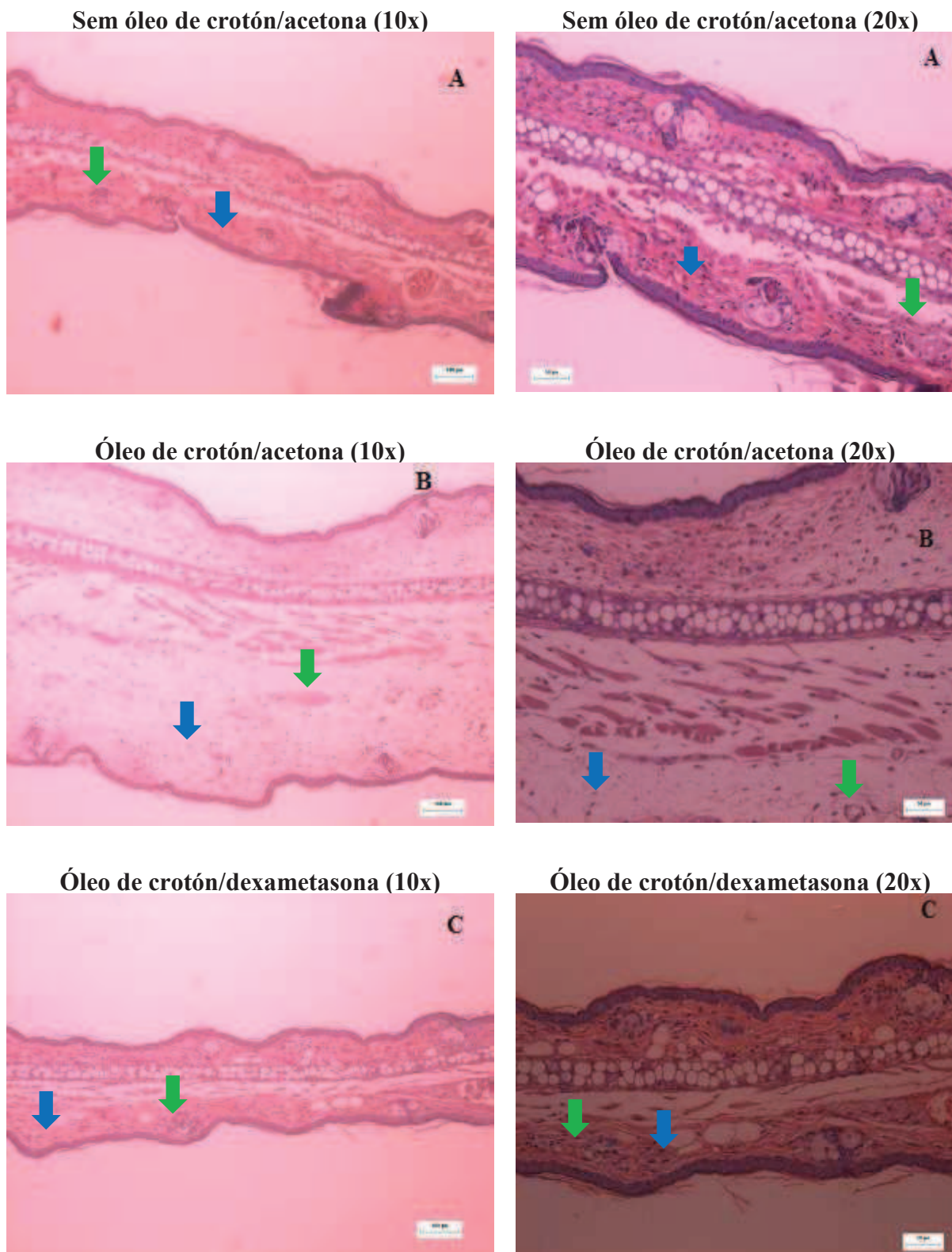
Os valores correspondem à média ± E.P.M. da diferença de massa entre as orelhas (mg). * $p < 0,001$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,05$, diferente do grupo controle após análise de variância seguida do teste de Newman-Keuls.

Fonte: Os Autores (2013).

5.6.3 ANÁLISE HISTÓLOGICA

Os parâmetros da inflamação, como a infiltração leucocitária, edema e hiperproliferação celular, foram avaliados através da análise histológica. Os cortes histológicos das orelhas dos camundongos foram obtidos 4 horas após a aplicação tópica do óleo de cróton. A Figura 48 apresenta fotos dos controles, tanto controle negativo e positivo, quanto da orelha sem óleo de crotón. A Figura 48A representativa da orelha tratada somente com acetona e o controle negativo de referência (Figura 48B) apresentou um aumento do volume do edema, assim como uma quantidade maior de infiltrado leucocitário, principalmente de polimorfonucleares. Na Figura 48C é observado que o tratamento com dexametasona, controle positivo, inibiu expressivamente o volume do edema e o infiltrado leucocitário com redução dos polimorfonucleares.

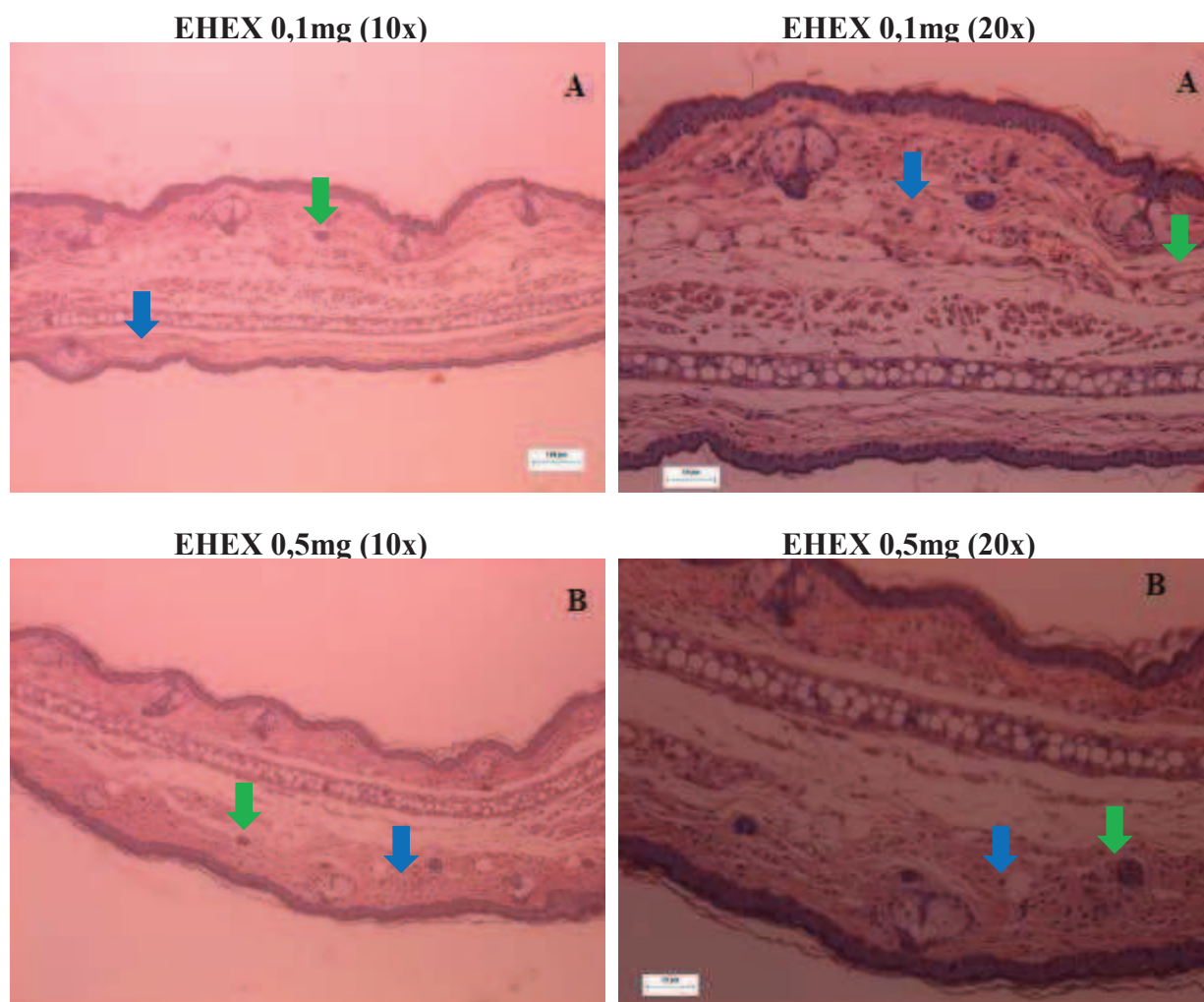
Figura 48: Imagens representativas da histologia de cortes transversais do edema de orelha induzido pelo óleo de crótón em camundongos.



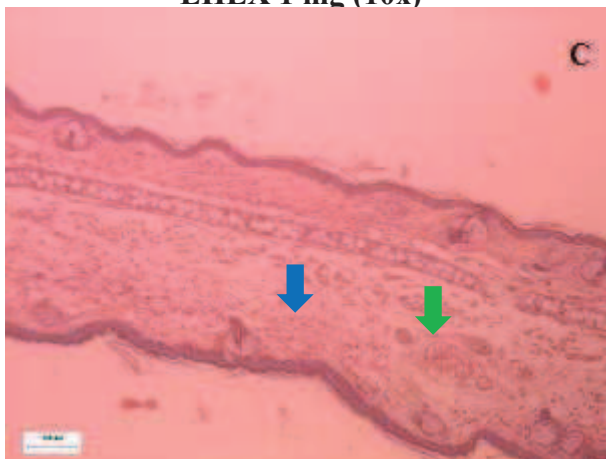
Grupos tratados com: (A) sem óleo de crótón/acetona, (B) óleo de crótón/acetona, (C) óleo de crótón/dexametasona. Coloração com hematoxilina/eosina, examinados no aumento de 10x (escala de 100 μ m) e 20x (escala de 50 μ m), respectivamente. Leucócitos (seta azul); vasos sanguíneos (seta verde).**Fonte:** Os Autores (2013).

Após tratamento com o extrato EHEX, é observado que houve inibição do edema e do infiltrado leucocitário com redução dos polimorfonucleares (Figura 49) nas concentrações de 0,1 mg, 0,5 mg e 1,0 mg/orelha quando comparado ao grupo controle (Figura 48B). Sugere-se que as concentrações de 0,1 e 0,5 mg/orelha foram mais ativas em inibir os parâmetros da inflamação.

Figura 49: Imagens representativas da histologia de cortes transversais do edema de orelha induzido pelo óleo de cróton em camundongos dos grupos tratados com o extrato hexânico das folhas de *V. polyanthes*.



EHEX 1 mg (10x)

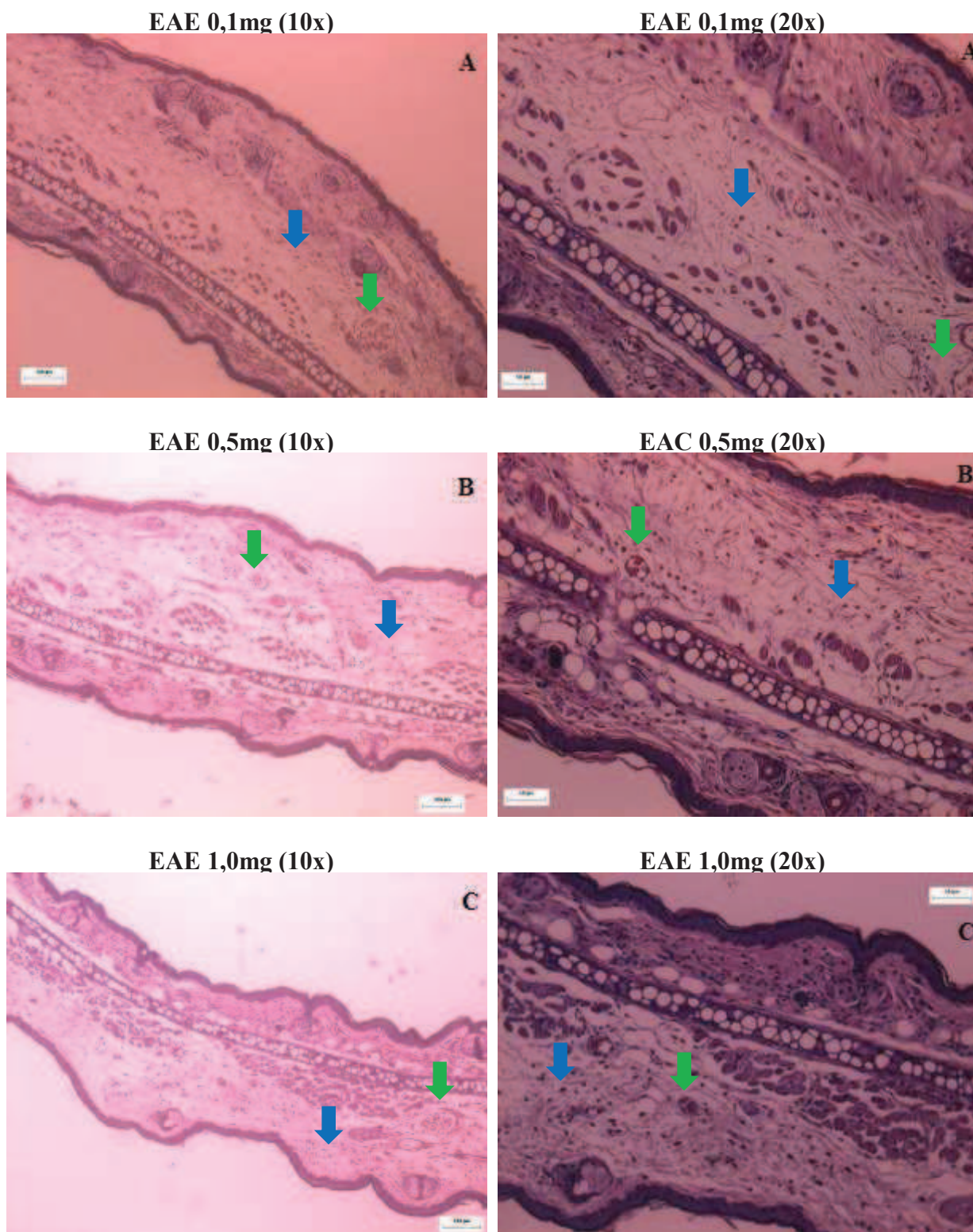


Grupos tratados com: (A) extrato hexânico 0,1mg/orelha, (B) extrato hexânico 0,5mg/orelha, (C) extrato hexânico 1,0mg/orelha. Coloração com hematoxilina/eosina, examinados no aumento de 10x (escala de 100 μ m) e 20x (escala de 50 μ m), respectivamente. Leucócitos (seta azul); vasos sanguíneos (seta verde).

Fonte: Os Autores (2013).

Na Figura 50 é representado o efeito do extrato EAE sobre o edema de orelha induzido pelo óleo de cróton. É observado que nas concentrações testadas de 0,1 mg; 0,5 mg e 1,0 mg/orelha deste extrato reduziu o processo inflamatório, diminuindo o volume do edema e o infiltrado leucocitário. No entanto, este efeito não foi significativo quando comparado com a massa edematosa da orelha do grupo controle mostrado na Figura 48B.

Figura 50: Imagens representativas da histologia de cortes transversais do edema de orelha induzido pelo óleo de cróton em camundongos dos grupos tratados com o extrato em acetato de etila das folhas de *V. polyanthes*.

