

VANESSA DOS SANTOS TEMPONI

**INVESTIGAÇÃO QUÍMICA E ATIVIDADES
FARMACOLÓGICAS DE *Vernonia polyanthes* LESS**

JUIZ DE FORA - MG

2012

UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
MESTRADO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

INVESTIGAÇÃO QUÍMICA E ATIVIDADES
FARMACOLÓGICAS DE *Vernonia polyanthes* LESS

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

JUIZ DE FORA – MG

2012

Temponi, Vanessa dos Santos.

Investigação Química e Atividades Farmacológicas de *Vernonia polyanthes* Less.

– 2012.

98 f. : il.

Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas)-
Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, 2012.

1. *Vernonia polyanthes* L. 2. Fitoconstituintes. 3. Atividades Farmacológicas.

I. Investigação Química e Atividades Farmacológicas de *Vernonia polyanthes* Less.

INVESTIGAÇÃO QUÍMICA E ATIVIDADES FARMACOLÓGICAS DE *Vernonia polyanthes* LESS

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

Banca Examinadora:

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

Profa. Dra. Maria Silvana Alves – Co-Orientadora
Faculdade de Farmácia – Universidade Federal de Juiz de Fora

Profa. Dra. Antônia Ribeiro – Co-Orientadora
Instituto de Ciências Biológicas - Universidade Federal de Juiz de Fora

Profa. Dra. Maria Auxiliadora Coelho Kaplan
Núcleo de Pesquisa de Produtos Naturais – Universidade Federal do Rio de Janeiro

Profa. Dra. Glauciemar Del-Vechio Vieira
Faculdade de Farmácia – Universidade Federal de Juiz de Fora

Profa. Dra. Mírian Pereira Rodarte - Suplente
Faculdade de Farmácia – Universidade Federal de Juiz de Fora

Juiz de Fora (MG), 14 de junho de 2012

“De tudo ficaram três coisas:

A certeza de que estamos sempre começando...

A certeza de que é preciso continuar...

*A certeza de que seremos interrompidos antes de
terminar...*

Portanto devemos:

Fazer da interrupção um caminho novo...

da queda, um passo de dança...

do medo, uma escada...

do sonho, uma ponte...

da procura... um encontro”

(Fernando Sabino em “o encontro marcado”)

Aos meus pais Eritelto e Maria da Consolação, pelo apoio, amor incondicional, carinho e sacrifício que sempre fizeram pela minha formação profissional. Tenho em vocês os meus grandes e verdadeiros amigos.

À vó Dalica (in memoriam), que sempre rezou e torceu por mim. Sinto saudades todos os dias, mas sei que ela está sempre comigo.

*À minha amiga Jucélia, que literalmente pegou na minha mão quando mais precisei.
Pessoa admirável.*

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus, todo poderoso, por ter colocado em meu caminho essa oportunidade e me guiado até o fim.

Ao Prof. Dr. Orlando Vieira de Sousa pela orientação, oportunidade e apoio, pois sem o seu esforço e a sua dedicação não seria possível o desenvolvimento deste trabalho.

À Profa. Dra. Maria Silvana, co-orientadora e amiga, com quem aprendi que tudo que fizermos na vida temos que colocar foco e muito amor. Obrigada pelo apoio em um momento tão difícil na minha vida. Te admiro como profissional e como ser humano.

À Profa. Dra. Antônia Ribeiro, co-orientadora, por dispor de seu tempo, sempre com boa vontade, para me acompanhar nos procedimentos experimentais.

À Profa. Dra. Elita Scio Fontes que tornou possível a aprendizagem de métodos novos disponibilizando seu laboratório e seus parceiros.

Ao Prof. Dr. José de Jesus Ribeiro Gomes de Pinho, pela companhia, orientações, conversa amiga, por disponibilizar seu laboratório sempre que precisei.

À minha querida amiga-irmã Jucélia, companheira de todas as horas, que foi essencial para o desenvolvimento e execução dos experimentos laboratoriais. Foi uma pessoa com quem dividi todas as alegrias e tristezas, difícil resumir tudo o que tenho a dizer, então eu digo apenas OBRIGADA POR TER ENTRADO NA MINHA VIDA.

Aos meus queridos amigos de laboratório Felipe Valente e Dalyara Matos, pela ajuda sem medidas, sem horários de ir para casa, obrigada pelo comprometimento e a seriedade com que me ajudaram. Georgia Assis, menina responsável e esforçada, aprendi muito com você. Jésus e Oscavo, que estiveram comigo auxiliando em tudo que foi possível. Profissionais de primeira. À Carolina Gasparetto (Carolzinha), por todo apoio, todo carinho, pela ajuda em tudo que pode.

Ao professor e amigo Rodrigo Fabri, obrigada pela parceria e por tudo que me ensinou, você é uma pessoa incrível, foi um orientador brilhante para nós.

À Danielle Aragão, profissional competente, por ceder seu tempo para me ajudar sempre que precisei.

À minha querida amiga Lena, que me mostrou que posso ser forte quando me senti fraca, que posso superar os meus limites e crescer.

Ao Vinícius Lopes, médico e amigo, por me passar firmeza, ajudar no meu equilíbrio e a descobrir que tenho potencial.

À Kamilla Coelho, queridíssima, pelo estímulo e carinho.

À Cíntia, grande amiga que ganhei, pelas conversas, pela companhia e pelas deliciosas jantinhas depois de dias cansativos de trabalho.

À Adriana, pela solicitude, amizade, você é uma pessoa linda.

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

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) pela concessão da bolsa de estudos.

E a todas as pessoas que, direta ou indiretamente, ajudaram na execução desse trabalho.

SUMÁRIO

		P.
1.	INTRODUÇÃO	1
2.	REVISÃO DA LITERATURA	3
2.1	BIODIVERSIDADE E IMPORTÂNCIA DO USO POPULAR	3
2.2	FAMÍLIA ASTERACEAE	4
2.3	GÊNERO <i>Vernonia</i>	6
2.4	ESPÉCIE <i>Vernonia polyanthes</i>	7
2.5	METABOLISMO VEGETAL	9
2.6	CONSTITUINTES FENÓLICOS	11
2.7	FLAVONÓIDES	13
2.8	ASPECTOS GERAIS DA AÇÃO ANTIOXIDANTE	15
2.9	ASPECTOS GERAIS DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE PRODUTOS NATURAIS	18
2.9.1	Microrganismos de Importância Clínica	21
2.9.2	Métodos Utilizados para Investigação de Atividade Antimicrobiana	22
2.10	MECANISMO FISIOLÓGICO DA NOCICEPÇÃO	24
2.11	MECANISMO DO PROCESSO INFLAMATÓRIO	27
2.11.1	Constituintes de Origem Vegetal com Atividade Anti-inflamatória	30
3.	OBJETIVOS	31
4.	MATERIAL E MÉTODOS	32
4.1	MATERIAL VEGETAL	32
4.2	PROCESSO DE EXTRAÇÃO E FRACIONAMENTO	32
4.3	PROSPECÇÃO FITOQUÍMICA	33
4.4	DETERMINAÇÃO DOS TEORES DE FENÓIS TOTAIS	33
4.5	DETERMINAÇÃO DOS TEORES DE FLAVONÓIDES TOTAIS	34
4.6	AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES ANTIOXIDANTES	34
4.6.1	Teste do DPPH	34
4.6.2	Técnica da Bioautografia com DPPH	35
4.6.3	Método do Poder de Redução	35
4.6.2	Determinação da Peroxidação Lipídica Através do Teste com Ácido 2-	

	tiobarbitúrico.....	36
4.7	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA.....	37
4.7.1	Teste de Difusão em Ágar.....	37
4.7.2	Concentração Inibitória Mínima.....	39
4.7.3	Determinação da Concentração Bactericida Mínima.....	41
4.8	ANIMAIS.....	41
4.9	AVALIAÇÃO DA TOXIDEZ AGUDA.....	41
4.10	TESTE DE CONTORÇÕES ABDOMINAIS.....	42
4.11	TESTE DA FORMALINA.....	42
4.12	TESTE DA PLACA QUENTE.....	42
4.13	EDEMA DE PATA INDUZIDO POR CARRAGENINA.....	43
4.14	PLEURISIA INDUZIDA POR CARRAGENINA.....	43
4.15	ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	43
5.	RESULTADOS.....	44
5.1	PESQUISA E QUANTIFICAÇÃO DE CONSTITUINTES QUÍMICOS.....	44
5.2	ATIVIDADES ANTIOXIDANTES	47
5.2.1	Avaliação pelo Método DPPH.....	47
5.2.2	Avaliação pelo Método Bioautografia.....	49
5.2.3	Avaliação pelo Método Poder de Redução.....	51
5.2.4	Avaliação pelo Método TBA.....	52
5.3	ATIVIDADE ANTIMICROBIANA.....	54
5.3.1	Método de Difusão.....	54
5.3.2	Concentração Inibitória Mínima.....	54
5.3.2	Concentração Bactericida Mínima.....	55
5.4	ATIVIDADES FARMACOLÓGICAS DO EXTRATO ETANÓLICO DAS FOLHAS DE <i>V. polyanthes</i>.....	57
6.	DISCUSSÃO.....	62
7.	CONCLUSÃO.....	67
8.	REFERÊNCIAS.....	68
9.	ANEXOS.....	84

Lista de Figuras

		P.
Figura 1	Representação da parte aérea da <i>Vernonia polyanthes</i> Less.....	8
Figura 2	Lâmina foliar com a organização do mesofilo e tricoma secretor do tipo capitado na epiderme abaxial.....	9
Figura 3	Ciclo biossintético dos metabólitos secundários.....	11
Figura 4	Estrutura básica dos flavonóides.....	13
Figura 5	Representação das subclasses de flavonóides.....	14
Figura 6	Exemplos de flavonóides antioxidantes.....	17
Figura 7	Mecanismo de estabilização do elétron desemparelhado do flavonóide.....	18
Figura 8	Mecanismo de transmissão e percepção da dor.....	26
Figura 9	Esquema ilustrativo da migração de leucócitos através do endotélio vascular.....	30
Figura 10	Esquema de extração e fracionamento.....	32
Figura 11	Fluxograma do método da avaliação da atividade antimicrobiana pelo método de difusão em ágar.....	38
Figura 12	Esquema da placa de 96 poços para determinação da CIM.....	40
Figura 13	Esquema de diluições sucessivas nos poços.....	43
Figura 14	Espectro de absorção da rutina.....	45
Figura 15	Curva de calibração do padrão rutina.....	45
Figura 16	Espectro de absorção do ácido gálico.....	46
Figura 17	Curva de calibração do ácido gálico.....	46
Figura 18	Espectro de absorção do DPPH (2,2-difenil-1-picrilidrazil).....	48
Figura 19	Bioautografia do extrato etanólico e frações em cromatografia de camada fina revelada com cloreto férrico e DPPH.....	49
Figura 20	Bioautografia do extrato etanólico e frações em cromatografia de camada fina revelada com NP/PEG e DPPH.....	50
Figura 21	Bioautografia do extrato etanólico e frações em cromatografia de camada fina revelada com Lieberman Bouchard e DPPH.....	51
Figura 22	Curva de calibração do MDA.....	52
Figura 23	Efeitos do extrato etanólico das folhas de <i>V. polyanthes</i> sobre as contorções induzidas por ácido acético 0,6% em camundongos (n = 8).....	57

Figura 24	Efeitos do extrato etanólico das folhas de <i>V. polyanthes</i> sobre a nocicepção induzida por formalina em camundongos (n = 8).....	58
Figura 25	Efeitos do extrato etanólico das folhas de <i>V. polyanthes</i> sobre o tempo de reação (s) de camundongos expostos ao teste da placa quente (n = 8)...	59
Figura 26	Efeitos do extrato etanólico das folhas de <i>V. polyanthes</i> sobre o edema de pata induzido por carragenina em ratos.....	60

Lista de Tabelas

		P.
Tabela 1	Classificação das substâncias fenólicas de acordo com o esqueleto básico.....	12
Tabela 2	Principais subclasses dos flavonóides.....	15
Tabela 3	Prospecção fitoquímica de <i>V. polyanthes</i>	44
Tabela 4	Teores de fenóis e flavonóides totais no extrato e frações de <i>V. polyanthes</i>	47
Tabela 5	Atividade antioxidante do extrato etanólico e frações de <i>V. polyanthes</i> pelo teste de DPPH.....	48
Tabela 6	Atividade antioxidante do extrato etanólico e frações de <i>V. polyanthes</i> pelo teste de poder de redução.....	52
Tabela 7	Atividade antioxidante do extrato etanólico e frações de <i>V. polyanthes</i> pelo método do TBA.....	53
Tabela 8	Atividade antibacteriana pelo método de difusão.....	54
Tabela 9	Atividade antibacteriana pela concentração inibitória mínima.....	55
Tabela 10	Atividades bactericida e bacteriostática através da concentração bactericida mínima.....	56
Tabela 11	Efeito do extrato etanólico das folhas de <i>V. polyanthes</i> sobre o volume do exsudato e o número total de leucócitos na pleurisia induzida por carragenina em ratos (n = 6).....	61

Lista de Siglas e Abreviaturas

AINES	Anti-inflamatórios não esteroidais
ATCC	“American Type Culture Collection”- Coleção de tipos de Cultura Americana
BHT	2,6-diterbutil-4-metilfenol
CBM	Concentração Bactericida Mínima
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute – Instituto de padrões clínicos e laboratoriais
COX	Ciclooxigenase
DL	Dose Letal
DMSO	Dimetilsulfóxido
DPPH	2,2-difenil-1-picril-hidrazila
EE	Extrato Etanólico
EHEC	<i>Escherichia coli</i> enterohemorrágica
EROs	Espécies reativas de oxigênio
FA	Fração em Acetato de Etila
FB	Fração Butanólica
FD	Fração Diclorometânica
FH	Fração Hexânica
MDA	Malonaldeído
MHB	Mueller Hinton Broth – Caldo Mueller Hinton
PG	Prostaglandina
SNC	Sistema Nervoso Central
TBA	Ácido tiobarbitúrico

TEMPONI, V.S. Investigação química e atividades farmacológicas de *Vernonia polyanthes* Less. 2012. 99p. Dissertação (Mestrado). 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 usada na medicina tradicional como anti-inflamatório, cicatrizante e antimicrobiano. O objetivo do presente estudo foi investigar o potencial químico e farmacológico de *V. polyanthes*. Folhas secas e pulverizadas foram exaustivamente extraídas com etanol por maceração estática. O extrato etanólico foi fracionado por partição, obtendo as frações hexânica, diclorometânica, em acetato de etila, butanólica e residual. A prospecção fitoquímica foi realizada por reações de identificação e os teores de fenóis e flavonóides totais foram determinados por espectrofotometria. A atividade antioxidante foi determinada pelos métodos de DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazil), poder de redução e TBA. A atividade antimicrobiana pelo método de difusão e concentração mínima inibitória. A toxidez aguda foi determinada pela dose letal 50% (DL₅₀). A atividade antinociceptiva foi avaliada pelos os testes de contorções abdominais, formalina e placa quente, enquanto a atividade antiinflamatória pelos métodos de edema de pata e pleurisia. Os dados foram demonstrados como média±erro padrão e análise de variância seguida dos testes de Newman-Keuls ou Tukey foi usada para medir o grau de significância ($p < 0,05$). Foram detectados a presença de taninos, flavonóides, cumarinas, saponinas, terpenos e esteróides e alcalóides. Os teores de fenóis totais variaram de 0,76 a 18,63 g/100 g, enquanto os flavonóides totais foram 0,26 a 7,73 g/100 g. O extrato e as frações apresentaram atividade antioxidante pelos métodos aplicados. A DL₅₀ do extrato etanólico foi 2,78 g/kg. O extrato etanólico reduziu as contorções abdominais, o tempo de lambida induzida pela formalina e aumentou o tempo de latência sobre a placa quente, demonstrando atividade antinociceptiva. O extrato etanólico também reduziu o edema de pata e o volume e o número de leucócitos do exsudato pleural induzido por carragenina, demonstrando atividade anti-inflamatória. Os resultados indicaram que *V. polyanthes* constitui uma fonte de substâncias bioativas, possui atividades antioxidante, antimicrobiana, antinociceptiva e anti-inflamatória e pode constituir uma alternativa para aplicações terapêuticas.

Palavras-chave: *Vernonia polyanthes*, prospecção fitoquímica, fenóis totais, flavonóides totais, atividade antioxidante, atividade antimicrobiana, atividade antinociceptiva, atividade anti-inflamatória.

TEMPONI, V.S. Chemical investigation and pharmacological activities of *Vernonia polyanthes* Less. 2012. 99p. Dissertation (Master of Pharmaceutical Sciences). Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, Minas Gerais.

ABSTRACT

Vernonia polyanthes Less, known as assa-peixe, is used in traditional medicine as anti-inflammatory, healing and antimicrobial. The aim of the present study was to investigate the chemical and pharmacological potential of *V. polyanthes*. Dried and powdered leaves were exhaustively extracted with ethanol by static maceration. The ethanol extract was fractionated by partition, obtaining the hexane fraction, dichloromethane, in ethyl acetate, butanol and residual fractions. The phytochemical screening was performed by identification reactions and of total phenols and flavonoids contents were determined by spectrophotometry. Antioxidant activity was measured by DPPH (2,2-diphenyl-1-picryl-hydrazyl), power reduction and TBA methods. The antimicrobial activity by the diffusion method and minimum inhibitory concentration. The acute toxicity was determined by 50% lethal dose (LD₅₀). The antinociceptive activity was evaluated by writhing, formalin and hot plate tests, while the anti-inflammatory activity by paw edema and pleurisy methods. Data are expressed as mean \pm standard error and analysis of variance followed by Newman-Keuls test or Tukey was used to measure the significance level ($p < 0.05$). Tannins, flavonoids, coumarins, saponins, alkaloids and terpenes and steroids were detected in the samples. The total phenolic content ranged from 0.76 to 18.63 g/100 g, while flavonoids were 0.26 to 7.73 g/100 g. Extract and fractions showed antioxidant activity using the applied methods. The LD₅₀ of the ethanolic extract was 2.78 g/kg. The extract reduced the writhing, licking time induced by formalin and increased latency on the hot plate, showing antinociceptive activity. The ethanol extract also reduced the paw edema and the volume and number of leukocytes in carrageenan-induced pleural exudate, demonstrating anti-inflammatory activity. The results indicated that *V. polyanthes* is a source of bioactive substances with antioxidant activity, antimicrobial, antinociceptive and anti-inflammatory activities and this plant may constitute an alternative for therapeutic applications.

1. INTRODUÇÃO

O uso dos produtos naturais iniciou-se há milhares de anos por populações de vários países com o intuito de tratar diversas patologias (SOUSA et al., 2008). Além das doenças humanas, o instinto de sobrevivência levou a descoberta de novas possibilidades de aplicações terapêuticas ao longo das épocas a partir das plantas medicinais (ALLEN JR et al., 2007; MACIEL et al., 2002; OLIVEIRA et al., 2006).

Dioscórides, um médico e botânico grego, foi o primeiro a trabalhar com a botânica como uma ciência aplicada à farmácia. Seu trabalho, *De Matéria Médica*, é considerado o marco no desenvolvimento da botânica farmacêutica e no estudo de produtos naturais para fins medicinais. Neste estudo, ele catalogou e ilustrou cerca de 600 diferentes plantas usadas terapeuticamente, descrevendo o efeito farmacológico de muitas delas. Algumas plantas descritas por Dioscórides, incluindo ópio, ergot e meimendo, ainda são usadas pela população. Suas descrições sobre a arte da identificação e coleta de produtos naturais, métodos adequados de armazenamento e meio de detectar adulterações e contaminações serviram de modelo para a época e evidenciaram a necessidade de trabalhos adicionais para futuros investigadores (ALLEN JR. et al., 2007; TOMAZZONI et al., 2006).

Embora a medicina moderna esteja bem desenvolvida na maior parte do mundo, a Organização Mundial de Saúde (OMS) reconhece que grande parte da população dos países em desenvolvimento depende da medicina tradicional para sua atenção primária. Essa dependência é decorrente do fato de que 80% desta população utilizam práticas tradicionais nos seus cuidados básicos de saúde e 85% destes utilizam plantas ou preparações destas (BRASIL, 2006). Assim, as plantas medicinais têm um importante papel na saúde mundial (PINTO et al., 2002; SOUSA et al., 2008), pois as mesmas continuam sendo utilizadas, e estima-se que 25 a 30% de todas as drogas avaliadas como agentes terapêuticos são derivados de produtos naturais (SOUSA et al., 2008).

As observações populares sobre o uso e a eficácia de plantas medicinais contribuem de forma relevante para a divulgação das virtudes terapêuticas dos produtos naturais que são prescritos, com frequência, pelos efeitos farmacológicos já evidenciados medicinais (CALIXTO, 2005). Dessa forma, usuários de plantas medicinais mantêm em voga a prática do consumo de fitoterápicos, tornando válidas informações terapêuticas que foram acumuladas durante séculos. Em geral, o uso dessas plantas é decorrente da melhor tolerância do organismo (COSTA, 1994). Além disso, de maneira indireta, este tipo de cultura medicinal

desperta o interesse de pesquisadores em estudos envolvendo áreas multidisciplinares, como por exemplo, botânica, farmacologia e fitoquímica, que juntas enriquecem os conhecimentos sobre a inesgotável fonte da medicina natural (MACIEL et al., 2002).

No Brasil, o uso das plantas medicinais foi disseminado principalmente pela cultura indígena. É um país rico em diversidade cujo território possui cinco principais biomas sendo designados como floresta amazônica, cerrado, mata atlântica, pantanal e caatinga. Portanto, é uma rica fonte de produtos terapêuticos que necessitam de investigação científica (CALIXTO, 2000; RATES, 2001; VEIGA-JUNIOR, 2008).

Vernonia polyanthes Less, conhecida como assa-peixe, pertencente à família Asteraceae, é utilizada na medicina popular para o tratamento de afecções do aparelho respiratório, afecções da pele, problemas renais, feridas, fraturas e em torções, contusões e luxações, tratamento de infecções, dores musculares, como tônica, emenagoga e diurética, para processos inflamatórios e como cicatrizante (ALVES; NEVES, 2003). O presente estudo teve como objetivo avaliar os constituintes fitoquímicos e as atividades farmacológicas dos extratos das folhas de *V. polyanthes* Less, visando evidenciar cientificamente o uso medicinal e investigar suas potencialidades químicas e terapêuticas.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 BIODIVERSIDADE E IMPORTÂNCIA DO USO POPULAR

O termo biodiversidade ou diversidade biológica refere-se à variedade de formas de vida que ocorrem na natureza, como resultado da história evolutiva. O conceito inclui a diversidade de organismos em todos os níveis, a partir de variantes genéticas que pertencem à mesma espécie, através de matrizes de diferentes espécies, bem como a variedade de ecossistemas, envolvendo as comunidades ecológicas em um determinado *habitat* e as condições físicas em que vivem. Também envolve a ocorrência atual de espécies diferentes de plantas, animais e microrganismos, assim como os genes que contêm diferentes populações e os ecossistemas compostos das associações de espécies e genes (GOTTLIEB et al., 1998). Esse conjunto de formas de vida é o resultado de um processo dinâmico de evolução ao longo de milhões de anos, desde muito antes do homem aparecer como uma espécie na Terra. Com o aparecimento do homem, e especialmente nos últimos tempos, devido a atual degradação ambiental, o papel dos seres humanos tem sido crucial na modificação dos processos ecológicos. Por causa desta evolução dinâmica, algumas espécies desapareceram com a extinção e os ecossistemas se tornaram mais complexos, como os biomas brasileiros. Assim, aumenta a biodiversidade, quando nova variação genética é produzida, uma nova espécie de figura ou um aumento na complexidade dos ecossistemas heterogêneos. Há uma intensa relação de interdependência entre as formas vivas da vida na natureza por meio de processos ecológicos (ALHO, 2008).

Considerando a biodiversidade brasileira, a magnitude não é conhecida com precisão tal a sua complexidade, estimando-se a existência de mais de dois milhões de espécies distintas de plantas, animais e microrganismos. Sobre este aspecto, o Brasil é o país com a maior diversidade genética do mundo, contando com mais de 55.000 espécies catalogadas de um total estimado entre 350.000 e 550.000. No entanto, mais da metade dessas espécies se encontram nas florestas tropicais, cuja área corresponde a apenas 7% da superfície da terra. Dessa forma, essas regiões devem ser consideradas como prioritárias no estabelecimento de programas de conservação *in situ* de germoplasma (conjunto de genótipos de uma espécie, considerada como um todo) vegetal (GIULIETTI et al., 2005).

O resgate e a revalorização crescente da Fitoterapia no Brasil exigem cuidados para que muitas plantas de alto valor medicinal não desapareçam das Matas, da Caatinga e do

Cerrado, antes mesmo que os cientistas descubram suas propriedades para depois transformá-las em remédios. Para tanto, a principal providência da gestão da biodiversidade é desenvolver técnicas de cultivo e colheita que não comprometam a reprodução das espécies, assim como evitar que o crescimento urbano desordenado cause o extermínio das áreas verdes ricas em ervas medicinais, periféricas às cidades (LOPEZ, 2006). Além disso, nesta gestão devem também valorizar a cultura local, os saberes tradicionais e as formas regionais da relação com os diferentes ecossistemas. Estudiosos e ambientalistas salientam que, principalmente quando as populações tradicionais apresentam algum tipo de comércio local, estes aspectos devem ser fortalecidos, visando o uso racional das espécies e o ecodesenvolvimento (GANEM, 2011).

Em especial, o estado de Minas Gerais, influenciado pela miscigenação das culturas, enriqueceu a prática do uso das plantas na medicina popular no Brasil e algumas espécies, principalmente pertencentes à família Asteraceae, são ainda usadas atualmente. Dentre as plantas desta família, destacam-se a alcachofra (*Cynara scolymus* L), utilizada como hipoglicemiante e hipocolesterolêmica, a arnica (*Solidago chilensis* Meyen), para dor e inflamação, e o assa-peixe (*Vernonia polyanthes* Less) para o tratamento de tosse e bronquite e como cicatrizante (ALMEIDA et al., 2009).

2.2 FAMÍLIA ASTERACEAE

A família Asteraceae, também denominada Compositae, é o grupo sistemático mais numeroso dentro das Angiospermas, compreendendo cerca de 1.100 gêneros e 25.000 espécies e representa 10% da flora mundial (VERDI et al., 2005; BARROSO et al., 1991; MAIA et al., 2010). O Brasil, onde se encontra boa parte da diversidade desta família, possui aproximadamente 180 gêneros e 1.900 espécies, distribuídas nas regiões tropicais, subtropicais e temperadas (ROMERO; NAKAJIMA, 1999).

As Asteráceas apresentam aspectos muito variados que incluem principalmente pequenas ervas ou arbustos e raramente árvores. Segundo Verdi e outros (2005), 98% dos gêneros são constituídos por vegetais de pequeno porte e são encontrados em todos os tipos de *habitats*, mas, sobretudo nas regiões tropicais montanhosas da América do Sul.

Forma um grupo facilmente reconhecível e obviamente monofilético onde tanto sinapomorfias (características que duas ou mais espécies compartilham em comum e que as

diferenciam de seu ancestral comum) morfológicas quanto moleculares são numerosas (JUDD et al., 1999). As folhas são variadas, inteiras ou fendidas, alternadas ou opostas. A inflorescência típica da Asteraceae é o capítulo, que é constituído de uma a muitas flores, assentadas sobre um receptáculo comum e cercado por brácteas involucrais dispostas em uma ou mais séries (BARROSO et al., 1991). Podem apresentar simetria radial ou zigomorfa e serem hermafroditas ou apresentarem sexo separado, estando na mesma inflorescência ou em plantas dioicas (JOLY, 1998). Os frutos nesta família frequentemente apresentam pápus persistente e transformado em uma estrutura de dispersão, sendo a anemocoria (dispersão pelo vento) e a zoocoria (dispersão pelos animais) as formas mais significativas (HEIDEN et al., 2007).

O nome Áster do grego faz referência a suas estruturas florais na forma de estrelas. Plantas da família Asteraceae foram exaustivamente estudadas nos últimos 25 anos não somente quanto à sua morfologia, anatomia, ontogenia e ecologia, mas também quanto a sua fotoquímica, citogenética e estrutura macromolecular e algumas dessas têm sido base para obtenção e criação de novos fármacos (protótipos), inseticidas, entre outros (NAKAJIMA; SEMIR, 2001; BREMER, 1996; NIJS; MENKEN, 1996).

Muitas espécies são cultivadas como ornamentais como a margarida (*Leucanthemum vulgare*) e os crisântemos (*Chrysanthemum spp.*). Diversas plantas medicinais estão incluídas nesta família, destacando a carqueja (*Baccharis trimera*) e o guaco (*Mikania spp.*). Também apresenta as principais plantas invasoras, incluindo o picão-preto (*Bidens pilosa*) e o dente-de-leão (*Taraxacum officinale*) (SOUZA; LORENZI, 2005).

Nos campos, os gêneros *Vernonia*, *Baccharis* e *Senecio* são frequentes. Em florestas secundárias as Asteráceas podem ser relativamente comuns, especialmente espécies arbustivas ou arbóreas de *Vernonia*, como o assa-peixe (*V. polyanthes*) (SOUZA; LORENZI, 2005).

Dentre as inúmeras plantas da família Asteraceae utilizadas na medicina caseira, destaca-se a *Artemisia absinthium*, uma erva de sabor amargo conhecida popularmente como losna, que possui benéficas funções digestivas, sendo utilizada também para a fabricação da bebida absinto. Espécies dessa família têm sido investigadas e uma variedade de metabólitos secundários tem sido identificada, principalmente substâncias flavonoídicas que são consideradas como importantes marcadores quimiotaxonômicos, possuindo importância terapêutica, no tratamento e prevenção de várias doenças (VERDI et al., 2005).

2.3 GÊNERO *Vernonia*

O gênero *Vernonia* recebeu essa denominação em homenagem a Will Vernon, pesquisador botânico que viajou pela América do Norte (ZANON, 2006). Este gênero, um dos maiores e mais importantes da família Asteraceae, é 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. Inúmeras espécies de *Vernonia* integram o elenco de plantas medicinais de várias partes do mundo, inclusive do Brasil (MAIA et al., 2010).

Substâncias bioativas como lactonas sesquiterpênicas que apresentam propriedades antimicrobiana, anticâncer e antiplasmódica, glicosídeos esteroidais que revelam atividade anti-inflamatória, e sesquiterpenoides citotóxicos têm sido isolados de espécies do gênero *Vernonia* (ROOS et al., 1998; MAIA et al., 2010). Adicionalmente, espécies deste gênero são ricas em glândulas oleíferas e muitos dos seus óleos essenciais apresentam atividades biológicas, como antimicrobiana e inseticida (MAIA et al., 2010).

Algumas espécies de *Vernonia* já tiveram sua ação terapêutica cientificamente comprovada. Dentre estas, destacamos as espécies *Vernonia colorata*, com atividade antibacteriana e anti-inflamatória, e *Vernonia cinerea*, com atividades analgésica, antipirética, anti-inflamatória e ação citotóxica (OLGUIM et al., 2005). Foram investigadas, também, *Vernonia arborea* e *Vernonia scorpioides* com atividade antifúngica, *Vernonia amygdalina* como agente antimalárico e anticancerígeno, e *Vernonia liatroides* com ação relaxante muscular (CAMPOS et al., 2003).

Plantas do gênero *Vernonia* são utilizadas em várias partes do mundo para o tratamento de inúmeras enfermidades. Por exemplo, *Vernonia Amigdalina* faz parte da Farmacopeia Natural da Nigéria, onde é usada como anti-helmíntica em humanos e em animais de criação (ALAWA et al., 1999). Esta espécie também é utilizada tradicionalmente para distúrbios estomacais e gastrintestinais, a decocção das folhas no tratamento da malária (AKINPELU et al., 1999), como abortivo (AWE et al., 1999) e na redução da pressão sanguínea (AWE et al., 1998). Segundo Iglie e outros (1995), extratos aquosos ou alcoólicos são muito usados na terapêutica, incluindo aplicações antimaláricas, anti-helmínticas, anti-anoréxicas e ginecológicas.

