

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

Nícolas de Castro Campos Pinto

**ESTUDO FITOQUÍMICO E ATIVIDADES BIOLÓGICAS DAS FOLHAS DE  
*Pereskia aculeata* Miller (CACTACEAE)**

Juiz de Fora  
2012

Nícolas de Castro Campos Pinto

**Estudo fitoquímico e atividades biológicas das folhas de  
*Pereskia aculeata* Miller (Cactaceae)**

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

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Elita Scio Fontes

Co-orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Antônia Ribeiro

Juiz de Fora

2012

Pinto, Nícolas de Castro Campos.

Estudo fitoquímico e atividades biológicas das folhas de *Pereskia aculeata* Miller (Cactaceae) / Nícolas de Castro Campos Pinto.  
– 2012.

127 f. : il.

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

1. *Pereskia aculeata*. 2. Antitumoral. 3. Antinocicepção. I.  
Título.

**ESTUDO FITOQUÍMICO E ATIVIDADES BIOLÓGICAS DAS FOLHAS  
DE *PERESKIA ACULEATA* MILLER (CACTACEAE)**

**Nícolas de Castro Campos Pinto**

**Orientadora: Dra. Elita Scio Fontes**

**Co-orientadora: Dra. Antônia Ribeiro**

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

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

---

Dra. Elaine Maria de Souza Fagundes

---

Dr. Jorge Willian Leandro Nascimento

---

Dra. Elita Scio Fontes

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, pela oportunidade que me concede de crescer moral e intelectualmente, e aos benfeitores espirituais que me auxiliam nesse propósito.

Aos meus pais e à minha irmã, pelo amor e todo o incentivo que sempre me deram para alcançar todos os meus objetivos.

À minha namorada Marina que, com seu amor, carinho e compreensão, me enche de forças para buscar a realização de meus sonhos.

A todos os meus familiares, os familiares da Marina (que para mim também são família) e meus amigos, pelos conselhos valiosos, os quais me auxiliam sempre a traçar um caminho mais seguro e menos tortuoso.

À minha orientadora Dra. Elita Scio Fontes, pela atenção, paciência, pelos conhecimentos que me transmitiu e pela oportunidade de desempenhar este trabalho.

À minha co-orientadora Dra. Antônia Ribeiro, com quem aprendi muito, sobretudo acerca dos estudos químicos desenvolvidos.

À Dra. Maria Christina Marques Nogueira Castañon, pela realização dos estudos histológicos e pela participação como membro da banca em minha qualificação.

À Dra. Elaine Maria de Souza Fagundes, pela realização dos ensaios para verificação da atividade antitumoral.

À Dra. Elaine Soares Coimbra, pela realização dos ensaios para verificação da atividade leishmanicida e citotóxica.

Ao Dr. Jorge Willian Leandro Nascimento, pela participação como membro da banca em minha qualificação.

À Dra. Daniela Zappi, pela identificação botânica da espécie em estudo.

Aos companheiros de laboratório, pela convivência, pela ajuda na realização dos estudos químicos e farmacológicos e pela troca de conhecimentos.

Ao técnico de laboratório Delfino, pela amizade e pela dedicação em colaborar com nossas pesquisas.

Aos técnicos de laboratório Sebastião e André, pela confecção das lâminas histológicas.

À coordenação do curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas.

E a todos aqueles que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

## RESUMO

*Pereskia aculeata* Miller, popularmente conhecida como ora-pro-nobis, é uma trepadeira arbustiva cujas folhas são empregadas na culinária tradicional de algumas regiões do Brasil. Na medicina popular, são utilizadas como cicatrizantes e no abrandamento de processos inflamatórios. Para contribuir com os estudos sobre *P. aculeata*, a caracterização fitoquímica de seu extrato bruto metanólico e partições, além do doseamento de fenóis e flavonoides e da pesquisa por compostos indólicos. *In vitro*, foi avaliada a atividades citotóxica para macrófagos normais, células HL60 e MCF-7 e parasitos do gênero *Leishmania* pelo método do MTT e a atividade antimicrobiana pelo método de microdiluição em caldo. Além disso, avaliou-se, *in vivo*, a atividade anti-inflamatória do extrato bruto pelo modelo de edema de orelha induzido pelo óleo de cróton e a atividade antinociceptiva do extrato bruto e partições pelo método de contorções abdominais induzidas pelo ácido acético. Uma vez que a partição hidrometanólica demonstrou maior potencial antinociceptivo, esta também foi estudada pelos testes da formalina, *tail-flick* e contorções abdominais induzidas pelo ácido acético em animais pré-tratados com *p*-clorofenilalanina (PCPA). O perfil cromatográfico da partição hidrometanólica foi determinado por CLAE. Todas as classes de constituintes químicos pesquisados foram encontrados, à exceção de triterpenos e saponinas. Alcaloides, flavonoides e compostos indólicos foram encontrados em todas as amostras estudadas. A partição em diclorometano apresentou maiores concentrações de fenóis e flavonoides. O extrato bruto e algumas partições demonstraram toxicidade diante de células HL60 e MCF-7. Nenhuma das amostras apresentou toxicidade para macrófagos normais, parasitos do gênero *Leishmania* e para as estirpes de bactérias testadas. No ensaio do edema de orelha, o extrato bruto apresentou atividade edematogênica via oral, e a análise histológica dos fragmentos de orelha sugeriu que o edema não deve ter sido causado por um aumento do processo inflamatório. O estudo mais aprofundado da partição hidrometanólica revelou que seu mecanismo de ação antinociceptivo se dá a nível periférico e central, não associado à ativação de receptores opióides ou à liberação e síntese de serotonina. A análise por CLAE revelou a presença de substâncias cujo espectro UV é típico de compostos indólicos. Segundo a literatura, as folhas de *P. aculeata* são ricas em triptofano, aminoácido precursor da serotonina, um dos mediadores inflamatórios vasodilatores e um dos neurotransmissores que atuam inibindo a nocicepção a nível central. Nas plantas, o triptofano dá origem aos alcalóides indólicos, compostos estruturalmente semelhantes à serotonina. Assim, levanta-se a hipótese de que alcalóides indólicos estejam contribuindo para os efeitos observados *in vivo* para o extrato bruto e a partição hidrometanólica.

**Palavras-chave:** *Pereskia aculeata*, antitumoral, antinocicepção.

## ABSTRACT

*Pereskia aculeata* Miller, known as ora-pro-nobis, is a climbing shrub which leaves are used in traditional cuisine in Brazil. The leaves are used in folk medicine in skin wound healing and to treat inflammation. To contribute to the studies on *P. aculeata*, the phytochemical characterization of its crude methanol extract and partitions, the quantification of phenols and flavonoids and the search for indoles compounds were carried out. *In vitro*, we tested the cytotoxic activity to normal macrophages, HL60 and MCF-7 cells and parasites of the genus *Leishmania* by MTT method and also antimicrobial activity by microdilution method. Furthermore, we evaluated the *in vivo* anti-inflammatory activity of the crude extract by the model of ear edema induced by croton oil and antinociceptive activity of crude extract and partitions by acetic acid-induced writhing test. Since hydromethanolic partition showed the greatest antinociceptive potential, it was also studied by acetic acid-induced writhing test in animals pretreated with *p*-chlorophenylalanine (PCPA), formalin and tail-flick tests. The chromatographic profile of the hydromethanolic partition was determined by HPLC. All classes of chemical constituents investigated were found, with the exception of triterpenes and saponins. Alkaloids, flavonoids and indoles were found in all samples. Dichloromethane partition showed higher phenols and flavonoids contents. Crude extract and some partitions showed cytotoxicity against HL60 and MCF-7 cells. None of the samples showed cytotoxicity against normal macrophages, *Leishmania* parasites or bacteria strains. Crude extract showed edematogenic activity in croton oil test when administered orally, but the histological analysis of the ears suggested that the edema should not have been caused by an increase in inflammatory process. The study further revealed that the antinociceptive mechanism of hydromethanolic partition was peripheral and central, but not related to opioid receptors or serotonin synthesis and release. HPLC analysis revealed the presence of indoles in this partition. The leaves of *P. aculeata* are rich in tryptophan, a serotonin precursor. Serotonin is a vasodilator and a neurotransmitter which inhibits central nociception. In plants, tryptophan leads to indole alkaloids, structurally similar to serotonin. Thus, we hypothesize that indole alkaloids are involved in the *in vivo* activities observed for crude extract and hydromethanolic partition.