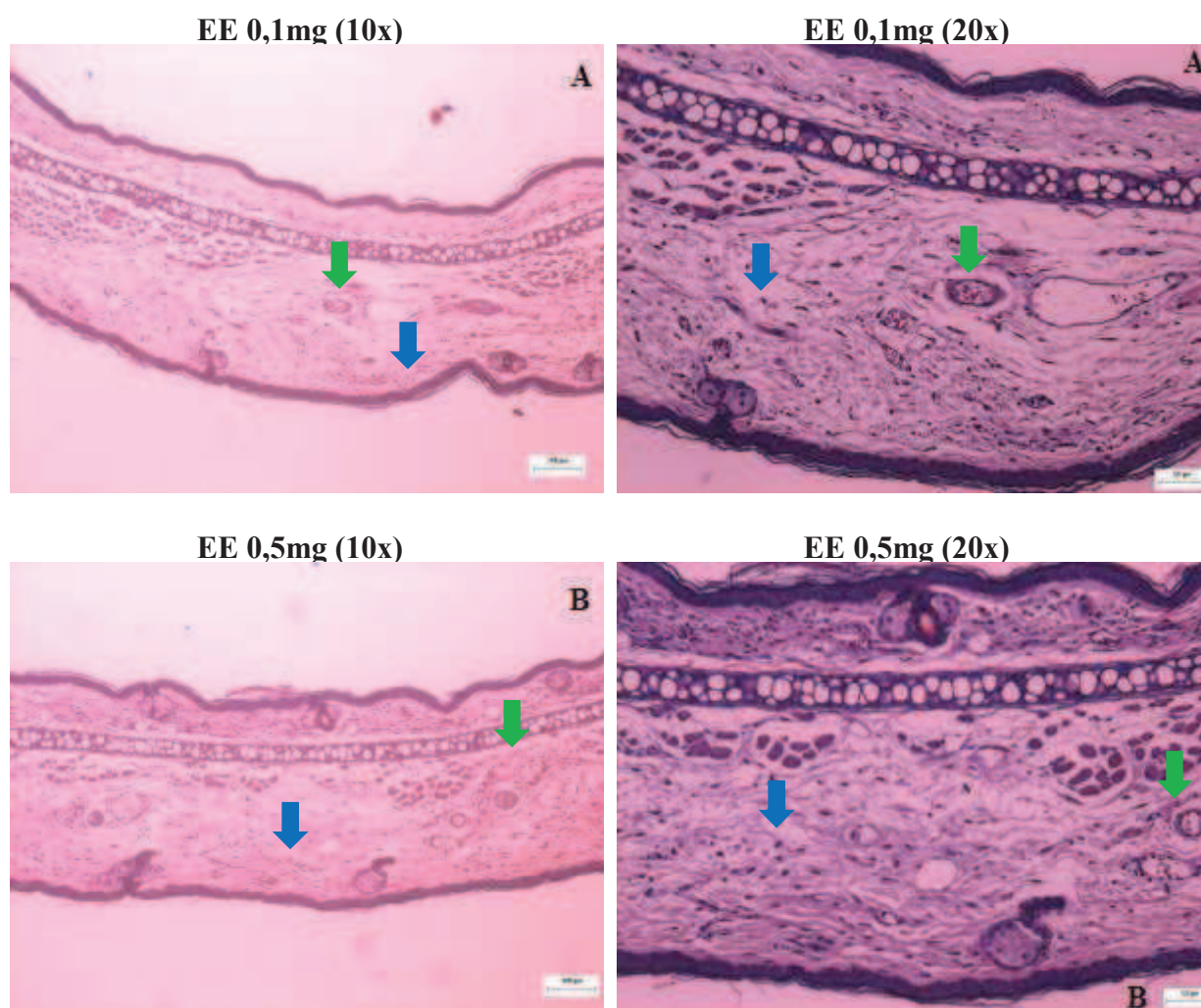


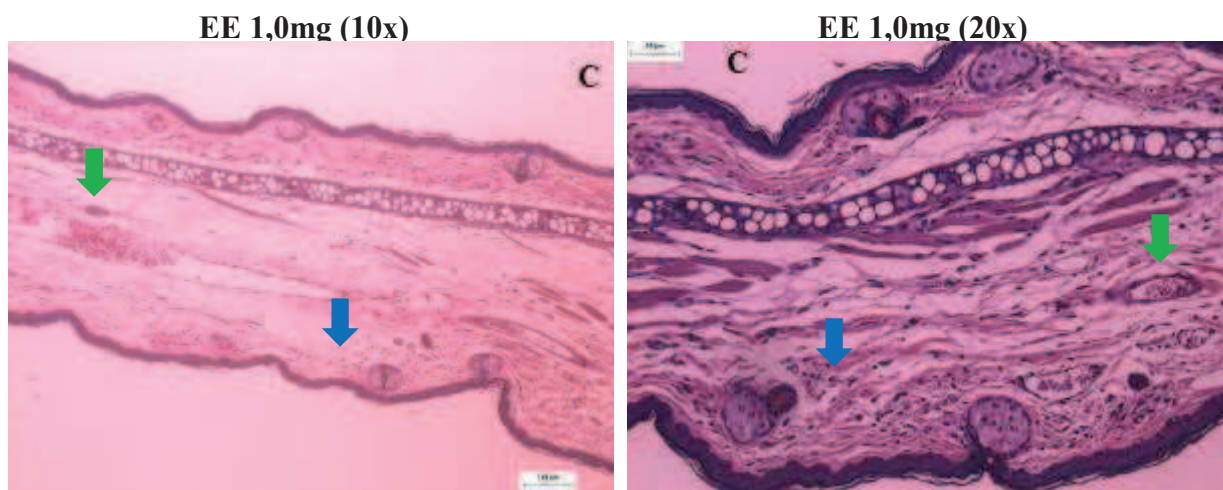
Grupos tratados com: (A) extrato em acetato de etila 0,1mg/orelha, (B) extrato em acetato de etila 0,5mg/orelha, (C) extrato em acetato de etila 1,0mg/orelha. Coloração com hematoxilina/eosina, examinados no aumento de 10x (escala de 100 μ m) e 20x (escala de 50 μ m), respectivamente. Leucócitos (seta azul); vasos sanguíneos (seta verde).

Fonte: Os Autores (2013).

O tratamento do edema de orelha induzido pelo óleo de cróton com o extrato EE inibiu o edema e o infiltrado leucocitário com redução dos polimorfonucleares (Figura 51). Na concentração de 0,1 mg/orelha, a diminuição do processo inflamatório foi mais acentuada (Figura 51A). As concentrações de 0,5 mg e 1,0 mg/orelha demonstraram efeitos semelhantes (Figura 51B e Figura 51C).

Figura 51: Imagens representativas da histologia de cortes transversais do edema de orelha induzido pelo óleo de cróton em camundongos dos grupos tratados com o extrato etanólico das folhas de *V. polyanthes*.





Grupos tratados com: (A) extrato etanólico 0,1mg/orelha, (B) extrato etanólico 0,5mg/orelha, (C) extrato etanólico 1,0mg/orelha. Coloração com hematoxilina/eosina, examinados no aumento de 10x (escala de 100 μ m) e 20x (escala de 50 μ m), respectivamente.

Fonte: Os Autores (2013).

6 DISCUSSÃO

O gênero *Vernonia* possui diversas espécies que são largamente utilizadas na medicina popular para o tratamento de diversos males, incluindo processos inflamatórios e distúrbio associados à inflamação. O presente estudo avaliou os efeitos farmacológicos das folhas de *V. polyanthes*, uma planta medicinal brasileira usada popularmente por suas propriedades antiinflamatória, cicatrizante e antimicrobiana (ALVES, NEVES, 2003; SILVEIRA et al., 2003).

A investigação das atividades biológicas da *V. polyanthes* se faz necessária para evidenciar cientificamente as aplicações terapêuticas, especialmente nas doenças inflamatórias, pois somente o uso tradicional não é suficiente para validar uma planta medicinal como um produto eficaz e seguro (LAPA et al., 2004). Além disso, a interação dos estudos químico/farmacológicos e as informações provenientes da abordagem etnofarmacológica junto às comunidades resultam numa estratégia bastante útil na investigação de novos fármacos a partir de plantas medicinais. Nesse contexto, o presente estudo investigou constituintes químicos e o efeito antioxidante, antibacteriano e anti-inflamatório tópico dos extratos obtidos das folhas de *V. polyanthes*.

Por meio da determinação dos teores de constituintes fenólicos foi possível verificar que o extrato EE apresentou-se com maior teor de fenóis e flavonoides totais. Além disso, através de métodos cromatográficos como CLAE e com o uso de substâncias padrão foram identificados componentes flavonoídicos. Substâncias fenólicas, tais como os flavonoides, têm sido investigadas por suas propriedades antioxidante (VAN ACKER et al., 1996), antimicrobiana (CUSHNIE, LAMB, 2006) e anti-inflamatória (ORHAN et al., 2006; TOKER et al., 2004). A luteolina, apigenina e rutina, por exemplo, identificadas neste estudo, apresentam atividade antioxidante (LIMA et al., 2001; OZGEN et al., 2011; XU et al., 2009).

A principal propriedade atribuída aos flavonoides é a atividade antioxidante, sendo essa atividade decorrente da capacidade desses compostos atuarem como sequestradores de espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio (SADIK et al., 2003). Além da propriedade antioxidante, vários estudos também demonstraram a ação dos flavonoides sobre os estágios iniciais do processo inflamatório, como a inibição da infiltração de leucócitos e diminuição da permeabilidade capilar (ALCARAZ, CARVALHO, 2004).

O potencial antioxidante de produtos naturais tem sido pesquisado, uma vez que a presença de radicais livres no organismo está relacionada a certas doenças crônicas, tais como

as autoimunes (artrite reumatoide, lúpus eritematoso sistêmico), câncer, doença de Parkinson (CHUNG et al., 1998).

Os métodos aplicados na pesquisa possuem metodologias simples, rápidas e sensíveis que correlacionam espectrofotometricamente a capacidade antioxidante de constituintes com o desaparecimento ou formação de cor por substâncias cromogênicas. O DPPH, por exemplo, é um cromóforo estável que gera formação de uma coloração violeta intensa (ARNAO, 2000; MENSOR et al., 2001), a qual diminui à medida que é reduzido por um antioxidante e seu elétron se torna emparelhado (BRAND, CUVELIER, BERSET, 1995). Baseado neste método, *V. polyanthes* possui atividade antioxidante, especialmente o extrato EE que produziu CE_{50} igual a 2,29 $\mu\text{g/mL}$. Esta atividade está correlacionada com os teores de fenóis totais e flavonoides (BROINIZI et al., 2007), pois este extrato também apresentou a maior quantidade desses constituintes com 22,93 mg/g e 8,23 mg/g, respectivamente. Além disso, os flavonoides, como a luteolina e a rutina, detectada neste extrato podem corroborar com essa atividade (OZGEN et al., 2011; XU et al., 2009).

A atividade antioxidante foi ainda avaliada pela capacidade redutora com base na transformação do $\text{Fe}^{+3}/\text{Fe}^{+2}$ (OYAIZU, 1986). A habilidade redutora de uma substância também é utilizada como indicativo para a avaliação do seu potencial antioxidante. O extrato EE apresentou uma CE_{50} de 31,20 $\mu\text{g/mL}$, demonstrando melhor atividade antioxidante, com um melhor poder de redução.

A peroxidação lipídica é um processo oxidativo iniciado pela reação de um radical livre com ácido graxo insaturado, resultando na formação de hidroperóxidos lipídicos e aldeídos (LIMA, ABDALLA, 2001). Dessa forma, o teste de oxidação do β -caroteno/ácido linoleico avalia o poder de inibição que um antioxidante exerce sobre os radicais livres gerados durante a peroxidação do ácido linoleico. A atividade antioxidante por este método é muito útil especialmente na investigação de antioxidantes lipofílicos (DUARTE-ALMEIDA, et al., 2006). Dos extratos avaliados, o extrato EE foi o que apresentou maior porcentagem de inibição (22,7%) em relação ao controle negativo, reduzindo a peroxidação do ácido linoleico. Essa redução da peroxidação lipídica também foi quantificada para os extratos EAE (20,5%) e EHEX (19,7%).

Ao se comparar os resultados da metodologia de peroxidação lipídica com os da avaliação da atividade antioxidante pela redução do radical livre DPPH, pode-se observar que os extratos se comportaram de formas distintas. A provável explicação para esta diferença pode ser devido às particularidades que este método apresenta, ou seja, o meio reacional é composto por uma emulsão que apresenta simultaneamente, regiões polares e apolares.

A propriedade antioxidante dos fenólicos apresenta-se dependente da solubilidade do composto (FRANKEL et al., 1994). Segundo Porter e outros (1994), os antioxidantes solúveis em água tendem a ser mais efetivos do que os antioxidantes solúveis em lipídeos quando testados em óleo puro. Ao contrário, antioxidantes solúveis em lipídeos tendem a apresentar uma maior proteção para uma emulsão óleo em água do que os antioxidantes solúveis em água. Em emulsões lipídicas, os fenólicos geralmente encontram-se equilibrados em água emulsionada com Tween, formando micelas e aumentando sua propriedade hidrofílica. É possível que os constituintes fenólicos do extrato EHEX tenham atingido este equilíbrio, justificando assim a ação equivalente a do extrato EAE.

Este fenômeno pode ser chamado de “paradoxo polar”, sendo baseado na suposição de que o início da oxidação de lipídeos está localizado na interface do sistema, ou seja, a oxidação do óleo puro ocorre na interface ar/óleo, onde os antioxidantes hidrofílicos estão concentrados, enquanto a oxidação de emulsões está localizada na interface água/óleo onde os antioxidantes lipofílicos encontram-se (HUANG, 1996).

Em sistemas lipofílicos as taxas de reações de sequestro podem ser influenciadas pelo coeficiente de partição dos constituintes fenólicos entre as fases aquosas e lipídicas, e dessa forma, reduzir a reação dos fenólicos polares (RICE-EVANS, NICHOLAS, PAGANGA, 1996).

Segundo Koleva e outros (2002) a oxidação lipídica é um processo complexo em cadeia, no qual estão envolvidos vários tipos de radicais livres de diferentes reatividades, e, a ação antioxidante de um composto bioativo depende do substrato lipídico, da sua solubilidade e do seu mecanismo de ação. Assim, em ensaios que contém lipídios como substrato oxidável, a exemplo da oxidação acoplada β -caroteno/ácido linoleico, o papel protetor do antioxidante depende de sua solubilidade que determina sua distribuição na fase do sistema, incluindo localização e orientação.

A complexa composição dos extratos pode provocar interações sinérgicas ou antagônicas entre os constituintes presentes, podendo, também, afetar sua partição nas fases do meio e, conseqüentemente, sua ação antioxidante. O exato mecanismo do antioxidante no sistema β -caroteno/ácido linoleico é difícil de ser explicado, especialmente ao se testar a ação de matrizes complexas, como é o caso dos extratos vegetais.

Com base nos resultados encontrados, pode-se afirmar que os extratos EHEX, EAE e EE apresentam substâncias doadoras de elétrons e prótons, capazes de neutralizar radicais livres e torná-los produtos mais estáveis, além do poder de inibição sobre os radicais livres gerados durante a peroxidação do ácido linoleico.

Os resultados preliminares obtidos por meio do método de difusão em ágar mostraram que os extratos EAE e EE foram efetivos em inibir o crescimento de *S. aureus* ATCC 25923, demonstrando atividade antibacteriana. O maior halo de inibição foi do EAE (16 mm). O aumento crescente da frequência de *S. aureus* resistentes à oxacilina (ORSA) e resistentes à meticilina (MRSA), e da possibilidade do aparecimento de linhagens resistentes também à vancomicina, tornam relevantes o desenvolvimento de novas drogas com atividade anti-estafilocócicas (SADER et al., 1993). Flavonoides, taninos, xantonas, ácidos triperpênicos, saponinas, substâncias fenólicas em geral, terpenos e esteroides são substâncias que apresentam atividade antimicrobiana (AKIYAMA et al., 2001; CUSHNIE, LAMB, 2006; MANDAL et al., 2005; SHER, 2009; SOLÍS et al., 2004).

Considerando-se que não existe correlação entre tamanho do halo de inibição e potencial antimicrobiano, os extratos que não inibiram o crescimento de micro-organismos pelo método de difusão, podem demonstrar atividade através da CIM. Essa variação pode ser justificada pela composição química das amostras, pois moléculas mais polares ou de maior massa molecular podem ser mais solúveis e de mais fácil dispersão em meio líquido (VALGAS et al., 2007). Neste sentido, utilizou-se o método de microdiluição para estabelecimento da CIM que determina a concentração mínima dos extratos capaz de inibir o crescimento das cepas bacterianas.

A CIM mais significativa observada foi aquela obtida com o EHEX com valor de 1,25 mg/mL frente a *S. aureus* ATCC 25923, *E. coli* ATCC 10536, *S. typhimurium* ATCC 13311 e *P. aeruginosa* ATCC 27853 sendo considerado um moderado inibidor de acordo com a classificação de Aligiannis e outros (2001). A CIM do EAE foi de 1,25 mg/mL frente a *P. aeruginosa* ATCC 27853 e 2,5 mg/mL frente a *S. aureus* ATCC 25923, *E. coli* ATCC 10536 e *S. typhimurium* ATCC 13311, enquanto o EE apresentou uma CIM de 1,25 mg/mL frente *E. coli* ATCC 10536, *S. typhimurium* ATCC 13311 e *P. aeruginosa* ATCC 27853 e 2,5 mg/mL frente *S. aureus* ATCC 25923.

Espécies do gênero *Vernonia* (Asteraceae) têm sido estudadas quanto ao seu potencial antimicrobiano. De acordo com Silva e outros (2012), o extrato metanólico de *V. polyanthes* foi capaz de inibir 16 amostras clínicas humanas de *S. aureus* e *E. coli* testadas, sendo que as linhagens de *S. aureus* foram mais susceptíveis do que as de *E. coli*. Temponi (2012) avaliou o extrato etanólico e as frações hexânica, diclorometânica, em acetato de etila e butanólica obtidas a partir das folhas de *V. polyanthes*, e observou que as frações diclorometânica e butanólica foram capazes de inibir significativamente *S. aureus* ATCC 25923 e *E. coli* ATCC 10536. Nota-se que atividade antibacteriana pode estar atribuída a presença de diversas

substâncias, especialmente os constituintes fenólicos, visto que nestes estudos os resultados foram mais ativos para extratos polares.

Os resultados do presente estudo demonstraram que os extratos EHEX, EAE e EE, possuem atividade antibacteriana, o que pode contribuir para o entendimento do uso popular da espécie no tratamento de infecções e como cicatrizante. Além disso, as atividades antioxidante e antibacteriana podem ser devidas aos constituintes fenólicos, como taninos e flavonoides (BANERJEE et al., 2005; CHOI et al., 2006; EINBOND et al., 2004), descritos nessa espécie vegetal e determinados nesse estudo.