Em Camarões, a planta *Vernonia guinensis* é empregada como anti-helmíntica, afrodisíaca, como antídoto para venenos e no tratamento da malária e icterícia (TCHINDA et al., 2002). A decocção das folhas de *V.colorata* tem diversas aplicações na medicina

tradicional africana, especialmente no tratamento de febre, tosse, diarreia e como tônico geral (RABE et al., 2002)

Na medicina tradicional do Paquistão, Filipinas e Índia, *Vernonia anthelmintica* é utilizada como anti-helmíntica, enquanto na China tem emprego no tratamento de vitiligo e mostrou ser uma alternativa para o tratamento do câncer de mama (HORDEGER et al., 2003).

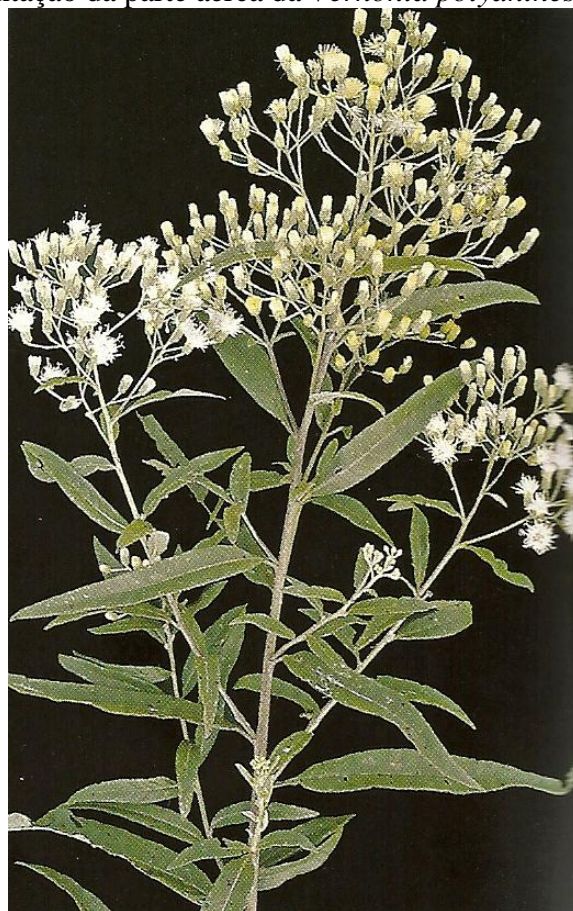
No Brasil, o macerado das folhas de *Vernonia condensata* é usado na medicina tradicional como analgésico, anti-ulcerogênico, além de prevenir distúrbios no estômago e no fígado (FRUTUOSO et al., 1994). O chá das raízes dessa *Vernonia* tem ação expectorante e é a terceira planta medicinal mais utilizada em Goiânia-Goiás (RIZZO et al., 1990).

2.4 ESPÉCIE *Vernonia polyanthes*

V. polyanthes, popularmente conhecida como assa-peixe, assa-peixe branco, estanca-sangue, tramanhém, mata-pasto, cambará-guassu e enxuga, é uma planta silvestre, comum nos cerrados de São Paulo, Mato Grosso, Minas Gerais e Goiás. Multiplica-se com facilidade em terrenos de pastagens e solos pouco férteis, nas beiras de estradas, sendo até mesmo consideradas plantas daninhas nas culturas perenes (ALVES; NEVES, 2003).

É um arbusto grande ou arvoreta, perene, ereto, pouco ramificado, rizomatoso, de caules pubescentes de coloração acinzentada, com 1-3 m 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, possuem cerca de 10-24 cm de comprimento e 3 cm de largura (Figura 1). A lâmina foliar possui como características anatômicas ser dorsiventral, com tricomas em ambas as faces (Figura 2). 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. As flores esbranquiçadas, melíferas, reunidas em capítulos pequenos dispostos em panículas terminais, são as principais características morfológicas desta espécie (LORENZI; MATOS, 2002).

Figura 1. Representação da parte aérea da *Vernonia polyanthes* Less.



Fonte: LORENZI; MATOS, 2002.

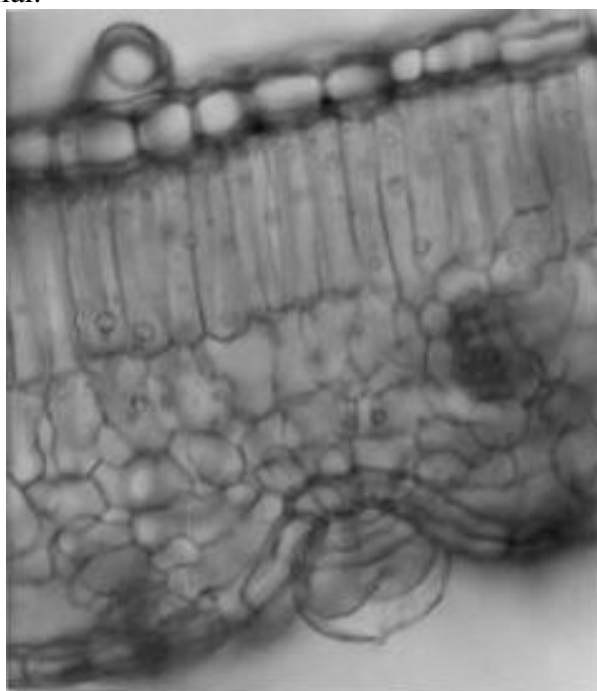
Floresce de junho a julho, ocorrendo em áreas perturbadas, ou seja, aquelas que sofreram distúrbio, mas mantiveram meios de regeneração biótica. São observadas diversas espécies de abelhas e borboletas e uma espécie de beija-flor visitando as inflorescências de *V. polyanthes* Less. Leitão-Filho e outros (1972) consideraram a espécie uma planta apícola por excelência. *V. polyanthes* Less pode ser reconhecida por apresentar ramos nitidamente angulosos, indumento estrigoso na face adaxial da lâmina foliar, capítulos dispostos em inflorescências laxas e cipselas glabras (FERREIRA, 2006).

As folhas de *V. polyanthes* são utilizadas no tratamento de afecções do aparelho respiratório, de problemas renais, de feridas e fraturas e em torções, contusões e luxações. É ainda indicada como tônica, emenagoga, diurética, cicatrizante e anti-inflamatória (SOUZA et al., 2008; ALVES; NEVES, 2003).

Na pesquisa de constituintes fitoquímicos, sabe-se que *V. polyanthes* Less apresenta reação positiva para flavonóides, marcadores quimiotaxonômicos das Asteráceas, capazes de diminuir a permeabilidade dos capilares e reforçar a sua resistência (SOUZA et al., 2008).

Possuem também ações sobre a redução do ácido dehidroascórbico, aumentando o aproveitamento da vitamina C, além de promoverem a melhoria da atividade anti-inflamatória por inibição da peroxidação do ácido araquidônico, reforçam a qualidade das fibras de colágeno, assim como sua propriedade vitamínica P (fator P), reconhecidos, ainda, por terem efeitos benéficos principalmente em alterações circulatórias (ZUANAZZI; MONTANHA, 2001; FRACARO et al., 2004).

Figura 2. Lâmina foliar com a organização do mesofilo e tricoma secretor do tipo capitado na epiderme abaxial.



Fonte: ALVES; NEVES, 2003.

2.5 METABOLISMO VEGETAL

Os vegetais produzem uma grande variedade de substâncias orgânicas que parecem não ter função direta sobre o seu crescimento e desenvolvimento. Tais substâncias, conhecidas como metabólitos secundários (especiais ou naturais), não apresentam efeitos diretos sobre processos celulares primários como fotossíntese, respiração, translocação de solutos e água, síntese de proteínas e assimilação de nutrientes, dentre outros. Estes diferem dos metabólitos primários (aminoácidos, nucleotídeos, açúcares e lipídios) pela distribuição restrita no reino vegetal, sendo característicos de uma espécie ou de um grupo de espécies

relacionadas, enquanto os metabólitos primários são de ocorrência universal (COSTA, 1978). Os metabólitos secundários defendem os vegetais contra herbívoros e patógenos, sendo divididos em três grupos principais: os terpenos, as substâncias fenólicas e as substâncias nitrogenadas (VICKERY e VICKERY, 1981).

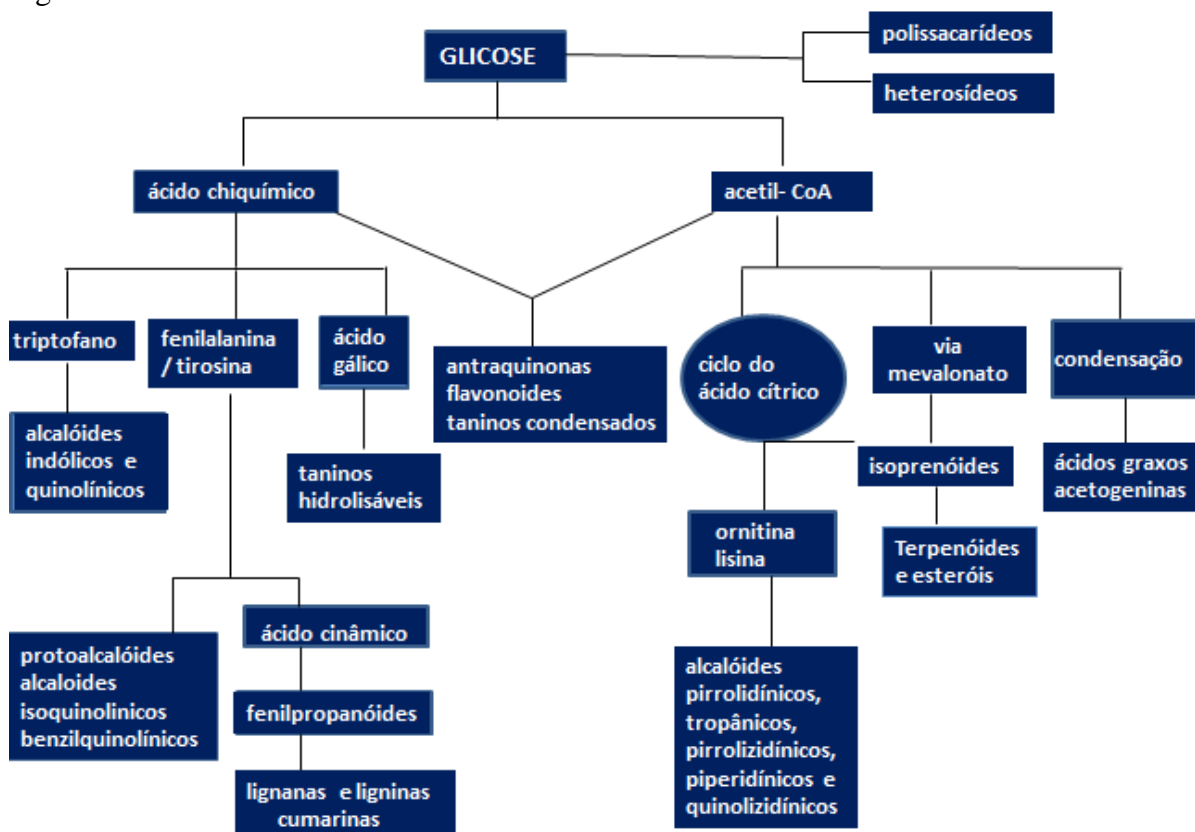
Os terpenos (ou terpenóides) constituem o maior grupo de produtos secundários. As diversas classes são, em geral, insolúveis em água e sintetizadas a partir do acetil-CoA. Exemplos de terpenóides incluem as giberelinas, os carotenóides e os piretróides (ROBINSON, 1991).

Constituintes fenólicos são substâncias que contêm um grupo fenólico em sua molécula. Constituem em vegetais um grupo muito heterogêneo com mais de 10.000 substâncias. Alguns são solúveis somente em solventes orgânicos enquanto outros são solúveis em água, havendo alguns altamente insolúveis. Suas funções metabólicas são variadas. Duas vias metabólicas estão envolvidas na síntese dos constituintes fenólicos: a via do ácido chiquímico e a via do acetato. Como exemplos de constituintes fenólicos destacam-se as ligninas, as cumarinas, os flavonóides e os taninos (ROBINSON, 1991).

As substâncias nitrogenadas formam uma grande variedade de metabólitos secundários contendo nitrogênio na sua estrutura. Estas incluem algumas substâncias bem conhecidas relacionadas à defesa vegetal contra herbivoria, como os alcalóides e os glicosídeos cianogênicos. Algumas dessas substâncias são tóxicas aos humanos, embora outras possam ser utilizadas no tratamento de doenças devido a suas propriedades medicinais. Os metabólitos secundários nitrogenados são sintetizados a partir de aminoácidos do metabolismo protéico (COSTA, 1978).

A rota biossintética dos principais metabólitos secundários está representada na Figura 3.

Figura 3: Ciclo biossintético dos metabólitos secundários.



Fonte: adaptado de SIMÕES et al. (2001).

2.6 CONSTITUINTES FENÓLICOS

Constituintes fenólicos de origem natural são representados por substâncias que apresentam desde peso molecular baixo àqueles mais elevados, com estruturas mais complexas, como taninos condensados e hidrolisáveis e ligninas. Tais constituintes podem ser classificados segundo o tipo do esqueleto básico conforme apresentado na Tabela 1, onde C6 corresponde ao anel aromático com uma hidroxila (OH) e CX a cadeia substituinte com X átomos de carbono (CARVALHO et al., 2000).

Substâncias fenólicas podem ser biossintetizadas pelas vias do ácido chiquímico, acetato, ou por ambas (via mista). Dependendo da via, o padrão de substituição na substância fenólica pode ser determinado. A via do ácido chiquímico produz substâncias com grupos OH na posição *orto*, que se formam a partir do ácido cinâmico, enquanto a via do acetato origina moléculas OH dispostas em *meta*. Um exemplo de substância dessa última via é o timol que é um terpenóide fenólico (ANDERSEN; MARKHAM, 2005; DEWICK, 2009).

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

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

Fonte: CARVALHO et al. (2000).

Aos constituintes fenólicos, encontrados em diversos vegetais, são atribuídas as propriedades de sabor, odor e coloração. Em decorrência dessas propriedades, substâncias fenólicas, como o aldeído cinâmico e a vanilina, são empregadas nas indústrias de alimentos e bebidas como flavorizantes e corantes. Além disso, substâncias fenólicas, tais como hidroquinona, ácido elágico e ésteres do ácido gálico, possuem propriedades de defesa das plantas, além de participarem na interrelação entre animais e vegetais, com atividades de inibição da germinação de sementes, do crescimento de fungos e de plantas em geral. Alguns arilpropanóides também têm importante papel na supressão do apetite de insetos (VERMERRIS; NICHOLSON, 2007).

Os vegetais são ricos em substâncias antioxidantes como os constituintes fenólicos que são produtos do metabolismo secundário. Esta característica é resultado do processo evolutivo das espécies como proteção natural aos radicais livres formados pela radiação ultravioleta (UV) necessária à fotossíntese. Tais substâncias são antioxidantes primários, pois neutralizam a reatividade radicalar através da doação de um átomo de hidrogênio, bloqueando as reações

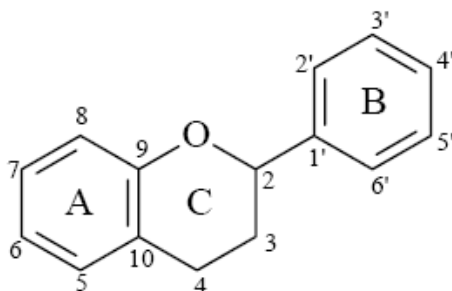
em cadeia (F'GUYER et al., 2003; NIKOLIC, 2006). Entre os constituintes fenólicos que possuem atividade antioxidante, destacam-se os flavonoides que serão descritos no item seguinte.

2.7 FLAVONOIDES

Flavonóides são substâncias fenólicas de baixo peso molecular e representam uma ampla classe de constituintes encontrada no reino vegetal (ANDERSEN; MARKHAM, 2005; BUER et al., 2010). São encontrados em frutas, vegetais, sementes, cascas de árvores, raízes, talos, flores e em seus produtos de preparação, tais como os chás e vinhos (NIJVELDT et al., 2001). Esses constituintes são conhecidos como pigmentos amarelos, sendo responsáveis pela maioria dos corantes amarelos, vermelhos e azuis presentes nas plantas (WINKEL-SHIRLEY, 2001). Por atuarem em diferentes sistemas orgânicos, diversas propriedades biológicas e farmacológicas são atribuídas a essas substâncias (NIJVELDT et al., 2001; TAPAS et al., 2008).

Do ponto de vista químico, os flavonóides são substâncias aromáticas que contêm 15 átomos de carbono no seu núcleo fundamental (Figura 4). Este núcleo comum é caracterizado por dois anéis aromáticos (A e B) e um heterociclo oxigenado (anel C) (ANDERSEN; MARKHAM, 2005; WINKEL-SHIRLEY, 2001).

Figura 4. Estrutura básica dos flavonoides.

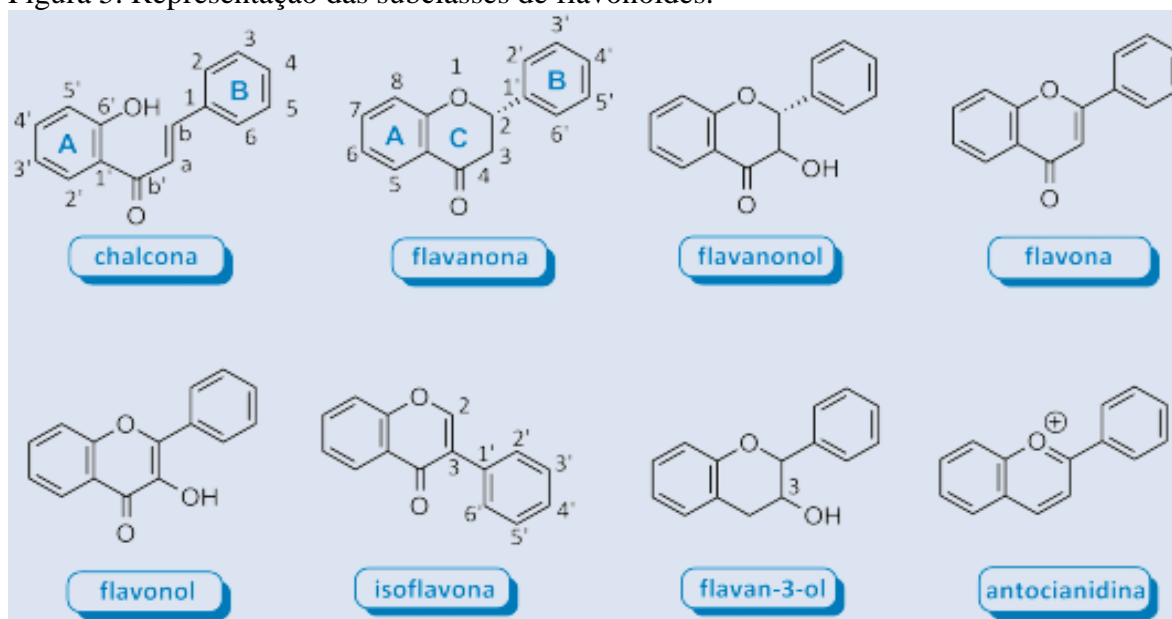


Fonte: ARAÚJO et al. (2005).

A diversidade de grupos substituintes, combinada a vários padrões de hidroxilação, metilação, glicosilação e outras substituições que podem ocorrer nos anéis aromáticos, gera uma grande diversidade de flavonoides, compreendendo mais de 9.000 estruturas

identificadas (BUER et al., 2010). A biossíntese dessas substâncias ocorre a partir da via mista do acetil-CoA e ácido chiquímico (ANDERSEN; MARKHAM, 2005; PIETTA, 2000; BUER et al., 2010). Dentre as subclasses de flavonoides podemos citar as antocianinas, as antocianidinas, os flavonóis, as flavononas, as flavonas, as catequinas, os flavanóis e as chalconas (ANDERSEN; MARKHAM, 2005; PIETTA, 2000; WINKEL-SHIRLEY, 2001). As estruturas dos esqueletos das principais subclasses de flavonoides são mostradas na figura 5.

Figura 5. Representação das subclasses de flavonoides.



Fonte: COUTINHO et al. (2009).

Como função biológica, os flavonoides protegem as plantas dos raios UV, de insetos, fungos, vírus e bactérias. Também ajudam a atrair polinizadores, regulam a ação de hormônios, inibem enzimas e funcionam como agentes alelopáticos (ANDERSEN; MARKHAM, 2005; BUER et al., 2010).

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 (TAPAS et al., 2008). Atuam 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 (ONWUKAEME, 1995; NIJVELDT et al., 2001), podendo apresentar atividades anti-inflamatória e analgésica (NIJVELDT et al., 2001; BUER et al., 2010). A catequina, um

flavonóide de ocorrência natural, demonstrou atividades antiespasmódica, broncodilatadora e vasodilatadora (GHAYUR; KHAN; GILANI, 2007). A atividade antioxidante destas substâncias pode proteger o corpo de efeitos cancerígenos e prevenir doenças crônico-degenerativas. São capazes de prevenir doenças cardiovasculares, seja pela inibição da agregação plaquetária, pela redução dos altos níveis de lipídios no sangue (triglicérides; colesterol), ou pela prevenção da oxidação de lipoproteínas de baixa densidade (LDL) (FRANKEL et al., 1993; ARAUJO, 2005). Uma mistura de flavonóides glicuronídeos, consistindo de kaempferol 7-O-glicuronídeo e quercetina 3-O-rutinosídeos, 3-O-gentiobiosídeos e 3-O-glicosídeos, isolada de *Tulipa gesneriana* L., mostrou atividade de proteção contra o aumento da permeabilidade vascular de pele de coelhos (BUDZIANOWSKI et al., 1999). Possuem também atividades tripanomicida e leishmanicida (SÜLSEN et al., 2007) e apresentam atividade antibacteriana e antiviral (HERNÁNDEZ; TERESCHUK; ABDALA, 2000). A tabela 2 traz alguns exemplos de flavonóides e suas respectivas fontes alimentares.

Tabela 2. Principais subclasses dos flavonoides.

Sub-classes	Cor	Flavonóides Representativos	Fontes Alimentares
Antocianidina	Azul, Vermelho e violeta	Cianidina	Frutas e flores
Flavonol	Incolor e amarelo	Catequina, epicatequina e 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: adaptado de ACKER et al. (1996).

2.8 ASPECTOS GERAIS DA AÇÃO ANTIOXIDANTE

As moléculas orgânicas e inorgânicas e os átomos que contêm um ou mais elétrons não pareados, com existência independente, podem ser classificados como radicais livres. Essa configuração faz dos radicais livres moléculas altamente instáveis, com meia-vida curtíssima e quimicamente muito reativas. A presença dos radicais é crítica para manutenção de muitas funções fisiológicas normais (BIANCHI; ANTUNES, 1999).

Os danos oxidativos induzidos nas células e tecidos têm sido relacionados com a etiologia de várias doenças, incluindo doenças degenerativas tais como as cardiopatias, aterosclerose e problemas pulmonares (MORAIS et al., 2009). Os danos no DNA causados pelos radicais livres também desempenham um papel importante nos processos de mutagênese e carcinogênese. A utilização de substâncias antioxidantes é um dos mecanismos de defesa contra os radicais livres que podem ser empregados nas indústrias de alimentos, cosméticos, bebidas e também na medicina, sendo que muitas vezes os próprios medicamentos aumentam a geração intracelular desses radicais (BIANCHI; ANTUNES, 1999).

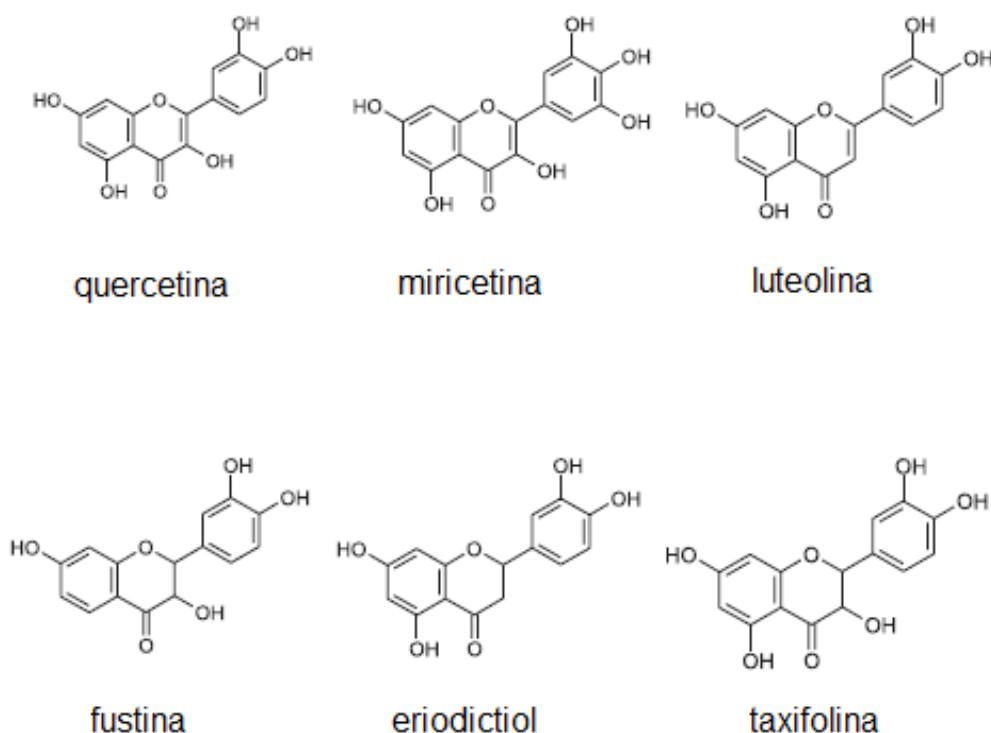
A geração de radicais livres pode ocorrer no citoplasma, nas mitocôndrias ou na membrana, e o seu alvo celular (proteínas, lipídeos, carboidratos e moléculas de DNA) está relacionado com seu sítio de formação (SHAMI, MOREIRA, 2004). A oxidação nos sistemas biológicos ocorre devido ao desequilíbrio entre o sistema antioxidante e a geração de radicais livres. Os ácidos graxos poli-insaturados das membranas, por exemplo, são muito vulneráveis ao ataque de radicais livres. Estas moléculas desencadeiam reações de oxidação nos ácidos graxos da membrana lipoproteica, denominadas de peroxidação lipídica, que afetarão a integridade estrutural e funcional da membrana celular, alterando sua fluidez e permeabilidade. Além disso, os produtos da oxidação dos lipídios da membrana podem causar alterações em certas funções celulares (SOARES, 2002).

Os antioxidantes podem ser definidos como substâncias capazes de retardar ou inibir a oxidação de substratos oxidáveis, podendo ser enzimáticos ou não enzimáticos, tais como α -tocoferol (vitamina E), β -caroteno, ascorbato (vitamina C) e os componentes fenólicos (como os flavonóides) (HALLIWELL, 2001). O consumo de antioxidantes naturais, como os constituintes fenólicos, presentes na maioria das plantas, inibe a formação de radicais livres, e tem sido associado a uma menor incidência de doenças relacionadas com o estresse oxidativo (DROGE, 2002).

Os flavonóides, por exemplo, possuem uma estrutura que facilita muito o sequestro de radicais, tornando-os potentes antioxidantes. Sua eficácia é determinada por cinco fatores: facilidade com que doa H 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 H e de elétrons (CAO; PRIOR, 1997). No entanto, flavonóides, flavonas e flavanonas monohidroxilados apresentam atividade antioxidante muito baixa. Dessa forma, para proteger os lisossomos e membranas contra o estresse

oxidativo são necessárias no mínimo duas hidroxilas fenólicas no flavonóide. Flavonóides polihidroxilados, como por exemplo, a miricetina, quercetina, luteolina, fustina, eriodictiol e taxifolina (Figura 6) possuem forte atividade antioxidante quando comparados aos antioxidantes α -tocoferol, ácido ascórbico, β -caroteno, glutatona, ácido úrico e bilirrubina (CAO; PRIOR, 1997; YANG et al., 2001).

Figura 6. Exemplos de flavonóides antioxidantes.



Fonte: BARREIROS; DAVID (2006).

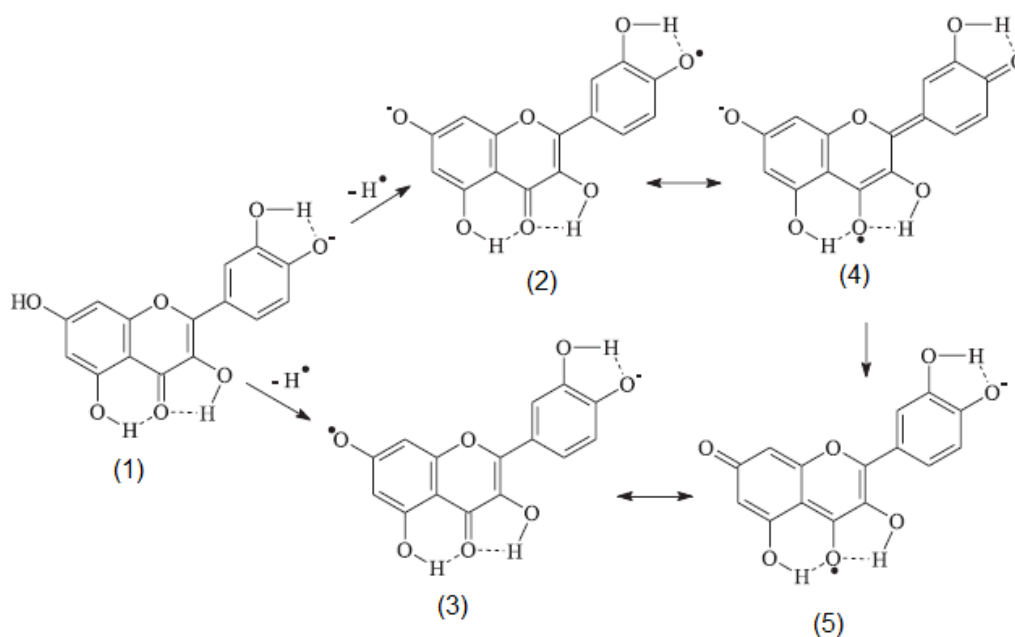
Para que o radical livre flavanoil formado seja estável, este tem que ser capaz de rearranjar o elétron desemparelhado. Assim, a presença de hidroxilas na posição *orto*, a presença de insaturação no anel C (Figura 7) favorecem a estabilidade. A doação do H• ocorre mais facilmente nas hidroxilas das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

Os metais de transição que estão livres no meio biológico catalisam reações que dão origem a radicais. Quanto maior for a capacidade do flavonóide de quelar metais de transição, maior será a sua eficiência como antioxidante (RICE-EVANS et al., 1997; BORS et al.,

1990). Além disso, a interação dos flavonóides com as biomembranas possibilita que eles permaneçam próximos aos sítios de ataque dos radicais, evitando a difusão e ataque das espécies reativas de oxigênio (ERO) e das espécies reativas de nitrogênio (ERN) à membrana (VAN ACKER et al., 1996).

A quercetina (1) parcialmente ionizada em C-4' (Figura 7), 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 (5) e (6).

Figura 7. Mecanismo de estabilização do elétron desemparelhado do flavonóide.



Fonte: BARREIROS; DAVID, 2006.

2.9 ASPECTOS GERAIS DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DOS PRODUTOS NATURAIS

Desde a descoberta das penicilinas naturais, novos antimicrobianos com espectro de ação cada vez mais amplo têm surgido e sido aplicados na terapêutica. Entretanto, o uso irracional dos antibacterianos tem potencializado o evento de resistência, limitando as opções

terapêuticas no tratamento das infecções e tornando um problema de saúde pública para a população mundial (CUNICO et al., 2004). A limitação dos fármacos em decorrência da resistência tem aumentado significativamente a pesquisa por substâncias antibacterianas derivadas de plantas (COELHO et al., 2004; SHER, 2009). Neste sentido, substâncias, extratos e óleos essenciais de plantas têm se mostrado eficientes no controle do crescimento de uma ampla variedade de microrganismos, incluindo fungos filamentosos, leveduras e bactérias (JANSEN; SCHEFFER; BAERHEIM, 1987; SHER, 2009).