**Keywords:** *Pereskia aculeata*, antitumor, antinociception.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> - Rotas biossintéticas do metabolismo especial .....	<b>22</b>
<b>Figura 2</b> - Ciclo de vida dos parasitos do gênero <i>Leishmania</i> .....	<b>30</b>
<b>Figura 3</b> - Distribuição geográfica das espécies do gênero <i>Pereskia</i> .....	<b>38</b>
<b>Figura 4</b> - Distribuição geográfica de <i>Pereskia aculeata</i> Miller .....	<b>41</b>
<b>Figura 5</b> - <i>Pereskia aculeata</i> Miller .....	<b>42</b>
<b>Figura 6</b> - Esquema da extração e partição das folhas de <i>P. aculeata</i> .....	<b>47</b>
<b>Figura 7</b> - Cromatograma da partição hidrometanólica .....	<b>61</b>
<b>Figura 8</b> - Espectros UV na partição hidrometanólica .....	<b>61</b>
<b>Figura 9</b> - Exemplos de espectros UV de compostos indólicos .....	<b>62</b>
<b>Figura 10</b> - Atividade antitumoral de EBM, PHEX, PDCM, PAC e PHM frente à linhagem HL60 .....	<b>62</b>
<b>Figura 11</b> - Atividade antitumoral de EBM, PHEX, PDCM, PAC e PHM frente à linhagem MCF-7.....	<b>63</b>
<b>Figura 12</b> - Efeito de EBM, PHEX, PDCM e PHM via oral diante do teste de contorções abdominais induzidas por ácido acético em camundongos .....	<b>64</b>
<b>Figura 13</b> - Efeito de PHM via oral em diferentes doses diante do teste de contorções abdominais induzidas por ácido acético em camundongos .....	<b>65</b>
<b>Figura 14</b> - Efeito de PHM via oral diante da primeira fase do teste da formalina em camundongos .....	<b>66</b>

<b>Figura 15</b> - Efeito de PHM via oral diante da segunda fase do teste da formalina em camundongos .....	<b>66</b>
<b>Figura 16</b> - Efeito de PHM via oral diante do teste da retirada da cauda em camundongos .....	<b>67</b>
<b>Figura 17</b> - Efeito de EBM via tópica diante do estímulo inflamatório induzido pelo óleo de cróton em camundongos .....	<b>68</b>
<b>Figura 18</b> - Efeito de EBM via oral diante do estímulo inflamatório induzido pelo óleo de cróton em camundongos .....	<b>68</b>
<b>Figura 19</b> - Microscopia de um fragmento de orelha normal de camundongo .....	<b>69</b>
<b>Figura 20</b> - Microscopia com coloração de hematoxilina-eosina de um fragmento de orelha de um camundongo que recebeu o tratamento com veículo .....	<b>70</b>
<b>Figura 21</b> - Microscopia com coloração de azul de toluidina de um fragmento de orelha de um camundongo que recebeu o tratamento com veículo .....	<b>70</b>
<b>Figura 22</b> - Microscopia com coloração de hematoxilina-eosina de um fragmento de orelha de um camundongo que recebeu o tratamento com EBM 100 mg/kg .....	<b>71</b>
<b>Figura 23</b> - Presença de vasodilatação em um fragmento de orelha de um camundongo que recebeu o tratamento com EBM 100 mg/kg .....	<b>71</b>

**Figura 24** - Microscopia com coloração de azul de toluidina de um fragmento de orelha de um camundongo que recebeu o tratamento com EBM 100 mg/kg ..... **72**

**Figura 25** - Microscopia com coloração de hematoxilina-eosina de um fragmento de orelha de um camundongo que recebeu o tratamento com EBM 300 mg/kg ..... **72**

**Figura 26** - Microscopia com coloração de azul de toluidina de um fragmento de orelha de um camundongo que recebeu o tratamento com EBM 300 mg/kg ..... **73**

## LISTA DE TABELAS

**Tabela 1** - Teor de fenóis e flavonoides do extrato bruto metanólico e partições ....**60**

## LISTA DE QUADROS

<b>Quadro 1 - Análise fitoquímica preliminar do extrato bruto metanólico e partições</b> .....	<b>59</b>
---	-----------

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

**5 - LOX** – 5 - lipoxigenase

**μl** – microlitro(s)

**AA** – ácido araquidônico

**ATCC** – American Type Culture Collection

**ATP** – adenosina trifosfato

**AlCl<sub>3</sub>** – cloreto de alumínio

**BHI** – infusão cérebro coração

**CBD** – Convenção de Diversidade Biológica

**CBR** – Centro de Biologia da Reprodução

**CEEA** – Comissão de Ética na Experimentação Animal

**COBEA** – Colégio Brasileiro de Experimentação Animal

**COX** – ciclo-oxigenase

**CCD** – cromatografia em camada delgada

**CESJF** – Centro de Ensino Superior de Juiz de Fora

**CLAE** – cromatografia líquida de alta eficiência

**cm** – centímetros

**DMRI** – degeneração macular relacionada à idade

**DMSO** – dimetilsulfóxido

**EAT** – equivalentes de ácido tânico

**EBM** – extrato bruto metanólico

**e.p.m.** – erro padrão médio

**ER** – equivalentes de rutina

**ERO** – espécies reativas do oxigênio

**FeCl<sub>3</sub>** – cloreto férrico

**g** – grama(s)

**h** – hora(s)

**HCl** – ácido clorídrico

**HL60** (linhagem celular) – células de leucemia promielocítica humana

**IAPS** – Associação Internacional para o Estudo da Dor

**IL-1** – interleucina-1

**INAN** – Instituto Nacional de Alimentação e Nutrição

**iNOS** – óxido nítrico sintase induzida

**KOH** – hidróxido de potássio

**KB** (linhagem celular) – células de carcinoma epidermoide nasofaríngeo

**kg** – quilograma(s)

**LSD** – dimetilamida do ácido lisérgico

**MAPK** – proteínas quinases ativadas por mitógenos

**MCF-7** (linhagem celular) – células de adenocarcinoma de mama humano

**mg** – miligrama(s)

**min** – minuto(s)

**mL** – mililitros(s)

**mm** – milímetro(s)

**MRC-5** (linhagem celular) – células de fibroblastos humanos normais

**MRSA** – *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina

**MTT** – brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium

**N** – normal

**Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>** – carbonato de sódio

**NaOH** – hidróxido de sódio

**nm** – nanômetro(s)

**NP** – ácido difenilbórico beta-etilaminoéster

**OMS** – Organização Mundial de Saúde

**PAC** – partição acetato de etila

**PAF** – fator de ativação plaquetária

**PB** – partição butanólica

**PCPA** – para-clorofenilalanina

**PDCM** – partição em diclorometânica

**PEG** – polietilenoglicol

**PHEX** – partição hexânica

**PHM** – partição hidrometanólica

**PKC** – proteína quinase C

**PLA<sub>2</sub>** – fosfolipase A<sub>2</sub>

**PPTi** – precipitado insolúvel

**qsp** – quantidade suficiente para

**rpm** – rotações por minuto

**s** – segundo

**SBED** – Sociedade Brasileira para Estudo da Dor

**SBF** – soro bovino fetal

**s.pl.** – sub-pantar

**T47-D** (linhagem celular) – células do carcinoma mamário

**TNF- $\alpha$**  – fator de necrose tumoral – alfa

**TPA** –12-o-tetradecanoilforbol-13-acetato

**UFJF** – Universidade Federal de Juiz de Fora

**UFMG** – Universidade Federal de Minas Gerais

**UV** – ultravioleta

## SUMÁRIO

<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>18</b>
<b>1 REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	<b>21</b>
<i>Metabolismo especial</i> .....	<b>21</b>
<i>Dor e nocicepção</i> .....	<b>23</b>
<i>Resposta inflamatória</i> .....	<b>24</b>
<i>Câncer e neoplasia</i> .....	<b>26</b>
<i>Resistência bacteriana</i> .....	<b>28</b>
<i>Leishmanioses</i> .....	<b>29</b>
<i>A família Cactaceae</i> .....	<b>31</b>
<i>O gênero Pereskia</i> .....	<b>36</b>
<i>A espécie Pereskia aculeata Miller</i> .....	<b>40</b>
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	<b>45</b>
<b>2.1 OBJETIVOS GERAIS</b> .....	<b>45</b>
<b>2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS</b> .....	<b>45</b>
<b>3 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>46</b>

<b>3.1 Material vegetal .....</b>	<b>46</b>
<b>3.2 Preparo do extrato bruto metanólico e partições .....</b>	<b>46</b>
<b>3.3 Caracterização fitoquímica preliminar.....</b>	<b>47</b>
<b>3.4 Determinação do conteúdo de fenóis totais .....</b>	<b>49</b>
<b>3.5 Determinação do conteúdo de flavonoides .....</b>	<b>50</b>
<b>3.6 Determinação da presença de compostos indólicos .....</b>	<b>50</b>
<b>3.7 Determinação do perfil cromatográfico por Cromatografia Líquida de alta Eficiência para a partição hidrometanólica .....</b>	<b>50</b>
<b>3.8 Atividades biológicas <i>in vitro</i> .....</b>	<b>51</b>
<b>3.8.1 Atividade antitumoral .....</b>	<b>51</b>
<b>3.8.2 Atividade antimicrobiana .....</b>	<b>52</b>
<b>3.8.3 Atividade leishmanicida .....</b>	<b>52</b>
<b>3.8.4 Avaliação da citotoxicidade em células de mamíferos .....</b>	<b>53</b>
<b>3.9 Atividades farmacológicas <i>in vivo</i> .....</b>	<b>54</b>
<b>3.9.1 Animais .....</b>	<b>54</b>
<b>3.9.2 Atividade antinociceptiva .....</b>	<b>54</b>
<b>3.9.2.1 Teste de contorções abdominais induzidas por ácido acético .....</b>	<b>54</b>
<b>3.9.2.2 Teste da formalina .....</b>	<b>55</b>