Comparando o nível de atividade antibacteriana dos extratos, nota-se que o EHEX apesar de ser um extrato apolar apresentou a CIM mais significativa para todas as cepas testadas, este resultado pode ser justificado pela presença neste extrato de dois triterpenos derivados do ácido ursólico e β -amirina. De acordo com Zaletova e outros (1986) o ácido ursólico e seus derivados apresentam atividade antibacteriana, inibindo o crescimento de *S. aureus*. Presente em *Rosmarinus officinalis* (alecrim), o ácido ursólico é uma das substâncias responsável por inibir o crescimento de bactérias alimentares (COLLINS, CHARLES, 1987). Uma mistura de α e β -amirina mostrou boa atividade sobre *S. aureus* (SANCHES et al., 2005). De acordo com Choi e outros (2012), a β -amirina apresentou-se como potente agente antibacteriano, principalmente contra *E. coli* e *Helicobacter pylori*.

Entre as plantas com grande potencial anti-inflamatório estão incluídas as pertencentes à família Asteraceae. Plantas dessa família são vastamente estudadas e podem ser utilizadas para o desenvolvimento de novos fármacos (VERDI et al., 2005). O presente estudo investigou o efeito redutor de processos inflamatórios cutâneos pela ação do extrato EHEX, EAE e EE em modelos animais de inflamação cutânea. Entre os modelos de inflamação cutânea, destaca-se o edema de orelha que utiliza uma metodologia simples e, além disso, pode ser induzido por inúmeros agentes irritantes. Entre as vantagens desse modelo pode-se destacar o fato de necessitar de pouca quantidade de amostras para estudos *in vivo*, além de permitir a obtenção rápida de resultados. E quando o objetivo é o desenvolvimento de novos fármacos para uso tópico estas vantagens são ainda maiores, visto que substâncias com baixa absorção através da pele são identificadas rapidamente. Portanto, esse modelo constitui um método importante para a investigação de novos medicamentos para doenças inflamatórias que acometem a pele (BOUCLIER et al., 1990; GABOR, 2003; VANE, 2000).

O modelo do edema de orelha induzido pelo óleo de cróton ou por outros agentes flogísticos permite a avaliação da atividade antiinflamatória em nível de pele, de extratos vegetais ou substâncias isolada, quando administrados topicamente ou mesmo de maneira

sistêmica (GABOR, 2003). O óleo de cróton é uma mistura de lipídios extraídos da espécie *Croton tiglium* L. (Euphorbiaceae), nele contêm o 12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato (TPA) e outros esterres de forbol, responsáveis por sua atividade flogística. O TPA é ativador da proteína quinase C (PKC) que, por sua vez, ativa proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPK) e a enzima fosfolipase A2 (PLA2), a qual favorece a liberação do fator de ativação plaquetária (PAF) e de ácido araquidônico (AA). Esses mecanismos induzem ao aumento da permeabilidade vascular, vasodilatação, migração leucocitária, liberação de histamina e serotonina, e produção de eicosanóides sintetizados pelas enzimas ciclooxigenase (COX) e 5-lipoxigenase (5-LOX) (DE BERNARDIS et al., 1994; MURAKAWA et al., 2006; SARAIVA et al., 2010).

Os extratos das folhas de *V. polyanthes* reduziram o edema de orelha induzido pela aplicação tópica do óleo de cróton. O extrato EHEX 0,5 mg/orelha (56,14%) e o EE 0,1 mg/orelha (55,36%) foram mais ativos nesse modelo. No caso do EHEX, a presença da β -amirina e dos triterpenos derivados do ácido úrsólico, podem justificar a ação anti-inflamatória (RODRIGUES et al., 1997). O efeito anti-inflamatório é uma característica comum dos triterpenos (MAHATO, SARKAR, PODDAR, 1988; PRICE et al., 1987). Existe um grande interesse pela classe dos triterpenos devido ao seu variado espectro de atividades farmacológicas (PATOCKA, 2003). A propriedade anti-inflamatória é comum nas substâncias dessa classe, principalmente aqueles triterpenos da classe oleanano, ursano ou lupano (MÁÑEZ et al., 1997; SAFAYHI, SAILER, 1997). Triterpenos na forma de aglicona ou heterosídeos, inibem a enzima COX-2 e a produção do NO (SHIN et al., 2005), modulam a expressão de moléculas de adesão, via inibição de NF-kappa B (ZHANG et al., 2003), ou ainda inibem a isoenzima fosfodiesterase, um novo alvo intracelular para novas drogas anti-inflamatórias (WENIGER et al., 2005). Portanto, os resultados indicam que os extratos apresentam atividade anti-inflamatória tópica.

A aplicação tópica do AA gera uma resposta inflamatória rápida caracterizada por intenso eritema e edema com pequeno acúmulo de neutrófilos, quando comparado com a migração celular verificada no modelo de óleo de cróton, cujos principais mediadores envolvidos são PGE₂, LTC₄, LTD₄ (CRUMMEY et al., 1987; HUMES et al., 1986; YOUNG et al., 1983).

Os anti-inflamatórios não-esteroidais (AINEs) inibem a via da COX, impedindo, portanto, a síntese das PGs (RANG et al., 2007). A indometacina, fármaco de referência, um AINE cuja ação anti-inflamatória está relacionada com a inibição não seletiva das isoformas da COX (COX-1 e COX-2), reverte efetivamente o edema induzido pela aplicação tópica do

AA (GABOR, 2000). Da mesma forma que a indometacina, todos os extratos inibiram o edema de orelha após aplicação tópica do AA, sendo mais efetivos nas concentrações de 1,0 mg/orelha, 0,5 mg/orelha e 0,1 mg/orelha para o extrato EHEX e EE. Para o extrato EAE a concentração mais eficaz foi 0,1 mg/orelha, seguida por 0,5 e 1,0 mg/orelha. Anti-inflamatórios não esteroidais (AINE) produzem os seus efeitos terapêuticos através da inibição da COX. Duas isoformas de ciclooxigenase foram identificadas e são referidas como COX-1 e COX-2. A COX-1 é expressa constitutivamente e regula uma série de funções, tais como homeostasia vascular e gastroproteção, enquanto que COX-2 é induzível por mediadores, tais como fatores de crescimento, citocinas e endotoxinas, estando presente em locais de inflamação (KULKARNI et al., 2000). Portanto, os resultados indicam que os extratos podem inibir a cascata do AA, impedindo a formação de prostaglandinas ou leucotrienos.

De acordo com Souza e outros (2008), as folhas de *V. polyanthes* são ricas em alcaloides, cumarinas, flavonoides, saponinas glicosiladas, podendo assim justificar este resultado e também novamente pela presença dos constituintes terpênicos, pois estes apresentam importantes atividades farmacológicas, tais como, antitumoral (CARNESECCHI et al., 2004; DA SILVA et al., 2007), sedativa (DO VALE et al., 2002), analgésicas, anti-inflamatórias (AHMAD et al., 2005; CARVALHO et al., 1996; IWAMOTO et al., 2001; KLEIN, NEWTON, 2007; KUPALI et al., 2003), ativadoras de proteína quinase A (RAJIC et al., 2000), cardioprotetoras (LIEBGOTT et al., 2000); bloqueadores dos canais de cálcio (WANG et al., 2002), antioxidantes (ZHANG et al., 1996), hipolipidêmica (SILVA et al., 2001), relaxante da musculatura lisa vascular (TORRES et al., 2000), antimicrobiana (WALENCKA et al., 2007), antiulcerogênica (HIRUMA-LIMA et al., 2002), gastroprotetora (GUEDES, 2002; IZQUIERDO et al., 2007) e hepatoprotetora (OLIVEIRA et al., 2005).

Neste estudo, a análise histológica de amostras das orelhas após 4 horas da indução do edema por óleo de cróton evidenciou que o tratamento com todos os extratos das folhas de *V. polyanthes* diminuem, de maneira marcante, o infiltrado celular, a espessura da derme e da epiderme. O aumento do número de neutrófilos na pele tem grande relação com algumas doenças inflamatórias cutâneas como dermatites e psoríase (RANG et al., 2007; SCHAERLI et al., 2004). Desta forma, os resultados obtidos dão suporte à hipótese da ação anti-inflamatória da *V. polyanthes*, uma vez que os extratos demonstraram, efetivamente, a capacidade de redução do edema.

Enfim, os resultados obtidos neste trabalho demonstram que os extratos das folhas de *V. polyanthes* testados apresentam atividade antioxidante, antibacteriana e anti-inflamatória

tópica. No entanto, estudos adicionais são necessários para elucidar o mecanismo de ação pelo qual essa planta exerce seus efeitos e para assegurar a inexistência de toxicidade, garantindo a segurança de seu uso tópico em humanos.

7. CONCLUSÃO

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

1. Os extratos em acetato de etila e etanólico das folhas *V. polyanthes* Less. possuem teores expressivos de constituintes fenólicos (fenóis totais e flavonoides) e podem ser alvos de investigação química para o isolamento e detecção de substâncias bioativas;
2. A luteolina, apigenina, rutina, β -amirina e dois triterpenos derivados do ácido ursólico foram as principais substâncias detectadas nos extratos das folhas de *V. polyanthes* Less. pelos métodos cromatográficos aplicados;
3. Os extratos hexânico, em acetato de etila e o extrato etanólico das folhas de *V. polyanthes* inibiram o crescimento das bactérias testadas e apresentam potencial para a busca de novas substâncias antibacterianas;
4. Os extratos das folhas de *V. polyanthes* Less. inibiram o edema de orelha induzido pelos agentes flogísticos testados, demonstrando efeito anti-inflamatório tópico;
5. Os extratos das folhas de *V. polyanthes* Less. constituem potenciais candidatos para a busca de novos agentes antioxidante, antibacteriano e anti-inflamatório tópico para serem utilizados em diferentes enfermidades, especialmente relacionadas às doenças inflamatórias e infecções;
6. Os resultados da presente investigação justificam o uso de *V. polyanthes* Less. na medicina popular. Entretanto, estudos clínicos e toxicológicos aprofundados são necessários para provar a segurança e eficácia e a utilização como fitomedicamento.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

_____. Ministério da Saúde. **Portaria nº 971, 3 de maio de 2006.** Aprova a Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares (PNPIC) no Sistema Único de Saúde. 2006.

_____. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento de Assistência Farmacêutica. **Política Nacional de Plantas Mediciniais e Fitoterápicos.** Brasília: Ministério da Saúde, 60 p. (Série B. Textos Básicos de Saúde). 2008.

ABRÃO, R. **As ervas e a saúde - A farmácia no cerrado.** Ed. de autor. Campo Grande, MS: Produtora M, 2010, 303p.

AHMAD, V.U.; HUSSAIN, H.; BUKHARI, I.A.; HUSSAIN, J.; JASSBI, A.R.; DAR, A. Antinociceptive diterpene from *Euphorbia decipiens*. **Fitoterapia**, v. 76, p. 230-232, 2005.

AHMAD, V.U.; HUSSAIN, H.; BURKHARI, I.A.; HUSSAIN, J.; JASSBI, A.R.; DAR, A.; AKIYAMA, H.; FUJII, K.; YAMASAKI, O.; ONO, T.; IWATSUKI, K. Antibacterial action of several tannins against *Staphylococcus aureus*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 48, p. 487-491, 2001.

AKTUMSEK, A.; ZENGIN, G.; GULER, G.O.; CAKMAK, Y.S.; DURAN, A. Antioxidant potentials and anticholinesterase activities of methanolic and aqueous extracts of three endemic *Centaurea* L. species. **Food and Chemical Toxicology**, v.55, p. 290-296, 2013.

ALBURQUERQUE, U.P.; MEDEIROS, P.M.; ALMEIDA, A.L.S.; MONTEIRO, J.M.; NETO, E. M. F. L.; MELO, J.G.; SANTOS, J.P.; Medicinal plants of the caatinga (semi-arid) vegetation of NE Brazil: a quantitative approach. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 114, p. 325-354, 2007.

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

ALLEN JR, L. V.; POPOVICH, N. G.; ANSEL, H. C. **Formas farmacêuticas e sistemas de liberação de fármacos.** 8. ed°, Porto Alegre: Artmed, 776 p., 2007.

ALLEN JR., L. V. Manipulando emulsões. **International Journal of Pharmaceutical Compounding**, v. 6, p. 169-176, 2004.

ALLER, M.A.; ARIAS, J.L.; SÁNCHEZ-PATÁN, F.; ARIAS, J. The inflammatory response: an efficient way of life. **Medical Science Monitor**, v. 12, p. 225-234, 2006.

ALMEIDA, M. Z. **Plantas medicinais**, 3ª edição. Salvador: EDUFBA, 2000. p. 34-35.

ALMEIDA, N. F. L.; SILVA, S. R. S.; SOUZA, J. M.; QUEIROZ, A. P. N.; MIRANDA, G. S.; OLIVEIRA, H. B. Levantamento etnobotânico de plantas medicinais na cidade de Viçosa MG. **Revista Brasileira de Farmácia**, v. 90, p. 316-320, 2009.

ALVES, R. B. **Estudo químico das raízes de *Vernonia polyanthes* Less e tentativas de O-glicosidação do lupeol**. Minas Gerais, 1991. 160p. Dissertação de Mestrado–Universidade Federal de Minas Gerais.

ALVES, V. F. G.; NEVES, L. J. Anatomia foliar de *Vernonia polyanthes* Less (Asteraceae). **Revista Universidade Rural, Série Ciências da Vida**, v. 22, p. 1-8, 2003.

AMIGÓ, M.; PAYÁ, M.; DE ROSA, S.; TERCENIO, M.C. Antipsoriatic effects of avarol-3'-thiosalicylate are mediated by inhibition of TNF-alpha generation and NF-kappaB activation in mouse skin. **British Journal of Pharmacology**, v. 152, p. 353-365, 2007.

ANDERSEN, O. M.; MARKHAM, K. R. **Flavonoids: Chemistry, Biochemistry and Applications**. 1ª ed., New York: CRC Press, 2005.

ANDRADE, M.V.; IWAKI, S.; ROPERT, C.; GAZZINELLI, R.T.; CUNHA-MELO, J.R.; BEAVEN, M.A. Amplification of cytokine production through synergistic activation of NFAT and AP-1 following stimulation of mast cells with antigen and IL-33. **European Journal of Immunology**. v. 41, p. 760-772, 2011.

ANSEL, H. C.; POPOVICK, N. G.; ALLEN Jr., L. V. **Ansels Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems**. 8 ed. Philadelphia: Ed. Lippincott Williams & Wilkins, 2005.

ANTONIO, M.E.C.O. **Permeação cutânea in vitro como ferramenta auxiliar para o estudo de formulações semi-sólidas de cetoconazol para aplicações tópicas**. Curitiba, 2007. 147p. Dissertação de Mestrado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas- Universidade Federal do Paraná.

APPELBAUM, P.C.; JACOBS, M.R. Recently approved and investigational antibiotics for treatment of severe infections caused by Gram-positive bacteria. **Current Opinion in Microbiology**, v. 8, p. 510-517, 2005.

AQUILA, S.; GINER, R.M.; RECIO, M.C.; SPEGAZZINI, E.D.; RÍOS, J.L. Anti-inflammatory activity of flavonoids from *Cayaponia tayuya* roots. **Journal of Ethnopharmacology**, v.121, p.333-337, 2009.

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

ARNAO, M.B. Some methodological problems in the determination of antioxidant activity using chromogen radicals: a practical case. **Trends in Food Science & Technology** v. 11, p. 419-421, 2000.

ASHLEY, N.T.; WEIL, Z.M.; NELSON, R.J. Inflammation: Mechanisms, Costs, and Natural Variation. **Annual Reviews of Ecology, Evolution, and Systematics** is online at ecolsys.annualreviews.org, v.43, p. 385-406, 2012.

AULTON, M.E. **Delineamento de formas farmacêuticas**. 2º ed. Porto Alegre: Artmed, p. 504-536, 2005.

AWE, S.O.; OLAJIDE, O.; MAKINDE, J.M. Cathartic effect of the leaf extract of *Vernonia amygdalina*. **Phytotherapy Research**, v. 12, p. 57-58, 1998.

BANERJEE, A.; DASGUPTA, N. In vitro study of antioxidant activity of *Syzygium cumini* fruit. **Food Chemistry**, v. 90, p. 727-733, 2005.

BARBASTEFANO, V.; COLA, M.; LUIZ-FERREIRA, A.; FARIAS-SILVA, E.; HIRUMA-LIMA, A. C.; VILEGAS, W.; SOUZA-BRITO, M. R. A. *Vernonia polyanthes* as a new source of antiulcer drugs. **Fitoterapia**, v.78, p. 545-551, 2007.

BARBOSA-FILHO, J.M.; ALENCAR, A.A.; NUNES, X.P.; TOMAZ, A.C.A.; SENA-FILHO, J.G.; ATHAYDE-FEILHO, P.F.; SILVA, M.S.; SOUZA, M.F.V.; CUNHA, E.V.L. Sources of apha-, beta-, gama-, delta-and épsilon-carotenes: a twentieth century review. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, p. 135-154, 2008.

BARBOSA-FILHO, J.M.; NASCIMENTO-JÚNIOR, F.A.; TOMAZ, A.C.A.; ATHAYDE-FILHO, P.F.; SILVA, M.S.; CUNHA, E.V.L.; SOUZA, M.F.V.; BATISTA, L.M.; DINIZ, M.F.F.M. Natural products with antileprotic activity. **Revista Brasileira Farmacognosia**, v. 17, p. 141-148, 2007.

BARREIRO, E. J.; BOLZANI, V. S. Biodiversidade: fonte potencial para a descoberta de fármacos. **Química Nova**, São Paulo, v. 32, 2009.

BARREIROS, A. L. S.; DAVID, J. M. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Química Nova**, v. 29, p. 113-123, 2006.