O potencial antimicrobiano de plantas medicinais tem sido investigado nas últimas décadas (RIOS; RECIO, 2005; USHIMARU et al., 2007; MAHESH; SATISH, 2008). O interesse dos pesquisadores pelas plantas para descobertas de novos antimicrobianos é devido à variedade de substâncias químicas pertencentes a diferentes classes de metabólitos secundários, tais como, cumarina, flavonóides, terpenóides, alcalóides e taninos (COWAN, 1999; KAROU et al., 2006; TANAKA et al., 2006; CUSHNIE; LAMB, 2005; SINGH; SINGH, 2003; SHER, 2009). Entre essas substâncias, os constituintes fenólicos, como os flavonóides, apresentam potente ação antibacteriana, inclusive frente a cepas resistentes (NASCIMENTO et al., 2000; CUSHNIE; LAMB, 2005; ÖZÇELIK et al., 2008; RATTANACHAIKUNSOPON; PHUMKHACHORN, 2010).

Dentre as plantas já estudadas e que apresentaram potencial antimicrobiano é citada a *Mentha suaveolens*, onde o óleo essencial inibiu o crescimento de bactérias Gram positivas e negativas (OUMZIL et al., 2000). O extrato de *A. absinthium* produziu concentração inibitória mínima que variou entre 165 a 2640 mg/mL contra *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Listeria sp.*, *Salmonella spp.* e *Escherichia coli* (ALZORIKY; NAKAHARA, 2003). Óleos essenciais de *Mentha piperita* L. e *Mentha arvensis* L. foram ativos sobre *Helicobacter pylori* e *S. aureus*, tanto linhagens sensíveis como resistentes a antibióticos (IMAI et al., 2001).

Atividade antibacteriana foi observada com os extratos hexânicos das flores de *M. calabura* contra *B. subtilis* e o extrato etanólico das folhas inibiram *S. aureus* e *B. subtilis* na concentração de 1 mg/mL (RAMOS et al., 2009). Pelissari, Pietro e Moreira (2010) analisaram a atividade antibacteriana dos óleos essenciais obtidos a partir de partes aéreas de *M. divaricatum* que foram ativos contra *S. aureus* e *B. subtilis*.

Do extrato butanólico de *C. psidiiflorus* foi isolado o 8-hidroxicalameneno que foi fortemente ativo frente a *S. aureus* e *B. subtilis* (DOMINGUES et al., 2010). Já o óleo da resina de *Copaifera multijuga* inibiu o crescimento de *E. coli*, *S. aureus* e *Pseudomonas aeruginosa* (MENDONÇA; ONOFRE; 2009), enquanto o óleo essencial das folhas de *L.*

camara mostrou considerável atividade antibacteriana frente às linhagens de *Proteus vulgaris*, *E. coli* e *S. aureus* (COSTA et al., 2009).

Espécies do gênero *Vernonia* têm sido estudadas quanto ao seu potencial antimicrobiano. Lactonas sesquiterpênicas isoladas de *Vernonia fastigata* apresentam atividade antibacteriana (ROOS et al., 1998). Braga e outros (2007) observaram uma ação inibidora do extrato de assa-peixe (*V. polyanthes*) sobre linhagens de *Leishmania*. O extrato da própolis do assa-peixe apresentou ação antimicrobiana contra *Paenibacillus larvae* (BASTOS et al., 2008), enquanto extratos hidroalcoólicos de *V. polyanthes* produziram ação antimicobacteriana significativa (OLIVEIRA et al., 2007).

A propriedade antibiótica das plantas é devido a pequenas moléculas conhecidas por fitoalexinas, apresentando natureza química de terpenóides, glicosídeos, flavonóides e polifenóis. Normalmente, os extratos têm demonstrado atividade antibiótica no combate às infecções em decorrência do sinergismo entre os constituintes. Esse mecanismo explica a superioridade terapêutica de muitos extratos de plantas derivados da medicina tradicional quando comparados com seus respectivos constituintes isolados (HEMAISWARY et al., 2008; WAGNER; ULRICH-MERZENICH, 2009).

Considerando os mecanismos de substâncias naturais, geralmente, as ações estão relacionadas à desintegração da membrana citoplasmática, à desestabilização da força próton motriz, ao fluxo de elétrons, ao transporte ativo e à coagulação do conteúdo da célula. Nem todos os mecanismos de ação agem em alvos específicos, podendo alguns sítios serem afetados em consequência de outros mecanismos (BURT, 2004). Uma característica importante responsável pela ação antimicrobiana dos óleos essenciais é os componentes hidrofóbicos que permitem a partição de lipídeos da membrana celular bacteriana, desintegrando as estruturas e tornando-as mais permeável (SIKKEMA et al., 1994). Componentes de óleos essenciais podem também agir em proteínas da membrana citoplasmática (KNOBLOCH et al., 1989), como as enzimas ATPases e distorcer a interação lipidioproteína através da interação direta das substâncias lipofílicas com partes hidrofóbicas da proteína (SIKKEMA; DE BONT; POOLMAN, 1995). Alguns óleos essenciais estimularam o crescimento de pseudomicélios, uma indicação de que pode atuar sobre enzimas envolvidas na síntese de componentes estruturais das bactérias (CONNER; BEUCHAT, 1984).

2.9.1 Microrganismos de Importância Clínica

Staphylococcus aureus é uma bactéria Gram-positiva e, dentro do gênero, destaca-se como a espécie mais virulenta. Uma ampla variedade de fatores contribui para essa virulência, como as toxinas e enzimas que medeiam a invasão tecidual e a sobrevivência no sítio de infecção (BLATT, PIAZZA, 2004; CATÃO et al., 2006). É um dos mais significativos agentes etiológicos de processos infecciosos adquiridos, tanto em pacientes ambulatoriais como em pacientes hospitalizados. As infecções causadas por *S. aureus* apresentam morbidade e mortalidade elevadas, sendo responsável por 20% das infecções bacterianas humanas (BLATT, PIAZZA, 2004; PRATES, BLOCH-JÚNIOR, 2001).

O surgimento nos últimos anos de cepas de *S. aureus* multirresistentes, inclusive isoladas de materiais e equipamentos usados em ambiente hospitalar estão entre os problemas mais relevantes no controle de infecções e na terapêutica antimicrobiana (ARAUJO et al., 2000; CATÃO et al., 2006). Dentre outros fatores, a multirresistência em *S. aureus* é determinada pela presença de plasmídeos que permite a transferência desta resistência em grande frequência (FREITAS, 2003).

Escherichia coli é uma bactéria Gram-negativa presente no trato gastrointestinal dos animais de sangue quente, inclusive o homem, fazendo parte da microbiota intestinal normal. No entanto, algumas linhagens especiais desse microrganismo podem ser patogênicas e causar doenças no homem e em animais, recebendo a denominação genérica de *Escherichia coli* enterovirulenta (EEC). Existem quatro classes distintas de *E. coli* enterovirulenta: *E. coli* patogênica (EPEC), *E. coli* enterotoxigênica (ETEC), *E. coli* enterohemorrágica (EHEC) e *E. coli* invasora (EIEC). Entende-se por EPEC a classe de *E. coli* pertencente a alguns sorogrupos epidemiologicamente associados a gastroenterites caracterizadas por diarreia aquosa ou sanguinolenta, que ocorrem predominantemente em crianças com menos de um ano de idade. Atualmente já existem dados indicando que adultos podem também apresentar esta síndrome. ETEC é a classe de *E. coli* associada à doença diarreica em indivíduos de todas as idades. A diarreia é consequência da ação de enterotoxinas produzidas por essas bactérias no intestino do indivíduo infectado. EHEC está associada à enterocolite hemorrágica em indivíduos de todas as idades. O mecanismo pelo qual essas bactérias causam enterocolite ainda está em estudo, embora se saiba que a síndrome é decorrente da adesão dessas bactérias às células epiteliais intestinais e consequente ação de citotoxinas produzidas no intestino do

indivíduo infectado. No momento são conhecidas pelo menos duas citotoxinas diferentes. As EHEC podem causar diarreia branda e sanguinolenta (colite hemorrágica). A colite pode se agravar e causar uma síndrome muito grave, denominada síndrome urêmica hemolítica em crianças e adultos. Essa síndrome caracteriza-se por anemia hemolítica, trombocitopenia e falha renal aguda que pode se estender a outras partes do corpo, inclusive ao sistema nervoso central (KAPER et al., 2004; BROOKS et al., 2009).

A infecção causada por EIEC consiste em inflamação e necrose da mucosa do cólon (intestino grosso). Clinicamente as infecções se manifestam por diarreia sanguinolenta ou não, com a presença de leucócitos e muco, frequentemente acompanhada de dores abdominais e febre. As infecções por EIEC são mais frequentes em crianças maiores de dois anos e em adultos (KAPER et al., 2004; TRABULSI et al., 1999).

Salmonella typhimurium é uma espécie de bactéria Gram-negativa pertencente à família Enterobacteriaceae que causa a doença chamada salmonelose. Ela se fixa na parede do intestino delgado, mais precisamente nas células M (microcílios), onde se multiplicam e se manifestam causando vômito, diarreia, náuseas, febre, anorexia intensa e cerca de 24 horas após a ingestão de alimentos contaminados (OSKAY; SARI, 2007).

Pseudomonas aeruginosa é um bacilo Gram-negativo, aeróbio. As doenças causadas por *P. aeruginosa* são infecções localizadas, decorrentes de uma contaminação oportunista. Este microrganismo pode causar infecções urinárias e respiratórias, pneumonias, meningites, endocardites e outros tipos de infecção. Entretanto, não há registro de gastroenterite causada por esse microrganismo. Além disso, *P. aeruginosa*, bem como outras espécies de *Pseudomonas*, apresentam grande importância para a indústria de alimentos, pois são causadores de deterioração (SOBERON, SGARIGLIA e SAMPIETRO, 2007).

2.9.2 Métodos Utilizados para Investigação da Atividade Antimicrobiana

Segundo o Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), os testes de sensibilidade a antimicrobianos são convenientes para qualquer organismo que provoque um processo infeccioso e precise de uma terapia antimicrobiana. Quando puder predizer a sensibilidade deste organismo, podem ser empregados para verificar a sensibilidade *in vitro* dos microrganismos frente aos agentes antimicrobianos.

Os mecanismos de ação, apesar de estar pouco caracterizados, parecem associados ao caráter lipofílico das substâncias, havendo um acúmulo em membranas e perda de energia

pelas células (DUARTE, 2006). Não existe um consenso a respeito dos níveis de inibição aceitáveis para substâncias de plantas quando comparadas aos antibióticos padrões (DUARTE, 2006; MENDES et al., 2011).

Uma grande variedade de métodos pode ser empregada para determinar a atividade *in vitro* de microrganismos contra os agentes antimicrobianos (SILVEIRA et al., 2009). Existem vários métodos disponíveis para a detecção da atividade antimicrobiana de produtos naturais (OSTROSKY et al., 2008; VALGAS et al., 2007). Esses métodos são classificados em três grupos, incluindo os métodos de difusão em ágar, bioautográfico e diluição. Os métodos de bioautografia e difusão são conhecidos como técnicas qualitativas uma vez que estes apenas demonstram a presença ou ausência de substâncias com atividade antimicrobiana. Já os métodos de diluição são considerados ensaios quantitativos por determinarem a concentração inibitória mínima (VALGAS et al., 2007).

Segundo Ostrosky e outros (2008) existem diversos fatores que afetam a suscetibilidade do método de difusão e de diluição, tais como: meios de cultura, disponibilidade de oxigênio, inóculo, pH e condições de incubação. Por isso, devem-se conhecer as condições experimentais para que se tenha uma padronização rigorosa na execução do teste.

O teste de difusão em ágar é um método físico, no qual um microrganismo é desafiado contra uma substância biologicamente ativa em meio sólido de cultura e relaciona o tamanho do diâmetro de inibição do crescimento do microrganismo com a concentração da substância ensaiada (PINTO; KANEKO; OHARA, 2003). Na técnica de perfuração em ágar, a remoção do meio sólido de cultura é realizada com auxílio de cilindros de 6-8 mm de diâmetro para a formação de poços, nos quais é possível aplicação das substâncias a serem analisadas (OSTROSKY et al., 2008). Fundamenta-se na difusão da substância a ser ensaiada, em um meio sólido de cultura, inoculado com o microrganismo. A partir da difusão ocorre o aparecimento de um halo, no qual não há crescimento do microrganismo, denominado halo de inibição (VANDEN BERGH; VLIETINCK, 1991).

O método da difusão é mais adequado para avaliar substâncias polares de tamanho molecular pequeno e médio e para determinar o espectro antimicrobiano, pois podem ser utilizadas várias substâncias contra um microrganismo (ALVES et al., 2008). Neste método, um microrganismo é desafiado contra uma substância biologicamente ativa em meio sólido de cultura e relaciona o tamanho do diâmetro de inibição do crescimento do microrganismo com a concentração da substância ensaiada (PINTO; KANEKO; OHARA, 2003). A presença de partículas em suspensão na amostra a ser testada apresenta menor possibilidade de interferir

na difusão da substância antimicrobiana no ágar do que utilizando o disco de papel de filtro, pois este evita a difusão de substâncias antimicrobianas no ágar (HOLETZ et al., 2002).

Apesar da difusão em poço ser considerada como uma técnica qualitativa, a fim de expressar o resultado do teste, existe uma provável correlação com resultados obtidos pela concentração inibitória mínima (ORLANDO, 2005; SILVEIRA et al., 2009).

A concentração inibitória mínima (CIM) corresponde à menor concentração de agente capaz de inibir completamente o crescimento do organismo teste (RICARDO, 2008). Este ensaio pode ser realizado através da macro ou microdiluição de substâncias e consiste em preparar diluições sucessivas da amostra teste em meios de cultura sólida ou líquida, semear o microrganismo e, após incubação, verificar a menor concentração (maior diluição) do antimicrobiano que inibiu o crescimento do microrganismo (CLSI, 2009a).

Após incubação, o crescimento do microrganismo é determinado pela leitura visual direta ou turbidimétrica pelo uso de espectrofotômetro em comprimento de onda apropriado (SILVEIRA et al., 2009), assim como pode-se mensurar a viabilidade e proliferação das células através de corantes indicadores de oxi-redução como Alamar blue e Cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio (DUARTE et al., 2005). As vantagens deste método é proporcionar mais informações quantitativas e ser aplicado a uma variedade mais ampla de isolados do que os testes de difusão (KONEMAN et al., 2001). Além disso, este ensaio requer uma pequena quantidade de amostra, ser barato, ter reprodutibilidade, ser 30 vezes mais sensível que outros métodos usados na literatura e possibilitar um registro permanente (OSTROSKY et al., 2008). As variações referentes à determinação da CIM de extratos de plantas podem ser atribuídas a vários fatores. Dentre eles podemos citar a técnica aplicada, o microrganismo e a cepa utilizada no teste, à origem da planta, a época da coleta, se os extratos foram preparados a partir de plantas frescas ou secas e a concentração de extrato. Assim, não existe método padronizado para expressar os resultados de testes antimicrobianos de produtos naturais (FENNEL et al., 2004).

2.10 MECANISMO FISIOLÓGICO DA NOCICEPÇÃO

A percepção de dor é caracterizada como uma sensação multidimensional, diversificando-se na qualidade e na intensidade sensorial que é afetada por variáveis afetivo-motivacionais (SOUSA, 2002). Dessa forma, a dor é definida como experiência emocional

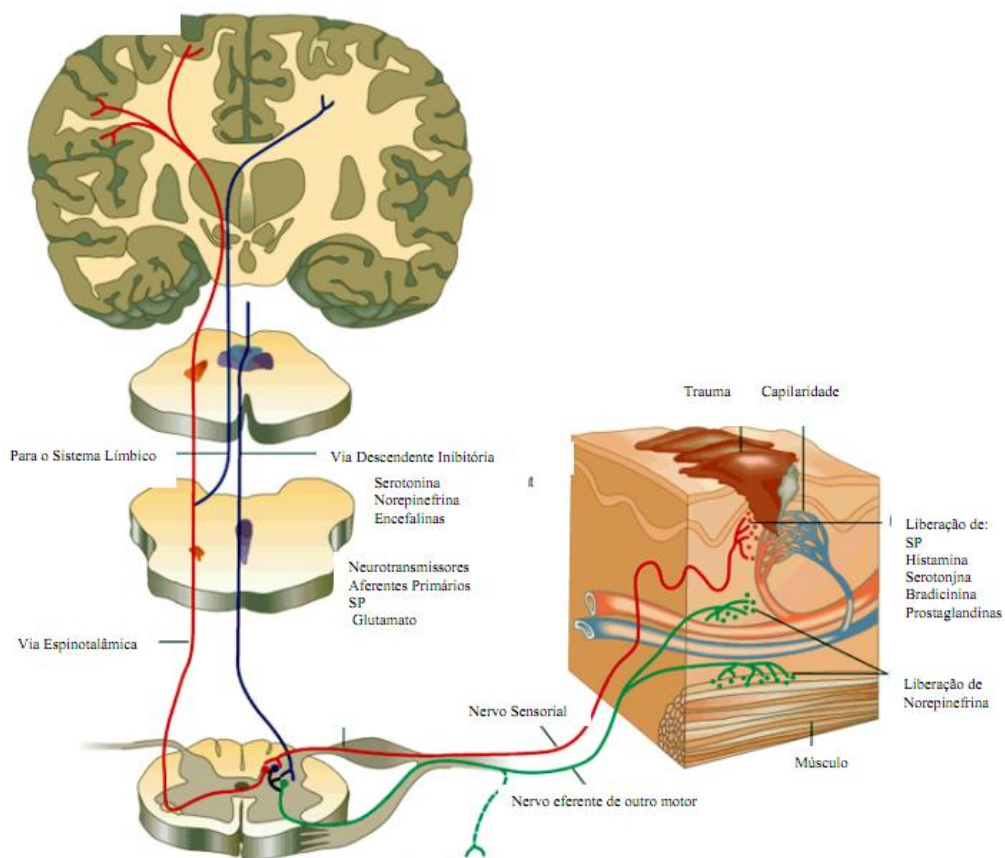
desagradável relacionada a um dano tecidual real ou potencial, sendo dividida nos tipos “nociceptiva” e “neuropática” (SCHESTATSKY, 2008). A dor nociceptiva ocorre por ativação fisiológica de receptores ou da via dolorosa e está relacionada à lesão de tecidos ósseos, musculares ou ligamentares (BENNETT et al., 2006). Já a dor neuropática é definida como dor iniciada por lesão ou disfunção do sistema nervoso, sendo melhor compreendida como resultado da ativação anormal da via nociceptiva (fibras de pequeno calibre e trato espinotalâmico) (SCHESTATSKY, 2008). No entanto, em função da possível concomitância de ambos os tipos de dor e das dificuldades diagnósticas, tem sido recomendado o uso do termo “dor predominantemente neuropática” ou “dor predominantemente nociceptiva”, dependendo do padrão clínico de apresentação (BENNETT et al., 2006).

A dor é reconhecida como um sintoma de alto custo em termos de sobrecarga humana e financeira. O manejo dos sintomas é o foco primário do cuidado. Sabe-se que a dor está relacionada com as mais diversas patologias e suas repercussões são consideradas potencialmente prejudiciais para o organismo. A Agência Americana de Pesquisa e Qualidade em Saúde Pública e a Sociedade Americana de Dor descrevem a dor como o quinto sinal vital que deve sempre ser registrado ao mesmo tempo e no mesmo ambiente clínico em que também são avaliados os outros sinais vitais, quais sejam: temperatura, pulso, respiração e pressão arterial (SOUSA, 2002).

É pressuposta a existência de dois componentes: a sensação dolorosa propriamente dita ou nocicepção, e a reatividade emocional à dor (WANNMACHER; FERREIRA, 2004). A dor também pode ser denominada, segundo o tipo de lesão e/ou os mediadores envolvidos, em: nociceptiva, quando ocorre por estimulação excessiva dos nociceptores; neurogênica, quando ocorre lesão do tecido neuronal; neuropática, quando ocorre a disfunção de um nervo; ou psicogênica, que ocorre por fatores psicológicos (MILLAN, 1999).

Os nociceptores são neurônios com terminações nervosas livres, não-especializadas, que respondem a estímulos nociceptivos, detectando, desse modo, lesão nos tecidos, onde os estímulos desencadeantes podem ser mecânicos, térmicos ou químicos (MILLAN, 2002). Nas vias nociceptoras, os neurônios projetam seus axônios da periferia para o sistema nervoso central, seguindo para a medula, tálamo e córtex cerebral (Figura 8). Assim, o potencial antinociceptivo de uma substância pode ser medido pelo seu poder de aumentar o limiar de excitação dessas terminações nervosas ao estímulo doloroso, ou então, fazer com que os nociceptores não percebam ou não respondam ao estímulo doloroso drogas analgésicas (PERAZA et al., 2007).

Figura 8. Mecanismo de transmissão e percepção da dor. Diagrama esquemático mostrando o corno dorsal da medula espinhal que recebe as informações sensoriais oriundas dos terminais periféricos de fibras nervosas nociceptivas ascendentes (cor vermelha) e fibras descendentes (cor azul).



Fonte: Adaptado de BEAR et al. (2000)

Ocorrendo traumatismo, os receptores nociceptivos modificam-se lentamente, gerando dor prolongada em decorrência da alteração da sua estrutura anatômica e funcional e da liberação de substâncias algigênicas nos tecidos. A sensibilização dos neurônios periféricos gera hiperalgesia termomecânica primária e a dos neurônios centrais hiperalgesia mecânica secundária. As anormalidades neuroplásticas segmentares e supra-segmentares são responsáveis pela sua cronificação. As normalidades comportamentais psíquicas primárias ou secundárias e a adoção de comportamentos anormais pelo reforço da condição de mal-estar contribuem para sua cronificação (TEIXEIRA, 2001).

Um produto ou substância é considerado antinociceptivo quando inibe o estímulo doloroso por algum mecanismo que esteja envolvido na nocicepção. Por exemplo, a dor pode ser desencadeada pela ação dos metabólitos da inflamação, tais como prostaglandinas, sobre receptores de neurônios nociceptores. A inibição da ciclooxigenase, enzima responsável pela biossíntese de prostaglandinas, é um dos mecanismos que suprime a dor. Outro mecanismo

importante para ação antinociceptiva é a ativação dos receptores opióides na medula espinhal. Os opióides, tal como a morfina, causam analgesia por ativar as vias descendentes, por inibir a transmissão no corno dorsal e por impedir a excitação das terminações nervosas sensoriais na periferia (RANG et al., 2007).

Os animais não são capazes de verbalizar os componentes subjetivos da dor, ou seja, neles não se avalia dor, mas nocicepção. Sendo assim, termos como dor e analgesia são mais adotados para humanos e nocicepção e antinocicepção para animais (Jones, 1992). Um dos métodos utilizados para avaliar a ação antinociceptiva é o teste de formalina aplicada na pata de camundongos (HUNSKAAR; HOLE, 1987). Esse método é uma metodologia que melhor mimetiza a dor clínica e é constituída por duas fases dolorosas. A 1ª fase é típica de uma ação em nível de sistema nervoso central, onde as sinapses que contêm receptores opióides constituem um dos mecanismos que controla a dor. Fármacos, como a morfina, podem agir centralmente nesses receptores e diminuir o estímulo doloroso. A morfina também, por ser um fármaco opióide, age na 2ª fase (SHIBATA et al., 1989). A 2ª fase é caracterizada pelo surgimento de um processo inflamatório local, onde são produzidos mediadores da inflamação. Esses mediadores são inibidos por fármacos antiinflamatórios tais como ácido acetilsalicílico, indometacina e dexametasona (RANG et al., 2007).

2.11 MECANISMO DO PROCESSO INFLAMATÓRIO

O processo inflamatório, envolvido em diversas patologias, é caracterizado por uma sequência de processos que, geralmente, é propagada por uma substância estranha ou por lesão física, seguida do recrutamento e ativação de células inflamatórias com a liberação de mediadores da inflamação que são capazes de lesar ou de destruir um micróbio invasor ou tumor. Em alguns casos, a resposta inflamatória é desencadeada por um material estranho normalmente inócua (como, por exemplo, pólen). A inflamação também pode resultar de uma resposta auto-imune ao próprio tecido do hospedeiro, como é observado na artrite reumatóide (SIQUEIRA JR.; DANTAS, 2000; PEAKMAN; VERGANI, 2011).

A área inflamada, em nível macroscópico, exige características marcantes. Os sinais clássicos da inflamação consistem em vermelhidão, intumescimento, calor, dor e perda da função. A expressão efetiva desses processos depende do local de inflamação. Assim, por exemplo, um abscesso cutâneo pode levar ao aparecimento de todos esses sinais. Por outro lado, pneumonia, em virtude da inacessibilidade dos pulmões a um exame físico, pode

manifestar-se tão somente na forma de perda da função (dificuldade respiratória e hipóxia). Todavia, ocorrem processos patológicos semelhantes em ambos os locais (SIQUEIRA JR.; DANTAS, 2000; PEAKMAN; VERGANI, 2011).

Em consequência da resposta inflamatória, o tecido do hospedeiro pode sofrer lesão colateral, visto que muitos dos mediadores inflamatórios não são específicos de determinado tecido-alvo. Assim, muitos dos sinais (febre e respiração trabalhosa) e sintomas (dificuldade respiratória e tosse) clínicos da pneumonia pneumocócica resultam mais da inflamação do que do microrganismo invasor (SIQUEIRA JR.; DANTAS, 2000; PEAKMAN; VERGANI, 2011).

A resposta inflamatória inicial é inespecífica, independente do tipo de agressão. Os eventos que se seguem após essa reação dependem de fatores associados ao agente agressor e ao próprio tecido agredido. Dessa forma, a inflamação pode mostrar uma variedade de quadros clínicos que resulta em uma reação inata e uma resposta imune específica (ABBAS et al., 2008; COTRAN et al., 2000).

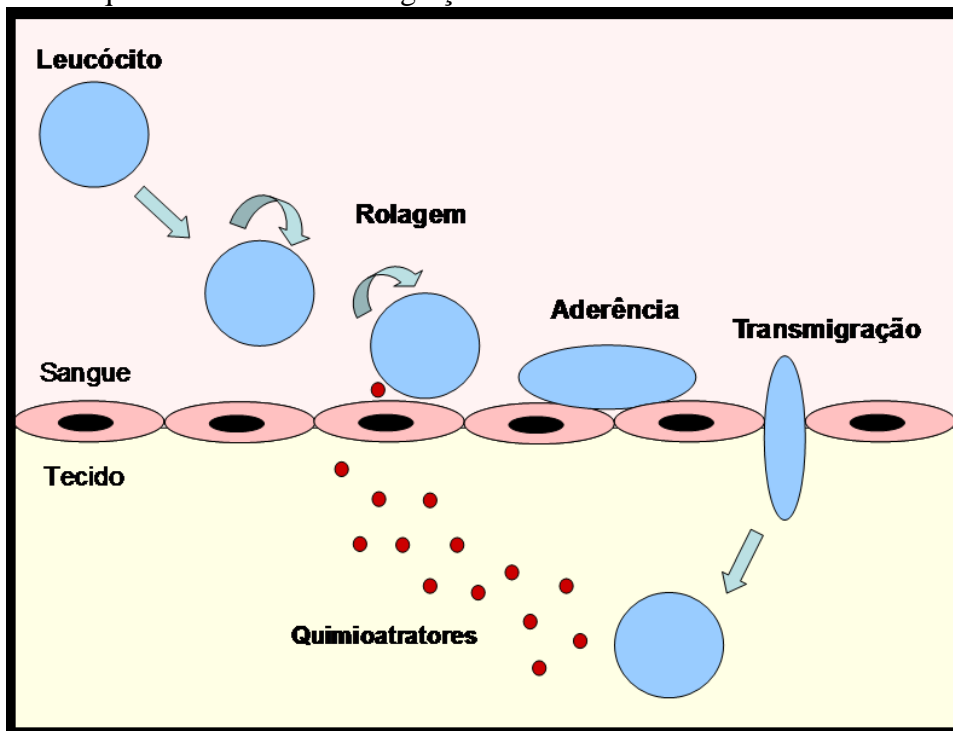
As reações inatas (ou inespecíficas) ocorrem localmente, no interior dos tecidos, podendo se dividir em eventos celulares. Os fenômenos vasculares caracterizam-se por alterações no calibre vascular, que provocam um aumento no fluxo sanguíneo (calor) e por alterações na permeabilidade vascular, conduzindo ao extravasamento de exsudato para o interstício, com conseqüente formação de edema. A vasodilatação e o aumento da permeabilidade vascular com exsudação são provocados por mediadores, produzidos a partir do plasma e das células. Tais mediadores, agindo isoladamente, em conjunto, ou em sequência, amplificam a resposta inflamatória e influenciam sua evolução. Já nos eventos celulares, as células envolvidas estão normalmente presente nos tecidos (como células endoteliais e macrófagos) ou têm acesso ao local a partir da circulação (por exemplo, plaquetas e leucócitos) (COUTINHO et al., 2009).

Os leucócitos circulantes aderem-se ao endotélio vascular e transmigram para o tecido intersticial em direção ao local da lesão, sob sinalização de agentes quimiotáticos (por exemplo, citocinas e leucotrienos). Em seguida, os leucócitos fagocitam o agente agressor e degradam o tecido necrótico (Figura 9) (COUTINHO et al., 2009).

A resposta imunológica específica ou adaptativa auxilia a resposta inata, visto que é específica contra um determinado patógeno invasor. Os anticorpos produzidos pelos linfócitos durante este tipo de resposta imunológica melhoram acentuadamente a resposta do organismo ao hospedeiro. Entretanto, como os anticorpos não podem alcançar os patógenos quando estes se encontram no interior das células, foram desenvolvidos mecanismos imunes mediados por

células. Desta forma, os linfócitos envolvidos migram para área inflamada através de sua interação com as moléculas de adesão e as células endoteliais (MACHADO et al., 2004).

Figura 9. Esquema ilustrativo da migração de leucócitos através do endotélio vascular.



Fonte: COUTINHO et al. (2009).

Na maioria dos casos, a resposta inflamatória acaba regredindo; todavia, se essa regulação não ocorrer, a resposta inflamatória irá exigir uma intervenção farmacológica. A necessidade de drogas anti-inflamatórias surge quando a resposta inflamatória é inapropriada, aberrante, persistente ou provoca destruição dos tecidos (SIQUEIRA JR.; DANTAS, 2000; PEAKMAN; VERGANI, 2011).

Entre os testes utilizados para avaliar a atividade anti-inflamatória, destacam-se edema de pata e a pleurisia induzidos por carragenina. O modelo de edema de pata em ratos por carragenina baseia-se no princípio da liberação de vários mediadores inflamatórios por carragenina. A formação de edema devido à aplicação de carragenina na pata do rato é um evento bifásico. A fase inicial é atribuída à liberação de histamina e serotonina. A segunda fase do edema é devido à liberação de prostaglandinas, protease e lisossomos. A injeção subcutânea de carragenina na pata de rato produz inflamação resultante de extravasamento de plasma, exsudação de fluidos para o tecido lesionado e exsudação de proteínas plasmáticas, juntamente com o extravasamento de neutrófilos, devido ao metabolismo do ácido araquidônico. A primeira fase começa imediatamente após a injeção de carragenina e diminui

em duas horas, enquanto a segunda fase começa no final da primeira fase e permanece através da terceira hora até cinco horas (VINEGAR et al., 1969). O modelo experimental de pleurisia induzida pela carragenina, realizado em camundongos ou ratos, é caracterizado pela migração de leucócitos para a cavidade pleural após 4 horas da aplicação do agente inflamatório. Constitui um método importante para avaliar o infiltrado inflamatório e confirmar a atividade anti-inflamatória demonstrada pelo método do edema de pata (COMPASSO et al., 1975; ALMEIDA et al., 1980).

2.11.1 Constituintes de Origem Vegetal com Atividade Anti-inflamatória

Existem muitos constituintes de fontes naturais, de grande diversidade química, que possuem propriedade anti-inflamatória. Entre esses se encontram triterpenos, esteroides, lactonas sesquiterpênicas, flavonóides, cumarinas e alcalóides que tem apresentado atividade anti-inflamatória em vários modelos de inflamação, agindo sobre diferentes mecanismos do processo inflamatório, possibilitando a descobertas de novos fármacos anti-inflamatórios (WAGNER, 1989; RECIO et al., 1995; LYSS et al., 1997; PELZER et al., 1998).

Um exemplo recente de fitoterápico com propriedade anti-inflamatória é o Acheflan®, indicado no tratamento local de processos inflamatórios. Produto oriundo de pesquisa 100% nacional é encontrado nas formas farmacêuticas de aerossol e de creme, cada uma contendo 5,0 mg do óleo essencial de erva-baleeira (*Cordia verbenacea*, Boraginaceae), padronizado em 2,3 – 2,9 % do terpeno α - humuleno. Outro exemplo é o Daflon 500 mg®, medicamento composto por fração flavonoidica purificada, sob forma micronizada contendo 450 mg de diosmina e 50 mg de flavonoides titulados em hesperidina com ação venotônica e vasoprotetora (COUTINHO et al., 2009).