3.9.2.3 Teste da retirada da cauda ( <i>Tail-Flick</i> ) .....	56
3.9.2.4 Teste de contorções abdominais induzidas pelo ácido acético em animais pré-tratados com para-clorofenilalanina .....	56
3.9.3 Atividade anti-inflamatória .....	57
3.9.3.1 Edema de orelha induzido por óleo de cróton .....	57
3.9.3.1.1 Tratamento tópico .....	57
3.9.3.1.2 Tratamento via oral .....	58
3.10 Análise estatística .....	58
4 RESULTADOS .....	59
4.1 Caracterização fitoquímica preliminar .....	59
4.2 Teor de fenóis e flavonoides .....	60
4.3 Determinação da presença de compostos indólicos .....	60
4.4 Determinação do perfil cromatográfico por cromatografia líquida de alta eficiência para a partição hidrometanólica .....	60
4.5 Atividades biológicas <i>in vitro</i> .....	62
4.5.1 Atividade antitumoral .....	62
4.5.2 Atividade antimicrobiana .....	63
4.5.3 Atividade leishmanicida .....	63

4.5.4 Avaliação da citotoxicidade em células de mamíferos .....	63
4.6 Atividades farmacológicas <i>in vivo</i> .....	63
4.6.1 Atividade antinociceptiva .....	64
4.6.1.1 Teste de contorções abdominais induzidas por ácido acético .....	64
4.6.1.2 Teste da formalina .....	65
4.6.1.3 Teste da retirada da cauda ( <i>Tail-Flick</i> ) .....	66
4.6.1.4 Contorções abdominais induzidas pelo ácido acético em animais pré-tratados com PCPA .....	67
4.6.2 Atividade anti-inflamatória .....	67
4.6.2.1 Edema de orelha induzido pelo óleo de cróton .....	67
4.6.2.2 Análise histológica dos fragmentos de orelha .....	69
5 DISCUSSÃO .....	73
6 CONCLUSÃO .....	80
REFERÊNCIAS .....	81
ANEXO .....	93

## INTRODUÇÃO

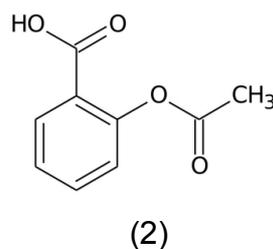
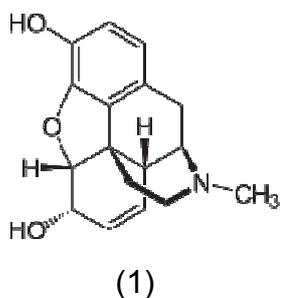
Os produtos naturais são utilizados pela humanidade desde a Antiguidade, quando era comum a busca pelo alívio de doenças ou feridas através da ingestão de ervas e da utilização de unguentos a base de óleos vegetais, como óleos de alho, de girassol e de mostarda (JÚNIOR, BOLZANI e BARREIRO, 2006; NOGUEIRA, MONTANARI e DONICCI, 2009).

Segundo estimativas da Organização Mundial de Saúde (OMS), 60% a 80% da população mundial ainda hoje dependem fundamentalmente de plantas medicinais para cuidados básicos de saúde, o que ocorre especialmente nos países em desenvolvimento, já que o custo desses produtos é bem menor quando comparado com o de medicamentos industrializados (ALMEIDA et al., 2009; MACÍA, GARCÍA e VIDAURRE, 2005). No Brasil, especialmente em comunidades mais pobres, as plantas medicinais representam produtos importantes no comércio de feiras livres e mercados populares (USTULIN et al., 2009).

O conhecimento da medicina tradicional, transmitido ao longo do tempo, contribui para o conhecimento de possíveis atividades biológicas de plantas, o que desperta o interesse dos pesquisadores para os estudos químicos e farmacológicos de plantas empregadas na cura de doenças, ou mesmo como venenos em culturas antigas, como as tradições gregas, egípcias, indígenas e africanas (JÚNIOR, BOLZANI e BARREIRO, 2006; NOGUEIRA, MONTANARI e DONICCI, 2009).

O Brasil é um país propício para os estudos dessa natureza, em virtude da imensa biodiversidade e endemismo de seus biomas aliados a uma enorme diversidade cultural, evidenciada por cerca de 220 etnias indígenas, variadas culturas afro-descendentes e de grupos quilombolas, como caiçaras, caboclos, ribeirinhos e jangadeiros (RODRIGUES e CARLINI, 2003). De acordo com a Convenção de Diversidade Biológica (CBD), o Brasil detém 15% a 20% de toda a biodiversidade mundial, e é tido como o país de maior endemismo vegetal do mundo. Estima-se que só a floresta amazônica dispõe de 25 a 30 mil espécies vegetais endêmicas. Segundo dados estatísticos, existem no território brasileiro 55 mil espécies de plantas, dentre as quais muitas são ainda completamente desconhecidas (BARREIRO e BOLZANI, 2009; RODRIGUES, ALMEIDA e PIRES, 2010).

Não somente plantas, mas também fungos, bactérias, organismos marinhos, dentre outros, constituem as mais importantes fontes de substâncias biologicamente ativas. A prova disso é que a maioria dos fármacos disponíveis no mercado é de origem natural ou foram desenvolvidos a partir de uma substância natural que serviu de protótipo para a síntese química (BARREIRO e BOLZANI, 2009). Entre os exemplos mais clássicos, podemos citar a morfina (1), constituinte da *Papaver somniferum* indicado para tratamento de dores intensas; o ácido acetil-salicílico (2), cuja síntese se tornou possível a partir do ácido salicílico isolado de *Salix alba*; e os antibióticos, os quais foram desenvolvidos a partir da descoberta da penicilina, metabólito produzido por fungos do gênero *Penicillium* (BARREIRO, 1990; JÚNIOR, BOLZANI e BARREIRO, 2006).

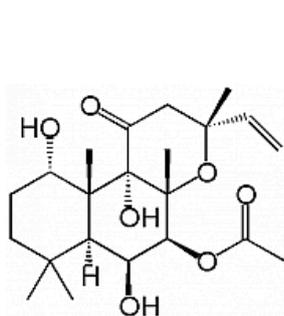


Com o progresso tecnológico, a indústria farmacêutica passou a investir fortemente em modelos modernos de síntese orgânica na tentativa de se obter novas entidades químicas bioativas. Essas moléculas resultantes da química combinatória passaram a ser testadas diretamente em enzimas e receptores, importantes alvos moleculares de fármacos, isolados através de técnicas envolvendo biologia molecular e genética. Todavia, apesar de tantos avanços, é pequeno o número de novos fármacos lançados no mercado, uma vez que as novas tecnologias falharam ao tentar representar a principal fonte de diversidade química, o que garantiria a descoberta de numerosas moléculas candidatas a fármacos inovadores. Neste contexto, os produtos naturais têm recuperado seu prestígio e sua relevância na indústria farmacêutica como fonte para a descoberta de novas substâncias bioativas (JÚNIOR, BOLZANI e BARREIRO, 2006). O maior foco nos últimos anos tem sido os compostos enantiometricamente puros, frequentemente produzidos em espécies vegetais, e que geraram somente no ano de 2001 um faturamento de 45,2 bilhões de dólares, induzindo a indústria farmacêutica, desde

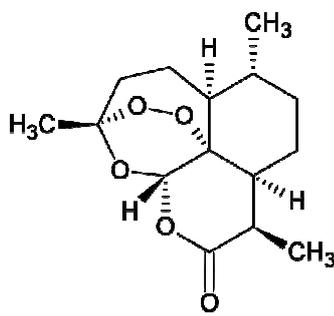
então, a investir de forma cada vez mais maciça em programas de bioprospecção (PINTO et al., 2002).

As atenções voltadas para os estudos químicos e farmacológicos de produtos naturais têm refletido no aumento do número de trabalhos publicados na área em revistas indexadas internacionais e nacionais (PUPO e GALLO, 2007). As pesquisas pré-clínicas e clínicas são as ferramentas mais utilizadas para a comprovação científica da eficácia, indicações e contra-indicações de plantas medicinais, o que ocasiona maior aceitação médica e crescimento do mercado de fitoterapia (FILHO e YUNES, 1998).

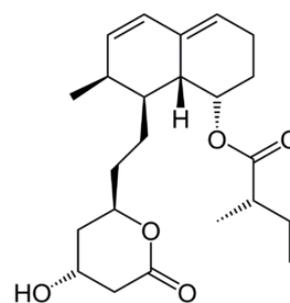
Novos compostos derivados de produtos naturais têm surgido com relevante potencial terapêutico. Pode-se mencionar a forskolina (3), obtida de *Coleus barbatus*, de promissora atividade antihipertensiva e antitumoral; a artemisina (4), isolada de *Artemisia annua*, de potente atividade antimalárica; o taxol, encontrado no gênero *Taxus*, e a vimblastina e vincristina, extraídas de *Catharrantus roseus*, os quais já estão disponíveis no mercado para o tratamento de certos tipos de câncer; e as estatinas, que desempenham papel importante no tratamento de hiperlipidemias, como a lovastatina, sinvastatina e atorvastatina, produzidas após a descoberta da mevastatina (5), metabólito do fungo *Penicilium brevicompactum* (FILHO e YUNES, 1998; JÚNIOR, BOLZANI e BARREIRO, 2006). A camptotecina (6) e seus derivados constituem outro exemplo importante, pois são antitumorais que movimentam cerca de 50 bilhões de dólares anualmente (PINTO et al., 2002).