BARROSO, G. M.; PEIXOTO, A. L.; COSTA, C. G.; ICHASO, C. L. F.; GUIMARÃES, E. F.; LIMA, H. C. **Sistemática das angiospermas do Brasil**. 1ª ed., Viçosa: UFV, v. 3, 1991. 336 p.

BARRY, B. Transdermal drug delivery. In: ALTON, M. E. **Pharmaceutics the science of dosage form design**. London: Churchill Livingstone, 2002, p. 499-533.

BAS, E.; RECIO, M. C.; MÁNEZ, S.; GINER, R.M.; ESCANDELL, J.M.; LOPEZ-GINES, C.; RIOS, J.L. New insight into the inhibition of the inflammatory response to experimental delayed-type hypersensitivity reactions in mice by scopolioside A. **European Journal of Pharmacology**, v. 555, p. 199-210, 2007.

BASTOS, E. M. A. F.; SIMONE, M.; JORGE, D. M.; SOARES, A. E. E.; SPIVAK, M. *In vitro* study of the antimicrobial activity of Brazilian propolis against *Paenibacillus larvae*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 97, p. 273–281, 2008.

BAUER, A. W.; KIRBY, W. M. M.; SHERRIS, J. C.; TURCK, M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. **American Journal of Clinical Pathology**, v.36, p. 493-496, 1966.

BECKER, P.F.L. Inflamação. In: **Patologia Geral**, Brasil: Sarvier, p.140-193, 1997.

BEDI, M. K.; SHENEFELT, P. D.; Herbal Therapy in Dermatology. **Archives of Dermatology**, v.138, p. 232-242, 2002.

BELCH, J. J. F.; HILL, A. Evening primrose oil and borage oil in rheumatologic conditions. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 71, p. 352, 2000.

BERNARD, J. J.; GALLO, R. L. Protecting the boundary: the sentinel role of host defense peptides in the skin. **Cellular and Molecular Life Sciences**. v. 68, p. 2189-2199, 2011.

BOHLMANN, F.; JAKUPOVIC, J.; GUPTA, R.K.; KING, R.M.; ROBINSON H. **Phytochemistry**, v. 20, p. 473, 1981. Apud BARBASTEFANO, V.; COLA, M.; LUIZ-FERREIRA, A.; FARIAS-SILVA, E.; HIRUMA-LIMA, A. C.; VILEGAS, W.; SOUZA-BRITO, M. R. A. *Vernonia polyanthes* as a new source of antiulcer drugs. **Fitoterapia**, v.78, p. 545-551, 2007.

BOHLMANN, F.; MAHANTA, P, K.; JAKUPOVIC, J.; RASTOGI, R. C.; NATU, A. New sesquiterpene lactones from *Inula* species. **Phytochemistry**, v. 17, p. 1165-1172, 1978.

BONOLI, M.; VERARDO, V.; MARCONI, E.; CARBONI, F. Antioxidant Phenols in Barley (*Hordeum vulgare* L.) Flour: Comparative Spectrophotometric Study among Extraction Methods of Free and Bound Phenolic Compounds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, p. 5195-5200, 2004.

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, p. 339-347, 2000.

BOUCLIER, M.; CAVEY, D.; KAIL, N.; HENSBY, C. Experimental models in skin pharmacology. **Pharmacology Reviews**, v. 42, p. 127-154, 1990.

BOUWSTRA, J. A.; HONEYWELL-NGUYEN, P. L.; GOORIS, G. S.; PONEC, M. Structure of skin barrier and its modulation by vesicular formulations. **Progress in lipid research, Oxford**, v. 42, p. 1-36, 2003.

BRADLEY, P. P.; PRIEBAT, D.A.; CHRISTENSEN, R.D.; ROTHSTEIN, G. Measurement of cutaneous inflammation: estimation of neutrophil content with an enzyme marker. **Journal Investigative of Dermatology**. v. 78, p. 206-209, 1982.

BRAGA, F. G.; BOUZADA, M. L. M.; FABRI, R. L.; MATOS, M. O.; MOREIRA, F. O.; SCIO, E.; COIMBRA, E. S. Antileishmanial and antifungal activity of plants used in traditional medicine in Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 111, p. 396-402, 2007.

BRALLEY, E.E.; HARGROVE, J.L.; GREENSPAN, P.; HARTLE, D.K. Topical anti-inflammatory activities of *Vitis rotundifolia* (muscadine grape) extracts in the tetradecanoylphorbol acetate model of ear inflammation. **Journal of Medicinal Food**, v. 10, p. 636-642, 2007.

BRAND, C.; TOWNLEY, S.L.; FINLAY-JONES, J.J.; HART, P.H. Tea tree oil reduces histamine-induced oedema in murine ears. **Inflammation Research**, v.51, p. 283-289, 2002.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M.E.; BERSSET, C. Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. **Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie**, London, v. 28, p. 25-30, 1995.

BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE, Secretaria de Ciências, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Portaria Interministerial nº 2960 em 9 de dezembro de 2008. Publica o Programa de Nacional de Plantas Mediciniais e Fitoterápicos. **Diário Oficial da União**, 10 de dez. 2008.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RDC nº 14, de 31 de Março de 2010 - Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos / Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brasília: Anvisa, 2010.

BRAVO, L. Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. **Nutrition Review**, v. 56, p. 317-333, 1998.

BREMER, K. Branch support and tree stability. **Cladistics**, v.10, p. 295-304, 1994.

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.*). **Ciências e Tecnologia de Alimentos**, v. 27, p. 902-908, 2007.

BUER, C. S.; IMIN, N.; DJORDJEVIC, M. A. Flavonoids: new roles for old molecules. **Journal of Integrative Plant Biology**, v. 52, p. 98-111, 2010.

BURBACH, G. J.; ANSEL, J. C.; ARMSTRONG, C. A. Cytokines in the skin. In: **The Biology of the Skin**. 1 ed. The New York : Parthenon Publishing Group, p. 299-3319, 2000.

BURSAL, E.; KOKSAL, E., GULÇIN, I.; BILSEIL, G.; GOREN, A.C. Antioxidant activity and polyphenol content of cherry stem (*Cerasus avium L.*) determined by LC-MS/MS. **Food Research International**, v.51, p. 66-74, 2013.

BURT, S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in food – a review. **Internacional Journal of Food Microbiology**, v.94, p. 223-253, 2004.

BUSKUHLE, H.; OLIVEIRA, F.L.; BLIND, L.Z.; FREITAS, R.A.; BARISON, A.; CAMPOS, F.R.; CORILO, Y. E.; EBERLIN, M.N.; CARAMORI, G.F.; BIAVATTI, M.W. Sesquiterpene lactones from *Vernonia Scorpioides* and their in vitro cytotoxicity. **Phytochemistry**, v.71, p. 1539-1544, 2010.

BUTLER, M. S. The Role of Natural Product Chemistry in Drug Discovery. **Journal of Natural Products**. v. 67, p. 2121-2153, 2004.

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

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

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

CALS-GRIERSON, M. M.; ORMEROD, A. D. Nitric oxide function in the skin. **Nitric Oxide**.v. 10, p. 179-193, 2004.

CANCELLI, R. R.; EVALDT, A. C. P.; BAUERMANN, S. G. Contribuição à morfologia polínica da família asteracea martinov. No Rio Grande do Sul – Parte I. **Pesquisas, Botânica**, p. 347-374, 2007.

CANDI, E.; SCHMIDT, R.; MELINO, G. The cornified envelope: A model of cell death in the skin. **Nature review molecular cellular biology**, v. 6, p. 328-340, 2005.

CAO, G.; SOFIC, E.; PRIOR, L. R. Antioxidant and prooxidant behavior of flavonoids: Structure-activity relationships. **Free Radicals in Biology and Medicine**, v. 22, p. 749–760, 1997.

CAO, J., XIA, X., CHEN, X., XIAO, J., WANG, Q. Characterization of flavonoids from *Dryopteris erythrosora* and evaluation of their antioxidant, anticancer and acetylcholinesterase inhibition activities. **Food and Chemical Toxicology**, v. 51, p. 242-250, 2013.

CARNESECCHI, S.; BRAS-GONCALVES, R.; BRADAIA, A.; ZEISEL, M.; GOSSE, F.; POUPON, M.F.; RAUL, F. Geraniol, a component of plant essential oils, modulates DNA synthesis and potentiates 5-fluorouracil efficacy on human colon tumor xenografts. **Cancer Letters**, v. 215, p. 53-59, 2004.

CARVALHO, A. C. B.; BALBINO, E. E.; MACIEL, A.; PERFEITO, J. P. S.. Situação do registro de medicamentos fitoterápicos no Brasil. **Revista Brasileira Farmacognosia**, v. 18, p. 314-319, 2008.

CARVALHO, J. C. T. Inflamação In: SILVA, M. C.; CARVALHO, J. C. T. **Fitoterápicos anti-inflamatórios: Aspectos químicos, farmacológicos e aplicações terapêuticas**. 1ºed. Ribeirão Preto: Tecmedd, p. 408. 2004.

CARVALHO, J. C. T.; GOSMANN, G.; SCHENKEL, E. P. Compostos fenólicos simples e heterosídicos. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 3ª ed., Porto Alegre/Florianópolis, Ed. Universidade/UFRGS/ Ed. UFSC, p. 443-459, 2000.

CARVALHO, J.C.T. Calêndula (*Calendula officinalis* L.). In: CARVALHO, J.C.T. **Fitoterápicos anti-inflamatórios: aspectos químicos, farmacológicos e aplicações terapêuticas**. Ribeirão Preto: Tecmedd, p.257-265, 2004.

CARVALHO, J.C.T.; CASCON, V.; POSSEBON, L.S.; MORIMOTO, M.S.S.; CARDOSO, L.G.V.; KAPLAN, M.A.C.; GILBERT, G. Topical antiinflammatory and analgesic activities of *Copaifera duckei* Dwyer. **Phytotherapy Research**, v.19, p. 946-950, 2005.

CARVALHO, J.C.T.; SILVA, M.F.C.; MACIEL, M.A.M. Investigation of anti-inflammatory and antinociceptive activities of trans-dehydrocrotonin, a 19-nor-clerodane diterpene from *Croton cajucara*. Part 1. **Planta Medicinal**, v. 62, p. 402-404, 1996.

CARVALHO, M.G.; COSTA, P.M.; ABREU, H.S. Flavones from *Vernonia diffusa*. **Journal Brazilian Chemistry Societ**, v. 10, p. 163-166, 1999.

CASTELLANO, G.; GONZÁLEZ-SANTANDER, J.L.; LARA, A.; TORRENS, F. Classification of flavonoid compounds by using entropy of information theory. **Phytochemistry**, article in prees, 2013. <http://dx.doi.org/10.1016/j.phytochem.2013.03.024>.

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

CASTRO, R. D.; FREIRES, I. A.; FERREIRA, D. A. H.; JOVITO, V. C.; PAU, M. Q. Atividade antibacteriana *in vitro* de produtos naturais sobre *Lactobacillus casei*. **Internacional Journal Dentist**, v. 9, p. 74-77, 2010.

CATALÁN, C. A. N.; IGLESIAS, D. I. A.; KAVKA, J.; SOSA, V.E.; HERZ, W. Sesquiterpene lactones and other constituents of *Vernonia molissima* and *Vernonia squamulosa*. **Journal of Natural Products**, v. 49, p. 351-353, 1986.

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 *Oropea enneandra* and isolation of a polyacetylene, lignans, and a tocopherol derivative. **Journal of Natural Products**, v. 61, p. 1497-1501, 1998.

CEVC, G.; VIERL, U. Nanotechnology and the transdermal route. A state of the art review and critical appraisal. **Journal of Controlled Release**, v.141, p.277-299, 2010.

CHAN, L.S. **Animal model of human inflammatory skin diseases**. Boca Raton: CRC.Press, 2004.

CHEN, Y. C.; YANG, L. L.; LEE, T. J. F. Oroxylin A inhibition of lipopolysaccharide-induced iNOS and COX-2 gene expression via suppression of nuclear factor-kB activation. **Biochemical Pharmacology**, v. 59, p. 1445-1457, 2000.

CHIU, Y.; HUANG, T.; CHIU, C.; LU, T.; CHEN, Y.; PENG, W.; CHEN, C. Analgesic and Antiinflammatory Activities of the Aqueous Extract from *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng. Both In Vitro and In Vivo. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v.2012, p.1-11, 2011.

CHOI, J.W.; CHO, E.J.; LEE, D.G.; CHOI, K.; KU, J.; PARK, K-W.; LEE, S. Antibacterial activity of triterpenoids from *Clerodendron trichotomum*. **Journal of Applied Biological Chemistry**, v.55, p. 169-172, 2012.

CHOI, Y. M.; NOH, D. O.; CHO, S. Y.; SUH, H. J.; KIM, K. M.; KIM, J. M. Antioxidant and antimicrobial activities of propolis from several regions of Korea. **LWT - Food Science and Technology**, v. 39, p. 756-761, 2006.

CHORILLI, M.; BRIZANTE, A. C.; RODRIGUES, C. A.; SALGADO, H. R. N. Aspectos gerais em sistemas transdérmicos de liberação de fármacos. **Revista Brasileira de Farmácia**, v. 88, p. 7-13, 2007.

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, p. 421-464, 1998.

CHUONG, C. M.; NICKOLOFF, B. J.; ELIAS, P. M.; GOLDSMITH, L. A.; MACHER, E.; MADERSON, P. A.; SUNDBERG, J. P.; TAGAMI, H.; PLONKA P. M.;

THESTRUPPEDERSON, K.; BERNARD, B. A.; SCHRODER, J. M.; DOTTO, P.; CHANG, C. M.; WILLIAMS, M. L.; FEINGOLD, K. R.; KING, L. E.; KLIGMAN, A. M., REES, J. L.; CHRISTOPHERS, E. What is the “true” function of skin? **Experimental Dermatology**, v. 11, p. 159-187, 2002.

CLARK, A. Natural Products. WILLIAMS, D. LEMKE, T.L. In: **Foye's Principles of Medicinal Chemistry**. 5^o ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2002.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). **Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically**. Approved standard-8th ed., M07-A8. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA. 2009.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). **Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing**. Twenty-Second Information Supplement. M100-S22. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA. 2012.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). **Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts**. Approved standard, 3rd ed., M27-A3. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA. 2009.

COELHO, S.G.C.; HAAS, A.P.S.; VON POSER, G. L.; SCHAPOVAL, E. E. S.; ELISABETSKY, E. Ethnopharmacological studies of antimicrobial remedies in the South of Brazil. **Journal of Ethnopharmacological**, v. 90, p. 135-143, 2004.

COLLINS, M.A.; CHARLES, H.P. Antimicrobial activity of carnosol and ursolic acid: two anti-oxidant constituents of *Rosmarinus officinalis*. **Food Microbiology**, v. 4, p. 311-315, 1987.

CORCORAN M.P.; MCKAY D.L.; BLUMBERG J.B. Flavonoid basics: chemistry, sources, mechanisms of action, and safety. **Journal of Nutrition in Gerontology and Geriatrics**. V. 31, p. 176-89, 2012.

COSTA, J. G.; SOUSA, E. O.; RODRIGUES, F. F. G.; LIMA S. G.; BRAZ-FILHO, R. Composição química e avaliação das atividades antibacteriana e de toxicidade dos óleos essenciais de *Lantana camara* L. e *Lantana* sp. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 19, p. 721-725, 2009.

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

COWAN, M. M. Plant products as antimicrobial agents. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 22, p. 564-582, 1999.

CROTEAU, R.; KUTCHAN, T. M.; LEWIS, N. G. Natural products (secondary metabolism). In: BUCHANAN, B.; GRUISSEM, W.; JONES, R. **Biochemistry & Molecular Biology of Plants**. Somerset: John Wiley and Sons Inc, 2000. p. 1250- 1318.

CRUMMEY, A.; HARPER, G. P.; BOYLE, E. A.; MANGAN, F. R. Inhibition of arachidonic acid-induced ear oedema as a model for assessing topical anti-inflammatory compounds. **Agents and Actions**, v. 20, p. 69-76, 1987.

CUNHA, R. W. **Estudo fitoquímico e ensaios biológicos de *Linchnophora rupestris*, Samir leitão (Vernonia, Compositae)**. Tese (Doutorado). Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Ribeirão Preto, 1989.

CUSHNIE, T.P.; LAMB, A.J. Antimicrobial activity of flavonoids. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 26, p. 343-356, 2006.

CUYCKENS, F.; CLAEYS, M. Mass spectrometry in the structural analysis of flavonoids. **Journal Mass Spectrometry**, v. 39, p. 1-15, 2004.

DA SILVA, S.L.; FIGUEIREDO, P.M.; YANO, T. Chemotherapeutic potential of the volatile oils from *Zanthoxylum rhoifolium* Lam. leaves. **European Journal of Pharmacology**, v. 3, 2007.

DALAZEN, P.; MOLON, A.; BIAVATTI, M. W.; KREUGER, M. R. O. Effects of the topical application of the extract of *Vernonia scorpioides* on excisional wounds in mice. **Revista brasileira de farmacognosia**, vol. 15, p. 82-87, 2005.

DE BERNARDIS, L.; LEONARDI, G.; CARUSO, A.; CUTULI, V.M.; ARNICO-ROXAS, M. Protective effects of papaverine salicylate in mouse ear dermatitis and PAF-induced rat paw edema. **Agents Actions**, v. 42, p. 29-33, 1994.

DE VRY, C.G.; VALDEZ, M.; LAZAROV, M.; MUHR, E.; BUELOW, R.; FONG, T.; IYER, S. Topical application of a novel immunomodulatory peptide, RDP58, reduces skin inflammation in the phorbol ester-induced dermatitis model. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 125, p. 473-481, 2005.