A *Calêndula officinalis* é uma representante da família Asteraceae com atividade anti-inflamatória comprovada. Foram avaliados diversos constituintes isolados das flores da Calêndula, incluindo dez triterpenos glicosídeos. Os autores obtiveram como resultado uma potente ação contra inflamação induzida por TPA (agente promotor de tumor) em camundongos de nove dos dez triterpenos (UKIYA et al., 2006).

3. OBJETIVOS

OBJETIVO GERAL

O presente projeto tem como objetivo geral investigar o potencial químico-farmacológico de *Vernonia polyanthes* Less com intuito de corroborar com seu uso popular, garantir uma melhor segurança para o usuário e valorizar a pesquisa da flora mineira.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Extrair metabolitos de *V. polyanthes* Less com intuito de avaliar seu potencial farmacológico.
- Pesquisar e determinar os teores de constituintes em extrato etanólico e nas frações de *V. polyanthes* Less.
- Avaliar o potencial antioxidante e antimicrobiano do extrato etanólico e frações de *V. polyanthes*.
- Determinar a toxidez aguda, através da dose letal 50% (DL₅₀), para garantir o uso seguro e definir as doses a serem administradas na avaliação das atividades farmacológicas.
- Investigar as atividades antinociceptiva e anti-inflamatória do extrato etanólico de *V. polyanthes* Less.

4. MATERIAL E MÉTODOS

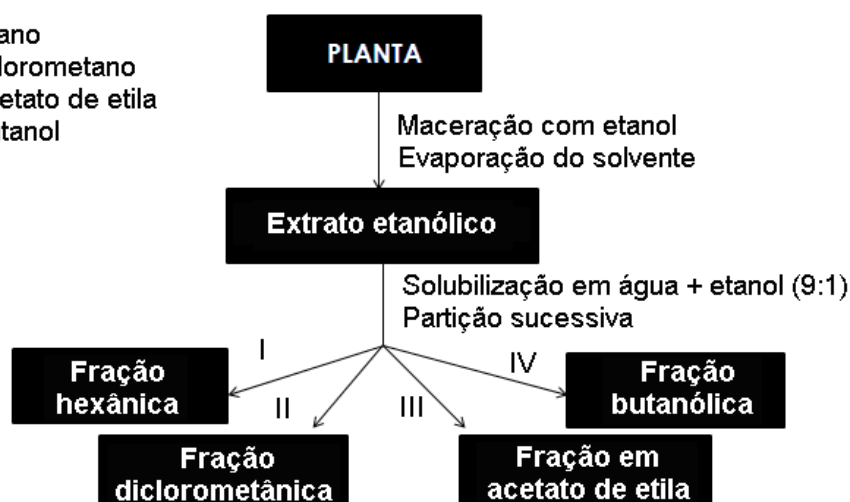
4.1 MATERIAL VEGETAL

Vernonia polyanthes Less. foi coletada no Horto Medicinal da Faculdade de Farmácia da Universidade de Juiz de Fora, cidade de Juiz de Fora, Minas Gerais. Uma exsicata (CESJ nº 10.329) encontra-se depositada no Herbário do Departamento de Botânica da Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF). A coleta constou de folhas que foram submetidas à secagem em estufa sob ventilação forçada até perda da umidade de 90 a 96%. Após secagem, o material botânico foi triturado em liquidificador industrial e pulverizado em tamise nº18 para preparo dos extratos.

4.2 PROCESSO DE EXTRAÇÃO E FRACIONAMENTO

O material pulverizado foi submetido à extração por maceração estática em etanol P.A. Após rota-evaporação do solvente, parte do extrato etanólico seco foi suspenso em Água: Etanol (9:1) seguido de partição liquido/liquido com solventes orgânicos: hexano, diclorometano, acetato de etila e butanol (do mais apolar pro mais polar) (Figura 10). O extrato etanólico e as frações hexânica, diclorometânica, em acetato de etila e butanólica foram solubilizados em dimetilsulfóxido 1% para realização das atividades farmacológicas.

Figura 10. Esquema de extração e fracionamento.



4.3 PROSPECÇÃO FITOQUÍMICA

Os metabólitos secundários foram pesquisados nas folhas, no extrato etanólico e nas frações através de reações características dos grupos funcionais das moléculas, segundo Matos (1997) e Wagner e Bladt (1996) modificados: flavonóides, taninos, cumarinas, terpenóides e esteróides, saponinas, alcalóides e antraquinonas. Para os ensaios fitoquímicos, foram pesados aproximadamente 100 mg do extrato etanólico bem como das respectivas frações (hexânica, diclometânica, fração acetato de etila, butanólica e residual) e preparado uma solução 1mg/mL com etanol a 98%.

4.4 DETERMINAÇÃO DOS TEORES DE FENÓIS TOTAIS

A determinação dos teores de fenóis totais foi realizada por meio de espectrofotometria na região do visível utilizando o método de Folin-Ciocalteu (SOUSA et al., 2007). O ácido gálico foi utilizado como padrão nas análises. A curva de calibração foi preparada uma solução-estoque aquosa de 1 mg/mL. Uma solução aquosa diluída do reagente de Folin-Ciocalteu foi preparada com 10 mL do reagente em balão de 100 mL.

Foi transferido para uma bateria de cinco tubos em triplicata, 0,01mL (tubo1), 0,02 mL (tubo 2), 0,03 mL (tubo 3), 0,04 mL (tubo 4) e 0,05 mL (tubo 5) da solução-estoque de ácido gálico. Em cada tubo foi adicionado 5 mL do reagente diluído de Folin-Ciocalteu, 4 mL de carbonato de sódio e água em quantidade suficiente para completar o volume em 10 mL. O padrão permaneceu 1 hora em temperatura ambiente.

O reagente de Folin-Ciocalteu consiste de mistura dos ácidos fosfomolibídico e fosfotungústico, no qual o molibdênio e o tungstênio encontram-se no estado de oxidação 6^+ . Na presença de agentes redutores, como as substâncias fenólicas, formam-se os chamados molibdênio azul e tungstênio azul, nos quais a média do estado de oxidação dos metais está entre 5 e 6 e cuja coloração permite a determinação da concentração das substâncias redutoras (SOUSA et al., 2007).

A varredura espectrofotométrica foi feita com a solução número 3 de 420 nm a 900 nm, obtendo-se pico do espectro de absorção em 765 nm (SOUSA et al., 2007). A partir deste comprimento de ondas (765 nm), as absorbâncias das soluções de ácido gálico foram determinadas para montagem da reta de calibração. Para isto, usou-se análise de regressão linear pelo método dos mínimos quadrados e determinação do coeficiente de correlação (r).

A quantificação dos fenóis totais do extrato etanólico e das frações foi feita pelo mesmo procedimento analítico, obtendo-se as absorvâncias. A absorvância obtida de cada solução foi substituída na equação da reta do padrão e a concentração foi ajustada em teor de fenóis totais.

4.5 DETERMINAÇÃO DOS TEORES DE FLAVONÓIDES TOTAIS

A quantificação dos teores de flavonóides totais foi realizada por método espectrofotométrico (VENNAT et al., 1992; SOBRINHO et al., 2008). Para este ensaio, utilizou-se o extrato e as frações que foram submetidos à semipurificação com hexano após centrifugação. Ácido acético glacial, solução de piridina: etanol e solução de cloreto de alumínio foram utilizados na reação para quantificação. A rutina foi a substância padrão usada para montagem da curva de calibração, onde os dados foram submetidos à análise de regressão linear, pelo método dos mínimos quadrados, sendo calculada a equação da reta e o coeficiente de correlação (r). O comprimento de onda de 418nm foi utilizado para a realização das leituras em absorvância. As amostras foram analisadas em triplicata.

4.6 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

4.6.1 Teste do DPPH

A atividade antioxidante dos produtos obtidos de *V. polyanthes* foi determinada através do método espectrofotométrico utilizando o radical livre DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazila) conforme descrito por Mensor e outros (2001). Os extratos foram levados a resíduo seco em rotavapor e, em seguida, foram preparadas soluções de concentração 1µg/mL com etanol 92,8%. A partir desta solução inicial foram obtidas as concentrações de 5, 10, 25, 50, 125 e 250 µg/mL. Uma solução 0,03 mM de DPPH foi preparada para realização do teste. O controle positivo foi feito com rutina a partir de soluções com as mesmas concentrações citadas. Todo o teste foi realizado em quadruplicata. Após 30 minutos de reação, verificou-se a capacidade dos diversos extratos em reduzir o 2,2-difenil-1-picril hidrazila em 2,2-difenil-1-picril hidrazina observado pela mudança da cor púrpura para amarela. Esta mudança de cor foi detectada através da diminuição da absorvância em espectrofotômetro sob comprimento de onda de 520 nm (MENSOR et al., 2001). A partir das leituras em absorvância, determinou-se

a porcentagem de atividade antioxidante (%AA) que corresponde à quantidade de DPPH reduzida pelos extratos. Para tal porcentagem, foi utilizada a fórmula abaixo:

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

onde $Abs_{controle}$ corresponde à absorvância de 2,5 mL de solvente utilizado na extração + 1 mL da solução de DPPH; $Abs_{amostra}$ corresponde à absorvância de 2,5 mL do extrato + 1 mL da solução DPPH e Abs_{branco} correspondem à absorvância de 2,5 mL do extrato + 1 mL do solvente utilizado na extração.

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 correlação (r). 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 foi a concentração efetiva 50% (CE_{50}) e maior foi sua atividade antioxidante.

4.6.2. Técnica da Bioautografia com DPPH

A atividade antioxidante do extrato etanólico e das frações com DPPH foi também avaliada em cromatoplasas em camada delgada, em gel de sílica, utilizando DPPH (2,2'-difetil-1-picrilhidrazila) como reagente. Foi preparada uma solução estoque das amostras a uma concentração de 10mg/mL e aplicadas nas cromatoplasas. As placas foram eluídas com diclorometano: metanol 5% para fração hexânica e diclorometano: metanol 15% para as frações diclorometânica, em acetato de etila e butanólica, o extrato etanólico foi eluído com ambos sistemas de solventes. Foram aplicados 10 µL de cada amostra sobre a cromatoplasa. Após evaporação do solvente, a placa foi nebulizada com a solução de DPPH a 2,54mM DPPH. Após 30 min, foi realizada a leitura da placa, em que halos brancos ou amarelados no ponto de aplicação, sobre o fundo violeta, foram considerados positivos (CAVIN et al., 1998).

4.6.3 Teste do Poder de Redução

O poder de redução das amostras foi determinado pelo método descrito por Oyaiku (1986). Uma solução aquosa de 10 mg/mL foram misturados com 2,5 mL de tampão fosfato de potássio 200 µM, pH 6,6 e 2,5 mL de ferrocianeto de potássio a 1% [$K_3Fe(CN)_6$]. A mistura foi incubada a 50 °C por 20 minutos. Uma alíquota de 2,5 mL de ácido tricloroacético

10% foi adicionada à mistura, sendo centrifugada a 3000 rpm. A camada superior foi retirada e misturada com 2,5 mL de água destilada e 0,5 ml de FeCl₃ 0,1% e a absorvância foi medida a 700 nm em espectrofotômetro. Ácido ascórbico e rutina foram usados como referência. A CE₅₀ foi calculada a partir de três concentrações 54,00; 27,00 e 13,50 µg/mL e estes valores determinaram a concentração efetiva na qual a absorvância foi 0,5 para o poder de redução. O CE₅₀ foi determinado por regressão linear. O coeficiente de correlação (R²) entre o teor de constituintes fenólicos, referentes às concentrações utilizadas para o cálculo do CE₅₀, e o poder de redução (absorvância a 700 nm) foi determinado usando MS Excel Software (função estatística CORREL).

4.6.3 Determinação da Peroxidação Lipídica Através do Teste com Ácido 2-tiobarbitúrico

A peroxidação lipídica é um processo oxidativo iniciado pela reação de um radical livre com um ácido graxo não saturado, resultando na formação de hidroperóxidos lipídicos e aldeídos (LIMA, 2001). Dessa forma, o teste do Ácido 2-tiobarbitúrico (TBA) consiste na reação do ácido tiobarbitúrico com os produtos de decomposição dos hidroperóxidos, sendo que um dos principais produtos formados é o malonaldeído (MDA), um aldeído com 3 átomos de carbono. Assim, para cada molécula de MDA, duas moléculas de TBA reagem formando um complexo de cor vermelha, que apresenta absorção em 535 nm. Em busca de aumentar a velocidade e a sensibilidade da reação são necessários um meio reacional ácido (pH 1-2) e temperatura elevada (100°C) (SILVA, 1999).

Esse ensaio foi realizado pelo método proposto por Wong (1995), com algumas modificações. Para a preparação das amostras, carne moída (com baixo teor de gordura) foi comprada de um açougue local. Três amostras foram preparadas com 25 g de carne moída, 17 mL de água destilada e 7,5, 15 e 30 mg de extrato etanólico e frações de *V. polyanthes*, respectivamente. O BHT foi usado como controle positivo nas concentrações de 7,5, 15 e 30 mg. O controle negativo continha 25 g de carne moída e 17 mL de água destilada. Todos estes preparados foram misturados com o auxílio de um liquidificador e levados ao aquecimento até o aparecimento da coloração marrom na carne. Assim, após o cozimento da carne, adicionou-se água destilada aos preparados até completar o volume de 100 mL e, por mais uma vez, foram misturados com liquidificador até formarem um homogenato. As amostras foram transferidas para frascos âmbar e armazenadas sob refrigeração.

No dia do preparo das amostras e nos quatro dias consecutivos, 0,5 g de cada homogeneato foram colocados em tubos de ensaio. Em seguida, foram adicionados 50 µL de solução etanólica de 2,6-Di-*tert*-butil-4-metilfenol (BHT) 4% (p/v), 2,5 mL de ácido fosfórico 1% (v/v) e 1,25 mL de ácido tiobarbitúrico 1% (p/v; em NaOH 0,05 M). Estas soluções foram aquecidas em banho fervente por 15 minutos e em seguida resfriadas em banho de gelo por 10 minutos. Depois de resfriadas, adicionou-se 3 mL de butanol em cada tubo de ensaio para que o complexo TBA-MDA (indicativo de oxidação da carne) passasse para a fase orgânica, após leve agitação por inversão. A fase contendo butanol foi separada por centrifugação a 4000 giros por 5 minutos e 200 µL do sobrenadante de cada amostra foram coletados e suas absorvâncias lidas no aparelho espectrofotômetro a 535nm. A concentração do complexo TBA-MDA foi calculada a partir da curva padrão de MDA, realizada sob as mesmas condições das amostras, porém com concentrações conhecidas (5 µmol/L, 2,5 µmol/L, 1,25 µmol/L, 0,625 µmol/L, 0,3125 µmol/L e 0,1562 µmol/L) de solução padrão de 1,1,3,3-tetraetoxipropano (TEP), o qual libera MDA e etanol após hidrólise ácida (BORGES, 1999).

4.7 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

Para a avaliação de atividade antimicrobiana realizaram-se testes de difusão em Agar e diluição. Os procedimentos a serem seguidos foram baseados nas recomendações do CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI, 2009a, b).

Para os testes foram utilizadas as seguintes amostras de referência: *Staphylococcus aureus* (ATCC®29213), *Escherichia coli* (ATCC®10536), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC®27853) e *Salmonella typhimurium* (ATCC®13311).

4.7.1 Teste de Difusão em Ágar

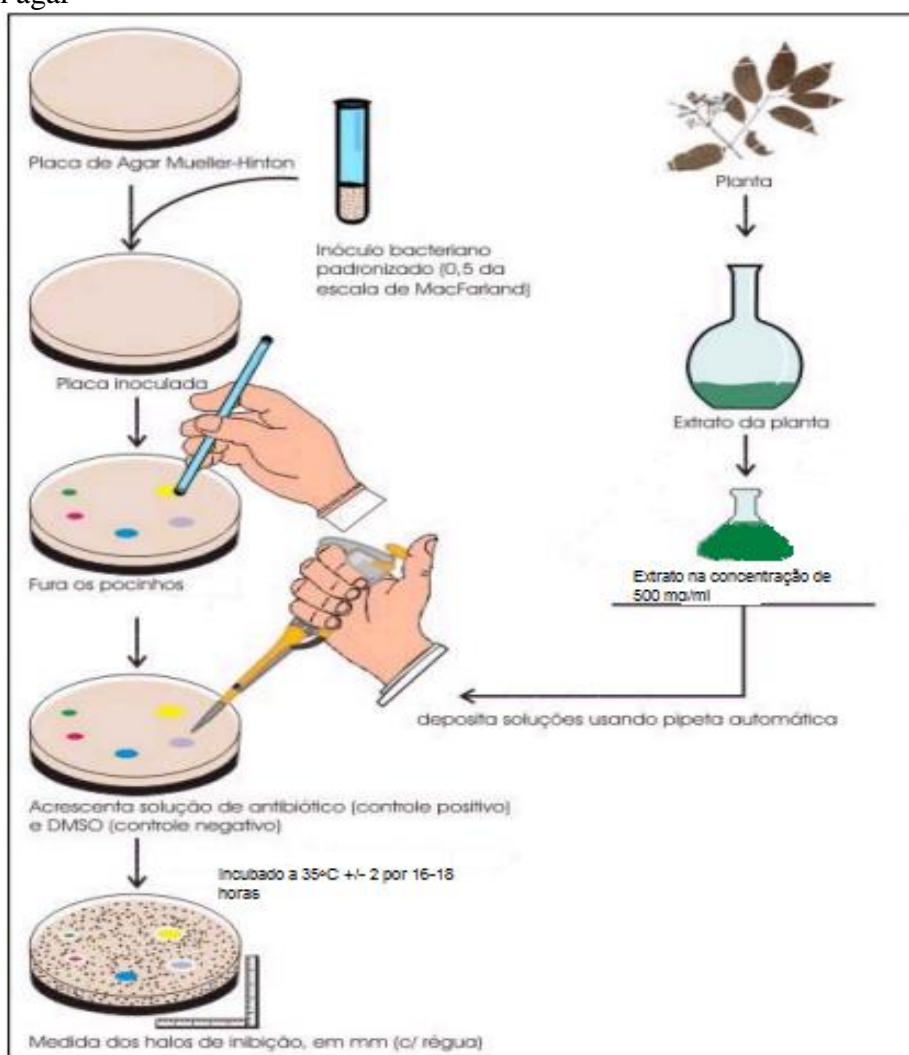
O teste de difusão do ágar foi descrito por Bauer e Kirby em 1966 e até os dias de hoje é a metodologia mais empregada pelos laboratórios de microbiologia. Foram utilizados para a avaliação da atividade antimicrobiana, o extrato etanólico e as frações hexânica, diclorometânica, em acetato de etila e butanólica das folhas de *V. polyanthes*.

As soluções-teste foram preparadas a partir do extrato ou fração, dissolvendo-os em dimetilsulfóxido (DMSO) até obter-se uma solução com concentração final de 500 mg/mL.

As suspensões microbianas foram preparadas, colocando-se 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 semeadas em superfície de uma placa de Petri contendo ágar Mueller- Hinton em três sentidos (diagonal, vertical e horizontal), para evitar o crescimento de colônias isoladas. Após as sementeiras, os discos de antibióticos foram então aplicados com o auxílio de uma pinça e foram confeccionados poços de 6 mm e aplicados 20µL de extrato (Figura 11). As placas foram incubadas em estufa a 35° C ± 2 por 16 horas.

Após o período de incubação, os diâmetros de inibição de crescimento microbiano foram medidos e registrados em milímetros nos tempos de 16 e 18 horas. Foram utilizados controles positivos (discos com cloranfenicol e ampicilina) e controle negativo (dimetilsulfóxido – DMSO).

Figura 11. Fluxograma do método da avaliação da atividade antimicrobiana pelo método de difusão em ágar



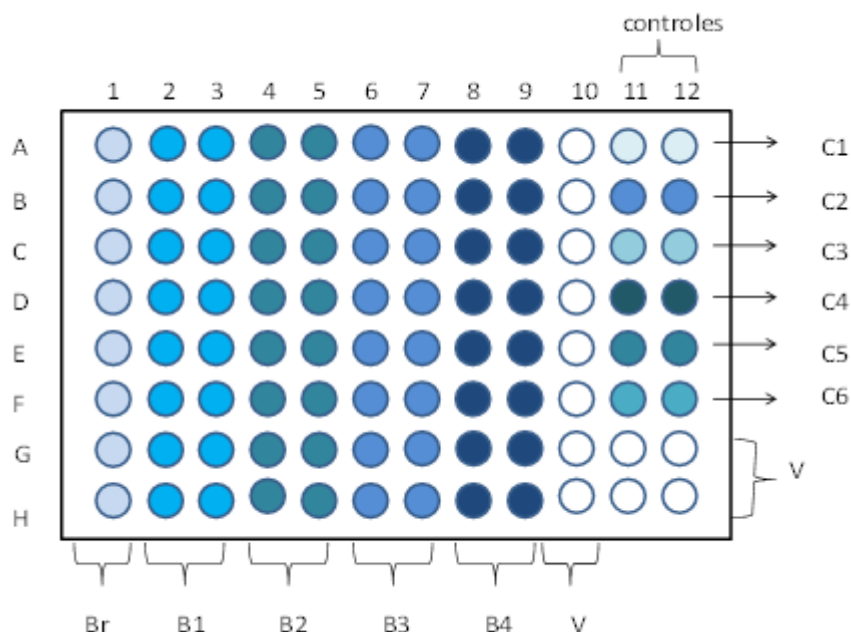
4.7.2. Concentração Inibitória Mínima

O ensaio de susceptibilidade em microdiluição em caldo foi realizado usando o método descrito pela CLSI para determinação do CIM (CLSI, 2009a). Todos os testes foram realizados utilizando caldo Mueller-Hinton (MHB). Cepas de bactérias foram cultivadas “overnight” a $35^{\circ}\text{C} \pm 2$ de 18 a 24h em ágar Mueller Hinton. Diluições sucessivas de 5,0 a 0,0025 mg/mL das amostras foram preparadas em microplacas de 96 poços (Figura 12). Para isso, foram utilizadas soluções estoque de 12,5 mg/mL em DMSO 1%. Foram transferidos 180 μL dessa solução para as microplacas que já continham 200 μL de meio de cultura (poços A1 a A9). Depois de homogeneizada, passou-se da fila A para a fila B 180 μL , e assim sucessivamente, até a fila H (Figura 13). A partir da fila B, todos já possuíam 180 μL de MHB. Para completar o volume final de 20 μL , foram adicionados 20 μL de inóculo (10^8 unidades formadoras de colônias (CFU/mL) de acordo com a escala turbidimétrica padrão de McFarland). As placas foram incubadas a $35^{\circ}\text{C} \pm 2$.

Os mesmos testes foram realizados simultaneamente com o crescimento do controle (MHB + microrganismo) e o controle negativo (MHB+extrato). Cloranfenicol (Feniclor®) foi usado como referência nas concentrações de 500 a 0,24 $\mu\text{g/mL}$ e de 10 a 0.002 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. A CIM foi calculada como a menor diluição que apresenta completa inibição da cepa testada. Todos os testes foram realizados em duplicatas.

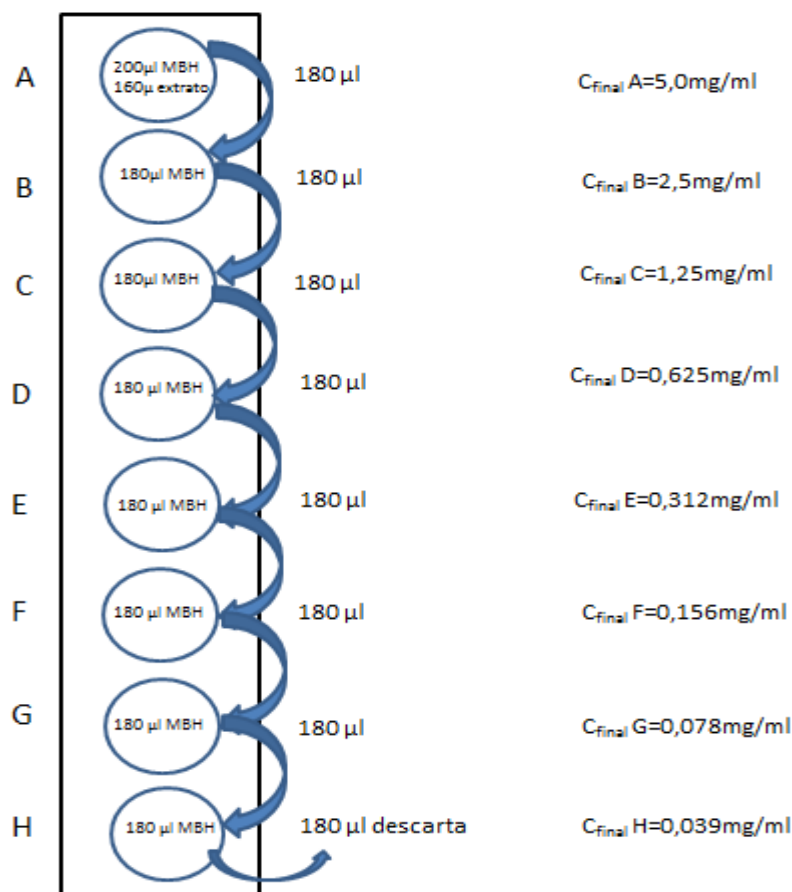
A leitura foi feita pela observação da presença ou ausência de turbidez indicativa de crescimento microbiano. Para melhor visualização dos resultados utilizou-se solução de iodonitrotetrazolium (INT), na concentração de 2 mg/mL. Essa solução foi aplicada 10 μL sobre cada poço das placas e, após incubação, foram observados poços com coloração avermelhada que era indicativo de crescimento bacteriano, e poços que mantiveram a cor original, isto é, não houve crescimento.

Figura 12. 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*.

Figura 13. Esquema de diluições sucessivas nos poços.



4.7.3 Determinação de Concentração Bactericida Mínima

A determinação da concentração bactericida mínima (CBM) foi realizada em placa de Petri contendo meio Mueller-Hinton. A placa de Petri 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 um alça estéril para o respectivo local na placa de Petri. Incubou-se a placa em estufa a $35^{\circ}\text{C} \pm 2$ de 18 a 24 horas. Foi determinada como CBM a menor concentração do extrato que não permitiu o desenvolvimento dos microrganismos.

4.8 ANIMAIS

Foram utilizados camundongos Swiss (25-30 g) e ratos Wistar (200-240 g) machos provenientes do Centro de Biologia da Reprodução da Universidade Federal de Juiz de Fora. Os animais foram mantidos em gaiolas de polipropileno (47x34x18 cm) com ração e água *ad libitum* em temperatura ambiente (22 ± 2 °C) durante 3 dias no ciclo claro/escuro de 12 horas (claro de 06:00 às 18:00 h). Doze horas antes da realização dos experimentos, os animais foram privados de alimentação. Os protocolos utilizados foram aprovados pelo Comitê de Ética na Experimentação Animal (CEEA) desta instituição (n° 053/2009 e n° 054/2009).

4.9 AVALIAÇÃO DA TOXIDEZ AGUDA

Grupos de 10 camundongos receberam doses de 0,5, 1, 1,5, 2 e 3 g/kg de solução dos produtos obtidos de *V. polyanthes* por via oral, enquanto o grupo controle recebeu solução salina. Os grupos foram observados por 48 horas, registrando-se a mortalidade dos animais (DIETRICH, 1983). A DL_{50} foi determinada através do método dos probitos usando a porcentagem da mortalidade e o logaritmo das doses seguidas de regressão linear (LITCHFIELD; WILCOXON, 1949).

4.10 TESTE DE CONTORÇÕES ABDOMINAIS

O extrato etanólico de *V. polyanthes* (100, 200 ou 400 mg/kg; 0,01 mL/g) foi administrado em camundongos, por via oral (v.o.), uma hora antes da aplicação de 10 mL/kg de ácido acético 0,6% (n = 8) (KOSTER et al., 1959; COLLIER et al., 1968) intraperitonealmente. O número de contorções abdominais foi contado entre 10 e 30 minutos após injeção do ácido acético. O grupo controle recebeu 10 mL/kg de salina (v.o.). Indometacina (10 mg/kg, v.o.) e ácido acetilsalicílico (200 mg/kg, v.o.), antiinflamatórios não-esteróides, foram usados como controles positivos.

4.11 TESTE DA FORMALINA

Um volume de 20 µL de formalina 2,5% (em salina estéril) foi aplicado no espaço subplantar da pata direita dos camundongos (n = 8) e a duração do tempo de lambida foi determinado de 0 a 5 minutos (1ª fase) e 15 a 30 minutos (2ª fase) (HUNSKAAR; HOLE, 1987). O extrato etanólico de *V. polyanthes* foi administrado nas doses de 100, 200 ou 400 mg/kg (v.o.) 1 hora antes da injeção da formalina. Os animais controles receberam 10 mL/kg de salina (v.o.) e a morfina (5 mg/kg, s.c.) e indometacina (10 mg/kg, v.o.) foram usadas como controles positivos.

4.12 TESTE DA PLACA QUENTE

Quatro grupos de oito camundongos foram tratados com salina ou extrato (100, 200 ou 400 mg/kg, v.o.; 0,1 mL/10 g). Os animais foram colocados em placa quente aquecida a 55 ± 1 °C (EDDY; LEIMBACH, 1953). As medidas foram realizadas nos tempos zero, 30, 60 e 90 minutos após administração do extrato, com tempo máximo de permanência sobre a placa quente de 30 segundos. Em outro grupo de animais, o efeito do pré-tratamento com naloxona (1 mg/kg, s.c.) sobre a analgesia produzido pelo extrato (400 mg/kg, v.o.) foi determinado. Morfina (5 mg/kg, s.c.), na ausência e na presença de naloxona, foi usada como controle positivo.

4.13 EDEMA DE PATA INDUZIDO POR CARRAGENINA

O edema de pata foi induzido pela injeção de 0,1 mL de carragenina (2% p/v) em salina estéril e administrada na região subplantar da pata direita de ratos Wistar machos (n = 6). Uma hora antes da injeção de carragenina, o extrato de *V. polyanthes* Less foi administrado (v.o.) nas doses de 100, 200 ou 400 mg/kg (WINTER et al., 1962). O grupo controle recebeu 10 mL/kg de salina (v.o.). Na pata esquerda, usada como controle, foi injetada 0,1 mL de salina estéril. Após quatro horas de injeção de carragenina, a medida do edema foi feita pela diferença entre o volume da água deslocado da pata direita e o da pata esquerda utilizando um pletismômetro. Indometacina (10 mg/kg, v.o.) foi usada como controle positivo.

4.14 PLEURISIA INDUZIDA POR CARRAGENINA

A pleurisia foi induzida em ratos Wistar pela injeção intrapleural de 0,5 mL, entre a terceira e a quinta costela do lado direito do mediastino, de uma suspensão de carragenina 2% em solução salina estéril (VINEGAR et al., 1973). Grupos de seis ratos foram tratados com o extrato de *V. polyanthes* (100, 200 ou 400 mg/kg, v.o.), indometacina (10 mg/kg, v.o.) ou salina (10 mL/kg, v.o.) uma hora antes da aplicação do agente inflamatório. Quatro horas após a indução da inflamação, os animais sofreram aprofundamento de anestesia com cloridrato de cetamina (75 mg/kg) e cloridrato de xilazina (10 mg/kg) seguido de eutanásia. Uma incisão foi feita entre a terceira e quinta costela em cada lado do mediastino. O exsudato pleural foi coletado, transferido a um tubo cônico de centrífuga e o volume foi determinado. Uma alíquota de 20 µL do exsudato foi usada para determinar a contagem total de leucócitos em câmara de Neubauer.

4.15 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

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

5. RESULTADOS

5.1 PESQUISA E QUANTIFICAÇÃO DE CONSTITUINTES QUÍMICOS

Foram detectados a presença de taninos, flavonóides, cumarinas, saponinas, terpenos e esteróides e alcalóides (Tabela 3). A fração hexânica apresentou reação positiva para terpenos e alcalóides. A reação para detecção de saponina foi positiva para as frações em acetato de etila e butanólica, assim como no material botânico seco. Antraquinonas não foram detectadas nas amostras analisadas.