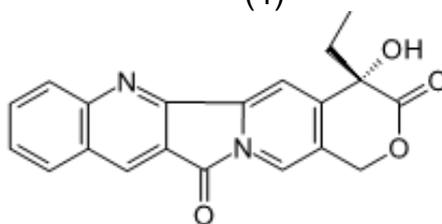
(3)



(4)



(5)



(6)

## 1 REVISÃO DA LITERATURA

### *Metabolismo especial*

Todos os organismos vivos necessitam desempenhar uma série de reações químicas primordiais para assegurarem a vida. É fundamental que sejam capazes de produzir energia na forma de ATP e, no caso de seres pluricelulares, de sintetizar os próprios tecidos. As plantas servem-se da fotossíntese para converter os compostos inorgânicos presentes no ambiente em moléculas orgânicas fundamentais para garantirem sua sobrevivência, crescimento e reprodução, entre elas os carboidratos, proteínas, nucleotídeos e lipídeos. Essas moléculas essenciais são denominadas metabólitos primários, e as vias metabólicas que participam da síntese dessas substâncias são conhecidas como metabolismo primário (DEWICK, 2002).

Os metabólitos primários podem ser encontrados em todos os seres vivos, porém existem outros produtos do metabolismo cuja distribuição na natureza é muito mais limitada. Tais compostos são encontrados em grupos de organismos específicos e são sintetizados de acordo com as particularidades de cada espécie. A grande maioria desses metabólitos parece não exercer um papel preponderante na sobrevivência, e por isso são designados metabólitos secundários ou especiais, e as cascatas bioquímicas que a eles dão origem constituem o metabolismo secundário ou especial (CROTEAU, KUTCHAN e LEWIS, 2000; DEWICK, 2002).

A maior parte de metabólitos especiais conhecidos é proveniente do reino vegetal. Nas plantas, essas substâncias podem apresentar uma série de funções, como atrair agentes polinizadores e dispersores de sementes, seja por estímulo químico ou visual, isto é, por meio de cores atrativas; servir como constituintes tóxicos em mecanismos de defesa contra insetos fitófagos e herbívoros; garantir proteção contra infecções por micro-organismos; e permitir a interação com outras plantas, desempenhando o papel de proporcionar a competição entre as espécies (CROTEAU, KUTCHAN e LEWIS, 2000; DEWICK, 2002; PINTO et al., 2002).

O maior interesse nesses constituintes consiste em suas aplicações como agroquímicos, corantes, polímeros, fibras, colas, óleos, ceras, aromatizantes, perfumes, e, sobretudo, medicamentos (CROTEAU, KUTCHAN e LEWIS, 2000; PINTO et al., 2002). As substâncias responsáveis pelos efeitos terapêuticos de plantas medicinais e que exercem relevante papel na descoberta de novos

fármacos, já abordadas anteriormente, possuem sua origem no metabolismo especial (DEWICK, 2002). Entretanto, apesar de serem conhecidas cerca de 100 mil substâncias derivadas do metabolismo especial, a grande maioria delas ainda não foi estudada quanto ao aspecto farmacológico (OKSMAN-CALDENTY e INZÉ, 2004).

Os metabólitos especiais são indiretamente provenientes do metabolismo primário, que através da fotossíntese dá origem à glicose. Esta, por sua vez, é submetida a reações químicas que produzem o ácido chiquímico e a acetil coenzima A (acetil-CoA). A partir dessas moléculas são biossintetizados todos os metabólitos especiais, dentre eles alcaloides, antraquinonas, taninos, flavonóides, cumarinas, lignanas, esteróides e terpenoides (Figura 1) (SANTOS, 2007).

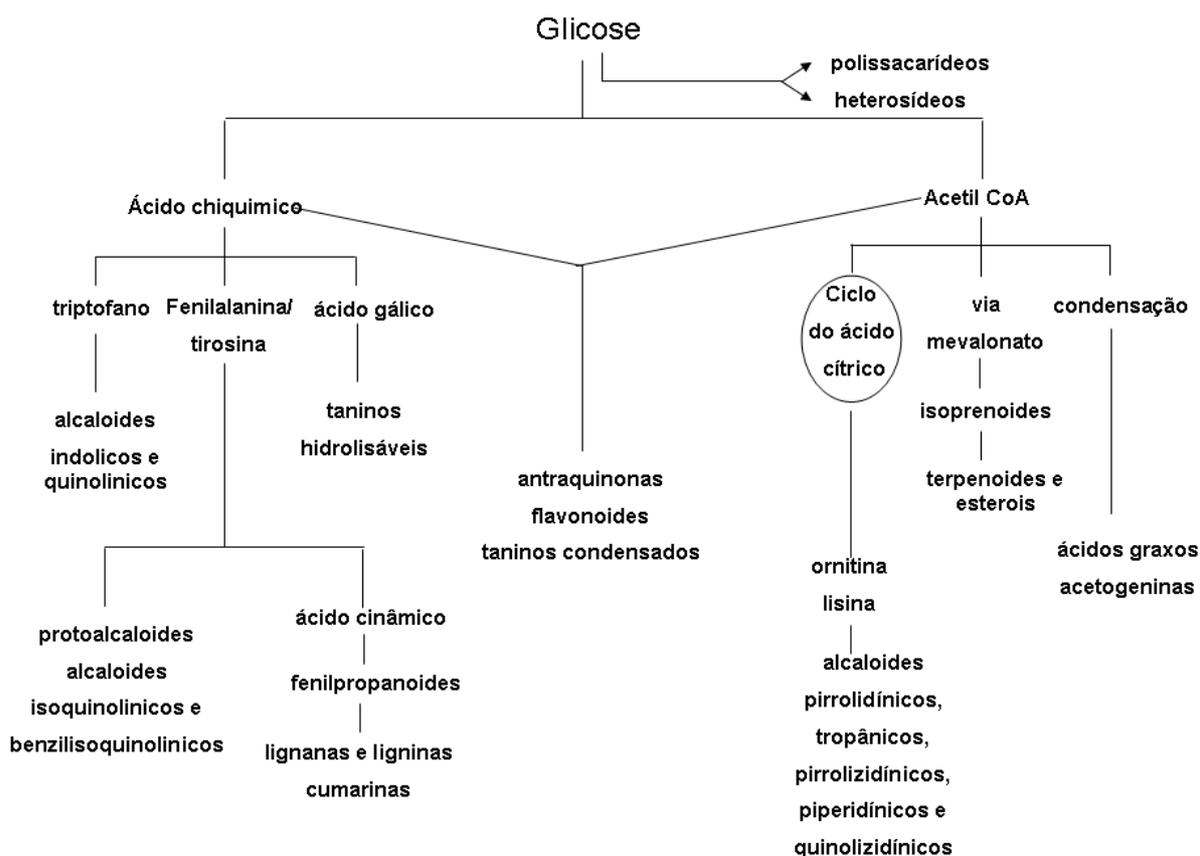


Figura 1 – Rotas biossintéticas do metabolismo especial (Fonte: adaptado de SANTOS, 2007).

## ***Dor e nocicepção***

A dor é definida pela Associação Internacional para o Estudo da Dor (IAPS) como “uma experiência desagradável, de natureza sensorial, cognitiva e emocional, associada a um dano tissular real ou potencial”. Tal definição engloba a dor de origem inflamatória, a dor neurogênica, isto é, por estimulação direta de um nociceptor; e a dor neuropática, que é resultante de uma alteração morfológica ou neurofisiológica das fibras sensoriais. Já o termo “nocicepção” diz respeito a respostas comportamentais e neurofisiológicas da dor dissociadas do caráter cognitivo, e, dessa forma, esse é o termo mais adequado nos estudos da dor envolvendo animais de laboratório, os quais não são capazes de verbalizar a resposta frente ao estímulo doloroso (LAPA et al., 2008).

Diferentes indivíduos apresentam diferentes percepções de dor, o que denota o seu caráter subjetivo. Sua manifestação, portanto, pode ocorrer das mais variadas formas, a depender de fatores emocionais, culturais, sociais e sensoriais. Sua interpretação só pode ser realizada a partir do relato de quem é afligido por ela, tornando difícil sua mensuração (ELLER e JAQUES, 2006; MENOSSI e LIMA, 2000). No Brasil, esse sintoma atinge 70% dos pacientes ambulatoriais, é o motivo principal de um terço das consultas médicas, e é a maior causa de absenteísmo no país (ELLER e JAQUES, 2006). O alívio da dor é uma das prioridades terapêuticas mais importantes, pois ela representa grande sofrimento e desgaste emocional para o paciente, o que afeta substancialmente sua qualidade de vida. A Sociedade Brasileira para Estudo da Dor (SBED) considera a dor atualmente como o quinto sinal vital, o qual deve ser avaliado juntamente com a pressão arterial, temperatura e frequências cardíaca e respiratória (BONICA, 1990; ELLER e JAQUES, 2006; GUISBURG, 1999; WHEDON e FERREL, 1992). Além disso, é um sintoma de fundamental importância para estabelecer o diagnóstico de diversas doenças, pois é através dela que diversas afecções se manifestam (PIMENTA et al., 1998).