DE YOUNG, L. M., KHEIFETS, J. B., BALLARON, S. J., YOUNG, J. M. Edema and cell infiltration in the phorbol ester-treated mouse ear are temporally separate and can be differentially modulated by pharmacologic agents. **Agents and Actions**, v. 26, p. 335- 341, 1984.

DEL-VECHIO-VIEIRA, G.; BARBOSA M. V. D.; LOPES B. C.; SOUSA, O. V.; SANTIAGO-FERNANDES, L. D. R. Caracterização morfoanatômica de *Ageratum fastigiatum* (Asteraceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, p. 769-776, 2008.

DEWANJEE, S.; KUNDU, M.; MAITI, A.; MAJUNDAR, R.; MAJUNDAR, A.; MANDAL, S. C. *In Vitro* Evaluation of Antimicrobial Activity of Crude Extract from Plants *Diospyros peregrina*, *Coccinia grandis* and *Swietenia macrophylla*. **Tropical Journal of Pharmaceutical Research**, v. 6, p. 773-778, 2007.

DEWICK, P. M. **Medicinal Natural Products: a biosynthetic approach**. 3^oed. Chichester: John Wiley & Sons Ltd. 2009. 539 p.

DEWICK, P. M. **Medicinal Natural Products: a biosynthetic approach**. 2^oed. Chichester: John Wiley & Sons Ltd. 2002. 507 p.

DI STASI, L.C. **Plantas Mediciniais: arte e ciência. Um guia de estudo interdisciplinar**. São Paulo: UNESP, 1996.

DI STASI, L.C.; OLIVEIRA, G.P.; CARVALHAES, M.A.; QUEIROZ-JUNIOR, M.; TIEN, O.S.; KAKINAMI, S.H. Medicinal plants popularly used in Brazilian Tropical Atlantic Forest. **Fitoterapia**, v. 73, p. 69-91, 2002.

DIAS, J.F.G.; VIRTUOSO, S.; DAVET, A.; CUNICO, M.M., MIGUEL, M.D., MIGUEL, O.G.; AUER, C.G.; GRIGOLETTI-JÚNIOR, A.; OLIVEIRA, A.B., FERRONATO, M.L. Atividade antibacteriana e antifúngica de extratos etanólicos de *Aster lanceolatus* Willd. Asteraceae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16, p. 83-87, 2006.

DO VALE, T.G.; FURTADO, E.C.; SANTOS, J.G.; J.R., VIANA, G.S. Central effects of citral, myrcene and limonene, constituents of essential oil chemotypes from *Lippia alba* (Mill.) n.e. Brown. **Phytomedicine**, v. 9, p. 709-714, 2002.

DOMINGUES, V. O.; HÖRNER, R.; REETZ, L. G. B.; KUHN, F.; COSER, V. M.; RODRIGUES, J. N.; BAUCHSPIESS, R.; PEREIRA, V. W.; PARAGINSKI, G. L.; LOCATELLI, A.; FANK, J. O.; GIGLIO, V. F.; HÖRNER, M. In Vitro Evaluation of Triazines: DNA Cleavage, Antibacterial Activity and Cytotoxicity against Acute Myeloid Leukemia Cells. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 21, p. 2226-2237, 2010.

DONNARUMMA, G.; PAOLETTI, I.; BUOMMINO, E.; FUSCO, A.; BAUDOUIN, C.; MSIKA, P.; TUFANO, M. A.; BARONI, A. AV119, a Natural Sugar from Avocado gratissima, Modulates the LPS-Induced Proinflammatory Response in Human Keratinocytes. **Inflammation**, v. 34, p. 568-575, 2011.

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, p. 241-249, 2007.

DUARTE-ALMEIDA, J.M; SANTOS, R.J.; GENOVESE, M.I.; LAJOLO, F.M. Avaliação da atividade antioxidante utilizando sistema β -caroteno/ácido linoleico e método de sequestro de radicais DPPH. **Ciências Tecnológicas de Alimentos**, v. 2, p. 446-452, 2006.

EDENHARDER, R.; GRUNHAGE, D.; Free radical scavenging abilities of flavonoides as mechanism of protection against mutagenicity induced by tert-butyl hydroperoxide or cumene hydroperoxide in *Salmonella typhimurium* TA102. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, p. 1-18, 2003.

EINBOND, L. S.; REYNERTSON, K. A.; LUO, X. D.; BASILE, M. J.; KENNELLY, E. J. Anthocyanin antioxidants from edible fruits. **Food Chemistry**, v. 84, p. 23-28, 2004.

ELSHAFEEY, A. H.; KAMEL, A. O.; FATHALLAH, M. M. Utility of nanosized microemulsion for transdermal delivery of tolterodine tartrate: Ex-vivo permeation and in-vivo pharmacokinetic studies. **Pharmaceutical Research**, v. 26, p. 2446-2453, 2009.

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

ESTEVEZ, M.; SIQUET, C.; GASPARD, A.; RIO, V.; SOUSA, B.J.; REIS, S.; MARQUES, M.P.M.; BORGES, F. A. Antioxidant versus cytotoxic properties of hydroxycinnamic acid

derivatives – A new paradigm in phenolic research. **Archiv der Pharmazie**, v. 3, p. 164-173, 2008.

FABRI, R. L.; NOGUEIRA, M. S.; DUTRA, L. B.; BOUSADA, M. L. M.; SCIO, E. Potencial antioxidante e antimicrobiano de espécies da família Asteraceae. **Revista Brasileira Medicinal**, Botucatu, v. 13, p. 183-189, 2011.

FERGUSON, L. R. Chronic inflammation and mutagenesis. Review. **Mutation Research**, v. 690, p. 3-11, 2010.

FERREIRA, A. O. **Guia Prático da Farmácia Magistral**. 3^oed. São Paulo: Pharmabooks, 2008. p. 277-279.

FIRESTEIN, G. S. Mechanisms of inflammation and tissue repair. GOLDMAN, L.; ANSIELLO, D. **Textbook of Medicine**, 22 ed., p. 227, 2004.

FISEHA, A.; TADESSE, M.; BEKELE, T.; BEDEMO, B. Phytochemical investigations of *Vernonia galamensis* seeds. **Chemistry of Natural Compounds**, v. 46, 2010.

FITZPATRICK, T. B. **Dermatology in General Medicine**. Rio de Janeiro: Revinter, 5^o ed.; p. 70-113, 2005.

FRANKEL, E. N.; HUANG, S. W.; KANNER, J.; GERMAN, J. B. Interfacial phenomena in the evaluation of antioxidants: bulk oils vs emulsions. **Journal Agricultural and food chemistry**, v. 42, p. 1054-1059, 1994.

FREIBURGHANUS, F.; OGWAL, E. N.; NKUNYA, M. H. H.; KAMINSKY, R.; BRUN, R. *In vitro* antitrypanosomal activity of African plants used in traditional medicine in Uganda to treat sleeping sickness. **Tropical Medicine and International Health**, v. 1, p. 765-771, 1996.

FREINKEIL, R. K.; WOODLEY, D. T. Introduction. FREINKEIL, R. K.; WOODLEY, D. T. In: **The Biology of the Skin**. 1^oed. New York: The Parthenon Publishing Group, p. 15-17, 2000.

FREIRE, M. F. I.; ABREU, H. S.; CRUZ, L. C. H.; FREIRE, R. B. Inhibition of fungal growth by extracts of *Vernonia scorpioides* (Lam.) Pers. **Microbiology**, v. 27, p. 1-6, 1996.

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 Medica**, v. 60, p. 21-25, 1994.

FUCHS, E.; RAGHAVAN, S. Getting under the skin of epidermal morphogenesis. **Nature Review Genetics**. v. 3, p. 199-209, 2002.

FUJII, T.; TANAKA, K.; SAKUMA, S.; OHKUBO, Y.; MUTOH, S. Effects of FK506 (tacrolimus hydrate) on chronic oxazolone-induced dermatitis in rats. **European Journal Pharmacology**, v. 456, p. 115-121, 2002.

GÀBOR, M. Models of acute inflammation in the ear. In: WINYARD, P. G.; WILLOUGHBY, D. A. **Inflammation protocols**, New Jersey: Humana Press, p. 129-131, 2003.

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

GÀBOR, M.; RAZGA, Z. Development and inhibition of mouse ear oedema induced with capsaicin. **Agents Actions**, v. 36, p. 83-86, 1992.

GARG, R.; RAMCHANDANI, A.G.; MARU, G.B. Curcumin decreases 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate-induced protein kinase C translocation to modulate downstream targets in mouse skin. **Carcinogenesis**, v. 29, p. 1249-1257, 2008.

GARTNER, L. P.; HIATT, J. L. **Tratado de Histologia**. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan S.A., p. 253-259, 1999.

GELFUSO, G. M. **Desenvolvimento de sistemas de liberação para a administração tópica passiva e iontoforética do minoxidil no tratamento da alopecia androgênica**. 2009. 158f. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2009.

GILLITZER, R., GOEBELER, M. Chemokines in cutaneous wound healing. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 69, p. 513-521, 2001.

GILROY, D. W.; LAWRENCE, T.; PERETTI, M.; ROSSI, A. G. Inflammatory resolution: new opportunities for drug discovery. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 3, p. 401-416, 2004.

GNIADECKI, R. Regulation of keratinocyte proliferation. **General Pharmacology**, v. 30, p. 619-622, 1998.

GOADSBY, P.J.; LIPTON, R.B.; FERRARI, M.D. Migraine: current understanding and treatment. **New England Journal of Medical**, v. 336, p. 257-270, 2002.

GOMIG, F.; PIETROVSKI, E.F.; GUEDES, A.; DALMARCO, E.M.; CALDERARI, M.T.; GUIMARÃES, C.L.; PINHEIRO, R.M.; CABRINI, D.A.; OTUKI, M.F. Topical anti-inflammatory activity of *Serjania erecta* Radlk (Sapindaceae) extracts. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 118, p. 220-224, 2008.

GUEDES, M.M.; CUNHA, A.N.; SILVEIRA, E.R.; RAO, V.S. Antinociceptive and gastroprotective effects of diterpenes from the flower buds of *Egletes viscosa*. **Planta Medica**, v. 68, n. 11, p. 1044-1046, 2002.

GUPTA, M.; MAZUMDER, U. K.; MANIKANDAN, L.; BHATTACHARYA, S.; HALDAR, P. K.; ROY, S. Evaluation of antipyretic potential of *Vernonia cinerea* extract in rats. **Phytomedicine**. v.17, p. 804-806, 2003.

GUYTON AC & HALL JE. **Tratado de fisiologia médica**. 9ª ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, p. 1014, 1997.

HAAKE, A.; SCOTT, G. A.; HOLBROOK, K. A. Structure and function of the skin: overview of the epidermis and dermis. FREINKEIL, R. K.; WOODLEY, D. T In: **The Biology of the Skin**, p.15-17, 1ª ed. New York: The Parthenon Publishing Group, 2000.

HAAS, N. K.; HERLYN, M. Normal Human Melanocyte Homeostasis as a Paradigm for Understanding Melanoma. **JID Symposium Proceedings**, v.10, p. 2, 2005.

HANASAKI, Y., OGAWA, S., FNKUI, S.; The correlation between active oxygens scavenging and antioxidative effects of flavonoids. **Free Radical Biology Medicine**, v.16, p. 45-850, 1994.

HARRIS, M. I. N. C. **Pele: estrutura, propriedades e envelhecimento**. 3ª edição. São Paulo: Senac, São Paulo. 353 p. 2009.

HAUSDORFF, W. P.; FEIKIN, D R.; KLUGMANN, K. P. Epidemiological differences among Pneumococcal serotypes. **Lancet Infectious Diseases**, v. 5, p. 83-93, 2005.

HEIDEN, G.; BARBIERI, R. L.; WASUM, R. A.; SCUR, L.; SARTORI, M. A família Asteraceae em São Mateus do Sul, Paraná. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 5, p. 249-251, 2007.

HERNÁNDEZ, I.; MÁRQUEZ, L.; MARTÍNEZ, I.; DIEGUEZ, R.; DELPORTE, C.; PRIETO, S.; MOLINA-TORRES, J.; GARRIDO, G. Anti-inflammatory effects of ethanolic extract and alkaloids-derived from *Heliopsis longipes* roots. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 124, p. 649-652, 2009.

HILÁRIO, M. O. E., TERRERI, M. T., LEN, C. A. Anti-inflamatórios não-hormonais: inibidores da ciclooxigenase 2. **Jornal de Pediatria**, v. 82, 2006.

HIRUMA-LIMA, C.A.; TOMA, W.; GRACIOSO, J.D.E.S.; DE ALMEIDA, A.B.; BATISTA, L.M.; MAGRI, L.; DE PAULA, A.C.; SOARES, F.R.; NUNES, D.S.; SOUZA BRITO, A.R. Natural trans-crotonin: the antiulcerogenic effect of another diterpene isolated from the bark of *Croton cajucara* Benth. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**; v. 25, p. 452-456, 2002.

HOFSETH, L.J. Nitric oxide as a target of complementary and alternative medicines to prevent and treat inflammation and cancer. **Cancer Letter**, Amsterdã, v. 268, p. 10-30, 2008.

HORDEGEN, P.; The anthelmintic efficacy of five plant products against gastrointestinal trichostrongyloids in artificially infected lambs. **Veterinary Parasitology**, v. 17, p. 51-60, 2003.

HUANG, D.; OU, B.; PRIOR, R. The chemistry behind antioxidant capacity assays. **Journal Agricultural Food Chemistry**, v. 53, p. 1841-1856, 2005.

HUANG, S.W.; FRANKEL, E.N.; SCHWARZ, K.; AESCHBACH, R.; GERMAN, J.B. Antioxidant activity of carnosic acid and methyl carnosate in bulk oils and oil-in-water emulsions. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.44, p. 2951-2956, 1996.

HUMES, J. L.; OPAS, E. E.; BONNEY, R. J. Arachidonic acid metabolites in mouse ear oedema. LEWIS, A. e CAPETOLA, R. In: **Advances in Inflammations Research I**. New York: Raven Press, p. 57-65, 1986.

IKAWA, M.; SCHAPER, T. D.; DOLLARD, C. A.; SASNER, J. J. Utilization of Folin-Ciocalteu phenol reagent for the detection of certain nitrogen compounds. **Journal of Agricultura and Food Chemistry**, v. 51, p.1811-1815, 2003.

INNGJERDINGEN, K. T.; MESKINI, S.; AUSTARHEIM, I.; BALLO, N.; INNGJERDINGEN, M.; MICHAELSEN, T. E.; DIALLO, D.; PAULSEN, B. S. Chemical and biological characterization of polysaccharides from wild and cultivated roots of *Vernonia kotschyana*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 139, p. 350-358, 2012.

IWALEWA, E. O.; IWALEWA, O. J.; ADEBOYE, J. O. Analgesic, antipyretic, anti-inflammatory effects of methanol, chloroform and ether extracts of *Vernonia cinerea* less leaf. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 86, p. 229-234, 2003.

IWAMOTO, M.; OHTSU, H.; TOKUDA, H.; NISHINO, H.; MATSUNAGA, S.; TANAKA, R. Anti-tumor promoting diterpenes from the stem bark of *Thuja standishii* (Cupressaceae). **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 9, p. 1911-1921, 2001.

IZQUIERDO, R.; ASTUDILLO, L.; RODRIGUEZ, J.Á.; THEODULOZ, C.; PALENZUELA, J.Á.; SCHMEDA-HIRSCHMANN, G. Gastroprotective effect and cytotoxicity of labdenamides. **Planta Medicinal**, v. 73, p. 310-317, 2007.

JACOBS, H.; BUNBURY, M.; McLEAN, S. Tricin from *Vernonia rematiflora*. **Journal of Natural products**, v. 49, p. 1164, 1986.

JOLY, A. **Botânica: introdução à taxonomia vegetal**. 12^a ed., São Paulo: Companhia Editora Nacional, 1998.

KALE, M.; MISAR, A.V.; DAVE, V.; JOSHI, M.; MUJUMDAR, A.M. Anti-inflammatory activity of *Dalbergia lanceolaria* bark ethanol extract in mice and rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 112, p. 300-304, 2007.

KAMAKAR, J.; MUKHOPADHYAY, S.K. Study of antimicrobial activity and root symbionts of *Hemionitis arifolia*. **Physiology and Molecular Biology of Plants**, v. 17, p. 199-202, 2011.

KEDE, M. P. V.; SABATOVICH, O. **Dermatología Estética**. São Paulo: Atheneu, P. 3-8, 2004.

KELLY, M.; KWANG, J. M.; KUBES, P. Modulating leukocyte recruitment in inflammation. **Journal of Allergy and Clinical Immunologic**, v. 120, p. 3-10, 2007.

KHALILI, H.; SOLTANI, R.; NEGAHBAN, S.; ABDOLLAHI, A.; GHOLAMI, K. Reliability of Disk Diffusion Test Results for the Antimicrobial Susceptibility Testing of Nosocomial Gram-positive Microorganisms: Is E-test Method Better? **Iranian of Pharmaceutical Research**, v. 11, p. 559-563, 2011.

KINSELLA, J.E. α -Linolenic acid: functions and effects on linolenic acid metabolism and eicosanoid-mediated reactions. **Advances in Food and Nutrition Research**, v. 35, p. 1-184, 1991.