Tabela 3. Prospecção fitoquímica de *V. polyanthes* Less.

Classes Químicas	Reações	EE	FH	FD	FA	FB	MS
Taninos	Sais de Ferro	+	-	-	+	+	+
	Sais de Chumbo	+	-	+	+	-	+
	Acetato de Cobre	+	-	+	+	+	+
	Alcalóides	-	-	-	-	-	-
	Gelatina	-	-	-	-	-	-
Flavonóides	Cloreto de Alumínio	+	-	+	+	+	+
	Hidróxido de Sódio	+	-	+	+	+	+
	Shinoda	-	-	-	-	-	-
Cumarinas	Hidróxido de Potássio	+	-	+	-	+	+
Terpenos e Esteróides	Lieberman-Buchard	+	+	+	+	+	+
Saponinas	Índice de Espuma	-	-	-	+	+	+
Alcalóides	Dragendorff	+	+	+	+	+	+
	Mayer	-	-	-	-	-	-
	Bouchardat	-	-	-	-	-	-
	Bertrand	-	-	-	-	-	-
Antraquinonas	Borntraeger	-	-	-	-	-	-

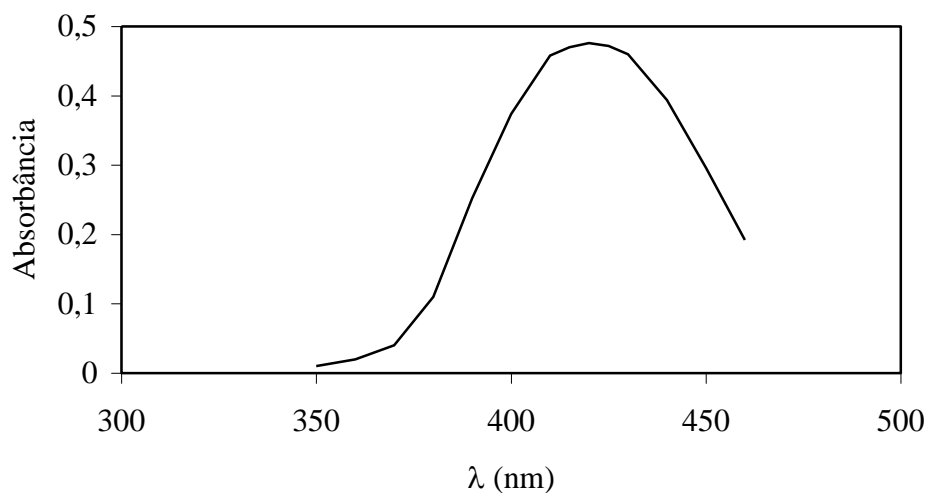
(+): reação positiva; (-): reação negativa

EE: Extrato etanólico; FH: Fração hexânica; FD: Fração diclorometânica; FA: Fração de acetato de etila; FB: Fração butanólica; MS: Material seco e moído

Para quantificar os teores de flavonóides totais, foi realizada uma varredura espectrofotométrica entre 350 e 460 nm com uma solução de rutina para obtenção do espectro

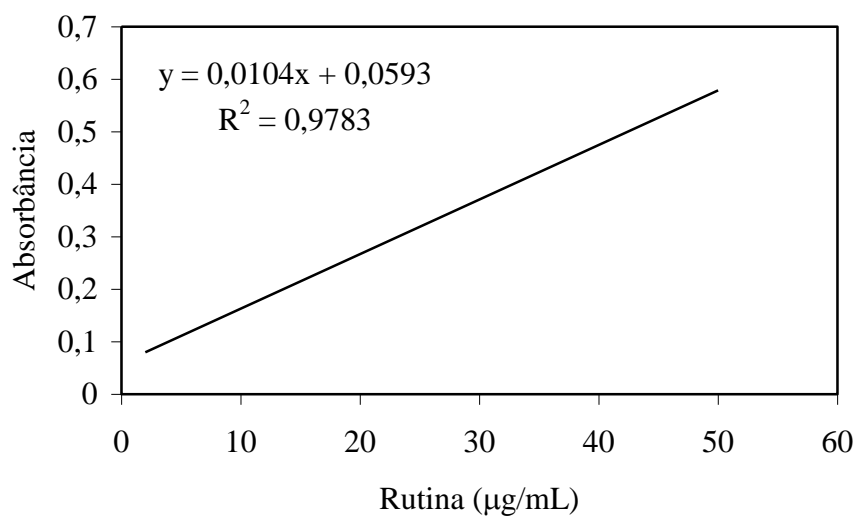
de absorção (Figura 14). O comprimento de onda em 418 nm apresentou máximo de absorção e foi usado para obtenção da reta de calibração e determinação dos flavonóides totais. Este espectro está de acordo com aquele preconizado por Sobrinho et al. (2008).

Figura 14. Espectro de absorção da rutina.



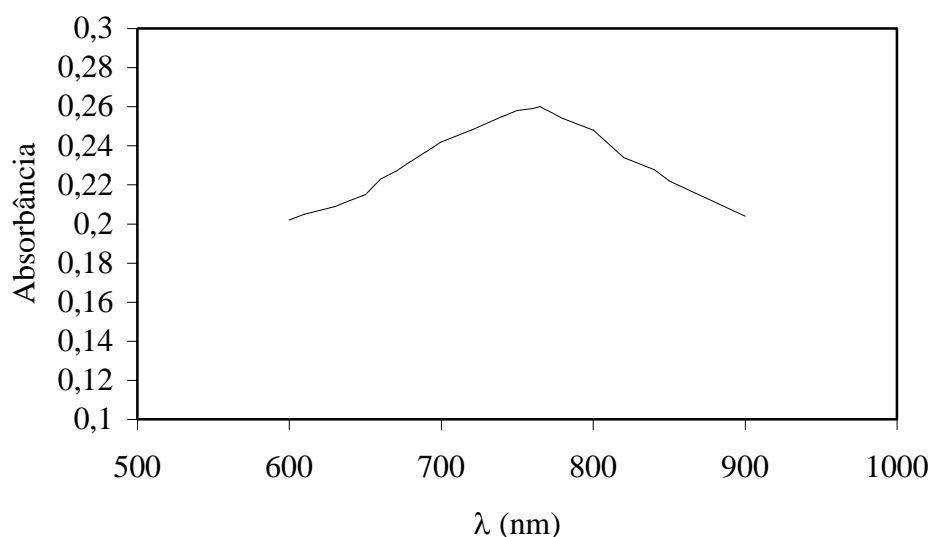
A partir das leituras do padrão rutina em diferentes concentrações, foi obtida a reta de calibração mostrada na figura 15. Os dados obtidos foram submetidos à análise de regressão linear para determinação da equação da reta e do coeficiente de determinação (R^2), produzindo a equação da reta de calibração $y = 0,0104x + 0,0593$.

Figura 15. Curva de calibração do padrão rutina.



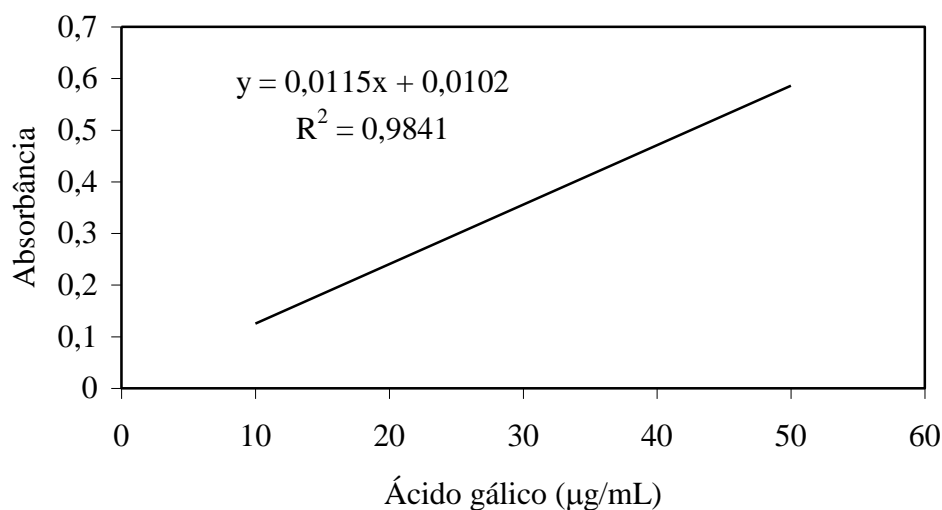
O espectro de absorção do ácido gálico foi obtido a partir de uma varredura espectrofotométrica entre 600 e 900 nm. O comprimento de onda de maior absorção foi em 765 nm que serviu de base para quantificação dos fenóis totais (Figura 16).

Figura 16. Espectro de absorção do ácido gálico.



Após definição do comprimento de ondas de 765 nm, a reta de calibração do ácido gálico foi obtida para determinação dos teores de fenóis totais (Figura 17). A equação da reta utilizada foi $y = 0,0115x + 0,0102$, onde os valores das absorbâncias das amostras foram adicionados em y para obtenção da concentração inicial (x).

Figura 17. Curva de calibração do ácido gálico.



Na Tabela 4 são mostrados teores de fenóis e flavonóides totais equivalentes ao ácido gálico e à rutina, respectivamente. Os teores de fenóis totais variaram de 0,76 a 18,63 g/100 g nos produtos avaliados de *V. polyanthes*. As frações butanólica e residual apresentaram maiores teores de fenóis totais quando comparadas com os demais produtos analisados. Nessa tabela são observados os teores de flavonóides totais que variaram de 0,26 a 7,73 g/100 g no extrato etanólico e nas frações avaliadas. A fração em acetato de etila ($7,73 \pm 0,14$ g/100 g) produziu maior rendimento de flavonóides totais equivalentes à rutina.

Tabela 4. Teores de fenóis e flavonóides totais no extrato etanólico e frações de *V. polyanthes*.

Produtos testados	Fenóis totais (g/100g)	Flavonóides totais (g/100 g)
Extrato etanólico	$4,78 \pm 0,02$	$2,20 \pm 0,15$
Fração hexânica	$0,76 \pm 0,01$	$0,26 \pm 0,02^A$
Fração diclorometânica	$16,93 \pm 0,03$	$0,84 \pm 0,03$
Fração em acetato de etila	$14,48 \pm 0,01$	$7,73 \pm 0,14$
Fração butanólica	$18,63 \pm 0,32^A$	$4,28 \pm 0,17$
Fração residual	$18,52 \pm 0,02^A$	$0,26 \pm 0,02^A$

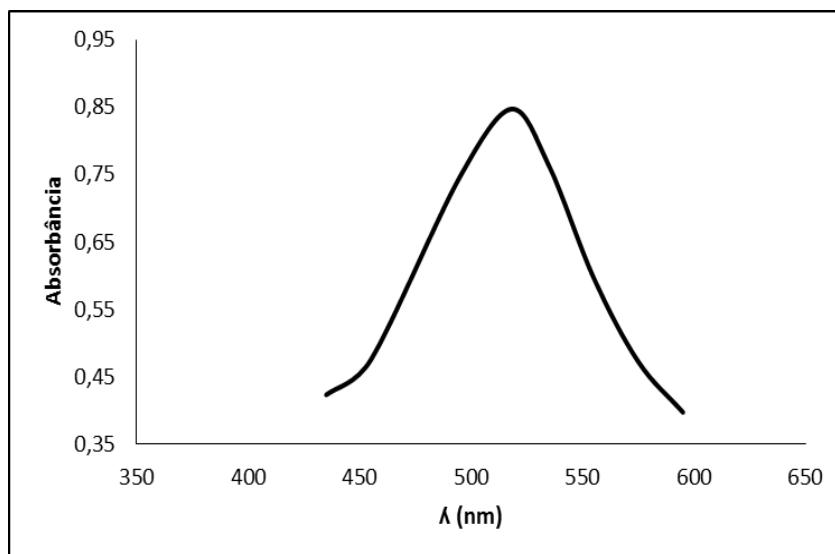
Letras iguais na mesma coluna, as médias são iguais entre si após ANOVA seguida do teste de Tukey para $p < 0,05$.

5.2 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

5.2.1 Avaliação pelo Método DPPH

Algumas substâncias presentes nas amostras, como as fenólicas, são capazes de seqüestrarem radicais livres, revelando assim, sua atividade antioxidante. Baseado neste princípio, a atividade do extrato etanólico e das frações de *V. polyanthes* foi avaliada usando o método 2,2-difenil-1-picrilidrazil (DPPH). Foi feito o espectro de absorção do DPPH que revelou o pico máximo de absorção a 520nm como mostrado na Figura 18.

Figura 18. Espectro de absorção do DPPH (2,2-difenil-1-picrilidrazil).



A atividade antioxidante do extrato etanólico e das frações de *V. polyanthes* avaliada pela CE_{50} é apresentada na Tabela 5. A concentração efetiva 50% (CE_{50}) variou de 4,28 a $75,10 \pm 0,24$ $\mu\text{g/mL}$. A fração em acetato de etila foi mais eficaz ao inibir o radical livre DPPH em comparação com os demais produtos testados, produzindo uma CE_{50} de 4,28 $\mu\text{g/mL}$. Esta fração foi cerca de três vezes mais potente em inibir o DPPH quando comparada ao controle positivo (rutina).

Tabela 5. Atividade antioxidante do extrato etanólico e frações de *V. polyanthes* pelo teste de DPPH.

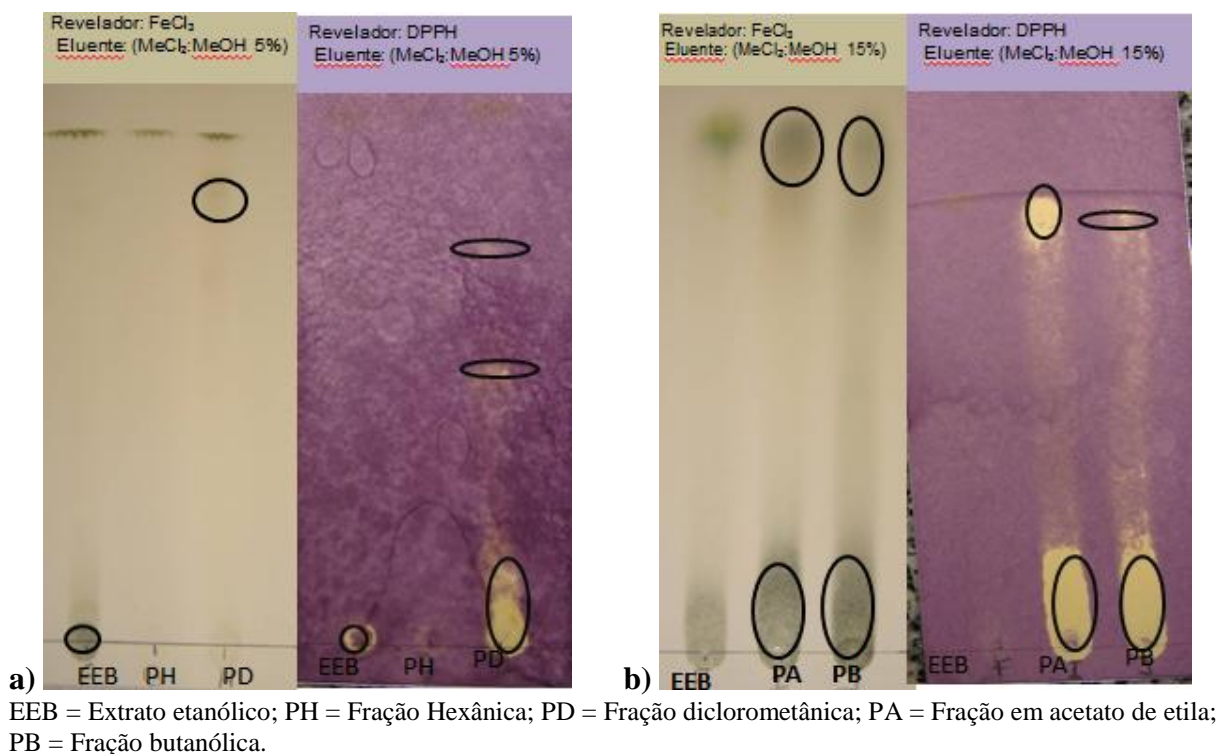
Produtos testados	CE_{50} ($\mu\text{g/mL}$)
Extrato etanólico	$23,45 \pm 0,14$
Fração hexânica	$75,10 \pm 0,24$
Fração diclorometânica	$61,90 \pm 0,66$
Fração em acetato de etila	$4,28 \pm 0,06$
Fração butanólica	$10,35 \pm 0,10$
Fração residual	$29,28 \pm 0,08$
Rutina	$14,29 \pm 0,11$

As médias são diferentes entre si após aplicação da ANOVA seguida de teste de Turkey para $p < 0,05$.

5.2.2 Avaliação pelo Método Bioautografia

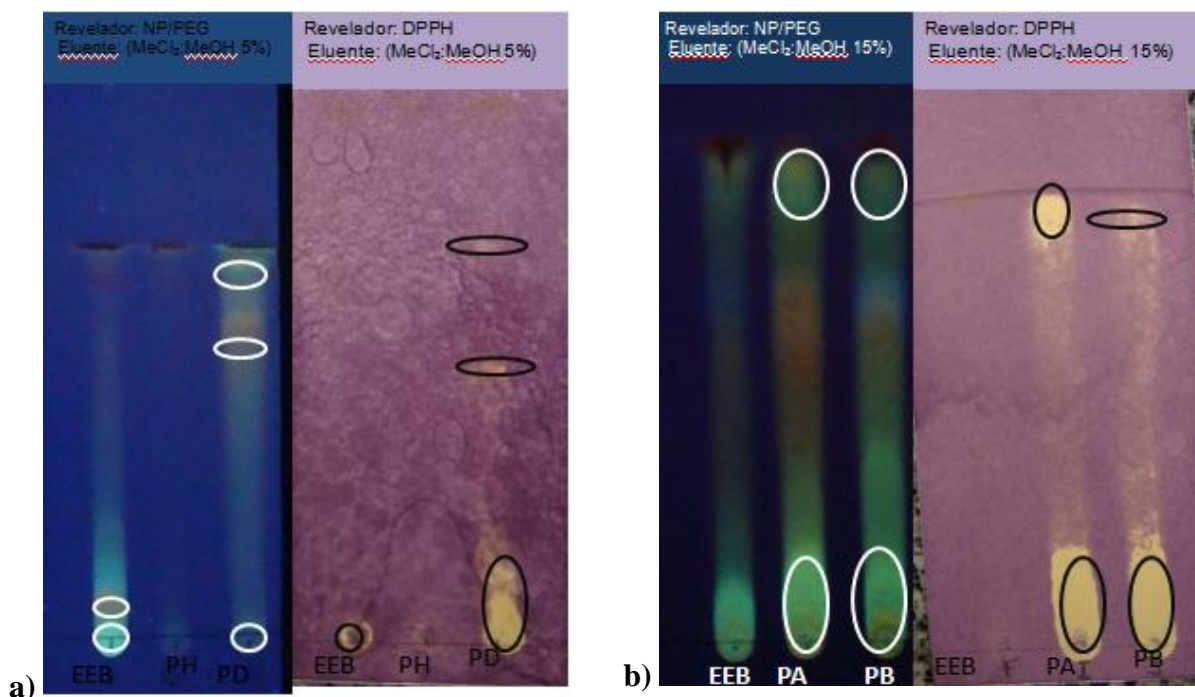
Na Figura 19, são mostradas placas de cromatografia de camada fina, contendo as amostras, reveladas com cloreto férrico e DPPH. As bandas escuras assinaladas, reveladas pelo cloreto férrico, são indicativas de constituintes fenólicos, enquanto as bandas amareladas, reveladas com DPPH, são indícios de antioxidantes pertencentes às substâncias fenólicas. As frações em acetato de etila e butanólica evidenciaram quantidades mais expressivas de constituintes fenólicos como observado na Figura 19b.

Figura 19. Bioautografia do extrato etanólico e frações em cromatografia de camada fina revelada com cloreto férrico e DPPH.



O extrato etanólico e as frações também foram revelados com NP/PEG frente à luz UV 365 nm com bandas em cores amarelo e laranja indicativas da presença de flavonóides (Figura 20). A presença de flavonóides foi mais expressiva nas frações em acetato de etila e butanólica conforme observado na Figura 20b. As bandas reveladas com NP/PEG correspondem às bandas reveladas com DPPH, sugerindo atividade antioxidante dos constituintes das amostras analisadas.

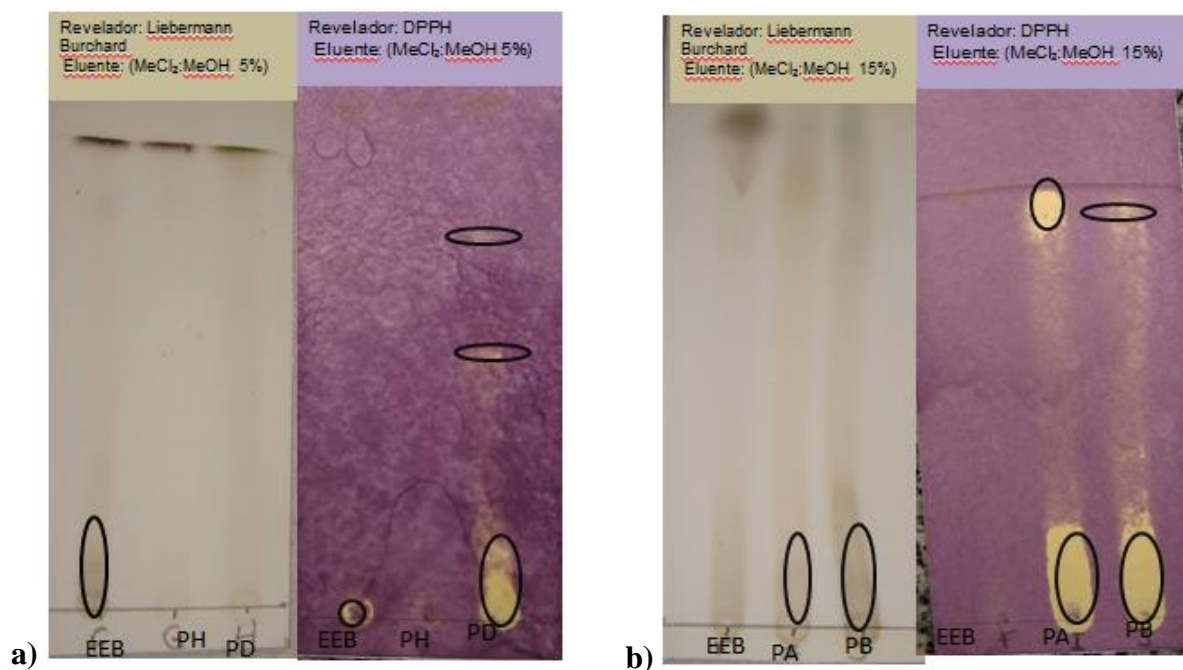
Figura 20. Bioautografia do extrato etanólico e frações em cromatografia de camada fina revelada com NP/PEG e DPPH.



EEB = Extrato etanólico; PH = Fração Hexânica; PD = Fração diclorometânica; PA = Fração em acetato de etila; PB = Fração butanólica.

Na Figura 21, mostra a bioautografia do extrato etanólico e frações reveladas com reagente de Lieberman-Bouchard e DPPH. O reagente Lieberman-Bouchard indica a presença de terpenoides e esteróides. Utilizando o eluente diclorometano e metanol 5%, é observado que os constituintes terpenoídicos e esteróidicos do extrato etanólico ficaram retidos no início da placa, entretanto, produziu baixa atividade antioxidante após revelação com DPPH (Figura 21a). Nesta figura, não possível detectar a presença desses constituintes nas frações hexânica e diclorometânica. No entanto, o eluente diclorometano e metanol 15% revelou a presença de terpenoides e esteróides nas frações em acetato e etila e butanólica, ficando no início da placa cromatográfica (Figura 21b).

Figura 21. Bioautografia do extrato etanólico e frações em cromatografia de camada fina revelada com Liebermann Bouchard e DPPH.



EEB = Extrato etanólico; PH = Fração Hexânica; PD = Fração diclorometânica; PA = Fração em acetato de etila; PB = Fração butanólica.

5.2.3 Avaliação pelo Método Poder de Redução

Na Tabela 6 é mostrada a atividade antioxidante do extrato etanólico e das frações de *Vernonia polyanthes* pelo teste de poder de redução. A concentração efetiva 50% (CE₅₀) variou de 1,73 ± 0,04 a 306,25 ± 1,15 µg/mL. É observado que dentro os produtos testados a fração em acetato de etila obteve melhor capacidade na redução do Fe⁺³. Esta fração foi tão potente quanto a rutina (controle positivo).

Tabela 6. Atividade antioxidante do extrato etanólico e frações de *V. polyanthes* pelo método de Poder de Redução

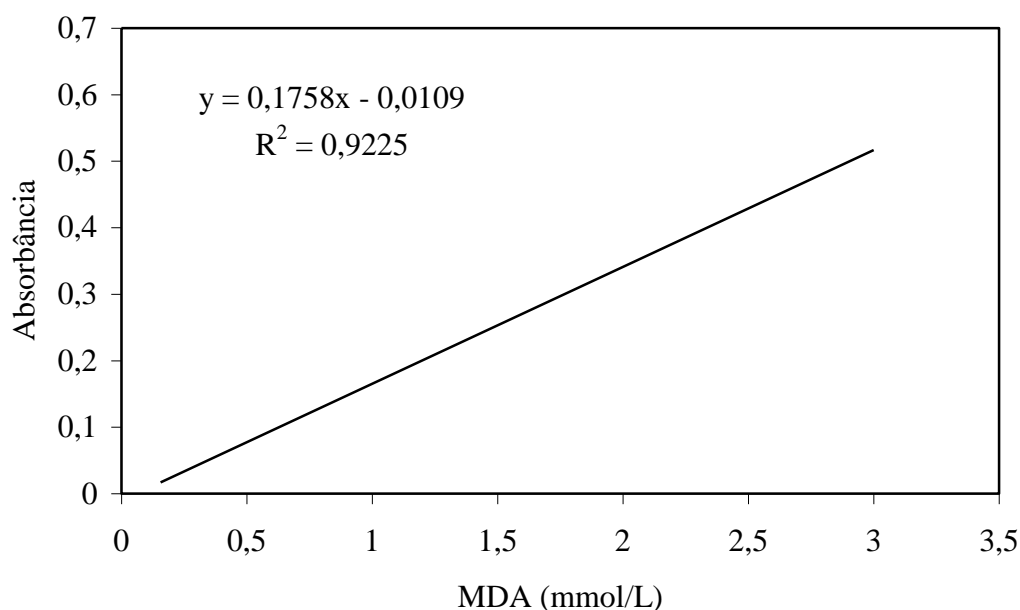
Produtos testados	CE ₅₀ (µg/mL)
Extrato etanólico	29,8 ± 0,09
Fração hexânica	306,25 ± 1,15
Fração diclorometânica	53,29 ± 1,03
Fração em acetato de etila	9,80 ± 0,09
Fração butanólica	15,71 ± 0,05
Rutina	8,27 ± 0,25
Ácido ascórbico	1,73 ± 0,04

As médias são diferentes entre si após aplicação da ANOVA seguida de teste de Turkey para $p < 0,05$.

5.2.4 Avaliação pelo Método TBA

Após definição do comprimento de onda com maior absorção, a reta de calibração do MDA foi obtida com concentrações conhecidas de solução padrão de 1,1,3,3-tetraetoxipropano para determinação da concentração de MDA dos produtos testados (Figura 19).

Figura 22. Reta de calibração do MDA.



A concentração de MDA formada no grupo controle negativo aumenta ao longo dos 5 dias de experimento, enquanto diminui quando tratado com BHT (controle positivo) (Tabela 7). Na presença do extrato etanólico e das frações, ocorreu uma redução da formação do MDA no período avaliado quando comparado ao grupo controle negativo. Com exceção da fração hexânica, no 5º dia de experimento, a concentração de 30 mg/mL foi mais efetiva em inibir a formação de MDA no homogenato.

Tabela 7. Atividade antioxidante do extrato etanólico e frações de *V. polyanthes* pelo método do TBA.

Produtos Testados	Concentração de MDA (mmol/L)				
	Dia 0	Dia 1	Dia 2	Dia 3	Dia 4
Controle negativo	0,29±0,015	0,38±0,048	0,45±0,018	0,95±0,005	1,33±0,005
7,5 mg	0,43±0,001	0,68±0,028	0,60±0,064	0,17±0,015	0,20±0,008
BHT 15 mg	0,17±0,017	0,42±0,018	0,36±0,005	0,17±0,006	0,17±0,005
30 mg	0,17±0,003	0,17±0,005	0,19±0,016	0,15±0,008	0,14±0,003
7,5 mg	0,24±0,013 ^a	1,14±0,001	0,39±0,011 ^a	0,46±0,010 ^a	0,46±0,008 ^a
EE 15 mg	0,28±0,036	0,39±0,003	0,37±0,022	0,44±0,011	0,52±0,017
30 mg	0,16±0,005	0,40±0,008	0,12±0,003	0,15±0,009	0,25±0,008
7,5 mg	0,16±0,003	0,53±0,009	0,24±0,006	0,34±0,026	0,38±0,019
FH 15 mg	0,20±0,013	0,54±0,015	0,46±0,015	0,57±0,006	0,67±0,017
30 mg	0,16±0,006	0,36±0,012	0,40±0,029	0,47±0,008	0,59±0,022
7,5 mg	0,12±0,001	0,15±0,005	0,32±0,005	0,41±0,005	0,37±0,001
FD 15 mg	0,20±0,005	0,21±0,008	0,32±0,005	0,36±0,005	0,30±0,005
30 mg	0,22±0,005	0,19±0,013	0,29±0,010	0,35±0,010	0,30±0,008
7,5 mg	0,40±0,021	0,20±0,006	0,37±0,003	0,48±0,015	0,37±0,005
FA 15 mg	0,25±0,001	0,13±0,005	0,29±0,005	0,40±0,003	0,35±0,011
30 mg	0,20±0,008	0,40±0,143	0,28±0,003	0,34±0,015	0,30±0,003
7,5 mg	0,15±0,001	0,21±0,005	0,46±0,007	0,52±0,001	0,06±0,003
FB 15 mg	0,15±0,006	0,14±0,003	0,35±0,003	0,42±0,027	0,39±0,009
30 mg	0,22±0,008	0,13±0,005	0,43±0,006	0,32±0,006	0,29±0,006

*Letras iguais minúsculas as médias não diferem entre si após análise de variância seguida do teste de Tukey para $p < 0,05$.

5.3 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

5.3.1 Método de Difusão

Na Tabela 8, são mostrados os resultados da atividade antibacteriana pelo método de difusão. É observado que a concentração de 500 mg/mL das frações diclorometânica e em acetato de etila inibiram o crescimento de *S. aureus*. Os produtos não foram ativos contra *P. aeruginosa*, *S. thyphimurium* e *E. coli* frente a concentração testada.

Tabela 8. Atividade antibacteriana pelo método de difusão.

Produtos testados	Diâmetro de inibição do crescimento (mm)			
	<i>S. aureus</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>S. thyphimurium</i>	<i>E. coli</i>
Extrato etanólico	-	-	-	-
Fração hexânica	-	-	-	-
Fração diclorometânica	17	-	-	-
Fração em acetato de etila	11	-	-	-
Fração butanólico	-	-	-	-
Cloranfenicol	18	-	22	12
Ampicilina	37	-	20	19
DMSO	-	-	-	-

A concentração do extrato e das frações aplicada foi de 500 mg/mL.

5.3.2 Concentração Inibitória Mínima

A atividade antibacteriana também foi avaliada pelo método da concentração inibitória mínima (CIM) (Tabela 9). As frações diclorometânica e butanólica apresentaram CIM que variaram de 1,25 a 5,0 mg/mL. Nas concentrações testadas, o extrato etanólico e as frações hexânica e em acetato de etila não inibiram o crescimento das bactérias avaliadas.

Tabela 9. Atividade antibacteriana pela concentração inibitória mínima.

Produtos testados	Concentração inibitória mínima (mg/mL ou µg/mL)			
	<i>S. aureus</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>S. typhimurium</i>	<i>E. coli</i>
Extrato etanólico	-	-	-	-
Fração hexânica	-	-	-	-
Fração diclorometânica	1,25	5,0	5,0	5,0
Fração em acetato de etila	-	-	-	-
Fração butanólico	1,25	-	5,0	5,0
Cloranfenicol	62,5	15,6	0,98	15,6

As concentrações do extrato etanólico e das frações variaram de 5,0 a 0,039 mg/mL..