A dor está associada com a atividade elétrica de fibras aferentes de nervos periféricos, os quais são sensibilizados por estímulos mecânicos, químicos ou térmicos. Essas fibras atingem a medula espinhal até a substância cinzenta do corno dorsal, onde formam conexões sinápticas que atingem o tálamo ou outros sistemas ascendentes para gerar a interpretação da dor (RANG et al., 2004). Ao mesmo tempo, vias descendentes exercem forte controle inibitório sobre a

transmissão no corno dorsal. Do mesencéfalo partem estímulos que correm para o núcleo magno da rafe, de onde fibras eferentes chegam à medula espinhal para inibir as descargas dos neurônios das vias aferentes da dor. O principal neurotransmissor envolvido na via descendente é a serotonina, mas outros mediadores também participam desse mecanismo inibitório, como noradrenalina, encefalina e adenosina (MILLAN, 2002; RANG et al., 2004).

Muitas das substâncias utilizadas como analgésicas têm sua origem em produtos naturais. A morfina e o ácido acetil-salicílico, fármacos que apesar de antigos são ainda dotados de relevante aplicação terapêutica, servem como exemplos clássicos de analgésicos produzidos a partir de plantas medicinais (JÚNIOR, BOLZANI e BARREIRO, 2006).

### ***Resposta inflamatória***

A inflamação é uma resposta de um tecido vivo e vascularizado do organismo frente a antígenos, patógenos ou estímulos irritantes de natureza física, química ou traumática. É caracterizada pela presença de eritema (rubor), calor (elevação da temperatura na região afetada), tumor (edema), dor e perda de função do tecido ou órgão atingido. O objetivo da inflamação consiste em fornecer mecanismos de defesa para combater um estímulo nocivo, facilitando o acesso de células de defesa e proteínas plasmáticas à região afetada, onde são fundamentais para reparar o dano tissular (IWALEWA et al., 2007; LAPA et al., 2008).

Os sintomas clínicos do processo inflamatório são decorrentes de uma série de eventos moleculares e celulares complexos, controlados por diversos mediadores químicos. Entre eles as citocinas, como a interleucina-1 (IL-1) e o fator de necrose tumoral (TNF- $\alpha$ ); substâncias provenientes de sistemas enzimáticos do plasma, como produtos do complemento e da coagulação; mediadores lipídicos, dentre os quais estão as prostaglandinas, leucotrienos, fator de ativação plaquetária (PAF); e substâncias vasoativas, por exemplo, histamina, serotonina e óxido nítrico (IWALEWA et al., 2007; LAPA et al., 2008; WINYARD e WILLOUGHBY, 2003).

Os mediadores inflamatórios são liberados por leucócitos, linfócitos, plaquetas e células endoteliais. Após a liberação, interagem com receptores celulares específicos, promovendo aumento da permeabilidade vascular, quimiotaxia, contração da musculatura lisa, dano oxidativo, dor e acréscimo na

expressão de determinadas enzimas, por exemplo, fosfolipase A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>), 5-lipoxigenase (5-LOX), ciclo-oxigenase (COX) e óxido nítrico sintase induzida (iNOS), todas envolvidas na síntese de substâncias pró-inflamatórias (IWALEWA et al., 2007).

De acordo com LAPA e colaboradores (2008), as principais consequências da resposta inflamatória são:

- Aumento do fluxo sanguíneo para o local: microscopicamente, um tecido inflamado aparentará conter um maior número de vasos sanguíneos, devido ao recrutamento de novos leitos capilares. Estes vasos apresentar-se-ão engurgitados, em decorrência da vasodilatação arteriolar.

- Retração de células endoteliais, causando um aumento da permeabilidade vascular. Este processo faz com que moléculas grandes, normalmente restritas ao interior dos vasos, atinjam o espaço intersticial. Este é um dos mecanismos que permite o acesso ao local dos mediadores solúveis do processo inflamatório.

- Extravasamento de macromoléculas plasmáticas, ao aumentar a pressão oncótica local, se faz acompanhar pela saída de água levando à formação do edema inflamatório.

- Migração quimiotáxica de leucócitos, desde os capilares até a sede do processo inflamatório. Os polimorfonucleares neutrófilos são o tipo celular predominante nos estágios iniciais da resposta. Caso o processo persista, aumenta a migração de células mononucleares (monócitos e linfócitos) para o local, modificando o padrão do tipo celular prevalente.

Todas essas reações constituem a inflamação aguda que, a princípio, é benéfica ao indivíduo por se tratar de um mecanismo de defesa diante de uma injúria. O resultado final tende a ser a cura, com a restauração das funções do órgão afetado e o reparo tissular, que pode ou não originar cicatrizes. Entretanto, em algumas circunstâncias, se o estímulo lesivo persistir ou essas respostas atuarem inapropriadamente, podem provocar lesões por si mesmas, e com isso contribuir para o estabelecimento do processo mórbido, o que determina a inflamação crônica. Esta consiste em uma reação que persiste por vários meses ou anos, caracterizada pela destruição tissular, proliferação local de células e de tecido conjuntivo, angiogênese e aumento da atividade de fibroblastos (RANG et al., 2004).

Os agentes terapêuticos disponíveis no mercado para o tratamento da inflamação frequentemente exibem reações adversas e nem sempre produzem os resultados esperados. Neste contexto, surgem como alternativa os extratos e substâncias isoladas de plantas, os quais têm sido estudados na busca por anti-inflamatórios mais seguros e eficazes (SARAIVA et al., 2010).

### ***Câncer e neoplasia***

O câncer é uma doença caracterizada pela multiplicação celular desenfreada, sendo a neoplasia um termo que se refere apenas aos tumores malignos. Essa proliferação celular anormal parece estar relacionada a uma susceptibilidade genética que favorece a ativação de genes normalmente inativos em células normais, os proto-oncogenes. Quando ativados são denominados oncogenes, os quais induzem as células a se multiplicarem constantemente, dando a elas a capacidade de se disseminarem pelo organismo e invadirem outros tecidos, os quais têm suas funções prejudicadas, processo este conhecido como metástase (ALMEIDA et al., 2005). Apesar de a doença estar associada a uma predisposição genética, a exposição do indivíduo a determinadas condições ambientais é a principal causa da maioria das neoplasias humanas. Os carcinógenos são esses elementos presentes no ambiente que constituem fatores de risco para o aparecimento do câncer, como produtos químicos, radiações e alguns vírus (REDDY, ODHAV e BHOOLA, 2003).

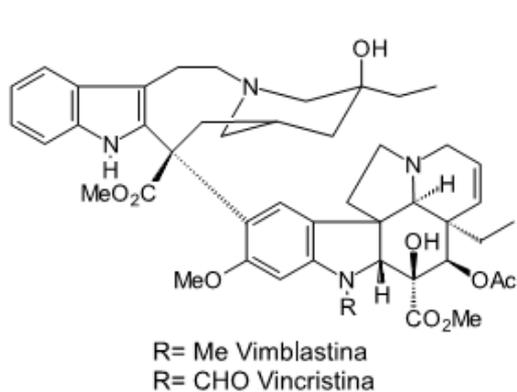
O câncer é a segunda maior causa de morte no mundo, e a primeira em países desenvolvidos. Estima-se que somente no ano de 2008, o câncer causou 7,6 milhões de óbitos, e 12,7 milhões de novos casos surgiram em todo mundo. O câncer de mama é o mais frequente entre as mulheres e a causa de 14% das mortes ocasionadas pela doença. Em homens, o câncer de pulmão é o que mais mata, compreendendo 23% das mortes decorrentes de neoplasias. Estimativas apontam que a mortalidade por câncer deve continuar aumentando, podendo alcançar 9,0 milhões de mortes em 2015 e 11,4 milhões em 2030 (BRANDÃO et al., 2010; JEMAL et al., 2011).

Em países desenvolvidos a incidência de câncer é o dobro em relação aos países em desenvolvimento, porém o número de óbitos é semelhante. O diagnóstico muitas vezes tardio e as dificuldades de acesso ao tratamento explicam

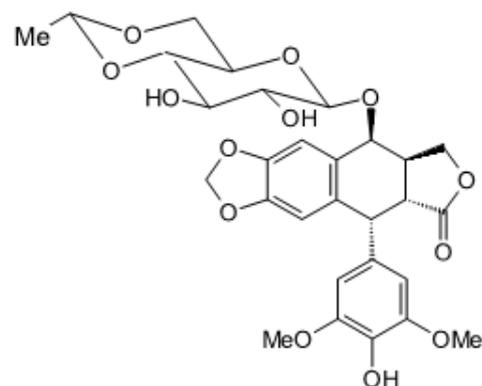
porque o câncer se torna ainda mais fatal nos países em desenvolvimento. A grande incidência de neoplasias, principalmente em países de primeiro mundo, é fruto de um estilo de vida comum nos dias atuais dotado de diversos fatores de risco para o desenvolvimento de câncer, por exemplo, a inatividade física, o fumo e maus hábitos alimentares (JEMAL et al., 2011). Cerca de 80% dos casos de câncer de cólon são consequência de uma má alimentação. Pelo menos 35% de todos os tipos de cânceres se originam de uma dieta inapropriada e, quando acrescentados álcool e cigarros a essa dieta, o valor em questão sobe para 60% (REDDY, ODHAV e BHOOLA, 2003).