KIPLIMO, J. J.; KOORBANALLY, N. A.; CHENIA, H. Triterpenoids from *Vernonia auriculifera* Hiern exhibit antimicrobial activity. **African Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 5, p. 1150-1156, 2011.

KLEIN, T.W.; NEWTON, C.A. Therapeutic potential of cannabinoid-based drugs. *Adv Exp Medical and Biological*, v. 601, p. 395-413, 2007.

KOGAN, A; GARTI, N. Microemulsions as transdermal drug delivery vehicles. *Advances in Colloid and Interface Science*, v.123-126, p. 369-385, 2006.

KOLEVA, I.I.; VAN BEEK, T.A.; LINSSEN, J.P.H.; GROOT A.; EVSTATIEVA, L.N. Screening of plant extracts for antioxidant activity: a comparative study on three testing methods. *Phytochemical Analysis*, Oak Ridge, v.13, p. 8-17, 2002.

KORKINA, L. G.; PASTORE, S.; LUCA, C.; KOSTYUK, V. A. Metabolism of plant polyphenols in the skin: beneficial versus deleterious effects. *Current Drug Metabolism*. v.9 p. 10-29, 2009.

KOSTER, M. I.; ROOP, D. R. Genetic pathways required for epidermal morphogenesis. *European Journal of Cellular Biology*, v. 83, p. 625-629, 2004.

KULKARNI, S.K.; DHIR, A. Cyclooxygenase in epilepsy: from perception to application. *Drugs Today*, v. 45, p.135-154, 2009.

KUMAR, V.; ABBAS, A. K.; FAUSTO, N. **Patologia: bases patológicas das doenças**. 7^oed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2005.

KUNDU, J.K.; HWANG, D.M.; LEE, J.C.; CHANG, E.J.; SHIN, Y.K.; FUJII, H.; SUN, B.; SURH, Y.J. Inhibitory effects of oligonol on phorbol ester-induced tumor promotion and COX-2 expression in mouse skin: NF κ B and C/EBP as potential targets. *Cancer Letters*, v. 273, p. 86-97, 2009.

KUPELI, E.; ERDEMOGLU, N.; YESILADA, E.; SENER, B. Antiinflammatory and antinociceptive activity of taxoids and lignans from the heartwood of *Taxus baccata* L. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 89, p. 265-270, 2003.

KUPPER, T.S. The role of epidermal cytokines. In: SHEVACH, E. e OPPENHEIM, **Immunophysiology: The role of cells and cytokines in immunity and inflammation**. New York:Oxford University Press, p. 285-305, 1990.

LAPA, A. J.; SOUCCAR, C.; LANDMAN, M. T. R. L.; GODINHO, R. O.; NOGUEIRA, T. C. M. L. Farmacologia e toxicologia. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. (Org). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5^o. ed. Porto Alegre/Florianópolis: UFRGS/UFSC, 2004. p. 250-261.

LAWRENCE, T.; GILROY, D. W. Chronic inflammation: a failure of resolution? *International Journal of Experimental Pathology*, v. 88, p. 85-94, 2007.

LAWRENCE, T.; WILLOUGHBY, D. A.; GILROY, D. W. Anti-inflammatory lipid mediators and insights into the resolution of inflammation. *Nature Reviews Immunology*, v. 2, p. 787-795, 2002.

LEE do, Y.; CHOO, B.K.; YOON, T.; CHEON, M.S.; LEE, H.W.; LEE, A.Y.; KIM, H.K. Anti-inflammatory effects of *Asparagus cochinchinensis* extract in acute and chronic cutaneous inflammation. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 121, p. 28-34, 2009.

LEE, D.Y.; CHOI, G.; YOON, T.; CHEON, M.S.; CHOO, B.K.; KIM, H.K. Anti-inflammatory activity of *Chrysanthemum indicum* extract in acute and chronic cutaneous inflammation. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 123, p. 149-154, 2009.

LEE, J. L.; MUKHTAR, H.; BICKERS, D. R.; KOPELOVICH, L.; ATHAR, M. Cyclooxygenase in the skin: pharmacological and toxicological implications. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 192, p. 294-306, 2003.

LEHNINGER, A.L.; NELSON, D.L. & COX, M.M. **Princípios de bioquímica**. 2ª ed., Sarvier, São Paulo, 1995. 839 p.

LEITÃO, S. G.; CASTRO, O.; FONSECA, E. M.; JULIÃO, L. S.; TAVARES, E. S.; LEO, R. R. T.; VIEIRA, R. C.; OLIVEIRA D. R.; LEITÃO, G. G.; MARTINO, V.; SULSEN, V.; BARBOSA, Y. A. G.; PINHEIRO, D. P. G.; SILVA, P. E. A.; TEIXEIRA, D. F.; LOURENÇO, M. C. S. Screening of Central and South American plant extracts for antimycobacterial activity by the Alamar Blue test. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16, p. 6-11, 2006.

LEITE, J. P. V. **Estudo fitoquímico de folhas de *Maytenus illicifolia* Mart. Ex Reis. E variação sazonal e intra-específica de polifenóis em populações nativas**. Tese de Doutorado. Departamento de Química/UFMG, 299p. 2002.

LEITE, S.N.; PALHANO, G.; ALMEIDA, S.; BIAVATTI, M.W. Wound healing activity and systemic effects of *Vernonia scorpioides* extract in guinea pig. **Fitoterapia**, v.73, p. 496-500, 2002.

LEONARD, E., YAN, Y., FOWLER, Z.L., LI, Z., LIM, C.G., LIM, K.H., KOFFAS, M.A. Strain improvement of recombinant *Escherichia coli* for efficient production of plant flavonoides. **Molecular Pharmaceutics**, v. 5, p. 257-265, 2008.

LI, J.; CHEN, J. Kirsner R. Pathophysiology of acute wound healing. **Clinics Dermatology**. v.25. p. 9-18, 2007.

LIEBGOTT, T.; MIOLLAN, M.; BERCHADSKY, Y.; DRIEU, K.; CULCASI, M.; PIETRI, S. Complementary cardioprotective effects of flavonoid metabolites and terpenoid constituents of *Ginkgo biloba* extract (EGb 761) during ischemia and reperfusion. **Basic Research in Cardiology**, v. 95, p. 368-377, 2000.

LIEW, F.Y. The role of innate cytokines in inflammatory response. **Immunology Letters**, v. 85, p. 131-134, 2003.

LIM, H.; PARK, H.; KIM, H. P. Inhibition of contact dermatitis in animal models and suppression of proinflammatory gene expression by topically applied flavonoid, wogonin. **Archives of Pharmacol Research**. v. 27, p. 442-448, 2004.

LIMA, A.B. Estudos da ação antinociceptiva e antiinflamatória do 1-nitro-2-feniletano, principal constituinte da *Aniba canelilla*. 2008. 69 f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Pará, Belém, 2008.

LIMA, G. R. M.; MONTENEGRO, C. A.; ALMEIDA, C. L. F.; ATHAYDE-FILHO, P. F.; BARBOSA-FILHO, J. M.; BATISTA, L. M. Database Survey of Anti-Inflammatory Plants in South America: A Review. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 12, p. 2692-2749, 2011.

LIMA, L.R.P.; OLIVEIRA, T.T.; NAGEM, T.J.; PINTO, A. S.; STRINGHETA, P.C.; TINOCO, A.L.A.; SILVA, J.F. Bixina, Norbixina e Quercetina e seus efeitos no metabolismo lipídico de coelhos. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 38, p. 196-200, 2001.

LIMA, R. R.; COSTA, A. M. R.; SOUZA, R. D.; GOMES-LEAL, W. Inflamação em doenças neurodegenerativa. **Revista Paranaense de Medicina**, v.21, n.2, p.29-33, 2007.

LOB, Alessandra. **Seleção sexual e evolução de capítulos em Asteraceae**. Minas Gerais, 2007.69p. Dissertação de Mestrado - Programa de Pós Graduação em Biologia Universidade do Vale do Rio dos Sinos.

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

LOPES, A. R. A.; VARGAS, M. L. S.; CAVALCANTI, A. S. S.; SILVA, A. G. Plantas e seus extratos-administração e biodisponibilidade de fitoterápicos aplicados na pele. **Natureza on line**, p. 62-66, 2006. Disponível em: http://www.naturezaonline.com.br/natureza/conteudo/pdf/04_LopesARAetal.pdf. Acesso em 14 de Agosto de 2012.

LOPES, J. L. C. Sesquiterpenes lactones from *Vernonia*. **Memorial Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 86, p. 227-230, 1991.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. **Plantas Mediciniais no Brasil: Nativas e Exóticas**. 3ºed. São Paulo, Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2002. 512p.

LUO, P.; ZHANG, Z.; YI, T.; ZHANG, H.; LIU, X.; MO, Z. Anti-inflammatory activity of the extracts and fractions from *Erigeron multiradiatus* through bioassay-guided procedures. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 119, p. 232 -237, 2008.

M. N. V. Role of antioxidants in prophylaxis and therapy: A pharmaceutical perspective. **Journal of Controlled Release**, v. 113, p.189-207, 2006.

MACGLASHAN, D. Jr. Histamine: A mediator of inflammation. **The Journal of allergy and clinical Immunology**, v. 112, p. 53-59, 2003.

MACGOWAN, P.A. Clinical implications of antimicrobial resistance for therapy. **Journal of antimicrobial chemotherapy**, v. 62, p. 105-114, 2008.

MADISON, K. C. Barrier function of the skin: “La Raison d’etre” of epidermis. **Journal of Investigative Dermatology**, Baltimore, v. 121, p. 231-241, 2003.

MAHATO, S.B.; SARKAR, S.K.; PODDAR, G. Triterpenoid saponins. **Phytochemistry**, v. 27, p. 3037-3067, 1988.

MAIA, A. I. V.; TORRES, M. C. M.; PESSOA, O. D. L. Óleos essenciais das folhas de *Vernonia Remotiflora* e *Vernonia Brasiliana*: composição química e atividade biológica. **Química Nova**, São Paulo, v. 33, p. 584-586, 2010.

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. M.; ALBUQUERQUE, M. R. J. R. Óleos essenciais das folhas de *Vernonia remotiflora* e *Vernonia brasiliana*: composição química e atividade biológica. **Química Nova**, v. 33, p. 584-586, 2010.

MAKRANTONAKI, E.; ZOUBOULIS, C. C. The skin as a mirror of the aging process in the human organism - State of the art and results of the aging research in the German National Genome Research Network 2 (NGFN-2). **Experimental Gerontology**, v. 42, p. 879-886, 2007.

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

MÁÑEZ, S.; RECIO, M.C.; GINER, R.M.; RÍOS, J.L. Effect of selected triterpenoids on chronic dermal inflammation. **European Journal of Pharmacology**, v. 334, p. 103-105, 1997.

MANTENA, R.K.R.; WIJBURG, O.L.C.; VINDURAMPULLE, C.; BENNETT-WOOD, V.R.; WALDUCK, A.; DRUMMOND, G.R.; DAVIES, J.K.; ROBINS-BROWNE, R.M.; STRUGNELL, R.A. R. Reactive oxygen species are the major antibacterials against *Salmonella typhimurium* purine auxotrophs in the phagosome of RAW 264.7 cells. **Cellular Microbiology**, v. 10, p. 1058-1074, 2008.

MARSON, C.V.; BOAS, E.V.; ZAMUNER, S.; SALVADOR, M.J. Preparo de uma formulação tópica e avaliação antiinflamatória do extrato *Blutaparon portulacoides*. **XIII Encontro Latino Americano de Iniciação Científica e IX Encontro Latino Americano de Pós-Graduação** – Universidade do Vale do Paraíba, 2011.

MARZZOCO, A.; TORRES, B.B. **Bioquímica básica**. 2ªed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 1999. 360 p.

MATHUR, V.; SATRAWALA, Y.; RAJPUT, M. S. Physical and chemical penetration enhancers in transdermal drug delivery system. **Asian Journal of Pharmaceutics**, v. 4, p. 173-183, 2010.

MAZUMDER, U. K.; GUPTA, M.; MANIKANDAN, L.; BHATTACHARVA, S.; HALDAR, P. K.; ROY, S. Evaluation of anti-inflammatory activity of *Vernonia cinerea* Less. extract in rats. **Phytomedicine**, v. 10, p. 185-188. 2003.

MBOSSO, E. J. T.; NGOUELA, S.; NGUEDIA, J. C. A.; BENG, V. P.; ROHMER, M.; TSAMO, E. *In vitro* antimicrobial activity of extracts and compounds of some selected medicinal plants from Cameroon. **Journal of ethnopharmacology**, v. 128, p. 476-481, 2012.

MCCLORY, Paul G.(Churchill, GB), ATKINSON, Anthony (Salisbury,GB) 2010 Use of naturally occurring epoxidised molecules from Vernonia galemensis United States Vernolix Limited (London.GB) 7803409. Disponível em: <http://www.freepatentsonline.com/7803409.html>. Acesso em 12/03/2012.

MCINTURFF, J. E.; MODLIN, R. L.; KIM, J. The role of Toll-like receptors in the pathogenesis and treatment of dermatological diseases. **Journal Investigative Dermatology**, v. 125, p. 1-8, 2005.

MENDES, D. A. G. B.; HORINOUCI, C. D. S.; PRUDENTE, A. S.; SOLEY, B. S.; ASSREUY, J.; OTUKI, M. F.; CABRINI, D. A. *In vivo* participation of nitric oxide in hyperproliferative epidermal phenomena in mice. **European Journal of Pharmacology**, v. 687, p. 1-8, 2012.

MENDES, Daniel Augusto Gasparin Bueno. **Participação do Óxido Nítrico no Fenômeno de Hiperproliferação da Epiderme em Camundongos**. Curitiba, 2009. Dissertação. Program de Pós-Graduação em Farmacologia, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Paraná.

MENDONÇA, D. E.; ONOFRE, S. B. Atividade antimicrobiana do óleo-resina produzido pela copaiba - *Copaifera multijuga* Hayne (Leguminosae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 19, p. 577-581, 2009.

MENSOR, L.L.; MENEZES, F.S.; LEITÃO, G.G.; REIS, A.S.; 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, p. 127-130, 2001.

MERFORT, I. Arnica: new insights on the molecular mode of action of a traditional medicinal plant. **Forsch Komplementarmed Klass Naturheilkd**. v. 10, p. 45- 48, 2003.

MEURER, R.; OPAS, E.E.; HUMES, J.L. Effects of cyclooxygenase and lipoxygenase inhibitors on inflammation associated with oxazolone-induced delayed hypersensitivity. **Biochemical Pharmacology**, v. 37, p. 3511-3514, 1988.

MOLYNEUX, P. The use of the stable free radical diphenylpicryl-hydrazil (DPPH) for estimating antioxidant activity. **Journal of Science and Technology**, v. 26, p. 211-219, 2003.

MONDIN, C. A. 2006. **Riqueza genérica e dados biogeográficos das asteráceas brasileiras. Os avanços da Botânica no início do século XXI: morfologia, fisiologia, taxonomia, ecologia e genética**. 1ºed. Conferências Plenárias e Simpósios do 57º Congresso Nacional de Botânica. Porto Alegre: Pallotti.

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

MONTENEGRO, M. R.; FRANCO, M. **Patologia: Processos Gerais**. 4° ed. São Paulo: Atheneu, p.109-151, 2008.

MOON, J. K.; SHIBAMOTO, T. Antioxidant assays for plant and food components. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, p. 1655-1666, 2009.

MOTA, C. S.; FREITAS, R. B.; ATHAYDE, M. L.; BOLIGON, A. A.; AUGUSTI, P. R.; SOMACAL, S.; ROCHA, M. P.; BAUERMAN, L. F. Effect of *Vernonia cognate* on oxidative damage induced by ethanol in rats. **Human and Experimental Toxicology**, p. 675-684, 2010.

MOVAT, H. Z. **The Inflammatory Reaction**. Oxford: Elsevier. 1985, p.49-71.

MURAKAWA, M.; YAMAOKA, K.; TANAKA, Y.; FUKUDA, Y. Involvement of tumor necrosis factor (TNF)-alpha in phorbol ester 12-Otetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA)-induced skin edema in mice. **Biochemical Pharmacology**, v. 71, p. 1331-1336, 2006.

MUREGI, F. W.; CHABRA, S. C.; NJAGI, E. N.; LANG'AT-THORUWA, C. C.; NJUE, W. M.; ORAGO, A. S.; OMAR, S. A.; NDIEGE, I. O. In vitro antiplasmodial activity of some plants used in Kisii, Kenia against malaria and their chloroquine potencial effects, **Journal of Ethnopharmacology**, v. 84, p. 235-239, 2003.

MURI, E. M. F.; SPOSITO, M. M. M.; METSAVAHT, L. Anti-inflamatórios não-esteróidais e sua farmacologia local. Artigo de revisão. **Acta Fisiátrica**, v. 16, p. 186-190, 2009.

NABAS, F.; CONTESINI, F.J.; MENIN, S.E.A.; ANTÔNIO, M.A.; BIGHETTI, A.E.; ARAÚJO, C.E.P.; CARVALHO, P.O. Efeito antiedematogênico de óleos contendo ácidos graxos ômega 3 e 6 em camundongos. **Revista Brasileira de Medicina**, v. 66, p. 92-96, 2009.

NACZK, M.; SHAHIDI, F. Extraction and analysis of phenolics in food. **Journal chromatography A**, p. 95-111, 2004.

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

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

NEPOMUCENO, R. **Viagem ao fabuloso mundo das especiarias**. 4ª edição. Rio de Janeiro: Ed. José Olympio, 2005.