Cloranfenicol foi usado como antibiótico de referência com concentrações de 500 a 0,24 µg/mL.

5.3.2 Concentração Bactericida Mínima

A partir dos resultados da concentração inibitória mínima, foi avaliada a concentração bactericida mínima (CBM) das frações diclorometânica e butanólica, sendo descrita como atividades bactericida e/ou bacteriostática (Tabela 10). A CBM é a mais baixa concentração que a substância é capaz de inibir o crescimento do microrganismo. No entanto, em algumas concentrações, as amostras foram capazes de deter o crescimento bacteriano, sendo então bactericida.

Tabela 10. Atividades bactericida e bacteriostática através da concentração bactericida mínima.

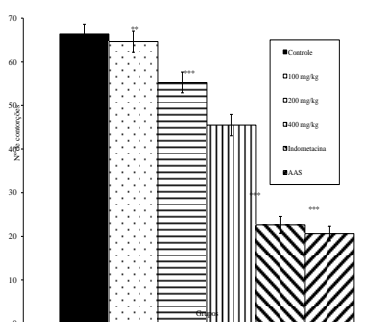
Produtos Testados	Cepas Testadas	CBM (mg/mL)	Atividade
Extrato etanólico	<i>S. aureus</i>	-	-
	<i>P. aeruginosa</i>	-	-
	<i>S. typhimurium</i>	-	-
	<i>E. coli</i>	-	-
Fração diclorometânica		2,5	Bactericida
	<i>S. aureus</i>	1,25	Bacteriostático
	<i>P. aeruginosa</i>	5,0	Bactericida
	<i>S. typhimurium</i>	5,0	Bactericida
	<i>E. coli</i>	5,0	Bactericida
Fração em acetato de etila	<i>S. aureus</i>	-	-
	<i>P. aeruginosa</i>	-	-
	<i>S. typhimurium</i>	-	-
	<i>E. coli</i>	-	-
Fração butanólica		2,5	Bacteriostático
	<i>S. aureus</i>	1,25	Bactericida
	<i>P. aeruginosa</i>	-	-
	<i>S. typhimurium</i>	5,0	Bacteriostático
	<i>E. coli</i>	5,0	Bacteriostático

5.4 ATIVIDADES FARMACOLÓGICAS DO EXTRATO ETANÓLICO DAS FOLHAS DE *V. polyanthes*

Nas doses administradas, o extrato etanólico das folhas de *V. polyanthes* foi tóxico para os animais, produzindo uma DL₅₀ de 2,78 g/kg com intervalo de confiança 95% que variou de 1,67 a 4,64 g/kg.

Doses de 200 e 400 mg/kg do extrato reduziram, significativamente, as contorções abdominais em 16,75 ($p < 0,01$) e 31,44% ($p < 0,001$) induzidas por ácido acético quando comparadas ao grupo controle ($66,37 \pm 2,19$) (Figura 20).

Figura 23. Efeitos do extrato etanólico das folhas de *V. polyanthes* sobre as contorções induzidas por ácido acético 0,6% em camundongos (n = 8).

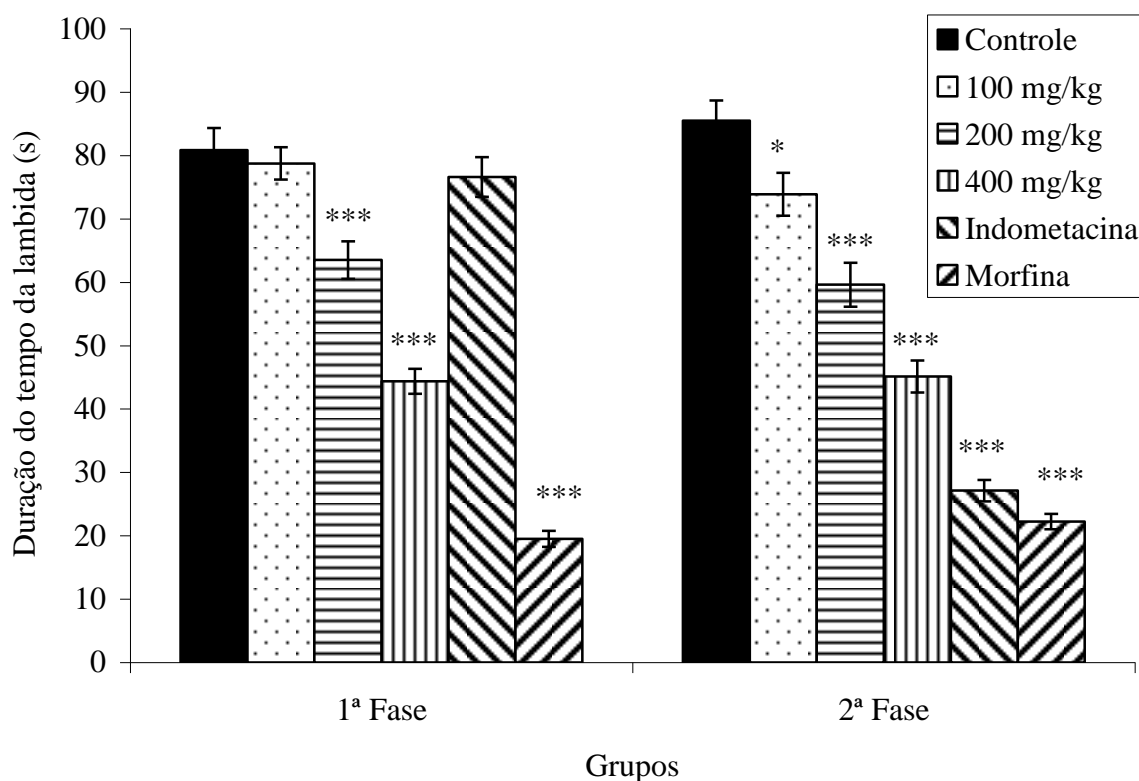


** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ vs grupo controle. AAS = ácido acetilsalicílico.

A injeção subplantar de formalina promoveu uma resposta característica bifásica (Figura 21). O tempo gasto na primeira fase (0-5 min) foi $80,87 \pm 3,47$ s e na segunda fase (15-30 min) foi de $85,50 \pm 3,19$ s para o grupo controle. Após 60 min de tratamento, doses de 200 e 400 mg/kg do extrato inibiram significativamente ($p < 0,01$ e $p < 0,001$) a primeira fase em 21,48 e 45,13%, respectivamente. A segunda fase foi inibida nas doses de 100 (13,60%), 200 (30,27%) e 400 mg/kg (47,23%) quando comparada ao controle. Como esperado, a

morfina (fármaco de referência) inibiu significativamente ambas as fases da lambida da pata induzida por formalina, enquanto a indometacina reduziu somente a segunda fase.

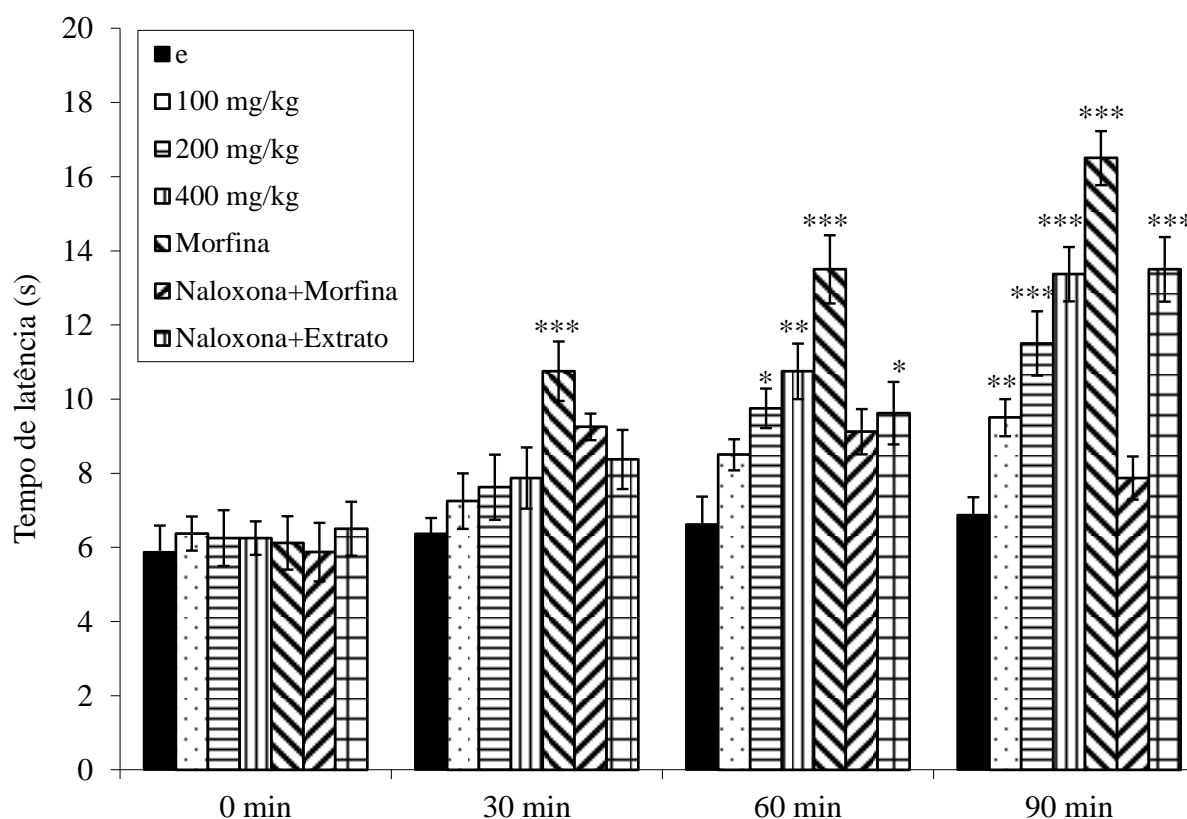
Figura 24. Efeitos do extrato etanólico das folhas de *V. polyanthes* sobre a nocicepção induzida por formalina em camundongos (n = 8).



* $p < 0,05$; *** $p < 0,001$ vs grupo controle.

O extrato etanólico de *V. polyanthes* aumentou o tempo de latência de camundongos expostos à placa quente (Figura 22). Após 60 e 90 min de tratamento, doses de 100 mg/kg (28,40 e 38,28%), 200 mg/kg (47,28 e 67,39%) e 400 mg/kg (32,68 e 40,31%) aumentaram significativamente ($p < 0,05$, $p < 0,01$ ou $p < 0,001$) o tempo de permanência sobre a placa quente com respectivo controle. Morfina, um analgésico opióide, aumentando o tempo de latência, enquanto a naloxona, um antagonista opióides, bloqueou a ação da morfina, mas não alterou completamente o efeito antinociceptivo do extrato testado (Figura 22).

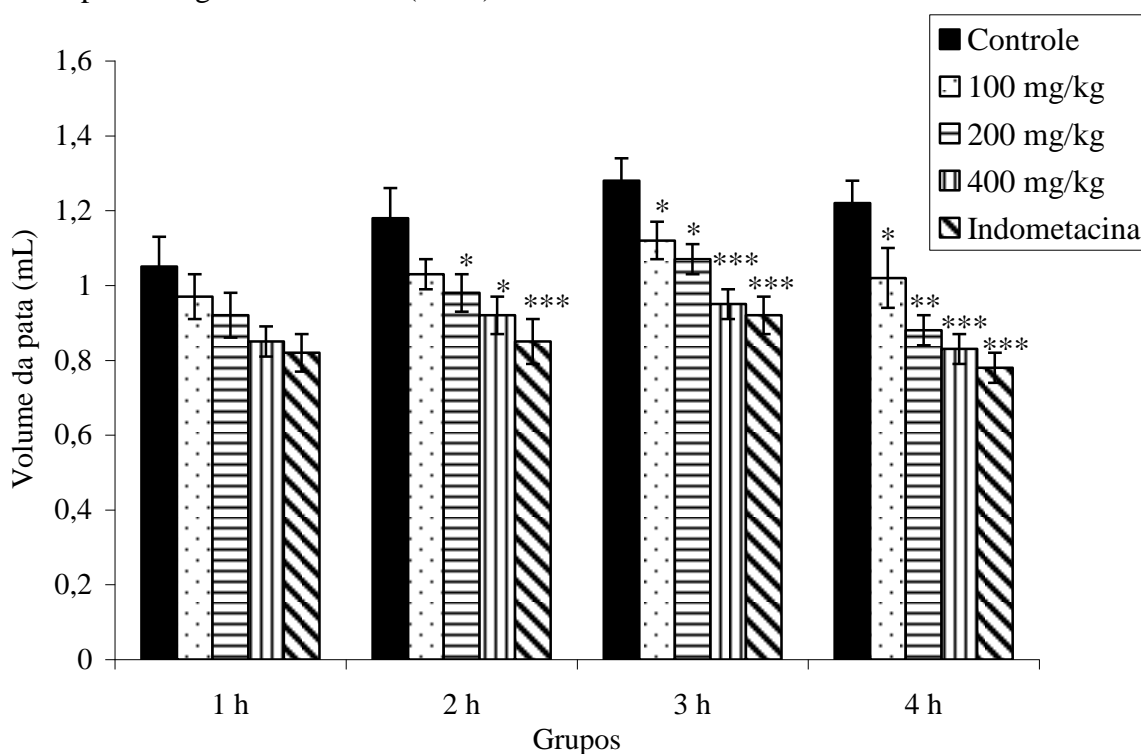
Figura 25. Efeitos do extrato etanólico das folhas de *V. polyanthes* sobre o tempo de reação (s) de camundongos expostos ao teste da placa quente (n = 8).



* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ vs grupo controle.

O efeito anti-inflamatório do extrato etanólico foi avaliado pelo método do edema de pata induzido por carragenina (Figura 23). Após 2 h da aplicação da carragenina, o edema de pata foi reduzido em 16,95 e 22,03% nas doses de 200 e 400 mg/kg, respectivamente. A inibição do edema foi observada 3 e 4 h após injeção de carragenina nas doses de 200 (16,41 e 27,87%; $p < 0,05$ e $p < 0,01$, respectivamente) e 400 mg/kg (25,78 e 31,97%; $p < 0,01$ e $p < 0,001$, respectivamente) quando comparado ao grupo controle. Nesses tempos, a indometacina (fármaco de referência) também inibiu o edema de pata (28,12 e 53,93%, respectivamente), demonstrando seu efeito anti-inflamatório.

Figura 26. Efeitos do extrato etanólico das folhas de *V. polyanthes* sobre o edema de pata induzido por carragenina em ratos (n = 6).



* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ vs grupo controle.

O efeito anti-inflamatório do extrato etanólico também foi avaliado pelo método de pleurisia induzida por carragenina (Tabela 6). Foi observado que doses de 200 ($p < 0,05$) e 400 mg/kg ($p < 0,001$) do extrato reduziram significativamente o volume do exsudato em 13,83 e 43,08% quando comparado ao grupo controle, respectivamente. O número de leucócitos totais foi também inibido nas doses de 200 (17,87%; $p < 0,001$) e 400 mg/kg (28,39%; $p < 0,001$) em comparação ao respectivo controle (Tabela 9). Além disso, a inibição da migração leucocitária ocorreu nas doses de 200 ($13,00 \pm 0,21 \times 10^3$ células/mm³; $p < 0,001$) e 400 mg/kg ($11,60 \pm 0,32 \times 10^3$ células/mm³; $p < 0,001$). Indometacina (fármaco de referência) reduziu o volume de exsudato e a migração leucocitária.

Tabela 11. Efeito do extrato etanólico das folhas de *V. polyanthes* sobre o volume do exsudato e o número total de leucócitos na pleurisia induzida por carragenina em ratos (n = 6).

Grupo	Dose (mg/kg)	Volume do exsudato (mL)	Inibição (%)	Nº Leucócitos (10^3 células/mm ³)	Inibição (%)
Controle	Salina	1,88 ± 0,08	-	15,50 ± 0,50	-
	100	1,78 ± 0,08	5,32	14,90 ± 0,43	3,87
Extrato	200	1,62 ± 0,04*	13,83	12,73 ± 0,21***	17,87
	400	1,07 ± 0,05***	43,08	11,10 ± 0,32***	28,39
Indometacina	10	0,73 ± 0,09***	61,17	9,87 ± 0,35***	36,32

* $p < 0,05$, *** $p < 0,001$ vs grupo controle.

6. DISCUSSÃO

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). Baseado em dados populares, *V. polyanthes* foi avaliada quanto à pesquisa e quantificação de constituintes fenólicos e aos efeitos antioxidante, antimicrobiano, antinociceptivo e antiinflamatório. Portanto, considerando os resultados dos métodos aplicados na presente investigação, *V. polyanthes* possui efeitos antimicrobiano, antioxidante, antinociceptivo e antiinflamatório e estes efeitos podem estar relacionados a componentes fenólicos presentes nas folhas desta planta.

Os métodos comumente utilizados para determinação da atividade antioxidante são aqueles que correlacionam espectrofotometricamente a capacidade antioxidante dos constituintes testados com o desaparecimento ou formação de cor por substâncias cromogênicas. Estes testes possuem metodologias simples, são rápidos e sensíveis.

O DPPH é um cromóforo estável que gera formação de uma coloração violeta intensa (ARNAO, 2000), a qual diminui à medida que é reduzido por um antioxidante e seu elétron se torna emparelhado (BRAND et al, 1995). Dentre o extrato e as frações de *V. polyanthes* testadas, a fração em acetato de etila foi a que apresentou maior atividade antioxidante apresentando um valor de CE_{50} igual a 4,28 $\mu\text{g/mL}$. Além disso, estes resultados foram confirmados pelo método de bioautografia usando o DPPH como revelador.

A atividade antioxidante foi ainda avaliada pelo poder de redução da amostra, método que indica a capacidade de uma substância em doar elétrons, e, conseqüentemente, reduzir os intermediários oxidados por processos de peroxidação lipídica (OYAZU, 1986). A fração em acetato de etila de *V. polyanthes* foi a que apresentou uma CE_{50} de 9,8 $\mu\text{g/mL}$, demonstrando maior atividade antioxidante.

A peroxidação lipídica é um processo oxidativo iniciado pela reação de um radical livre com o ácido graxo insaturado, resultando na formação de hidroperóxidos lipídicos e aldeídos (LIMA e ABDALLA, 2001). Dessa forma, o teste com o TBA consiste na sua reação com os produtos de decomposição dos hidroperóxidos, sendo que um dos principais produtos formados é o MDA, um aldeído com três átomos de carbono. Cada molécula de MDA reage com duas moléculas de TBA, formando um complexo de cor vermelha, que apresenta

absorção a 535 nm. Em busca de aumentar a velocidade e a sensibilidade da reação, são necessários meio ácido (pH 1-2) e temperatura elevada (100° C) (SILVA et al., 1999).

No teste de peroxidação lipídica avaliou-se o poder de inibição do extrato etanólico e das frações de *V. polyanthes* ao impedir que homogenatos de carne sofressem processo oxidativo, já que o MDA é um dos principais produtos de oxidação e reage fortemente com o TBA, formando um complexo de coloração vermelha. O extrato etanólico e as frações demonstraram atividade antioxidante significativa em relação ao controle negativo, inibindo a síntese de MDA e conservando a carne até o final do quarto dia de avaliação.

O conteúdo de fenóis totais e flavonoides também foram determinados, destacando-se as frações polares (acetato de etila e butanólica). Assim, observa-se que há uma relação positiva entre a capacidade antioxidante do extrato etanólico e das frações e seus teores de fenóis totais e flavonoides, empregando os métodos aplicados.

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

Nossos resultados indicaram que as frações diclorometânica e acetato de etila de *V. polyanthes* foram efetivos em inibir o crescimento de *S. aureus* pelo método de difusão, demonstrando atividade antibacteriana. Esta atividade pode ser atribuído a presença de diversas substâncias nesses produtos, especialmente os constituintes fenólicos, visto que as frações polares foram mais ativas.

O aumento crescente da frequência de *S. aureus* resistentes à oxacilina (ORSA) e resistentes à metilicina (MRSA), e da possibilidade do aparecimento de linhagens resistentes também a vancomicina, tornam relevantes o desenvolvimento de novas drogas com atividade antiestafilocócicas (SADER et al., 1993). Neste sentido, utilizou-se o método da Concentração Inibitória Mínima que investiga a concentração mínima do extrato etanólico e frações necessária para inibir o crescimento das cepas bacterianas

Extratos que não inibiram o crescimento de microrganismos pelo método de difusão, podem apresentar 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).

Além disso, a atividade antimicrobiana pode explicar parcialmente o uso popular da espécie no tratamento de infecções e cicatrizante. Atividades antioxidante e antimicrobiana são devidas aos constituintes fenólicos, como taninos e flavonóides (EINBOND et al., 2004;

BANERJEE et al., 2005; CHOI et al., 2006), o que pode explicar os resultados obtidos de *V. polyanthes*.

No modelo de contorções abdominais ocorre indução de contração e rotação do abdômen, seguida pela extensão de uma ou ambas as patas traseiras dos camundongos (KOSTER et al., 1959). O ácido acético, agente utilizado para estímulo da nocicepção, produz resposta cuja intensidade varia de acordo com a interação com neurotransmissores e neuromoduladores. Este agente atua na liberação indireta de mediadores que modulam a nocicepção (WHITTLE, 1964), sendo o modelo considerado inespecífico, porém útil em triagem de substâncias analgésicas, independente do seu modo de ação (LAPA et al., 2008).

Os resultados do teste de contorções abdominais induzidas por ácido acético demonstraram que o extrato etanólico de *V. polyanthes* reduziu as contorções abdominais quando comparado ao controle negativo. Esse dado sugere a hipótese da participação do extrato na inibição da síntese de prostaglandinas, pois o mecanismo nociceptivo de indução das contorções por ácido acético envolve metabólitos da via da ciclooxigenase (DUARTE et al., 1992).

A atividade antinociceptiva foi avaliada também pelo teste da formalina, que consistiu na injeção intraplantar de formalina na pata direita traseira de camundongos. O modelo é mais específico, e as respostas motoras geradas que são quantificadas permitem que se avalie a intensidade da resposta nociceptiva (DUBUISSON e DENNIS, 1977) a dois tipos de dor: de origem neurogênica (estimulação direta dos neurônios nociceptivos) e de dor inflamatória (caracterizada pela liberação de mediadores pró-inflamatórios). O tempo que o animal permaneceu lambendo ou mordendo a pata injetada com formalina foi quantificado cumulativamente em segundos como índice de nocicepção. Os 5 minutos iniciais, após a administração intraplantar de formalina, correspondem à primeira fase da nocicepção (dor de origem neurogênica), desencadeada por este agente nociceptivo. A segunda fase (dor de origem inflamatória), que ocorre entre 15 a 30 minutos após a administração de formalina, representa a resposta tônica à nocicepção, acompanhada de uma resposta inflamatória relacionada à liberação de mediadores inflamatórios (BEIRITH et al, 2002). Os resultados demonstraram o extrato agiu em dois níveis, periférico e central, sugerindo atividades antinociceptiva e antiinflamatória por reduzir a resposta bifásica (1ª e 2ª fases) (HUNSKAAR; HOLE, 1987).

A ação central foi confirmada no teste da placa quente, mostrando efeito máximo após 90 minutos da resposta. Nossos resultados indicaram que o efeito analgésico do extrato pode

ser dependente ou não do sistema opióide, pois o efeito do extrato etanólico não foi totalmente revertido na presença de naloxona, um antagonista opióide.

O efeito anti-inflamatório foi confirmado pelo método de edema de pata induzido por carragenina em ratos, um modelo animal empregado largamente para estudos de atividade antiinflamatória de substâncias e extratos vegetais. A resposta inflamatória induzida por carragenina é caracterizada pela formação de edema resultado da liberação de diversos mediadores como histamina, serotonina e bradicinina; que é subsequente sustentada pela liberação de prostaglandinas induzidas por isoformas de ciclooxigenase (COX-2) (DI ROSA et al., 1971; SEIBERT et al., 1994; NANTEL et al., 1999). No presente estudo, o tratamento com extrato de *V. polyanthes* produziu uma proeminente inibição do edema de rato induzido por carragenina. O extrato pode ter inibido uma das vias que biossintetiza a bradicinina, a histamina, a substância P e/ou o fator de agregação plaquetária (PAF) que participa da resposta inflamatória induzida pela carragenina (STOCHLA; MASLINSKI, 1982; GILLIGAN et al., 1994; DE CAMPOS et al., 1994). Portanto, esta evidência permite como sugestão que a ação anti-inflamatória de *V. polyanthes* está relacionada à inibição de uma ou mais vias da sinalização intracelular envolvidas nos efeitos desses mediadores.

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

As atividades antinociceptiva e anti-inflamatória verificadas neste estudo foram também descritas por plantas pertencentes ao gênero *Vernonia* (SILVA et al., 2011; RISSO et al., 2010, FRUTUOSO et al., 1994). Provavelmente, componentes similares detectados em nossos experimentos podem ser responsáveis por essas propriedades, pois a prospecção fitoquímica do extrato de *V. polyanthes* demonstrou a presença de taninos, flavonóides, cumarinas, saponinas, terpenos e esteróides e alcalóides, sugerindo uma ação sinérgica. Atividade anti-inflamatória tem sido atribuída a substâncias como flavonóides (KIM et al., 2004) e triterpenos (BEIRITH et al., 1999) que pode estar associada ao efeito antinociceptivo. Baseado nas classes das substâncias detectadas em *V. polyanthes*, diversos mecanismo de

ação pode ser usado para explicar as atividades observadas do extrato. Flavonoides são potentes inibidores da óxido nítrico sintase tipo 2 que está envolvida na síntese de NO (OLSZANECKI et al., 2002) via indireta do bloqueio das vias da ciclooxigenase e/ou da lipoxigenase (ROBAK et al., 1998), e das vias da proteína quinase C e da L-arginina/NO (MEOTTI et al., 2005) que têm sido conhecidas por fazer parte de uma série de eventos moleculares que permitem as ações antinociceptiva (MACHELSKA et al., 1997) e anti-inflamatória (KIM et al., 2004). A ligação entre a liberação de NO das células endoteliais durante relaxamento vascular, a habilidade dos flavonóides em induzir a vasodilatação e a importância da vasodilatação nos mecanismos antinociceptivo e antiinflamatório têm também sido descrito (NASERI et al., 2005; CHEN; PACE-ASCIAK, 1996). Além disso, Middleton e outros (2000) têm publicado sobre o potencial dos flavonóides em inibir a fosfolipase A2 3 fosfolipase C, que são enzimas importantes na cascada do processo inflamatório. A atividade anti-inflamatória do extrato etanólico e da fração em acetato de etila, por outro lado, pode estar associada com o efeito inibitório de flavonóides e triterpenos sobre o fator nuclear kB . Estudo tem revelado que saponina pode exercer atividade antinociceptiva pela via de modulação dos receptores do GABA_A, NMDA e não-NMDA em nível supraespinal (SUH et al., 1996). Suh e outros (1996) têm também demonstrado que a antinocicepção da saponina mediada por não opióides é modulada pela via descendente de ativação das vias da serotonina e α_2 -adrenérgico.

7. CONCLUSÃO

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

1. O estudo fitoquímico preliminar mostrou que as folhas de *V. polyanthes* são ricas em substâncias do metabolismo secundário como triterpenos, esteróides, taninos, flavonóides, saponinas e cumarinas;
2. A fração em acetato de etila constitui um alvo para pesquisa de substâncias fenólicas com potencial antioxidante;
3. As frações diclorometânica, em acetato de etila e butanólica são promissoras para busca de novas substâncias com atividade antimicrobiana;
4. O extrato etanólico das folhas de *V. polyanthes* constitui um potencial candidato para a busca de novos fármacos a serem usados como agentes analgésico, antiinflamatório, antimicrobiano e antioxidante para a terapia da dor, doenças inflamatórias e infecções.
5. Os resultados apresentados abrem perspectivas para o futuro isolamento, purificação e identificação das substâncias bioativas da espécie que possam ser utilizadas na terapêutica.
6. Portanto, os resultados da presente investigação justificam o uso de *V. polyanthes* na medicina popular, entretanto, estudos clínicos e toxicológicos aprofundados são necessários para provar a segurança e eficácia e a utilização como fitomedicamento.

8. REFERÊNCIAS

ABBAS, A.K.; LICHTMAN, A.H.; PILAI, S. In: **Imunologia celular e molecular**. 6^a ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2008. 564p.

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

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

ALAWA, C.B.I.; ADAMU, A.M.; GEFU, J.O.; AJANUSI, O.J.; ABDU, P.A.; CHIEZEY, N.P.; ALAWA, J.N.; BOWAN, D.D. *In vitro* screening of two Nigerian medicinal plants (*Vernonia amygdalina* and *Annona senegalensis*) for anthelmintic activity. **Veterinary Parasitology**, v.113, n.1, p.78-81, 2003.

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

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

ALMEIDA, N. F. L.; SILVA, S. R. S.; SOUZA, J. M.; Levantamento etnobotânico de plantas medicinais na cidade de Viçosa, MG. **Revista Brasileira de Farmácia**, v. 90, n. 4, p.316-320, 2009.

ALHO, C. R. J. The value of biodiversity. **Brazilian Journal of Biology**, v. 68, n. 4, suppl. 0, p. 1115-1118, 2008.

ALVES, V. F. G.; NEVES, L. J. Anatomia foliar de *Vernonia polyanthes* Less (Asteraceae). **Revista Universidade Rural, Série Ciências da Vida**, v. 22, n. 2, p. 1-8, 2003.

ALZORIKY, N. S.; NAKAHARA, K. Antibacterial activity of extracts from some plants commonly consumed in Asia. **International Journal of Food Microbiology**, v. 80, n. 3 p. 223-230, 2003.

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

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

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

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

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

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

BANERJEE, A.; DASGUPTA, N.; DE, B. In vitro study of antioxidant activity of *Syzygium cumini* fruit. **Food Chemistry**, v. 90, n. 4, p. 727-733, 2005.

BARREIROS, A. L. S.; DAVID, J. M. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Química Nova**, v. 29, n. 1, 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.

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, n. 3, p. 273–281, 2008.

BEIRITH, A.; SANTOS, A. R. S.; CALIXTO, J. B.; HESS, S. C.; MESSANA, I.; FERRARI, F.; YUNES, R. A. 1999. Study of the antinociceptive action of the ethanolic extract and the triterpene 24-hydroxytormentonic acid isolated from the stem bark of *Ocotea suaveolens*. **Planta Medica**, v. 65, n. 1, p. 5-55, 1999.

BENNETT, M. I.; SMITH, B. H.; TORRANCE, N.; LEE, A. J. Can pain can be more or less neuropathic? Comparison of symptom assessment tools with ratings of certainty by clinicians. **Pain**, v. 122, n. 3, p. 289-294, 2006.

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

BORS, W.; HELLER, W.; MICHEL, C.; SARAN, M. Flavonoids as antioxidants: determination of radical scavenging efficiencies. **Methods Enzymology**, v. 186, p. 343-355, 1990.

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, n. 2, p. 396-402, 2007.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M.E.; BERSET, C. Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. **Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie**, London, v. 28, n.1 p. 25-30, 1995

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento de Assistência Farmacêutica. **Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos** / Ministério da Saúde, Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos, Departamento de Assistência Farmacêutica. – Brasília: Ministério da Saúde, 2006. 60 p. – (Série B. Textos Básicos de Saúde)

BREMER, K. **Asteraceae, cladistics & classification**. Portland: Timber Press, 1994. 752 p.

BROOKS, G.F.; CARROLL, K.C.; BUTEL, J.S.; MORSE, S.A. **Jawetz, Melnick e Adelberg microbiologia médica**. 24^a ed. Rio de Janeiro: McGraw Hill, 2009.

BUDZIANOWSKI, J.; KORZENIOWSKA, K.; CHMARA, E.; MROZIKIEWICZ, A. Microvascular protective activity of flavonoid glucuronides fraction from *Tulipa gesneriana*. **Phytotherapy Research**, v. 13, n. 2, p. 166-168, 1999.

BUER, C. S.; IMIN, N.; DJORDJEVIC, M. A. Flavonoids: new roles for old molecules. **Journal of Integrative Plant Biology**, v. 52, n. 1, p. 98-111, 2010.

BURT, S. Essential Oils: their antibacterial properties and potential applications in foods – a review. **International Journal of Food Microbiology**. v. 94, n. 3, p. 223-253, 2004.