O tratamento do câncer consiste na retirada cirúrgica do tumor, quando for possível; na radioterapia, emissão de radiação para reduzir as recorrências e as chances de metástases, aplicada apenas em tumores superficiais; e na quimioterapia, baseada na administração de fármacos com o intuito de destruir as células neoplásicas. Os agentes quimioterápicos disponíveis apresentam alta toxicidade, pois atuam de forma não específica, lesando não só as células tumorais, mas também as células normais, o que acarreta uma série de efeitos adversos, como náuseas, perda de cabelo, maior susceptibilidade às infecções, entre outros (ALMEIDA et al., 2005).

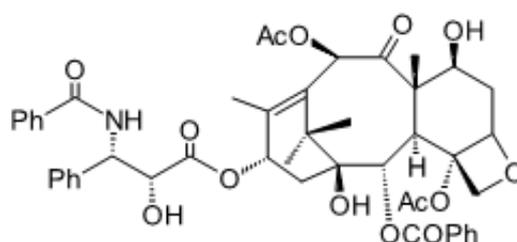
Os produtos naturais têm sido os principais agentes quimioterápicos nas últimas décadas, e diversas substâncias naturais ou delas derivadas têm obtido papel de destaque no tratamento do câncer. Os antitumorais vincristina e vimblastina (7), extraídos de *Catharanthus roseus*, contribuíram para remissão e cura de leucemias em crianças, teratoma testicular, linfoma de Hodgkin e muitos outros tipos de câncer. O etoposídeo (8), encontrado *Podophyllum peltatum*, é amplamente utilizado em casos de câncer de pulmão e é eficiente na leucemia linfocítica aguda, neuroblastoma em crianças, linfomas não-Hodgkin e tumores cerebrais em adultos. O taxol (9), produto isolado de *Taxus brevifolia*, é mais um exemplo importante, pois além de possuir grande eficácia contra câncer de mama e de ovário é líder em vendas entre as drogas antitumorais (MANN, 2002).



(7)



(8)



(9)

### ***Resistência bacteriana***

A resistência bacteriana é o surgimento de estirpes não sensíveis aos antibióticos disponíveis, apresentando a capacidade de se multiplicarem mesmo quando expostas a altas concentrações desses agentes. Esse fenômeno ocorre em função da própria evolução natural dos micro-organismos, mas tem sido maximizado devido ao uso irracional e abusivo de agentes antimicrobianos nas práticas médicas, agrárias e veterinárias (SILVA et al., 2010; WANNMACHER, 2004).

De acordo com dados da OMS, as infecções são responsáveis por 25% dos óbitos em todo o mundo (WANNMACHER, 2004). Dessa forma, a resistência bacteriana torna-se um problema de saúde pública de extrema magnitude. Os esforços para solucioná-lo visam racionalizar o uso de antibióticos, entender mais profundamente os mecanismos genéticos que conferem resistência às bactérias e desenvolver novos agentes terapêuticos para o tratamento e a prevenção de doenças infecciosas. Embora as indústrias farmacêuticas constantemente disponibilizem novas drogas para esse fim, os índices de resistência microbiana

continuam aumentando, e as perspectivas para o futuro quanto ao tratamento de infecções permanecem incertas (HEARST et al., 2010; NASCIMENTO et al., 2000).

Uma das principais funções dos metabólitos especiais produzidos pelas espécies vegetais é conferir proteção contra os micro-organismos (DEWICK, 2002). Muitos constituintes químicos isolados de plantas são dotados de atividade antimicrobiana, destacando-se os alcaloides, terpenos, compostos fenólicos e cumarinas. O uso de extratos vegetais e fitoquímicos, portanto, pode ser de grande valor no tratamento de doenças infecciosas e, em vista disso, inúmeras pesquisas têm investigado o potencial antimicrobiano de produtos naturais na busca por novos fármacos mais efetivos do que os já comercializados, especialmente em um momento em que se torna cada vez maior o problema da resistência bacteriana (NCUBE, AFOLAYAN e OKOH, 2008).

### ***Leishmanioses***

As leishmanioses constituem um conjunto de doenças causadas pela infecção de diferentes espécies de protozoários do gênero *Leishmania*. Segundo a OMS, são registrados cerca de 2 milhões de novos casos a cada ano e 350 milhões de pessoas estão expostas ao risco de contraírem a doença, tornando-a um grave problema de saúde pública. As leishmanioses podem se apresentar por diferentes formas clínicas, a depender da espécie de *Leishmania* infectante: leishmaniose cutânea, mucocutânea ou visceral (BRASIL, 2007; GONZÁLEZ et al., 2009).

A leishmaniose cutânea é a forma clínica mais comum, na qual o parasito afeta exclusivamente a pele e ocasiona ulcerações no rosto, braços e pernas, principalmente, áreas do corpo que geralmente estão mais expostas à picada do mosquito. A leishmaniose mucocutânea é uma forma crônica da doença em que algumas espécies do parasito, como *L. braziliensis*, *L. panamensis*, *L. guyanensis*, e *L. amazonensis*, se disseminam pelas membranas mucosas, especialmente do nariz, boca e esôfago, originando lesões muitas vezes desfigurantes. Esses dois tipos de leishmaniose são observados, principalmente, na América Central e do Sul (GONZÁLEZ et al., 2009). A leishmaniose visceral se concentra na África e afeta indivíduos imunologicamente deprimidos, sendo, portanto, considerada uma doença oportunista. Os parasitos causadores são *L. donovani* ou *L. infantum*, os quais se disseminam pelos órgãos internos como fígado, baço, medula óssea ou linfonodos.

É potencialmente fatal e responsável por aproximadamente 70 mil mortes por ano (GONZÁLES et al., 2008; KAYE e SCOTT, 2011).

A transmissão da leishmaniose se dá pela picada de flebotomíneos do gênero *Lutzomia*, conhecidos popularmente como mosquitos palha, tatuquira, birigui, entre outros (BRASIL, 2007). No interior do mosquito, o protozoário passa por variados estágios de diferenciação até atingir a forma infectante, chamada de promastigota metacíclica, presente no intestino médio do vetor. Durante a picada o mosquito regurgita os promastigotas que são então fagocitados e passam a residir no interior dos fagócitos, onde perdem o flagelo e originam a forma amastigota. O parasito se reproduz e o excesso de amastigotas favorece a lise celular e, com isso, a infecção em novos fagócitos. Estes são então sugados por um mosquito saudável para completar o ciclo de transmissão da doença (Figura 2) (KAYE e SCOTT, 2011).

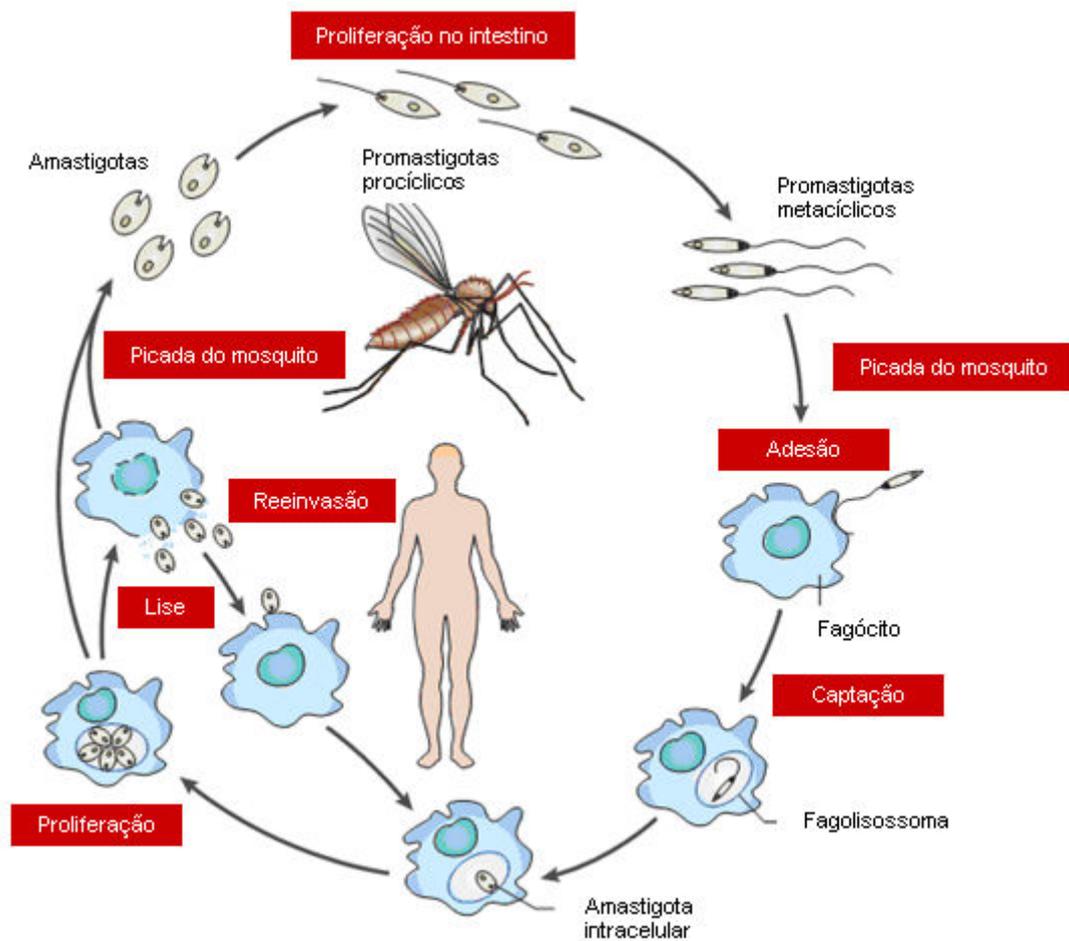


Figura 2 – Ciclo de vida dos parasitos do gênero *Leishmania* (Fonte: adaptado de KAYE e SCOTT, 2011).