NERGARD, C. S.; MATSUMOTO, T.; INNGJERDINGEN, M.; INNGJERDINGEN, K.; HOKPUTSAS, S.; HARDING, S. E.; MICHAELSEN, T. E.; DIALLO, D.; KIYOHARA, H.; PAULSEN, B. S.; YAMADA, H. Structural and immunological studies of a pectin and a pectic arabinogalactan from *Vernonia kotschyana* Sch. Bip. Ex Walp. (Asteraceae). **Carbohydrate Research**, v. 340, p. 115-130, 2005.

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. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 91, p. 141-152, 2004.

NEUKIRCH, H.; D'AMBROSIO, M.; SOSA, S.; ALTINIER, G.; DELLA LOGGIA, R.; GUERRIERO, A. Improved anti-inflammatory activity of three new terpenoids derived, by systematic chemical modifications, from the abundant triterpenes of the flowery plant *Calendula officinalis*. **Chemical Biodiversity**, v. 2, p. 657-671, 2005.

NIERO, R. Fármacos, Fitofármacos e Fitoterápicos: Abordagem Econômica e de Mercado. In: BRESOLIN, T. M.; CECHINEL- FILHO, V. (Org.). **Fármacos e Medicamentos: uma abordagem multidisciplinar**. São Paulo: Santos, 2009.

NIERO, R.; MALHEIROS, A.; BITTENCOURT, C. M. S.; BIAVATTI, M. W.; LEITE, S. N.; CECHINEL FILHO, V. Aspectos químicos e biológicos de plantas medicinais e considerações sobre fitoterápicos. In: CECHINEL FILHO, V.; BRESOLIN, T. M. B. **Ciências químico-farmacêuticas: Contribuição ao desenvolvimento de novos fármacos e medicamentos**. Itajaí: UNIVALI, 2003. p. 11-56.

NIJVELDT, R. J.; NOOD, E.; HOORN, D. E. C.; BOELENS, P. G.; NORREN, K.; LEEUWEN, P. A. M. Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 74, p. 418–425, 2001.

NIU, K. Y.; RO, J. Y. Changes in intramuscular cytokine levels during masseter inflammation in male and female rats. **Neuroscience letters**, v. 487, p. 223-227, 2011.

NORRIS, D. A. Structure and function of the skin. GOLDMAN, L.; ANSIELLO, D. **Textbook of Medicine**, 22 ed., p. 2444-2446, 2004.

NUALKAEW, S.; RATTANAMANEE, K.; THONGPRADITCHOTE, S.; WONGKRAJANG, Y.; NAHRSTEDT, A. Anti-inflammatory, analgesic and wound healing activities of the leaves of *Memecylon edule* Roxb. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 121, p. 278-281, 2009.

NWANGWU, S.; OFUSORI, D. A.; JOSIAH, S.; AMEGOR, O. F.; NJOYA, H.; AYOKA, A. O. The effects of aqueous and and ethanolic leaf extracts of *Vernonia amygdalina* on some vital organs in adult Wistar rats. **Journal of Cell & Molecular Biology**, v. 9, p. 75-82, 2011.

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

OLIVEIRA, A. C. **Fitoterápico: perfil fitoquímico, controle e validação de metodologia analítica**. 2005. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2005.

OLIVEIRA, C. M. B.; SAKATA, R. K.; ISSY, A. M.; GEROLA, L. R.; SALOMÃO, R. Citocinas e dor. **Revista Brasileira de Anestesiologia**, v. 61, p. 255-265, 2011.

OLIVEIRA, D. G.; PRINCE, K. A.; HIGUCHI, C. T.; SANTOS, A. C. B.; LOPES, L. M. X.; SIMOES, M. J. S.; LEITE, C. Q. F. Antimycobacterial activity of some Brazilian indigenous medicinal drinks. **Journal of Basic and Applied Pharmaceutical Sciences**, v. 28, p. 165-169, 2007.

OLIVEIRA, G. L.; OLIVEIRA, A. F. M.; ANDRADE, L. H. C. Plantas medicinais utilizadas na comunidade urbana de Muribeca, Nordeste do Brasil. **Acta Botânica Brasileira**, v.24, p. 571-577, 2010.

OLIVEIRA, I. O.; ALMEIDA JUNIOR, H. L. Conhecimentos atuais sobre a biologia dos melanócitos no folículo piloso humano. **Anais Brasileiros da Dermatologia**, Rio de Janeiro, v. 78, 2003.

OLIVEIRA, M.L.M.;VERDE,I.A.L.;PINHEIRO,D.C.S.N. Inflamação induzida por óleo essencial de *Lippia sidoides* Cham. (Verbenaceae): proposta de novo modelo experimental. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, 2009.

ORHAN, D.D.; KUPELI, E.; YESILADA, E.; ERGUN, F. Anti-inflammatory and antinociceptive activity of flavonoids isolated from *Viscum album* ssp. *Album*. **Zeitschrift fur Naturforschung C journal of Biosciences**, v. 61, p. 26-30, 2006.

OSTROSKY, E. A.; MIZUMOTO, M. K.; LIMA, M. E. L.; KANEKO, T. M.; NISHIKAWA, S. O.; FREITAS, B. R. Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da Concentração Mínima Inibitória (CMI) de plantas medicinais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, p. 301-307, 2008.

OTUKI, M. F.; BERNARDI, C. A.; PRUDENTE, A. S.; LASKOSKI, K.; GOMIG, F.; HORINOUCI, C. D. S.; GUIMARÃES, C. L.; FERREIRA, J.; DELLE-MONACHE, F.; CECHINEL-FILHO, V.; CABRINI, D. A. *Garcinia gardneriana* (Planchon & Triana) Zappi. (Clusiaceae) as a Topical Anti-inflammatory Alternative for Cutaneous Inflammation. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, v. 109, p. 56-62, 2011.

OTUKI, M.F.; VIEIRA-LIMA, F.; MALHEIROS, A.; YUNES, R.A.; CALIXTO, J.B. Topical antiinflammatory effects of the ether extract from *Protium kleinii* and alpha-amyrin pentacyclic triterpene. **European Journal of Pharmacology**, v. 507, p. 253-259, 2005.

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

PANNALA, A.S.; CHANT, T.S.; O'BRIEN, P.J.; RICE-EVANS, C.A. Flavonoid-b-ring chemistry and antioxidant activity: fast reaction kinetics. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 282, p. 1161-1168, 2001.

PANTHONG, A.; NORKAEW, P.; KANJANAPOTHI, D.; TAESOTIKUL, T.; ANANTACHOKE, N.; REUTRAKUL, V. Antiinflammatory, analgesic and antipyretic activities of the extract of gamboges from *Garcinia hanburyi* Hook f. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 111, p. 335-340, 2007.

PARK, J.H.; LEE, C.K.; HWANG, Y.S.; PARK, K.K.; CHUNG, W.Y. Hemin inhibits cyclooxygenase-2 expression through nuclear factor-kappa B activation and ornithine decarboxylase expression in 12-Otetradecanoylphorbol- 13-acetate-treated mouse skin. **Mutation Research**, v. 642, p. 68-73, 2008.

PASCUAL, G.; GLASS, C. K. Nuclear receptor versus inflammation: mechanisms of transrepression. **Trends in Endocrinology and Metabolism**, v. 17, p. 321-328, 2006.

PASSOS, G. F.; FERNANDES, E. S.; DA CUNHA, F. M.; FERREIRA, J.; PIANOWSKI, L. F.; CAMPOS, M. M.; CALIXTO, J. B. Anti-inflammatory and anti-allergic properties of the essential oil and active compounds from *Cordia verbenacea*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 110, p. 323-333, 2007.

PATOCHKA, J. Biologically active pentacyclic triterpenes and their current medicine signification. **Journal of Applied Biomedicine**, v. 1, p. 7-12, 2003.

PENA, M. **Dicionário brasileiro de plantas medicinais: descrição das plantas medicinais indígenas e das exóticas aclimatadas no Brasil**. 3ªed. Rio de Janeiro: Komos, 1946, p. 376.

PENNA, C.; MARINO, S.; VIVOT, E.; CRUANES, M.C.; MUNOZ, J.D.; CRUANES, J.; FERRARO, G.; GUTKIND, G.; MARTINO, V. Antimicrobial activity of Argentine plants used in the treatment of infectious diseases. Isolation of active compounds from *Sebastiania brasiliensis*. **Journal Ethnopharmacology**, v. 77, p. 37-40, 2001.

PETERSDORF, R.G.; ADAMS, R.D.; BRAUNWALD, E.; ISSELBACHER, K.J; MARTINS, J.B.; WILSON, J.D. **Harrison medicina interna**. Editora Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 1984. Vol.1, 1407p.

PICMAN, A.K., Biological activities of sesquiterpene lactones. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 14, p. 255-281, 1986.

PINTO, A. C.; SILVA, D. H. S.; BOLZANI, V. S.; LOPES, N. P.; EPIFANIO, R. A. Produtos naturais: atualidade, desafios e perspectivas. **Quimica Nova**, v. 25, p. 45-61, 2002.

PORTER, W.L. Paradoxical behavior of antioxidants in food and biological systems. **Toxicology and Industrial Health**, v. 9, p. 93-122, 1993.

POSSE, Juliana Costa. **Plantas medicinais utilizadas pelos usuários do SUS nos bairros de Paquetá e Santa Teresa: Uma abordagem etnobotânica**. Rio de Janeiro, 2007. Dissertação. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Farmácia Universidade Federal do Rio de Janeiro.

POTAPOVICH, A. I.; LULLI, D.; FIDANZA, P.; KOSTYUK, V. A.; LUCA, C.; PASTORE, S.; KORKINA, L. G. Plant polyphenols differentially modulate inflammatory responses of human keratinocytes by interfering with activation of transcription factors NFκB and AhR and EGFR–ERK pathway. **Toxicology and Applied Pharmacology**. v. 255, p. 138-149, 2011.

PRICE, K.R.; JOHNSON, I.T.; FENWICK, G.R.; MALINOW, M.R. The chemistry and biological significance of saponins in foods and feedingstuffs. **Food Science and Nutrition**, v. 26, p. 27-135, 1987.

PRISTA L. N.; Bahia M. F.; Vilar, E. **Dermofarmácia e cosmética**, Lisboa:editora ANF, 1995. p. 345.

PUPO, M. T.; GALLO, M. B. C.; VIEIRA, P. C.. *Biologia Química: uma estratégia moderna para a pesquisa em produtos naturais*. **Química Nova**, v. 30, p. 1446- 1455, 2007.

PUTIGNANI, L., MASSA, O., ALISI, A. Engineered *Escherichia coli* as new source of flavonoids and terpenoids. **Food Research International**, article in press, 2013. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2013.01.062>.

QI, L. W., LIU, E. H., CHU, C., PENG, Y. B., CAI, H. X., & LI, P. Anti-diabetic agents from natural products - An update from 2004 to 2009. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 10, p. 434-457, 2010.

RAJIC, A.; KWEIFIO-OKAI, G.; MACRIDES, T.; SANDEMAN, R.M.; CHANDLER, D.S.; POLYA, G.M. Inhibition of serine proteases by anti-inflammatory triterpenoids. **Planta Medicinal**, v. 66, p. 206-210, 2000.

RANG, H. P.; DALE, M. M.; RITTER, J. M.; FLOWER, R. J. **Farmacologia**. Rio de Janeiro: Elsevier, 6° ed., 2007.

RATNAM, D.V.; ANKOLA, D.D.; BHARDWAJ, V.; SAHANA, D.K.; KUMAR RAVI, M.N.V. Role of antioxidants in prophylaxis and therapy: A pharmaceutical perspective. **Journal of controlled release**, v. 113, p. 189-207, 2006.

RAUH, Laryssa Kathlin. **Avaliação da atividade antiinflamatória tópica da *Vernonia scorpioides* (Lam) Persons em modelos de inflamação cutânea em camundongos**. Curitiba, 2008. Dissertação. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Universidade Federal do Paraná.

RAUH,K.L.;HORINOUCI S.D.C.; LODDI, V.M.A.; PIETROVSKI, F.E.; NERIS, R.; GUIMARÃES, F. S. F.; BUCHI, F. D.; BIAVATTI, W. M.; OTUKI, F. M.; CABRINI, A.D. Effectiveness of *Vernonia scorpioides* ethanolic extract against skin inflammatory processes. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 138, p. 390-397, 2011.

RECIO, M.C.; GINER, R.M.; URIBURU, L.; MÁÑEZ, S.; CERDÁ, M.; De LA FUENTE, J.R.; RIOS, J.L. In vivo activity of pseudoguaianolide sesquiterpene lactones in acute and chronic inflammation. **Life Science**. v. 66, p. 2509-2518, 2000.

RICE-EVANS C. A.; MILLER N. J.; PAGANGA G. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 20, p. 933-956, 1996.

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

RICE-EVANS, C.A.; MILLER, N.J.; PAGANGA, G. Structure antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. **Free Radical Biology and Medicine**, New York, v. 20, p. 933-956, 1996.

RIOS, J.L.; RECIO, M.C. Medicinal plants and antimicrobial activity. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 100, p. 80-84, 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, p. 127-149, 1988.

ROGINSKY, V.; LISSI, E. A. Review of methods to determine chain-breaking antioxidant activity in food. **Food Chemistry**, v. 92, p. 235-254, 2005.

ROMANEZI DA SILVEIRA, R.; FOGGIO, M.A.; GONTIJO, J.A.R. Effect of the crude extract of *Vernonia polyanthes* Less. on blood pressure and renal sodium excretion in unanesthetized rats. **Phytomedicine**, v. 10, p. 127-131, 2003.

ROSS, M. H.; REITH, E. J.; ROMRELL, L. J. **Histologia: Texto e Atlas**. 2^oed. Rio de Janeiro: Ed. Médica Panamericana, p. 347, 1993.

ROSSI, F.; ANDREAZZI, D. **Resistência bacteriana: interpretando o antibiograma**. São Paulo: Atheneu, 2005.

ROY, P.; AMDEKAR, S.; KUMAR, A.; SINGH, R.; SHARMA, P.; SINGH, V. In vivo antioxidative property, antimicrobial and wound healing activity of flower extracts of *Pyrostegia venusta* (Ker Gawl) Miers. **Journal of ethnopharmacology**, v.140, p.186-192, 2012.

RYAN, M.; LEVY, M.M. Clinical review: Fever in intensive care unit patients. **Critical Care**, v. 7, p. 221-225, 2003.

SAAD, S.; TAHER, M.; SUSANTI, D.; QARALLEH, H.; AWANG, A F. I. B. *In vitro* antimicrobial activity of mangrove plant *Sonneratia alba*. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 2, p. 427-429, 2012.

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, p. 260-264, 1993.

SAFAYHI, H.; SAILER, E-R. Antiinflammatory actions of pentacyclic triterpenes. Review. **Planta Medica**, v. 63, p. 487-493, 1997.

SAMPAIO, S. A. P.; CASTRO, R. M.; RIVITTI, E. A. **Dermatologia Básica**, 2^o ed. São Paulo: Artes médicas, p. 1-5, 2000.

SANCHES, N.R.; CORTEZ, D.A.G.; SCHIAVINI, M.S.; NAKAMURA, C.V.; FILHO, B.P.D. An evaluation of antibacterial activities of *Psidium guajava* (L.). **Brazilian Archives of Biology and Technology – An International Journal**, v. 48, p. 429-436, 2005.

SANCHEZ, T.; MORENO, J. J. Role of leukocyte influx in tissue prostaglandin H synthase-2 overexpression induced by phorbol ester and arachidonic acid in skin. **Biochemical Pharmacology**, v. 58, p. 877-879, 1999.

SANTOS, R. I. Metabolismo Basico e origem dos metabolitos secundarios. In: SIMOES C. et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Porto Alegre/Florianopolis, 2007. 6^oed.

SARAIVA, R. A.; ARARUNA, M. K. A.; OLIVEIRA, R. C.; MENEZES, K. D. P.; LEITE, G. O.; KERNTOPF, M. F.; COSTA, J. G. M.; ROCHA, J. B. T.; TOME, A. R.; CAMPOS, A. R.; MENEZES, I. R. A. Topical anti-inflammatory effect of *Caryocar coriaceum* Wittm. (Caryocaraceae) fruit pulp fixed oil on mice ear edema induced by different irritant agents. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 136, p. 504-510, 2010.

SAÚDE-GUIMARÃES, D. A.; FARIA, A. R. Substâncias da natureza com atividade anti-*Trypanosoma cruzi*. **Revista Brasileira Farmacognosia**, v. 17, p. 455-465, 2007.

SCHAPOVAL, E.E.; SILVEIRA, S.M.; MIRANDA, M.L.; ALICE, C.B.; HENRIQUES, A.T.; Evaluation of some pharmacological activities of *Eugenia uniflora* L. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 44, p. 137-142, 1994.

SCHIANTARELLI, P.; CADEL, S.; ACERBI, D.; PAVESI, L. Antiinflammatory activity and bioavailability of percutaneous piroxicam. **Drug Research**, v. 32, p. 230-235, 1982.

SCHRAMM, R.; THORLACIUS, H. Neutrophil recruitment in mast cell-dependent inflammation inhibitory mechanisms of glucocorticoids. **Inflammation research**, v. 53, p. 644-652, 2004.

SHAEFER, H.; REDELMEIER, T. E. **Skin Barrier: Principles of Percutaneous Absorption**. Switzerland :Karger, p. 1-3, 1996.