CALIXTO, J. B. Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytotherapeutic agents). **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**. v. 33, n. 2, p. 179-189, 2000.

CALIXTO, J. B. Twenty-five years of research on medicinal plants in Latin America: a personal review. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 100, N. 1-2, p. 131-134, 2005.

CAMPOS, M.; OROPEZA, M.; PONCE, H.; FERNANDEZ, J.; JIMENEZ-ESTRADA, M.; TORRES, H.; REYES-CHILPA, R. Relaxation of uterine and aortic smooth muscle by glaucolides D and E from *Vernonia liatroides*. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v. 26, n. 1, p. 112-115, 2003.

CAO, G.; SOFIC, E.; PRIOR, L. R. Antioxidant and prooxidant behavior of flavonoids: Structure-activity relationships. **Free Radicals in Biology and Medicine**, v. 22, n. 5, p. 749–760, 1997.

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

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**. 3^a ed., Porto Alegre/Florianópolis, Ed. Universidade/UFRGS/ Ed. UFSC, p. 443-459, 2000.

CHEN, C. K.; PACE-ASCIAC, C. R. Vasorelaxing activity of resveratrol and quercetin in isolated rat aorta. **General Pharmacology**, v. 27, n. 2, p. 363–366, 1996.

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, n. 7, p. 756-761, 2006.

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. 2009a.

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. 2009b.

COELHO DE SOUZA, G.; 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 Ethnopharmacology**, v. 90, n.1, p.135-143. 2004.

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

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

CONNER, D. E.; BEUCHAT, L. R. Effect of essential oils from plants on growth of food spoilage yeasts. **Journal of Food Science**, v. 49, n. 2, p. 429-434, 1984.

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, n. 3, 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, n.3, p.241-256, 2009.

COTRAN, R.S.; KUMAR, V.; COLLINS, T. Robbins: **Patología Estructural e Funcional**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S. A. 2000. 1251p.

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

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

CUSHNIE, T. P. T.; LAMB, A. J. Antimicrobial activity of flavonoids. **Journal of Antimicrobial Agents**, v. 26, n. 5, p. 343-356, 2005.

DE CAMPOS, R.O.; ALVES, R.V.; KYLE, D.J.; CHAKRAVARTY, S.; MAVUNKEL, B.J.; CALIXTO, J.B. Antioedematogenic and antinociceptive actions of NPC 18521, a novel bradykinin B₂ receptor antagonist. **European Journal of Pharmacology**, v.316, n.2-3, p.277–286, 1996.

DEWICK, P. M. **Medicinal natural products: a biosynthetic approach**. 3^a ed., New York: Wiley, 2009. 507p.

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

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

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 Triazenes: DNA Cleavage, Antibacterial Activity and Cytotoxicity against Acute Myeloid Leukemia Cells. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 21, n. 12, p. 2226-2237, 2010.

DROGE, W. Free radicals in the physiological control of cell function. **Physiology Review**, v. 82, n. 1, p. 47-95, 2002.

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

DUARTE, M.C.T.; FIGUEIRA, G.M.; SARTORATTO, A.; REHDER, V.L.; DELARMELINA, C. Anti-Candida activity of Brazilian medicinal plants. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 97, n.2, p. 305-311, 2005.

DUARTE, M.C.T. Atividade antimicrobiana de plantas medicinais e aromáticas utilizadas no Brasil. **Multi-Ciência**, v.7, p.17, 2006.

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

EINBOND, L. S.; REYNERTSON, K. A.; LUO, X. D.; BASILE, M. J.; KENNELLY, E. J. Anthocyanin antioxidants from edible fruits. **Food Chemistry**, v. 84, n. 1, p. 23-28, 2004.

FENNEL, C.W.; LINDSEY, K.L.; MCGAW, L.J.; SPARG, S.G.; STAFFORD, G.I.; ELGORASHI, E.E.; GRACE, O.M. VAN STADEN, J. Review: Assessing African medicinal plants for efficacy and safety: Pharmacological screening and toxicology. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 94, n.2-3, p. 205-217, 2004.

FERREIRA, S. C.; Asteraceae **Martinov. em um fragmento florestal, Viçosa, Minas Gerais, Brasil: florística e aspectos reprodutivos**. 2006. 143p. Dissertação (Pós graduação – Área de Concentração em Botânica) Universidade Federal de Viçosa, 2006.

F'GUYER, S.; AFAQ, F.; MUKHTAR, H. Photochemoprevention of skin cancer by botanical agents. **Photodermatology, Photoimmunology & Photomedicine**, v. 19, n. 2, p. 56-72, 2003.

FRACARO, S. N.; DECONTO, I.; NAKASHIMA, T. **Potencial de toxicidade reprodutiva do extrato de Tillandsia usneoides Linnaeus, 1762 (barba-de-pau) em coelhas gestantes**. 2004. 60p. Tese (Mestrado em Ciências Veterinárias), Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 2004.

FRANKEL, E. N.; WATERHOUSE, A. L.; KINSELLA, J. E. Inhibition of human LDL oxidation by resveratrol. **Lancet**, v. 341, n. 8852, p. 1103-1104, 1993.

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, n. 1, p. 60, 21–25, 1994.

GANEM, R. S. **Conservação da biodiversidade, legislação e políticas públicas**. Biblioteca Digital da Câmara dos Deputados, 2011. Disponível em: < <http://www.bd.camara.gov.br>>. Acesso em: 10.jul.2011.

GHAYUR, M. N., KHAN, A. H., GILANI, A. H. Ginger facilitates cholinergic activity possibly due to blockade of muscarinic autoreceptors in rat stomach fundus. **Pakistan Journal of Pharmaceutical Science**, v. 20, n. 3, p. 231–235, 2007.

GILLIGAN, D.M.; BADAR, D.M.; PANZA, J.A.; QUYYULI, A.A.; CANNON, R.O. Acute vascular effects of estrogen in postmenopausal women. **Circulation**, v.90, p.786-791,1994.

GIULIETTI, A. M.; HARLEY, R. M., QUEIROZ, L. P. WANDERLEY, M. G. L.; VAN DEN BERG, C. Biodiversidade e conservação das plantas no Brasil. **Megadiversidade**, v. 1, n. 1, p. 52-51, 2005.

GOTTLIEB, O. R.; BORIN, M. R. M. B.; PAGOTTO, C. L. A. C.; ZOCHER, D. H. T. Biodiversidade: o enfoque interdisciplinar brasileiro. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 3, n. 2, p. 97-102, 1998.

HALLIWELL, B. Free radicals and other reactive species in disease. In: **Encyclopedia of Life Sciences**. Nature Publishing Group, p. 1-7, 2001.

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, supl. 2, p. 249-251, 2007.

HEMAISWARYA, S.; KRUTHIVENTIB, A. K.; DOBLEA, M. Synergism between natural products and antibiotics against infectious diseases. **Phytomedicine**, v. 15, n. 8, p. 639–652, 2008.

HERNANDEZ, N. E.; TERESCHUK M. L.; ABDALA, L. R. Antimicrobial activity of flavonoids in medicinal plants from Tafi del Valle (Tucuman, Argentina). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 73, n. 1-2, p. 317-322, 2000.

HOLETZ, F.B.; PESSINI, G.L.; SANCHES, N.R.; CORTEZ, D.A.G.C.; NAKAMURA, C.V.; DIAS FILHO, B.P. Screening of some plants used in the Brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases. **Memórias Instituto Oswaldo Cruz**, v. 97, n. 7, p.1027-1031, 2002.

HORDEGEN, P.; The anthelmintic efficacy of five plant products against gastrointestinal trichostrongyloids in artificially infected lambs. **Veterinary Parasitology**, v.17, n.1/2, p.51-60, 2003.

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

IGILIE, G.; OLESEK, W.; JURZYSTA, M. Vernoniosides D and E, two novel saponins from *Vernonia amigdalina*. **Journal of Natural Products**, v.58, n.9, p.1438-1443, 1995.

IMAI, H.; OSAKA, K.; YASUDA, H.; HAMASHIRA, H.; ARAI, T. Inhibition by the essential oils of peppermint and spearmint on the growth of pathogenic bacteria. **Microbios**, v. 106, suppl. 1, p. 31-39, 2001.

JANSEN A. M.; SCHEFFER J. J. C.; BAERHEIM S. A. Antimicrobial activity of essential oils from Greek Sideritis species, **Pharmazie**, v. 45, n. 1, p. 70-71, 1987.

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

JONES, S.L. Descending control of nociception. In: The initial processing of pain and its descending control: spinal and trigeminal systems (Light AR, ed). New York: Kager, p. 203-277, 1992.

JUDD, W. S.; CAMPBELL, C. S.; KELLONGG, E. A.; STEENS P. F.; DONOGUE, M. J. **Sistemática Vegetal**: um enfoque filogenético. 3^a ed., Porto Alegre: Artmed, 2009. 612p.

KAPER, J.B.; NATARO, J.P.; MOBLEY, H.L.T. Pathogenic Escherichia coli. **Nature Reviews Microbiology**, v.2, n.2, p.123-140, 2004.

KAROU, D.; SAVADOGO, A.; CANINI, A.; YAMEOGO, S.; MONTESANO, C.; SIMPORE, J.; COLIZZI, V.; TRAORE, A. S. Antibacterial activity of alkaloids from *Sida acuta*. **African Journal of Biotechnology**, v. 5, n. 2, p. 195-200, 2006.

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

KONEMAN, E.W.; ALLEN, S.D.; JANDA. W.M.; SCHRECKENBERGER, P.C.; WINN JR, W.C. **Diagnóstico Microbiológico**: Texto e Atlas Colorido. 5^a.ed. Rio de Janeiro: Medsi, 2001. 1465 p.

KNOBLOCH, K.; PAULI, A.; IBERL, B. Antibacterial and antifungal properties of essential oil components. **Journal of Essential Oil Research**, v. 1, p. 119-128, 1989.

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

LEITÃO FILHO, H. F.; ARANHA, C.; BACCHI, O. **Plantas invasoras de culturas no Estado de São Paulo**. São Paulo: HUCITEC, v. 1, p.93-94, 1972. 291p.

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

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

LÓPEZ, C. A. A. Considerações gerais sobre plantas medicinais. **Ambiente: Gestão e Desenvolvimento**, v. 1, n. 1, p. 19-27. 2006.

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

LYSS, G.; SCHMIDT, T. J.; MERFORT, I.; PAHL, H. L. Helenalin, an anti-inflammatory sesquiterpene lactone from *Arnica*, selectively inhibits transcription factor NF- κ B. **Biological Chemistry**, v. 378, n. 9, p. 951-961, 1997.

MACHADO, P. R. L.; ARAÚJO, M. I. A. S.; CARVALHO, L.; CARVALHO, E. M. Mecanismos de resposta imune às infecções. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 79, n. 6, p. 647-664, 2004.

MACHELSKA, H.; LABUZ, D.; PRZEWLOCKI, R.; PRZEWLOCKA, B. Inhibition of nitric oxide synthase enhances antinociception mediated by μ , δ and κ opioid receptors in acute and prolonged pain in the rat spinal cord. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 282, p. 977-984, 1997.

MAHESH, B.; SATISH, S. Antimicrobial activity of some important medicinal plant against plant and human pathogens. **World Journal of Agricultural Sciences**, v. 4, n. 5, p. 839-843, 2008.

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 brasiliensis*: composição química e atividade biológica. **Química Nova**, v. 33, n. 3, p. 584-586, 2010.

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

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

MENDES, L.P.M.; MACIEL, K.M.; VIEIRA, A.B.R.; MENDONÇA, L.C.V.; SILVA, R.M.F.ROLIM NETO, P.J. BARBOSA, W.L.R.VIEIRA, J.M.S. Atividade Antimicrobiana de Extratos Etanólicos de *Peperomia pellucida* e *Portulaca pilosa*. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v.32, n.1, p.121-125, 2011

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

MENDONÇA, D. E.; ONOFRE, S. B. Atividade antimicrobiana do óleo-resina produzido pela copaiba - *Copaifera multijuga* Hayne (Leguminosae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 19, n. 2b, p. 577-581, 2009.

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

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

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

MILLAN, M. J. Descending control of pain. **Progress in Neurobiology**, v. 66, n. 6, p. 355-474, 2002.

MORAIS, S. M.; CAVALCANTI, E. S. B.; COSTA; S.M.O.; AGUIAR, L. A. Ação antioxidante de chás e condimentos de grande consumo no Brasil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 19, n. 1b, p. 315-320, 2009.

NAKAJIMA, J. M.; SEMIR, J. Asteraceae no Parque da Serra da Canastra, Minas Gerais, Brasil. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 24, n. 4, p. 471-478, 2001.

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

NASCIMENTO, G. G. F.; LOCATELLI, J.; FREITAS, P. C. Antibacterial activity of plant extracts and phytochemicals on antibiotic-resistant bacteria. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 31, n. 2, p. 247-256, 2000.

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

NIJS, H. C. M.; MENKEN, S. B. J. Relations between breeding system, ploidy level, and taxonomy in some advanced sections of *Taraxacum*. In: CALIGARI, P. D. S.; HIND, D. J. N. (Eds). **Compositae: Systematics**. Royal Botanic Gardens: Kew, p. 665-677, 1996.

NIJVELDT, R. J.; NOOD, E.; HOORN, D. E. C.; BOELEN, 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, n. 4, p. 418-425, 2001.

NIKOLIC, K. M. Theoretical study of phenolic antioxidants properties in reaction with oxygen-centered radicals. **Journal of Molecular Structure**, v. 774, n. 1-3, p. 95-105, 2006.

OLGUIM, C. F. A.; HARMESKI, L.; PERCIO, M. R.; SOMENSI, A. Avaliação do potencial biológico alelopático dos extratos fracionados da raiz da *Vernonia Tweediana* baker. **Revista Varia Scientia**, v. 5, n. 10, p. 137-143, 2005.

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, n. 2, p. 165-169, 2007.

OLIVEIRA, M. J. R.; SIMÕES, M. J. S.; SASSI, C. R. R. Fitoterapia no Sistema de Saúde Pública (SUS) no Estado de São Paulo, Brasil. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 8, n. 2, p. 39-41, 2006.

OLSZANECKI, R.; GÊBSKA, A.; KOZLOVSKI, V. I.; GRYGLEWSKI, R. J. Flavonoids and nitric oxide synthase. **Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 53, n. 4, p. 571-584, 2002.

ONWUKAEME, N. D. Anti-inflammatory activities of flavonoids of *Baphia nitida* Lodd. (Leguminosae) on mice and rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 46, n. 2, p. 121-124, 1995.

ORLANDO, S.C. **Avaliação da atividade antimicrobiana do extrato hidralcoólico bruto da casca do *Stryphnodendron adstringens* (Martius) Coville (Barbatimão)**. 2005. 88 p. Dissertação (Mestrado em Promoção da Saúde) - Universidade de Franca, Franca, SP, 2005.

OUMZIL, H.; GHOULAMI, S.; RHAJAOU, M.; ILIDRISSI, A.; TETOUAMI, S.; FAID, M.; BENJOUAD, A. Antibacterial and antifungal activity of essential oils of *Mentha suaveolens*. **Phytotherapy Research**, v.16, n.8, p.727-731, 2000.

OYAIZU, M. Studies of products browning reaction: antioxidative activity of products of browning reaction prepared from glucosamine. **Japanese Journal of Nutrition**, v. 44, n. 6, p. 307-315, 1986

ÖZÇELİK, B.; ORHAN, D. D.; ÖZGEN, S.; ERGUN, F. Antimicrobial Activity of flavonoids against extended-spectrum-lactamase (ESL)-producing *Klebsiella pneumoniae*. **Tropical Journal of Pharmaceutical Research**, v. 7, n. 4, p. 1151-1157, 2008.

PEAKMAN, M.; VERGANI, D. **Imunologia básica e clínica**. 2ª ed., Rio de Janeiro: Elsevier, 2011.

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

PELZER, E. I.; GUARDIA, T.; JUÁREZ, A. O.; GUERRERO, E. Acute and chronic antiinflammatory effects of plant flavonoids. **II Farmaco**, v. 53, p. 421-424, 1998.

PERAZA, G. G.; RODRIGUES, S. T.; MEDEIROS, S. H. L.; MUCCILLO-BAISCH, A. L. O uso de modelos animais para avaliar o potencial antinociceptivo dos produtos de origem natural. **Vittalle**, Rio Grande, v. 19, n. 1, p. 35-44, 2007.

PIETTA, P. G. Flavonoids as antioxidants. **Journal Natural Products**, v. 63, n. 7, p. 1035-42, 2000.

PINTO, A. C.; SILVA, D. H. S.; BOLZANI, V. S.; LOPES, N. P.; EPIFANIO, R. A. Produtos naturais: atualidade, desafios e perspectivas. **Química Nova**, v. 25, suppl. 1, p. 45-61, 2002.

PINTO, T.J.A.; KANEKO, T.M.; OHARA M.T. **Controle biológico de qualidade de produtos farmacêuticos, correlatos e cosméticos**. 2^a ed., São Paulo: Editora Atheneu, 2003. 325p.

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

RAMOS, S. C. S.; OLIVEIRA, J. C. S.; CÂMARA, C. A. G. CASTELAR, IVAN.; CARVALHO, A. F. F. U.; LIMA-FILHO, J. V. Antibacterial and cytotoxic properties of some plant crude extracts used in Northeastern folk medicine. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 19, n. 2A, p. 376-381, 2009.

RANG, H. P.; DALE, M. M.; RITTER, J. M.; MOORE, P. K. **Farmacologia**. 6.^a ed., Rio de Janeiro: Elsevier, 2007.848p.

RATES, S. M. K. Plants as source of drugs. **Toxicon**, v. 39, n. 5, p. 603-613, 2001

RATTANACHAIKUNSOPON, P.; PHUMKHACHORN, P. Contents and antibacterial activity of flavonóides extracted from leaves of *Psidium guajava*. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 4, n. 5, p. 393-396, 2010.

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

RICARDO, S.B. Elevação de MIC para a vancomicina no *S. aureus*. **Prática Hospitalar**, Ano X, n. 60, p. 46-48, 2008.

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, n. 7, p. 933-956, 1996.

RICE-EVANS, C. A.; MILLER, N. J.; PAGANGA, G. Antioxidant properties of phenolic compounds. **Trends in Plant Science**. v. 2, n. 4, p. 152–159, 1997

RIOS, J. L.; RECIO, M. C. Medicinal plants and antimicrobial activity. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 100, n. 1-2, p. 80-84, 2005.

RISSO, W. E.; SCARMINIO, I. S.; MOREIRA, E. G. Antinociceptive and acute toxicity evaluation of *Vernonia condensata* Baker leaves extracted with different solvents and their mixtures. **Indian Journal of Experimental Biology**, v. 48, n. 8, p. 811–816, 2010.

ROBAK, J.; SHRIDI, F.; WOLBIS, M.; KROLIKOWSKA, M. Screening of the influence of flavonoids on lipoxygenase and cyclooxygenase activity, as well as on nonenzymic lipid oxidation. **Polish Journal of Pharmacology and Pharmacy**, v. 40, n. 5, p. 451-458, 1998.

ROMERO, R.; NAKAJIMA, J. N. Espécies endêmicas do Parque Nacional da Serra da Canastra, Minas Gerais. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 22, p. 259-265, 1999.

ROOS, G.; PRAWAT.,;H, WALTER, C. U.; KLAIBER, I.; VOGLER, B.; GUSE, J. H.; KRAUS, W. New sesquiterpene lactones with antibacterial activity from *Vernonia fastigiata*. **Planta Medica**, v. 64, n. 7, p. 673-674, 1998.

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

SCHESTATSKY, P. Definição, diagnóstico e tratamento da dor neuropática. **Revista do Hospital das Clínicas de Porto Alegre**, v. 28, n. 3, p.177-187, 2008.

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

SEJAS, L.M.; SILBERT, S.; REIS, A.O.; SADER, H.S. Avaliação da qualidade dos discos com antimicrobianos para testes de disco-difusão disponíveis comercialmente no Brasil. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 39, n. 1, p. 27-35, 2003.

SHAMI, N. J. I. E.; MOREIRA, E. A. M. Licopeno como agente antioxidante. **Revista de Nutrição**, v. 17, n. 2, p. 227-236, 2004.

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

SHIBATA, M.; OHKUBO, T.; TAKAHASHI, H.; INOKI, R. Modified formalin test: characteristic biphasic pain response. **Pain**, v. 38, n. 3, p. 347-352, 1989.

SIKKEMA, J.; BONT, J.A.M.; POOLMAN, B. Interactions of cyclic hydrocarbons with biological membranes. **Journal of Biological Chemistry**, v. 269, n. 11, p. 8022-8028, 1994.

SIKKEMA, J.; DE BONT, J. A. M.; POOLMAN, B. Mechanisms of membrane toxicity of hydrocarbons. **Microbiological Review**, v. 59, n. 2, p. 201-222, 1995.

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

SILVA, J. B.; TEMPONI, V. S.; FERNANDES, F. V.; ALVES, G. A. D; MATOS, D. M.; GASPARETTO, C. M. G.; 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. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 12, n. 12, p. 8993-9008, 2011.

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

SILVEIRA, R. R.; RÚBIO, C. R.; ALVES, M. J. Q. F. Modificações da diurese e da pressão arterial em ratos Wistar anestesiados, após administração de infuso de assa-peixe (*Vernonia polyanthes* Less.). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 2, n. 2, p. 31-35, 2000.

SINGH, B.; SINGH, S. Antimicrobial activity of terpenoids from *Trichodesma amplexicaule* Roth. **Phytother Research**, v. 17, n. 7, p. 814-816, 2003.

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

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

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

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

SOUSA, F. A. E. F. Dor: o quinto sinal vital. **Revista Latino Americana de Enfermagem**, v. 10, n. 3, p. 446-447, 2002

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, n.4, p. 642-654, 2008.

SOUZA, F. A.; SENA, J. MARANHÃO, L.T; OLIVEIRA, C. M. R; GUIMARÃES, A. T. B. Caracterização fitoquímica preliminar de infusões populares obtidas das partes aéreas das espécies *Apium leptophyllum* (Pers.) F. Muell. ex Benth. (Apiaceae), *Elvira biflora* L. (DC.) e *Vernonia polyanthes* Less. (Asteraceae). **Revista Brasileira de Farmácia**, v. 89, n. 1, p.24-27, 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.

STOCHLA, K.; MASLINSK, S. Carrageenan-induced in the rat paw- histamine participation. **Agents Action**, v.12, n.1-2, 1982.

SUH, H. W.; SONG, D. K.; SON, K. H.; WIE, M. B.; LEE, K. H.; JUNG, K. Y.; DO, J. C.; KIM, Y. H. Antinociceptive mechanisms of dipsacus saponin C administered intracerebroventricularly in the mouse. **General Pharmacology**, v. 27, n. 7, p. 1167–1172, 1996.

SÜLSEN, V. P., CAZORLA, S. I., FRANK, F. M., REDKO, F. C., ANESINI, C. A., COUSSIO, J. D., MALCHIODI, E. L., MARTINO, V. S., & MUSCHIETTI, L. V. Trypanocidal and Leishmanicidal activities of Flavonoids from Argentine Medicinal Plants. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 77, n. 4, p.654-659, 2007.

TANAKA, J. C. A.; SILVA, C. C.; OLIVEIRA, A. J. B.; NAKAMURA, C. V.; DIAS FILHO, B. P. Antibacterial activity of indole alkaloids from *Aspidosperma ramiflorum*. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 39, n. 3, p. 387-391, 2006.

TAPAS, A. R.; SAKARKAR, D. M.; KAKDE, R. B. Flavonoids as nutraceuticals: a review. **Tropical Journal of Pharmaceutical Research**, v. 7, n. 3, p. 1089-1099, 2008.

TCHINDA, A.T.; TSOPMO, A.; TANE, P.; AYAFOR, J.F.; CONNOLLY, J.D.; STERNER, O. Vernoguinosterol and vernoguinolide, trypanocidal stigmastane derivatives from *Vernonia guinensis* (Asteraceae). **Phytochemistry**, v.59, n.4, p.371-374, 2002.

TEIXEIRA, M. J. Fisiopatologia da nocicepção e da supressão da dor. **Jornal Brasileiro de Oclusão, ATM e Dor Orofacial**, v. 1, n. 4, p. 329-334, 2001.

TOMAZZONI M. I.; NEGRELLE, R. R. B.; CENTA, M.L. Fitoterapia popular: a busca instrumental enquanto prática terapêutica. **Texto & Contexto Enfermagem**. v. 15, n. 1, p. 115-21, 2006.

UKIYA, M.; AKIHISA, K. T.; YASUKAWA, K.; TOKUDA, H.; SUZUKI, T.; KIMURA, Y. Anti-inflammatory, antitumor-promoting, and cytotoxic activities of constituents of marigold (*Calendula officinalis*) flowers. **Journal of Natural Products**, v. 69, n. 12, p. 1692-1696, 2006.

USHIMARU, P. I.; SILVA, M. T. N.; DI STASI, L. C.; BARBOSA, L.; FERNANDES JUNIOR, A. Antibacterial activity of medicinal plant extracts. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 38, n. 4, p. 717-719, 2007.

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.

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, n. 3, p. 331-42, 1996.

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

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

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

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

VERMERRIS, W.; NICHOLSON, R. **Phenolic compound biochemistry**. 1ª ed., New York: Springer, 2007.

VINEGAR, R.; SCHREIBER, W.; HUGO, R. Biphasic development of carrageenan edema in rats, **Journal of Pharmacological Experimental Therapeutics**, v. 166, n. 1, p. 96-103, 1969.

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

WAGNER, H. Search for new plant constituents with potential antiphlogistic and antiallergic activity. **Planta Medica**, v. 55, n. 3, p. 235-241, 1989.

WAGNER, H.; BLADT, S. **Plant drug analysis**. 2ª ed. New York: Springer, 1996. 384p.

WAGNER, H.; ULRICH-MERZENICH, G. Synergy research: Approaching a new generation of phytopharmaceuticals. **Phytomedicine**, v. 16, n. 2-3, p. 97-110, 2009.

WANNMACHER, L.; FERREIRA, M. B. C. Princípios gerais no tratamento da dor. In: FUCHS, F. D.; WANNMACHER, L.; FERREIRA, M. B. C. **Farmacologia clínica**. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, p. 153-156, 2004.

WHITTLE, B.A. The use of changes in capillary permeability in mice to distinguish between narcotic and nonnarcotic analgesics. **British Journal of Pharmacology and Chemotherapy**, v.22, p.246-253, 1964.

WINKEL-SHIRLEY, B. Flavonoid Biosynthesis. A colorful model for genetics, biochemistry, cell biology, and biotechnology. **Plant Physiology**, v. 126, n. 2, p. 485-493, 2001.

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

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, n. 6, p. 747-751, 2001.

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.

ZUANAZZI, J A. S.; MONTANHA, J. A. Flavonóides. 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**. 3. ed., Porto Alegre/Florianópolis: UFRGS/ UFSC, p.499-526, 833p., 2001.

ANEXO: Artigo aceito na revista International Journal of Molecular Sciences intitulado: Antinociceptive and Anti-Inflammatory Effects of Ethanol Extract from *Vernonia polyanthes* Leaves in Rodents

Article

Antinociceptive and Anti-Inflammatory Effects of Ethanol Extract from *Vernonia polyanthes* Leaves in Rodents

Vanessa dos Santos Temponi¹, **Jucélia Barbosa da Silva**¹, **Maria Silvana Alves**²,
Antônia Ribeiro³, **José de Jesus Ribeiro Gomes de Pinho**², **Célia Hitomi Yamamoto**²,
Miriam Aparecida Oliveira Pinto², **Glauciemar Del-Vechio-Vieira**² and
Orlando Vieira de Sousa^{2,*}

¹ Graduate Program in Pharmaceutical Sciences, Faculty of Pharmacy, Federal University of Juiz de Fora, Campus Universitário, Juiz de Fora, Minas Gerais 36036-330, Brazil; E-Mails: vanessatemponi@hotmail.com (V.S.T.); juceliabs@yahoo.com.br (J.B.S.)

² Department of Pharmaceutical Sciences, Faculty of Pharmacy, Federal University of Juiz de Fora, Campus Universitário, Juiz de Fora, Minas Gerais 36036-330, Brazil; E-Mails: alves_ms2005@yahoo.com.br (M.S.A.); jose.pinho@ufjf.edu.br (J.J.R.G.P.); hytomani@yahoo.com (C.H.Y.); miriamaop@yahoo.com.br (M.A.O.P.); glauciemar@gmail.com (G.D.-V.-V.)

³ Department of Biochemistry, Institute of Biological Sciences, Federal University of Juiz de Fora, Campus Universitário, Juiz de Fora 36036-330, Brazil; E-Mail: Antonia.ribeiro@ufjf.edu.br

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

Received: 26 December 2011; in revised form: 2 March 2012 / Accepted: 19 March 2012 / Published: 22 March 2012

Abstract: The ethanol extract from *Vernonia polyanthes* leaves (EEVP) was investigated for antinociceptive and anti-inflammatory effects at the doses (p.o.) of 100, 200 and 400 mg/kg in animal models. The extract reduced the number of abdominal contortions by 16.75% and 31.44% at a dose of 200 and 400 mg/kg, respectively. The results obtained showed that EEVP exerted a significant antinociceptive effect in the two phases of formalin. The EEVP increased the reaction time on a hot plate at the doses of 100, 200 and 400 mg/kg after 90 min of treatment. The paw edema was reduced by EEVP at the doses of 100,

200 and 400 mg/kg after 4 h of application of carrageenan. Doses of 200 and 400 mg/kg, administered 4 h before the carrageenan injection, significantly reduced the exudate volume (29.25 and 45.74%, respectively) and leukocyte migration (18.19 and 27.95%, respectively). These results suggest that *V. polyanthes* can be an active source of substances with antinociceptive and anti-inflammatory activities.

Keywords: *Vernonia polyanthes*; antinociceptive effect; anti-inflammatory effect

1. Introduction

Inflammation is a reaction of the body against an aggressive agent, characterized by vasodilatation and access of fluid and cells to the target tissue [1]. One of the major signs of inflammation is the pain that can be triggered by direct stimulation of nociceptors or by the action of inflammatory mediators [2]. These mediators, for example cytokines, histamine, serotonin, leukotrienes and prostaglandins, increase the vascular permeability and the migration of leukocytes to inflamed tissue [2]. In addition, different pathologic processes, such as cardiovascular and metabolic disorders [3–5], peptic ulcer [6] and cancer [7] are related to inflammation. The usual treatment of inflammatory pain is done by non-steroidal anti-inflammatory drugs, but the adverse effects described as irritation of gastric mucosa and ulcer, water retention and nephrotoxicity prevent the use of these agents [8]. On the other hand, medicinal plants have been widely used in traditional medicine to treat different inflammatory conditions [9]. However, the pharmacological properties and identifying the active compounds of these plants are needed to ensure its effectiveness and safety of users based on scientific support.

The genus *Vernonia*, one of the largest and most important member of the Asteraceae family, is represented by approximately 1500 species [10]. Plants of this genus, as *Vernonia polyanthes* Less, are found in South America, and have been traditionally used as diuretic, hypotensive, antihemorrhagic, sedative, abortive, anthelmintic, antiulcerogenic, antirheumatic, cicatrizing and anti-inflammatory [11,12]. Among different studies of *Vernonia*, the investigations regarding antinociceptive and anti-inflammatory effects are particularly important [13–15].

V. polyanthes Less (Asteraceae), known as assa-peixe, have been studied and their pharmacological properties such as antihypertensive and diuretic [12,16], antiulcerogenic [17], antifungal and leishmanicidal [18] and antimycobacterial [19] have been established. However, the antinociceptive and anti-inflammatory activities were not previously reported using this plant. Fixed acids, alkaloids, aminoacids, coumarins, steroids, triterpenes, anthraquinones, flavonoids, saponins and tannins were detected in infusions of *V. polyanthes* [20] and may be responsible for their pharmacological effects.

Considering the medicinal use for treatment of rheumatism, cicatrization and inflammation and the lack scientific validation supported in pharmacological and clinical studies, the

present investigation was designed to evaluate the antinociceptive and anti-inflammatory effects of EEVP using experimental animal models. In addition, preliminary phytochemical screening was conducted in order to determine the presence of the main classes of constituents in this extract.