As drogas utilizadas no tratamento das leishmanioses apresentam alta toxicidade e muitos efeitos adversos, prejudicando a adesão ao tratamento e favorecendo o surgimento de estirpes resistentes. Além disso, o custo desses medicamentos é bastante elevado (SANTOS et al., 2008). As opções terapêuticas disponíveis para combater o parasito são ainda muito restritas. Os antimonials pentavalentes são as drogas de primeira escolha há mais de 50 anos, e entre os seus efeitos adversos estão febre, insônia, fraqueza, edema, hepatite e arritmias (ALMEIDA e SANTOS, 2011). Portanto, é de fundamental importância a busca por novas substâncias leishmanicidas desprovidas de efeitos tóxicos e capazes de atuarem contra as estirpes mais resistentes (SANTOS et al., 2008).

Várias substâncias isoladas de plantas, predominantemente alcaloides, são dotadas de atividade leishmanicida, apesar de nenhuma das substâncias estudadas até o momento possuírem sua eficácia e segurança comprovadas. Além disso, diversas plantas medicinais são utilizadas popularmente no tratamento da doença. Dessa forma, ressalta-se que o estudo dos produtos naturais constitui uma estratégia interessante para a obtenção de novas formas de tratamento para as leishmanioses (GIL et al., 2008).

### ***A família Cactaceae***

A família Cactaceae é representada por 124 gêneros e 1427 espécies. As recentes classificações a dividem em 4 subfamílias: Maihuenioideae, Pereskioideae, Opuntioideae e Cactoideae, sendo que as duas últimas compreendem juntas mais de 90% das espécies da família (NOBEL et al., 1986; ORTEGA-BAES et al., 2010). Os cactos são bem conhecidos por possuírem o caule suculento como o principal órgão fotossintético, apresentando folhas vestigiais ou que ao longo da evolução foram substituídas por espinhos. Em geral, as folhas estão reduzidas a nível microscópico, no entanto, membros das pequenas subfamílias Maihuenioideae e Pereskioideae conservaram ao longo do tempo folhas fotossintéticas bem desenvolvidas, e por isso são tidos como os representantes mais primitivos dentre as cactáceas (BUTTERWORTH et al., 2008).

A característica morfológica que define a família é a presença das aréolas vegetativa e reprodutiva, que são pequenos ramos cobertos por tricomas a partir dos quais emergem as flores, no caso da aréola reprodutiva; ou os espinhos e folhas, em

se tratando da aréola vegetativa. Os espinhos podem se apresentar de diversas formas (aciculares, cônicos, recurvados, etc.), tamanhos, consistências e cores. As flores, normalmente, são solitárias, actinomorfas, bissexuais e de pétalas brancas, amarelas, verdes, vermelhas ou roxas. Inflorescências são encontradas apenas em alguns cactos do gênero *Pereskia*. Normalmente, os frutos são carnosos e de funículos bem desenvolvidos, o que torna a polpa suculenta; podem ser de uma ampla variedade de cores e, em sua maioria, são cobertos por pêlos ou espinhos. As sementes possuem menos que 10 mm de diâmetro, são ovais, elípticas ou lenticulares, podendo ou não apresentar perisperma (ARIAS e PEREZ, 2006).

As maiores peculiaridades dos cactos dizem respeito a suas adaptações morfológicas e fisiológicas direcionadas para aperfeiçoar o armazenamento de água, permitindo que sobrevivam a ambientes extremamente secos (EDWARDS et al., 2006). As folhas reduzidas e o caule fotossintético são adaptações que minimizam a perda de água através da transpiração. Além disso, células ricas em mucilagem, complexos de polissacarídeos que podem conter até trinta mil subunidades de açúcar, funcionam como um reservatório eficaz para o estoque de água (OGBURN e EDWARDS, 2009). As cactáceas ainda são dotadas de uma diferente estratégia metabólica que permite uma perda mínima de água durante as trocas gasosas, denominada metabolismo do ácido crassuláceo (CAM) (NOBEL et al., 1986).

As plantas que utilizam o metabolismo CAM, diferentemente do que ocorre com as demais, apenas abrem os estômatos para fixar o CO<sub>2</sub> durante a noite, quando a temperatura é mais baixa e a umidade do ar é mais alta, minimizando a transpiração. O CO<sub>2</sub>, com auxílio da enzima fosfoenolpiruvato-carboxilase (PEP-carboxilase), é fixado na forma de ácido málico, que é então armazenado nos vacúolos das células fotossintéticas. Durante o dia, quando a temperatura se eleva, os estômatos são firmemente fechados para diminuir a perda de água, ao mesmo tempo em que o ácido málico é descarboxilado a fim de fornecer CO<sub>2</sub> para o ciclo de Calvin, através do qual é realizada a fotossíntese nos cloroplastos. A denominação CAM foi dada a esse tipo de metabolismo por ter sido descoberto primeiramente em uma planta da família Crassulaceae, a qual apresentava elevados níveis de acidez em suas células fotossintéticas durante a noite, período em que há maior produção de ácido málico (MOORE et al., 1998).

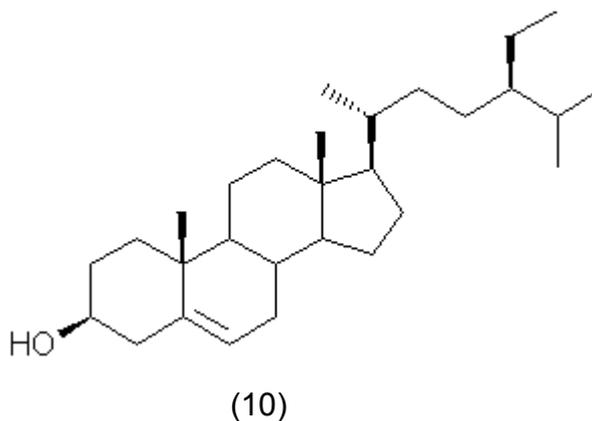
Com exceção de uma espécie do gênero *Rhipsalis*, encontrada em regiões tropicais da África e da Ásia, as cactáceas são nativas do continente

americano, sendo distribuídas desde o norte do Canadá até o sul da Argentina (ARIAS e PEREZ, 2006; NYFFELER, 2002). Habitam principalmente regiões áridas e semi-áridas do continente, apesar de também serem encontradas em locais de clima frio e úmido (ROJAS e YANEZ, 2000). Os principais centros de biodiversidade da família são o México, país que apresenta a maior variedade de espécies, e os Estados Unidos; Paraguai e as porções oeste, leste e sul do Brasil até o Uruguai; e as encostas centrais dos Andes, entre Peru, Bolívia, norte da Argentina e do Chile (ARIAS e PEREZ, 2006; NYFFELER, 2002; ORTEGA-BAES, 2010). No Brasil, a maior biodiversidade está presente nos estados da Bahia e de Minas Gerais, apesar de haver grande representatividade também no Rio de Janeiro (FREITAS, 1992). Provavelmente, a grande maioria dos cactos é originária das regiões sul e centro-oeste da América do Sul (EDWARDS et al., 2005).

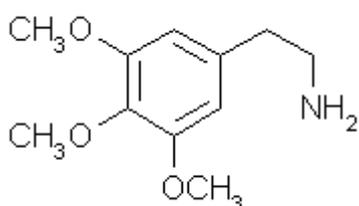
Desde muito tempo as cactáceas sofrem com a exploração devido à sua alta valorização no comércio de plantas ornamentais, já que chamam a atenção por conta de seus hábitos peculiares, espinhos, da beleza das flores e folhas vistosas, quando presentes (NYFFELER, 2002; ROJAS e YANEZ, 2000). Apesar de não serem muito apreciadas como plantas ornamentais na América Latina, são importantes no mercado europeu, asiático e norte-americano. Além disso, tanto o caule quanto as raízes, folhas, frutos e sementes de diversas espécies são utilizadas desde a época pré-colonial na medicina tradicional, na alimentação, em cerimônias religiosas, como forragem para gado de pequeno porte e até como corantes. Algumas plantas do gênero *Opuntia*, por exemplo, são cultivadas por serem parasitadas por *Dactylopius coccus*, inseto popularmente conhecido como cochonilha, que produz o ácido carmínico, o qual é utilizado como corante de tecidos e de alimentos. Várias espécies desse mesmo gênero são cultivadas devido ao caule e frutos comestíveis. Muitos países do continente americano e de regiões do Mediterrâneo são produtores de frutos de diversas outras cactáceas, como *Hylocereus spp.*, *Pereskia aculeata*, *Pereskia guamacho*, *Selenicereus setaceus* e *Stenocereus spp.* (ARIAS e PEREZ, 2006).