SHAGHAGHI, M.; MANZOORI, J.L.; JOUYBAN, A. Determination of total phenols in tea SHER, A. Antimicrobial activity of natural products from medicinal plants. **Gomal Journal of Medical Sciences**, v. 7, p. 72-78, 2009.

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

SHERWOOD, E. R.; TOLIVER-KINSKY, T. Mechanisms of the inflammatory response. **Best Practice & Research Clinical Anesthesiology**. v. 18, p. 385-405, 2004.

SHIRASAKI, H.; KANAIZUMI, E.; HIMI, T. Immunohistochemical Localization of the Bradykinin B1 and B2 Receptors in Human Nasal Mucosa. **Mediators of Inflammation**, v. 9, p. 1-9, 2009.

SILVA, C. S.; CARVALHO, J. C. T. Inflamação. CARVALHO, J. C. T. In: **Fitoterápicos anti-inflamatórios: Aspectos químicos, farmacológicos e aplicações terapêuticas**. São Paulo: Tecmedd, 2004.

SILVA, J. B.; TEMPONI, V. S.; FERNANDES, F. V.; ALVES, G. A. D.; MATOS, D. M. M.; GASPARETTO, C. M.; RIBEIRO, A.; PINHO, J. J. R. G.; ALVES, M. S.; SOUSA, O. V. New Approaches to clarify antinociceptive and anti-inflammatory effects of the ethanol extract from *Vernonia condensata* leaves. **Internacional Journal Molecular Science**, v.12, p. 8993-9008, 2011.

SILVA, M.L.C.; COSTA, R.S.; SANTANTA, A.S.; KOBLITZ, M.G.B. Compostos fenólicos, carotenoides e atividade antioxidante em produtos vegetais. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 31, p. 669-682, 2010.

SILVA, N.C.C.; BARBOSA, L.; SEITO, L.N.; JUNIOR, A.F. Antimicrobial activity and phytochemical analysis of crude extracts and essential oils from medicinal plants. **Natural Product Research**, v. 26, p. 1510-1514, 2012.

SILVA, P. **Farmacologia**. 7^oed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006. 1213p.

SILVA, R.M.; SANTOS, F.A.; MACIEL, M.A.M.; PINTO, A.C.; RAO, V.S. Effect of trans-dehydrocrotonin, a 19-nor-clerodane diterpene from *Croton cajucara* on experimental hypertriglyceridaemia and hypercholesterolaemia induced by Triton WR 1339 (Tyloxapol) in mice. **Planta Medical**, v. 67, p. 1-3, 2001.

SILVEIRA, R. R.; RÚBIO, C. R.; ALVES, M. J. Q. F. Modificações da diurese e da pressão arterial em ratos Wistar anestesiados, após a administração oral de infuso de assa-peixe (*Vernonia polyanthes* Less.). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 2, p. 31-35, 2000.

SIMMONS, D. L. What makes a good anti-inflammatory drug target? **Drug Discovery Today**, v. 11, p. 210-219, 2006.

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

SINGER, A. J.; CLARK, R. A. Cutaneous wound healing. **New England Journal Medicine**. p. 738-46, 1999.

SMITH, E. W.; MALBACH, H. I.; SUBER, C. Use of emulsions as topical drug delivery systems. In: NIELLOUD, F.; MARTI-MESTRES, G. **Pharmaceutical emulsions and suspensions**, New York: Marcel Dekker, 2000. p. 259-269.

SOARES, S.E. Ácidos fenólicos como antioxidantes. **Revista de Nutrição**. v. 15, 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, p. 683-689, 2008.

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

SONAGLIO, D.; ORTEGA, G. G.; PETROVICK, P. R.; BASSANI, V.L. Desenvolvimento Tecnológico e produção de fitoterápicos. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. , (Org). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5^oed. Porto Alegre: UFRGS; Florianópolis: UFSC, 2004. p. 821.

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, p. 351-355, 2007

SOUSA, F. C. F.; MELO, C. T. V.; CITÓ, M. C. O.; FÉLIX, F. H. C.; VASCONCELOS, S. M. M.; FONTELES, M. M. F.; FILHO, J. M. B.; VIANA, G. S. B. Plantas medicinais e seus constituintes bioativos: Uma revisão da bioatividade e potenciais benéficos nos distúrbios da ansiedade em modelos animais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, p. 642-654, 2008.

SOUZA, V. C.; LORENZI, H. **Botânica Sistemática**: Guia ilustrado para identificação das famílias de Angiospermas da flora brasileira, baseado em APGII. Nova Odessa, São Paulo: Instituto Plantarum, 2005. 291p.

SPELLBERG, B. The cutaneous citadel: a holistic view of skin and immunity. **Life Sciences**, v. 67, p. 477-502, 2000.

STANLEY, P. L., STEINER, S.; HAVENS, M.; TRAMPOSH, K. M. Mouse skin inflammation induced by multiple topical applications of 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate. **Skin Pharmacology**, v. 4, p. 262-271, 1991.

STORPIRTIS, S.; GONÇALVES, J. E.; CHIANN, C.; GAI, M. N. **Ciências Farmacêuticas: Biofarmacotécnica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2009.321p.

TAMURA, E.K.; JIMENEZ, R.S.; WAISMAM, K.; GOBBO-NETO, L.; LOPES, N.P.; MALPEZZI-MARINHO, E.A.L.; MARINHO, E.A.V.; FARSKY, S.H.P. Inhibitory effects of *Solidago chilensis* Meyen hydroalcoholic extract on acute inflammation. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 122, p. 478-485, 2009.

TAMURA, T.; MATSUBARA, M.; TAKADA, C.; HASEGAWA KSUZUKI, K.; OHMORI, K.; KARASAWA A. Effects of alopataidine hydrochloride an antihistamine drug on skink inflammation induced by repeated topical application of oxazolone in mice. **Brazilian Journal Dermatology**, v. 151, p. 1133-1142, 2004.

TAPAS, A. R.; SAKARKAR, D. M.; KAKDE, R. B. Flavonoids as nutraceuticals: a review. **Tropical Journal of Pharmaceutical Research**, v. 7, p. 1089-1099, 2008.

TEMPONI, V. S.; SILVA, J. B.; ALVES, M. S.; RIBEIRO, A.; PINHO, J. J. R. G.; YAMAMOTO, C. H.; PINTO, M. A. O. P.; DEL-VECHIO-VIEIRA, G.; SOUSA, O. V. Antinociceptive and anti-inflammatory effects of ethanol extract from *Vernonia polyanthes* leaves in rodents. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 13, p. 3887-3899, 2012.

TEMPONI, Vanessa dos Santos. **Investigação do Potencial Químico e Farmacológico Vernonia polyanthes**. Juiz de Fora, 2012. Dissertação. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Juiz de Fora.

THOMPSON, J. E. **A Prática Farmacêutica na Manipulação de Medicamentos**. Porto Alegre: Editorial Artmed, 2006. 576p.

TODAR, K. *Staphylococcus aureus* and Staphylococcal Disease. On Line Encyclopedia of Bacteriology. Disponível em www.textbookofbacteriology.net. Site acessado em Agosto/2011.

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

TOMAZZONI M. I.; NEGRELLE, R. R. B.; CENTA, M. L. **Fitoterapia popular: a busca instrumental enquanto prática terapêutica**. Texto & Contexto Enfermagem. v.15, p.115-121, 2006.

TORRES, L.M.; GAMBERINI, M.T.; ROQUE, N.F.; LIMA-LANDMAN, M.T.; SOUCCAR, C.; LAPA, A.J. Diterpene from *Baccharis trimera* with a relaxant effect on rat vascular smooth muscle. **Phytochemistry**, v. 55, p. 617-619, 2000.

TOYANG, N.J.; VERPOORTE, R. A review of the medicinal potentials of plants of the genus *Vernonia* (Asteraceae). **Journal Ethnopharmacology**, v. 146, p. 681-723, 2013.

TROWBRIDGE, H. O.; EMLING, R. C. Regeneração e cicatrização. In: **Inflamação: uma revisão do processo**. 4 ed. São Paulo: Quintessence, 1996. Cap. 7. P. 146-147.

TROWBRIDGE, H. O.; EMLING, R. C. Mediadores químicos da resposta vascular. In: **Inflamação uma revisão do processo**. Quintessence Publishing Co. Inc., São Paulo, p. 27-42, 1996.

TSAO, R. Chemistry and biochemistry of dietary polyphenols. **Nutrients**, v. 2, p. 1231-1246, 2010.

UCHI, H.; TERAOKA, H.; KOGA, T.; FURUE, M. Cytokines and chemokines in the epidermis. **Journal of Dermatological Science**, v. 24, p. 29-38, 2000.

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, p. 369-380, 2007.

VALLANCE, P.; CHAN, N. Endothelial function and nitric oxide: clinical relevance. **Heart (British Cardiac Society)**, v. 85, p. 342-350, 2001.

VAN ACKER, S. A. B. E.; BERG, V. J. V. D.; TROMP, M. N. J. L. GRIFFIOEN, D. H. Structural aspects of antioxidant activity of flavonoids. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 20, p. 331-42, 1996.

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, p. 1305-1312, 1996.

VANE, J. In: Gábor M. **Mouse ear inflammation models and their pharmacological applications**. Budapest: Akadémiai Kiadó 11, 2000.

VENABLE, D. L.; LEVIN, D. A. Morphological dispersal structures in relation to growth habit in the Compositae. **Plant Systematic Evolution**, v.143, p.1-16, 1983.

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

VICKERY, M. L.; VICKERY, B. **Secondary plant metabolism**. The Macmillan Press Ltd. Hong Kong, 1981.

VIEIRA, L.S. Apresentação/Introdução. In: **Fitoterapia da Amazônia: manual de plantas medicinais**. São Paulo: Ceres., 1992, p.5-12.

WALENCKA, E.; ROZALSKA, S.; WYSOKINSKA, H.; ROZALSKI, M.; KUZMA, L.; ROZALSKA, B. Salvipisone and aethiopinone from *Salvia sclarea* hairy roots modulate staphylococcal antibiotic resistance and express anti-biofilm activity. **Planta Medical**, v. 73, p. 545-551, 2007.

WANG, G.J.; WU, X.C.; LIN, Y.L.; REN, J.; SHUM, A.Y.; WU, Y.Y.; CHEN, C.F. Ca²⁺ channel blocking effect of iso-S-petasin in rat aortic smooth muscle cells. **European Journal Pharmacology**, v. 445, p. 239-245, 2002.

WEBER, F. T.; DIAS, C.; COSTA, M. Antimicrobial susceptibility of *Streptococcus Pneumoniae* and genotypic characterization of erythromycin-resistant strains in Porto Alegre, Brazil. **Brazilian Journal of microbiology**, v. 41, p. 1-5, 2010.

WEE, S. S.; SHIN, Y. W.; BAE, E. A.; KIM, D. H. Effect of chunghyuldan in chronic oxazolone-induced mouse dermatitis. **Biological Pharmacy Bulletin**; v. 28, p. 1079-1082, 2005.

WILLIAMS, I. R.; KUPPER, T. S. Immunity at the surface: Homeostatic mechanisms of the skin immune system. **Life sciences**, v. 58, p. 1485-1507, 1996.

WILLIAMSON, E. M. **Selection, Preparation and Pharmacological Evaluation of Plant Material**. Willey & sons Ltd.:Chinchester, 1996.

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

WINYARD, P.G. Key stages in the acute inflammatory response and their relevance as therapeutic targets. In: WINYARD, P. G.; WILLOUGHBY, D. A. **Inflammation protocols**, New Jersey: Humana Press, p.3-4, 2003.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Antimicrobial resistance. Reviewed, WHO, 2012. Disponível em <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs194/en/>. Site acessado em 10 de Setembro de 2012.

WYNGAARDEN, J.B.; SMITH, L.H.J.R.; BENETT, J.C. **Cecil-Tratado de medicina interna**. 19 ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 1993 vol. 2, 1338p.

YAKHLEF, G.; LAROUÏ, S.; HAMBABA, L.; ABERKANE, M.C.; AYACHI, A. Évaluation de l'activité antimicrobienne de *Thymus vulgaris* et de *Laurus nobilis*, plantes utilisées en médecine traditionnelle. **Phytothérapie**, v. 9, p. 209-218, 2011.

- YANG, B.; KOIANI, A.; ARAI, K.; KUSU, F. Relationship of electrochemical oxidation of catechins on their antioxidant activity in microsomal lipid peroxidation. **Chemical Pharmaceutical Bulletin**, v. 49, p. 747-751, 2001.
- YEAP, S.K.; HO, W.Y.; BEH, B.K.; LIANG, W.S.; KY, H.; YOUSR, A.H.N.; ALITHEEN, N.B. *Vernonia amygdalina*, an ethnoveterinary and ethnomedical used green vegetable with multiple bio-activities. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 4, p. 2787-2812, 2010.
- YEDGAR, S.; KRIMSKY, M.; COHEN, Y.; FLOWER, R. Treatment of inflammatory diseases by aselective eicosanoid inhibitor: a double-edged sword? **Pharmacological Sciences**, v. 28, p. 459-464, 2007.
- YOUNG, J. M.; SPIRES, D. A.; BEDORD, C. J.; WAGNER, B.; BALLRON, S. J.; DE YOUNG, L. M. The mouse ear inflammatory response to topical arachidonic acid. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 82, p. 367- 371, 1984.
- YOUNG, J.M.; WAGNER, B.; SPIRES, D.A. Tachyphylaxis in 12-tetradecanoylphorbol acetate-and arachidonic acide ar edema. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 80, p. 48-52, 1983.
- YUNES, R. A.; PEDROSA, R. C.; CECHINEL FILHO. V. Fármacos e fitoterápicos: A necessidade do desenvolvimento da indústria de fitoterápicos e fitofármacos no Brasil. **Química Nova**, v. 24, p. 147-152, 2001.
- ZALETOVA, N.I.; SHCHAVLINSKII, A.N.; TOLKACHEV, O.N.; VICHKANOVA, S.A.; FATEEVA, T.V.; KRUTIKOVA, N.M.; YARTSEVA, I.V.; KLYUEV, N.A. Preparation of certain derivates of ursolic and their antimicrobial activity. **Pharmaceutical Chemistry Journal**, v. 20, p. 345-348, 1986.
- ZANELLA, A. H. **Desenvolvimento de fórmulas semi-sólidas contendo extrato de *Mandevilla illustris* e avaliação de atividade antiinflamatória tópica**. 2005, 55p. Monografia (Graduação) - Centro de Ciências da Saúde, Universidade do Vale do Itajaí, Itajaí, 2005.
- ZANON, R. B. **Metabólitos secundários em *Vernonia tweediana* Baker**. 2006. Dissertação (Mestrado – Área de Concentração em Controle e Avaliação de Insumos e Produtos Farmacêuticos) Universidade Federal de Santa Maria, 2006.
- ZANON, R.B.; PEREIRA, D.F.; BOSCHETTI, T.K.; SANTOS, M.; ATHAYDE, M.L. Fitoconstituintes isolados da fração em diclorometano das folhas de *Vernonia tweediana* Baker. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, p. 226-229, 2008.
- ZATZ, J. Rational and approaches to skin permeation. In: Skin Permeation- Fundamentals and application. **Wheaton: Allured Publishing Corporation**, p. 11-31, 1993
- ZEGARSKA, B.; LELINSKA, A.; TYRAKOWSKI, T. Clinical and experimental aspects of cutaneous neurogenic inflammation. **Pharmacological Reports**, v.58, n.1, p.13-21, 2006.
- ZHANG, C.F.; WANG, D.S.; LING, X.Z. Diacetylammethystoidin A protects isolated working rat heart against myocard reperfusion injury. **Zhongguo Yao Li Xue Bao=Acta Pharmacologica Sinica**, v. 17, p. 245-248, 1996.

ZHANG, Z.; JIANG, J.; YU, P.; ZENG, X.; LARRICK, J.W.; WANG, Y. Hipoglycemic and beta cell protective effects of andrographolide analogue for diabetes treatment. **Journal of Translational Medicine**, v. 7, p. 62, 2009.

ZIMMERMANN, M. Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. **Pain**, v. 16, p. 109-110, 1983.



UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
PRO-REITORIA DE PESQUISA
Comissão de Ética na Experimentação Animal

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº 106/2012 – CEEA sobre “ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA TÓPICA DE EXTRATOS DAS FOLHAS DE VERNONIA POLYANTHES LESS”, projeto de pesquisa sob a responsabilidade de ORLANDO VIEIRA DE SOUSA , está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal, adotados pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (Concea), e foi aprovado pelo COMITÊ DE ÉTICA DE USO DE ANIMAIS (CEUA) da PRÓ-REITORIA DE PESQUISA/UFJF, em reunião realizada em 05/03/2013. Para o desenvolvimento da pesquisa foram liberados 616 camundongos (616 machos) da linhagem Swiss, conforme solicitado.

CERTIFICATE

We certify that the protocol nº 106/2012- CEEA about “ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA TÓPICA DE EXTRATOS DAS FOLHAS DE VERNONIA POLYANTHES LESS” under responsibility of ORLANDO VIEIRA DE SOUSA is in agreement with the Ethical Principles in Animal Research adopted by Brazilian Council for Control of Animal Experimentation (Concea) and was approved by the PRÓ-REITORIA DE PESQUISA/UFJF – ETHICAL COMMITTEE FOR ANIMAL HANDLING (CEUA) in 05/03/2013. For the development of this research 616 mice (616 males) lineage Swiss were released, as requested.

Juiz de Fora, 08 de Março de 2013.



Presidente/CEEA



Secretário/CEEA