2. Results and Discussion

2.1. Acute Toxicity

At the doses administered per oral route (p.o.), the EEVP was toxic to animals with LD₅₀ of 2.78 g/kg (95% confidence intervals 1.67–4.64 g/kg). However, in the evaluated period, the animals did not show cyanosis, piloerection, writhing, ptosis, tremors, convulsions, ataxia, hypnosis, red urine or diarrhea. There were not alteration when considered the parameters motor activity, respiration, corneal reflex, righting and withdrawal, body tone and amount of pats.

2.2. Acetic Acid-Induced Writhing Response in Mice

The treatment of animals with EEVP (200 and 400 mg/kg, p.o.) produced a significant ($p < 0.01$ and $p < 0.001$, respectively) and dose-dependent inhibition in abdominal writhes produced by acetic acid (Table 1). The control group produced 66.37 ± 2.19 abdominal contortions.

Table 1. Effects of the ethanol extract from *Vernonia polyanthes* leaves (EEVP) on acetic acid-induced writhing in mice.

Group	Dose (mg/kg)	Number of writhes	Inhibition (%)
Control	Saline	66.37 ± 2.19	-
EEVP	100	64.62 ± 2.44	2.64
	200	55.25 ± 2.39 **	16.75
	400	45.50 ± 2.44 ***	31.44
Indomethacin	10	22.62 ± 1.91 ***	65.92
Acetylsalicylic acid	200	20.62 ± 1.69 ***	68.93

Data are mean \pm S.E.M. of eight mice. ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ vs. control group.

2.3. Formalin-Induced Paw Licking in Mice

In Figure 1, it is shown that pretreatment with morphine (5 mg/kg) or with the extract of *V. polyanthes* (200 and 400 mg/kg, p.o.) produced significant changes of paw licking time in the first phase of pain response. In the second phase, a dose-dependent and significant ($p < 0.05$ or $p < 0.001$) reduction in licking time was observed in mice treated with EEVP (100, 200 and 400 mg/kg, p.o.) as well as with indomethacin (10 mg/kg, p.o.) and morphine (5 mg/kg, s.c.). For the control group, the time spent was 80.87 ± 3.47 s and 85.50 ± 3.19 s in the first and second phases, respectively.

2.4. Effects on Hot-Plate Latency Assay in Mice

Due to the analgesic effect observed in the first phase of formalin test, we decided to evaluate the EEVP using hot plate test, a model of central antinociceptive activity. After 90

min of treatment, doses of 100 ($p < 0.01$), 200 ($p < 0.001$) and 400 mg/kg ($p < 0.001$) increased significantly the latency time in the respective control group (Figure 2). Morphine proved to be a potent analgesic, increasing the latency time within the evaluation periods. Naloxone, an opioid antagonist, blocked the morphine action but did not alter the antinociceptive effect of the EEVP.

Figure 1. Effects of the EEVP on formalin-induced nociception in mice. First phase = 0–5 min after formalin injection; second phase = 15–30 min. Data are mean \pm S.E.M. of eight mice. ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ vs. control group.

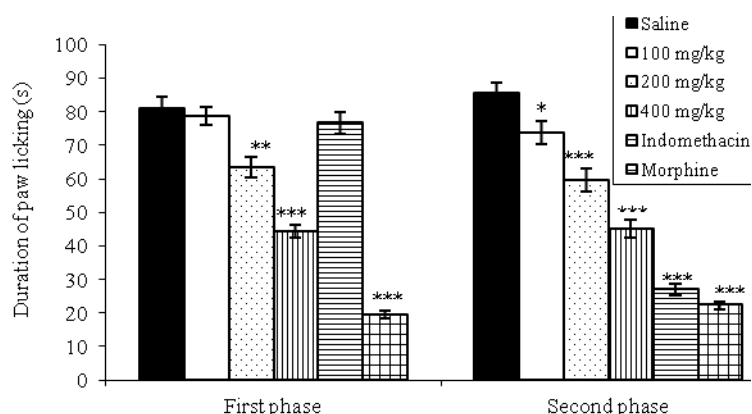
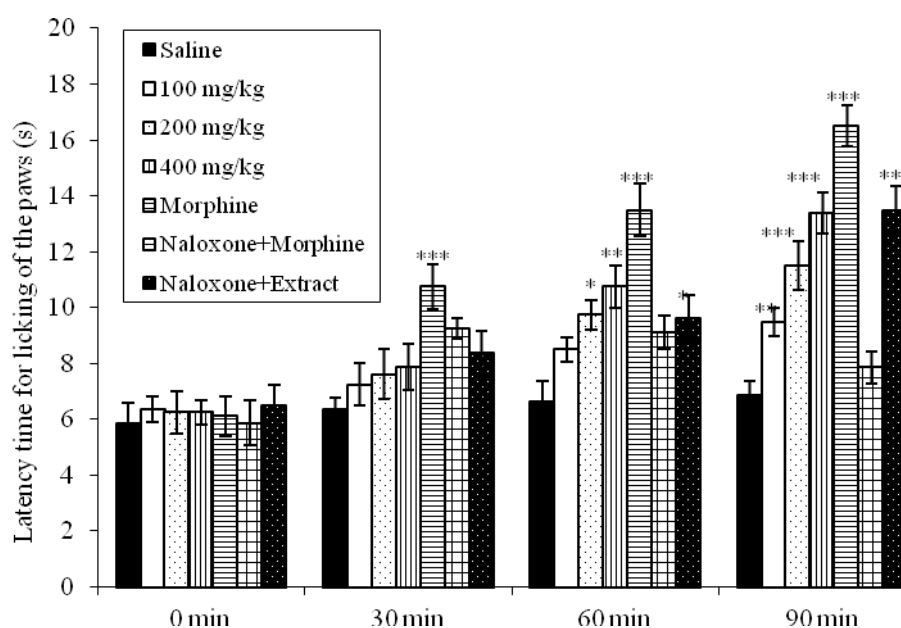


Figure 2. Effects of the EEVP on the latency time of mice exposed to the hot plate test. Data are mean \pm S.E.M. of eight mice. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ vs. control group.



2.5. Effects on Carrageenan-Induced Edema in Rats

The activity of the EEVP on carrageenan-induced edema in rat is shown in Table 2. After 2 h of carrageenan application, the paw edema was reduced in 16.95 and 22.03% at the doses of 200 and 400 mg/kg, respectively. Edema inhibition was observed 3 and 4 h after injection of carrageenan at the doses of 100 mg/kg (12.50 and 16.40%; $p < 0.05$, respectively), 200 mg/kg (16.41 and 27.87%; $p < 0.05$ and $p < 0.01$, respectively) and 400 mg/kg (25.78 and 31.97%; $p < 0.01$ and $p < 0.001$, respectively) when compared with control group. In these times, indomethacin (reference drug) also inhibited the paw edema (28.12 and 36.06%, respectively).

Table 2. Effects of the EEVP on carrageenan-induced paw edema in rats.

Group	Dose (mg/kg)	Volume of hind paw (mL)			
		1 h	2 h	3 h	4 h
Control	Saline	1.05 ± 0.08	1.18 ± 0.08	1.28 ± 0.06	1.22 ± 0.06
EEVP	100	0.97 ± 0.06	1.03 ± 0.04	1.12 ± 0.05 *	1.02 ± 0.08 *
	200	0.92 ± 0.06	0.98 ± 0.05 *	1.07 ± 0.04 *	0.88 ± 0.04 **
	400	0.85 ± 0.04	0.92 ± 0.05 *	0.95 ± 0.04 ***	0.83 ± 0.04 ***
Indomethacin	10	0.82 ± 0.05	0.85 ± 0.06 **	0.92 ± 0.05 ***	0.78 ± 0.04 ***

Data are mean ± S.E.M. of six rats. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ vs. control group.

2.6. Effects on Carrageenan-Induced Pleurisy in Rats

The pleurisy effects demonstrated that doses of 200 ($p < 0.05$) and 400 mg/kg ($p < 0.001$) of EEVP significantly reduced the exudate volume in 13.83 and 43.08% (Table 3) when compared with control group. The number of total leukocytes was also inhibited at the doses of 200 (17.87%; $p < 0.001$) and 400 mg/kg (28.39%; $p < 0.001$) (Table 3) in comparison to the respective control. Indomethacin reduced the exudate volume and the leukocyte migration.

Table 3. Effects of the EEVP on number of leukocytes in carrageenan-induced pleurisy in rats.

Group	Dose (mg/kg)	Exsudate volume (mL)	Inhibition (%)	N° Leukocytes (10^3 cells/mm ³)	Inhibition (%)
Control	Saline	1.88 ± 0.08	-	15.50 ± 0.50	-
EEVP	100	1.78 ± 0.08	5.32	14.90 ± 0.43	3.87
	200	1.62 ± 0.04 *	13.83	12.73 ± 0.21 ***	17.87
	400	1.07 ± 0.05 ***	43.08	11.10 ± 0.32 ***	28.39
Indomethacin	10	0.73 ± 0.09 ***	61.17	9.87 ± 0.35 ***	36.32

Data are mean ± S.E.M. of six rats. * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$ vs. control group.

2.7. Phytochemical Screening

Phytochemical screening of the ethanol extract indicated the presence of flavonoids, tannins, coumarins, terpenoids, sterols, saponins and alkaloids.

The present study assessed the pharmacological effects of the leaves of *V. polyanthes*, a medicinal plant reputed in Brazilian folk medicine for its anti-inflammatory and cicatrizing properties [11,12]. Based on popular reports, the EEVP was prepared and screened for their antinociceptive and anti-inflammatory effects using classical models of nociception in mice and inflammation in rats. Therefore, considering the results of pharmacological tests observed in the present investigation, the EEVP has antinociceptive and anti-inflammatory effects and this is the first report described in the literature.

The acute toxicity test showed that the doses of EEVP were toxic to mice. Based in this result, the pharmacological dose (400 mg/kg maximal dose), not described previously in the literature,

was defined from the LD₅₀. The toxic effects have been described on plants of the genus *Vernonia* [13,14,21–24]. It is possible that the toxic effect of the EEVP could be due to the presence of phytochemical compounds as saponins detected in this study [24,25].

The writhing test is an experimental model used for the screening of drugs with analgesic activity, based on the irritation caused after intraperitoneal injection of 0.6% acetic acid. The writhing response is considered to be a visceral inflammatory pain model [26], and in this way, this acid causes the release of pain mediators such as bradykinin, prostaglandins, histamine and serotonin in the peritoneal fluid of mice [27]. In the present study, we clearly showed a dose-related antinociceptive effect of EEVP in the writhing test and probably this action could be due the presence of bioactive substances. This action could be mediated by peripheral effects, including the prostaglandin synthesis inhibition.

According to the Figure 1, the EEVP produced significant inhibition in the both phases of formalin-induced pain from the 200 mg/kg. The formalin test is a valid and reliable model of nociception and is sensitive for various classes of analgesic drugs. This test produced a distinct biphasic response and different analgesics may act differentially in the first and second phases [28].

It is considered a model to clinical pain because it causes a local tissue injury to the paw and is also indicative of tonic and localized inflammation pain. Moreover, this model can be used to clarify the possible mechanism of antinociceptive effect of a proposed analgesic [29]. Centrally acting drugs such as opioids inhibit both phases equally [30]. But peripherally acting drugs such as aspirin, indomethacin and dexamethasone only inhibit the late phase. The second phase seems to be an inflammatory response with inflammatory pain that can be inhibited by anti-inflammatory drugs [28,31]. Substance P and bradykinin act as mediators in the first phase, while histamine, serotonin, prostaglandin and bradykinin are involved in the nociceptive response of the second stage [30].

In the hot plate test, a central model that has a selectivity for opioid-derived analgesics [32], oral treatment with EEVP exerts an antinociceptive action confirming the central activity observed in the first phase of formalin test (100, 200 and 400 mg/kg). This test is also considered to be sensitive to drugs acting at the supraspinal modulation level of the pain response [33], suggesting at least a modulatory effect of the investigated extract. Our results indicate that the analgesia induced by the EEVP is not dependent on the opioid system, since previous treatment with naloxone did not change the observed data (Figure 2).

Carrageenan induced paw edema is an experimental model of acute inflammation involving different phases [34]. The first phase (1–2 h) is related with the release of serotonin and histamine; kinins play a role in the middle phase [33], while prostaglandins appear to be the most important mediators in the second phase (3–5 h) of the postcarrageenan response [35–37]. Based on this explanation, it could be argued that the suppression of the first phase may be due to inhibition of the release of early mediators, such as histamine and serotonin,

and the action in the second phase may be explained by an inhibition of cyclooxygenase. Therefore, the present result indicates that ethanol extract (100, 200 and 400 mg/kg, p.o.) and indomethacin play a crucial role as protective factors against the carrageenan-induced acute inflammation.

The injection of carrageenan into the pleural cavity of rats elicited an acute inflammatory response, characterized by the accumulation of fluid containing large number of leukocytes [38–40]. It is an interesting method that evaluates the leukocyte migration during the inflammatory process. Non-steroidal anti-inflammatory drugs, such as indomethacin, inhibit the accumulation of exudates and mobilization of leukocytes between 3 and 6 h after application of carrageenan [39,41]. In our experiment, the EEVP in the pleurisy model clearly showed the inhibition of the formation of pleural exudate and the leukocyte migration (Table 3).

Studies have been reported the antinociceptive and anti-inflammatory effects of plants of the genus *Vernonia* [13–15]. Among the active compounds identified in this important genus, the highlights are the flavonoids [42–44]. In our investigation, phytochemical screening showed the presence of numerous constituents' classes, such as flavonoids, tannins, coumarins, terpenoids, sterols, saponins and alkaloids. Considering this chemical diversity, pharmacological effects could be attributed to the tannins and flavonoids, since these constituents are well established as antinociceptive and/or anti-inflammatory agents [45–47]. However, complementary studies are necessary to determine the better correlation between activities and chemical composition of *V. polyanthes*.

3. Experimental Section

3.1. Plant Material and Extraction

The plant material used in the present study was collected in Juiz de Fora, Minas Gerais State, Southeast region of Brazil, in March 2009. The species was identified by Dr. Fátima Regina Gonçalves Salimena and a voucher specimen (CESJ number 10.329) was deposited in the Herbarium of the Federal University of Juiz de Fora, Brazil. Dried and powdered leaves (450 g) were exhaustively extracted in 95% ethanol (2.5 L) by static maceration for 3 weeks at room temperature with renewal of solvent every 2 days. The EEVP was filtered and evaporated under a rotary evaporator at controlled temperature (50–60 °C). This material was placed in a desiccator with silica to yield 36.68 g. The dried extract was dissolved using 1% DMSO in normal saline for pharmacological studies.

3.2. Chemicals

Drugs and reagents used in this study (and their sources) were as follows: acetic acid and acetylsalicylic acid (Vetec Química Farm Ltda, Rio de Janeiro, RJ, Brazil), formaldehyde (Reagen Quimibrás Ind. Química S.A., Rio de Janeiro, RJ, Brazil), morphine hydrochloride

(Merck Inc., Whitehouse Station, NJ, USA), naloxone and indomethacin (Sigma Chemical Co, St Louis, MI, USA).

3.3. Animals

Male Wistar rats (90–110 days) weighing 200–240 g and male Swiss albino mice (50–70 days) weighing 25–30 g were used in the experiments. The animals were provided by the Central Biotery of the Federal University of Juiz de Fora. The animals were divided into groups and kept in plastic cages (47 × 34 × 18 cm) under a 12 h light/12 h dark cycle at room temperature (22 ± 2 °C), with free access to Purina rations and water. Animal care and the experimental protocol followed the principles and guidelines suggested by the Brazilian College of Animal Experimentation (COBEA) and were approved by the local ethical committee (protocol number 053/2009).

3.4. Acute Toxicity

Groups of ten mice received oral doses of 0.5, 1, 1.5, 2 and 3 g/kg of EEVP, while the control group received the vehicle (saline). The groups were observed for 48 h and mortality at end of this period was recorded for each group [48]. The LD₅₀ (50% lethal dose) was determined by probit test using the log of the dose *versus* probit [49]. The determination of LD₅₀ served to define the doses used in the experiments of pharmacological activities.

3.5. Writhing Test

Antinociceptive activity was evaluated on the acetic acid-induced writhing according to Collier *et al.* protocol [26]. Male Swiss albino mice were divided into groups of eight mice. The animals were pretreated with EEVP (100, 200, and 400 mg/kg, p.o.) or acetylsalicylic acid (200 mg/kg, p.o.) and indomethacin (10 mg/kg, p.o.) used as standard drugs, one hour prior to intraperitoneal (i.p.) of 0.6% v/v acetic acid (0.1 mL/10 g). Ten minutes after i.p. injection of acetic acid, the number of writhing during the following 20 min were counted. Control mice received 1% DMSO in sterile saline orally (10 mL/Kg).

3.6. Formalin Test

The method previously described by Hunskaar and Hole [28] was used. Pain was induced by injecting of 20 µL of 2.5% formalin (37% formaldehyde) in sterile saline in the subplantar right hind paw region. Male mice were divided into groups of eight mice each. Extract was administered orally at doses of 100, 200, and 400 mg/kg body wt., 60 min before formalin injection. The control group received 1% DMSO in sterile saline orally (10 mL/kg), while

indomethacin (10 mg/kg, p.o.) and morphine (5 mg/kg subcutaneous) were used as positive controls. The animals were observed to evaluate the licking time (an index of nociception) during the first phase, neurogenic (0–5 min), and the second phase, inflammatory (15–30 min), after formalin injection.

3.7. Hot-Plate Test

The hot plate test was carried out according to the method described by Eddy and Leimbach [50]. Mice were placed on a hot plate (Model LE 7406, Letica Scientific Instruments, Barcelona, Spain) maintained at 55 ± 1 °C. Latency of nociceptive response such as licking, flicking of a hind limb or jumping was measured. Three groups of mice ($n = 8$) were treated p.o. with EEVP (100, 200 or 400 mg/kg; 0.1 mL per 10 g body weight); the control group received 1% DMSO in sterile saline (10 mL/kg). Measurements were performed at time 0, 30, 60 and 90 min after drug administration, with a cut-off time of 40 s to avoid lesions to the animals' paws. The effect of pretreatment with naloxone (1 mg/kg, subcutaneously) on the analgesia produced by the EEVP (400 mg/kg) was determined in a separate group of animals. Morphine (5 mg/kg, subcutaneously), in the absence and presence of naloxone treatment, was used as a reference.

3.8. Carrageenan-Induced Paw Edema

According to the method described by Winter *et al.* [51], the paw edema volume of the rats was measured using a plethysmometer (model LE 7500, Letica Scientific Instruments, Barcelona, Spain). Male Wistar rats were divided into groups of six animals which received, p.o., doses of EEVP (100, 200 and 400 mg/kg; 0.1 mL per 10 g body weight), 1% DMSO in saline or indomethacin (10 mg/kg) 1 h before the injection of carrageenan. The animals were anesthetized with cetamine and xylazine (60 mg/kg and 8 mg/kg, respectively) 30 min before the injection of 0.1 mL of 2% (w/v) carrageenan into the subplantar region of the right hind paw for the induction of edema. In the left hind paw, used as a control, 0.1 mL of sterile saline was injected. The volume of paw edema, recorded three times, was measured at 1, 2, 3 and 4 h after carrageenan injection. The measure of edema was made by the difference between the volume displaced by the right paw and the left paw.

3.9. Carrageenan-Induced Pleurisy

Rats were anesthetized with cetamine and xylazine (60 mg/kg and 8 mg/kg, respectively) and a suspension of saline containing 2% carrageenan (0.4 mL) were injected into the pleural cavity [41]. EEVP (100, 200 and 400 mg/kg), 1% DMSO in saline or indomethacin (10

mg/kg, p.o.) were given 60 min before injection of the irritant. At 4 h after the injection of carrageenan, the animals were killed by overdose of cetamine and xylazine (120 mg/kg and 16 mg/kg, respectively), and the skin and pectoral muscles were retracted. A longitudinal incision was made between the third and fifth ribs on each side of the mediastinum. The exudate was collected and transferred to a 15 mL conical centrifuge tube and the total volume determined. A 20 μ L aliquot of the exudate was used to determine the total leukocyte count in Neubauer chambers.

3.10. Phytochemical Screening of the EEVP

Phytochemical screening of the EEVP was performed to detect the eventual presence of different classes of constituents, such as alkaloids, flavonoids, anthraquinones, coumarins, saponins, terpenes and tannins using specific reactions [52].

3.11. Statistical Analysis

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

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

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

4. Conclusions

Our results clearly demonstrated that the EEVP displayed significant antinociceptive and anti-inflammatory effects in mice and rats models. In addition, these results provided an initial scientific validation of popular use of this plant as a medicine against dolorous and inflammatory processes.

Acknowledgments

The present study was supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), and Pró-Reitorias de Pesquisa and Pós-Graduação of the Federal University of Juiz de Fora. We are grateful to Fátima Maria Gonçalves Salimena for plant identification.

References

1. Schmid-Schönbein, G.W. Analysis of inflammation. *Annu. Rev. Biomed. Eng.* **2006**, *8*, 93–151.
2. Brenner, P.S.; Krakauer, T. Regulation of inflammation: A review of recent advances in anti-inflammatory strategies. *Curr. Med. Chem. Anti-Inflamm. Anti-Allergy Agents* **2003**, *2*, 274–283.

3. Hansson, G.K. Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease. *N. Engl. J. Med.* **2005**, *352*, 1685–1695.
4. Hotamisligil, G.S. Inflammation and metabolic disorders. *Nature* **2006**, *444*, 860–867.
5. Tarzami, S.T. Chemokines and inflammation in heart disease: Adaptive or maladaptive? *Int. J. Clin. Exp. Med.* **2011**, *4*, 74–80.
6. Watanabe, T.; Higuchi, K.; Tanigawa, T.; Tominaga, K.; Fujiwara, Y.; Arakawa, T. Mechanisms of peptic ulcer recurrence: role of inflammation. *Inflammopharmacology* **2002**, *10*, 291–302.
7. Smith, G.R.; Missailidis, S. Cancer, inflammation and the AT1 and AT2 receptors. *J. Inflamm.* **2004**, *1*, 1–12.
8. Derle, D.V.; Gujar, K.N.; Sagar, B.S.H. Adverse effects associated with the use of nonsteroidal antiinflammatory drugs: An overview. *Indian J. Pharm. Sci.* **2006**, *64*, 409–414.
9. Falcão, H.S.; Lima, I.O.; Santos, V.L.; Dantas, H.F.; Diniz, M.F.F.M.; Barbosa-Filho, J.M.; Batista, L.M. Review of the plants with anti-inflammatory activity studied in Brazil. *Rev. Bras. Farmacogn.* **2005**, *15*, 381–391.
10. Lorenzi, H.; Matos, F.J.A. *Plantas Mediciniais no Brasil: Nativas e Exóticas*, 2nd ed.; Instituto Plantarum: Nova Odessa, Brazil, 2008; pp. 165–166.
11. Alves, V.F.G.; Neves, L.J. Anatomia foliar de *Vernonia polyanthes* Less (Asteraceae). *Rev. Univ. Rural, Sér. Ciên. da Vida* **2003**, *22*, 1–8.
12. Silveira, R.R.; Rúbio, C.R.; Alves, M.J.Q.F. Modificações da diurese e da pressão arterial em ratos Wistar anestesiados, após administração de infuso de assa-peixe (*Vernonia polyanthes* Less). *Rev. Bras. Plantas Med.* **2003**, *2*, 31–35.
13. Silva, J.B.; Temponi, V.S.; Fernandes, F.V.; Alves, G.A.D.; Matos, D.M.; Gasparetto, C.M.G.; 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. *Int. J. Mol. Sci.* **2011**, *12*, 8993–9008.
14. Risso, W.E.; Scarminio, I.S.; Moreira, E.G. Antinociceptive and acute toxicity evaluation of *Vernonia condensata* Baker leaves extracted with different solvents and their mixtures. *Indian J. Exp. Biol.* **2010**, *48*, 811–816.
15. Frutuoso, V.S.; Gurjão, M.R.R.; Cordeiro, R.S.B.; Martins, M.A. Analgesic and anti-ulcerogenic effects of a polar extract from leaves of *Vernonia condensata*. *Planta Med.* **1994**, *60*, 21–25.
16. Silveira, R.R.; Foglio, M.A.; Gontijo, J.A. Effect of the crude extract of *Vernonia polyanthes* Less. on blood pressure and renal sodium excretion in unanesthetized rats. *Phytomedicine* **2003**, *10*, 127–131.
17. Barbastefano, V.; Cola, M.; Luiz-Ferreira, A.; Farias-Silva, E.; Hiruma-Lima, C.A.; Rinaldo, D.; Vilegas, W.; Souza-Brito, A.R.M. *Vernonia polyanthes* as a new source of antiulcer drugs. *Fitoterapia* **2007**, *78*, 545–551.
18. 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.
J. Ethnopharmacol. **2006**, *11*, 396–402.
19. Oliveira, D.G.; Prince, K.A.; Higuchi, C.T.; Santos, A.C.B.; Lopes, L.M.X.; Simões, M.J.S.;
 Leite, C.Q.F. Antimycobacterial activity of some Brazilian indigenous medicinal drinks. *Rev. Ciênc. Farm. Básica Apl.* **2007**, *28*, 165–169.
 20. Souza, F.A.; Sena, J.; Maranhão, L.T.; Oliveira, C.M.R.; Guimarães, A.T.B. Caracterização fitoquímica preliminar de infusões populares obtidas das partes aéreas das espécies *Apium leptophyllum* (Pers.) F. Muell. ex Benth. (Apiaceae), *Elvira biflora* L. (DC.) e *Vernonia polyanthes* Less. (Asteraceae). *Rev. Bras. Farm.* **2008**, *89*, 24–27.
 21. Brum, K.B.; Purisco, E.; Lemos, R.A.A.; Riet-Correa, F. Intoxicação por *Vernonia rubricaulis* em bovinos no Mato Grosso do Sul. *Pesq. Vet. Bras.* **2002**, *22*, 119–128.
 22. Ojiako, O.A.; Nwanjo, H.U. Is *Vernonia amygdalina* hepatotoxic or hepatoprotective? Response from biochemical and toxicity studies in rats. *Afr. J. Biotechnol.* **2006**, *5*, 1648–1651.
 23. Latha, L.Y.; Darah, I.; Jain, K.; Sasidharan, S. Toxicity study of *Vernonia cinerea*. *Pharm. Biol.* **2010**, *48*, 101–104.
 24. Pérez-Amador, M.C.; Ocotero, V.M.; Benitez, S.P.; Jiménez, F.G. *Vernonia patens* Kunth, an Asteraceae species with phototoxic and pharmacological activity. *Phyton* **2008**, *77*, 275–282.
 25. Nergard, C.S.; Diallo, D.; Michaelsen, T.E.; Malterud, K.E.; Kiyohara, H.; Matsumoto, T.; Yamada, H.; Paulsen, B.S. Isolation, partial characterisation and immunomodulating activities of polysaccharides from *Vernonia kotschyana* Sch. Bip. ex Walp. *J. Ethnopharmacol.* **2004**, *91*, 141–152.
 26. Collier, H.D.J.; Dinnin, L.C.; Johnson, C.A.; Schneider, C. The abdominal response and its suppression by analgesic drugs in the mouse. *Br. J. Pharmacol. Chemother.* **1968**, *32*, 295–310.
 27. Deraedt, R.; Jouquey, S.; Delevallée, F.; Flahaut, M. Release of prostaglandins E and F in an algogenic reaction and its inhibition. *Eur. J. Pharmacol.* **1980**, *51*, 17–24.
 28. Hunskaar, S.; Hole, K. The formalin test in mice: dissociation between inflammatory and noninflammatory pain. *Pain* **1987**, *30*, 103–114.
 29. Tjolsen, A.; Berge, O.G.; Hunskaar, S.; Rosland, J.H.; Hole, K. The formalin test: An evaluation of the method. *Pain* **1992**, *51*, 5–17.
 30. Shibata, M.; Ohkubo, T.; Takahashi, H.; Inoki, R. Modified formalin test; characteristic biphasic pain response. *Pain* **1989**, *38*, 347–352.
 31. Rosland, J.H.; Tjolsen, A.; Maehle, B.; Hole, K. The formalin test in mice: Effect of formalin concentration. *Pain* **1990**, *42*, 235–242.
 32. Abbott, F.V.; Melzack, R. Brainstem lesions dissociated neural mechanisms of morphine analgesia in different kinds of pain. *Brain Res.* **1982**, *251*, 149–155.
 33. Yaksh, T.L.; Rudy, T.A. Studies on direct spinal action of narcotics in production of analgesia in rat. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1977**, *202*, 411–428.

34. Vinegar, R.; Schreiber, W.; Hugo, R. Biphasic development of carrageenan oedema in rats. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1969**, *166*, 96–103.
35. Di Rosa, M.; Sorrentino, L. The mechanism of the inflammatory effect of carrageenan. *Eur. J. Pharmacol.* **1968**, *4*, 340–342.
36. Di Rosa, M.; Giroud, J.P.; Willoughby, D.A. Studies of the mediators of the acute inflammatory response induced in rats in different sites by carrageenan and turpentine. *J. Pathol.* **1971**, *104*, 15–29.
37. Di Rosa, M. Biological properties of carrageenan. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1972**, *24*, 89–102.
38. Ammendola, G.; Di Rosa, M.; Sorrentino, L. Leucocyte migration and lysosomal enzymes release in rat carrageenin pleurisy. *Agents Actions* **1975**, *5*, 250–255.
39. Almeida, A.P.; Bayer, B.M.; Horakova, Z.; Beaven, M.A. Influence of indomethacin and other anti-inflammatory drugs on mobilization and production of neutrophils: Studies with carrageenan induced inflammation in rats. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1980**, *214*, 74–79.
40. Capasso, F.; Dunn, C.J.; Yamamoto, S.; Willoughby, D.A.; Giroud, J.P. Further studies on carrageenan-induced pleurisy in rats. *J. Pathol.* **1975**, *116*, 117–124.
41. Vinegar, R.; Truax, J.F.; Selph, J.L. Some quantitative temporal characteristics of carrageenin induced pleurisy in the rat. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **1973**, *143*, 711–714.
42. Igile, G.O.; Oleszek, W.; Jurzysta, M.; Burda, S.; Fafunso, M.; Fasanmade, A.A. Flavonoids from *Vernonia amygdalina* and their antioxidant activities. *J. Agric. Food Chem.* **1994**, *42*, 2445–2448.
43. Ahmad, I.; Chaudhary, B.A.; Janbaz, K.H. Cinerascenone, a new flavonoids from *Vernonia cinerascens*. *J. Chem. Soc. Pak.* **2010**, *32*, 101–103.
44. Malafrente, N.; Pesca, M.S.; Bisio, A.; Morales Escobar, L.; de Tommasi, N. New flavonoid glycosides from *Vernonia ferruginea*. *Nat. Prod. Commun.* **2009**, *4*, 1639–1642.
45. Bittar, M.; de Sousa, M.M.; Yunes, R.; Lento, R.A.; Delle-Monache, F.; Cechinel-Filho, V. Antinociceptive activity of I3, II8-Binaringenin, a biflavonoid present in plants of the Guttiferae. *Planta Med.* **2000**, *66*, 84–86.
46. Meyre-Silva, C.; Yunes, R.; Santos, A.R.S.; Magro, J.D.; Monache, F.D.; Cechinel-Filho, V. Isolation of a C-Glycoside Flavonoid with antinociceptive action from *Aleurites moluccana* Leaves. *Planta Med.* **1999**, *65*, 263–294.
47. Pathak, D.; Pathak, K.; Sigla, A.K. Flavonoids as medicinal agents: Recent advances. *Fitoterapia* **1991**, *62*, 371–388.
48. Dietrich, L. A new approach to practical acute toxicity testing. *Arch. Toxicol.* **1983**, *54*, 275–287.
49. Litchfield, J.T.; Wilcoxon, F. A simplified method of evaluating dose-effect experiments. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1949**, *96*, 99–113.

50. Eddy, N.B.; Leimbach, D. Synthetic analgesics. II. Dithienylbutenyl and dithienylbutylamines.
J. Pharmacol. Exp. Ther. **1953**, *107*, 385–393.
51. Winter, C.A.; Risley, E.A.; Nuss, G.W. Carrageenin-induced edema in hind paw of the rat as an assay for anti-inflammatory drugs. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **1962**, *111*, 544–547.
52. Matos, F.J.A. *Introdução à Fitoquímica Experimental*, 2nd ed.; Edições UFC: Fortaleza, Brazil, 1997; pp. 41–75.

© 2012 by the authors; licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution license (<http://creativecommons.org/licenses/by>