Dentre os constituintes químicos mais frequentemente encontrados em cactos estão os esteroides, em sua maioria  $\Delta^5$  esteróis (DAVET, 2005). Um estudo realizado por SALT, TOCKER e ADLER (1987) visou identificar os esteroides presentes em 8 espécies de cactáceas, representantes de 7 gêneros diferentes: *Echinopsis tubiflora*, *Pereskia aculeata*, *Hylocereus undatus*, *Notocactus scopa*,

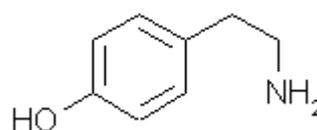
*Epiphyllum* sp., *Schlumbergera bridgesii*, *Opuntia comoduensis* e *Opuntia humifusa*. Em todas as espécies foram encontrados 24-alkil- $\Delta^5$ -esteróis, predominantemente o sitosterol (10). Outros esteroides foram identificados, como estigmasterol, avenasterol e sitostanol.



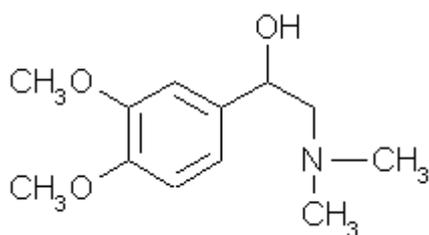
Diversas cactáceas já foram estudadas quanto à presença de alcaloides, constituintes químicos também comumente encontrados na família. BRUHN e BRUHN (1971) identificaram vários alcaloides em alguns cactos dos gêneros *Ariocarpus*, *Mammillaria*, *Obregonia*, *Pelecyphora*, *Solicia* e *Turbincarpus*, dentre eles a N,N-dimetil-3-hidróxi-4,5-dimetoxifenetilamina e N,N-dimetil-4-hidróxi-3-metoxifenetilamina. Os alcaloides do tipo feniletilamínicos são os mais frequentemente presentes, a exemplo da mescalina (11), muito conhecida por seus efeitos alucinógenos, hordenina (12) e a macromerina (13), que também pode causar alucinações por serem muito semelhantes à epinefrina (14) (CASADO et al., 2008; DAVET, 2005). Um estudo realizado por LIN e colaboradores (1991) demonstrou que a hordenina em sua forma glicosilada eleva a pressão arterial em ratos quando administrada via oral.



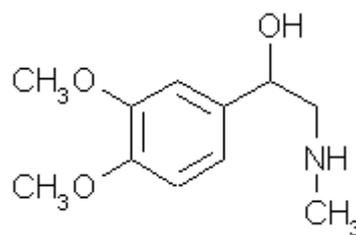
(11)



(12)



(13)



(14)

O cacto *Lophophora williamsii*, popularmente chamado de peiote, produz diversos alcaloides, principalmente a mescalina, responsável pelos seus efeitos alucinógenos semelhantes aos da dimetilamida do ácido lisérgico (LSD) (CASADO et al., 2008). O peiote era utilizado pelos Astecas e ainda hoje pelos indígenas mexicanos em cerimônias religiosas para produzir essas alucinações que, segundo a crença, permitem estabelecer o contato com os deuses (DEWICK, 2002). A mescalina também foi encontrada em espécies de *Pereskia*, *Pereskopsis* e *Islaya* por DOETSCH, CASSADY e MCLAUGHLIN (1980), que pesquisaram a presença desse alcaloide em 20 espécies distribuídas entre os três gêneros em questão.

Em *Echinocereus merkeri* foram encontrados os alcaloides feniletilamínicos N-metil-3,4-dimetoxifenetilamina, 3,4-dimetóxi-fenetilamina, 3-metóxitiramina e hordeína, além da salsolina, um alcalóide do tipo tetrahydroisoquinolínico (AGURELL et al., 1969). Em outra espécie do gênero, *Echinocereus triglochidiatus*, foi identificada a N,N-dimetilhistamina, que possui efeitos hipotensivos a nível periférico (FERRIGNI et al., 1982).

O gênero *Coryphanta* é um dos mais estudados, com diversos alcaloides já identificados, como hordenina, normacromerina, macromerina,  $\beta$ -fenetilamina, sinefrina, metanefrina, N-metilmetanefrina, (-)- $\beta$ -O-metilnormacromerina, (-)- $\beta$ -O-metilmacromerina, N-metil-3,4-dimetóxi-fenetilamina, e N-metil-4-metóxi- $\beta$ -fenetilamina (BELOW et al., 1978; BRUHN e AGURELL, 1974; HORNEMANN et al., 1972; KELLER et al., 1973).

A pilocereína isolada de *Lophocereus schottii* e *Pachycereus marginatus* é capaz de reduzir a pressão sanguínea em cães, galos e, em altas doses, em gatos. Esse alcaloide também parece possuir um efeito antimalárico (POWELL e CHEN, 1956).

Alcaloides do tipo tetrahydroisoquinolínicos também já foram identificados em espécies de cactáceas. Em *Pachycereus weberi* são encontradas a

nortehuanina, lemaireocercina, weberidina, weberina, heliamina, N-metilheliamina, tehuanaína e a pelotina (MATA e MCLAUGHLIN, 1980).

Os flavonoides normalmente encontrados em cactáceas são os flavonol-3-O-glicosídeos, como quercetina, campferol e isoramnetina; além de flavononóis, dihidroflavononóis e flavononas (CAI et al., 2010). A quercetina é um potente antioxidante que está quase sempre presente em grandes quantidades nas plantas, muitas vezes constituindo ao lado do campferol, antocianidinas e catequenas, um dos principais responsáveis pela atividade antioxidante de bebidas como chás e vinho tinto (DEWICK, 2002).

Não há muitos relatos a respeito da presença de triterpenos em cactáceas, mas algumas sapogeninas foram isoladas em vários membros da família, e parte delas demonstrou possuir atividade antinociceptiva. Recentemente foram isoladas onze novas saponinas a partir do cacto *Echinopsis macrogona* (OKAZAKI et al., 2010).

### **O gênero *Pereskia***

Os representantes do gênero *Pereskia* foram os primeiros cactos a serem estudados pelos botânicos, sendo descritos pela primeira vez no final do século XVII (LEUENBERGER, 2008). Abrange as espécies consideradas mais primitivas dentre as cactáceas, já que mantêm muitas características ancestrais perdidas em outros gêneros, como folhas fotossintéticas bem desenvolvidas e suculentas; caules finos, pouco espinhosos, sublenhosos ou lenhosos, e relativamente não suculentos; flores terminais dispostas em cimeiras; e hábitos arbóreos ou arbustivos. (DUARTE e HAYASHI, 2005; FARAGO et al., 2004; OGBURN, 2009). Além disso, estudos sugerem que, ao contrário do que ocorre com as outras espécies de cactáceas, a fotossíntese do tipo CAM é muito limitada no gênero *Pereskia*, que utiliza primordialmente a fotossíntese do tipo C3, considerada como menos evoluída, o que permite maiores condições de adaptação a ambientes moderadamente úmidos (EDWARDS et al., 2005; EDWARDS et al., 2006). Apesar de o gênero *Pereskia* ser visto como modelo geral de morfologia e fisiologia das condições ancestrais dos cactos, um estudo filogenético realizado por BUTTERWORTH e WALLACE (2005) sugere que, na verdade, *Maihuenia* seria o gênero mais primitivo da família.

O gênero *Pereskia* compreende 17 espécies: *P. aculeata*, *P. aureiflora*, *P. bahiensis*, *P. bleo*, *P. diaz-romeroana*, *P. guamacho*, *P. grandifolia*, *P. horrida*, *P. lychnidiflora*, *P. marcanoi*, *P. nemorosa*, *P. portulacifolia*, *P. quisqueyana*, *P. sacharosa*, *P. stenantha*, *P. weberiana*, e *P. zinniiflora* (EDWARDS et al., 2005).

As espécies de *Pereskia* ocorrem em regiões mésicas e levemente áridas do Caribe, América Central e América do Sul (DUARTE e HAYASHI, 2005; EDWARDS et al., 2005). Estão distribuídas desde o estado mexicano de Guerrero até o norte da Argentina, abrangendo as Antilhas, parte do estado da Flórida nos Estados Unidos, a costa leste dos Andes na Bolívia e Peru, Paraguai, Uruguai e leste do Brasil (Figura 3). Provavelmente, o noroeste da América do Sul foi o ponto de partida para a dispersão dessas espécies (BUTTERWORTH e WALLACE, 2005).

*P. grandifolia* e *P. bleo* estão entre as poucas espécies do gênero estudadas quanto às atividades biológicas. Na Malásia, ambas são utilizadas na medicina tradicional para o tratamento de doenças relacionadas ao câncer, dores de cabeça, dores de estômago, úlceras, hemorroidas, dermatite, diabetes, hipertensão, reumatismo, inflamação e para revitalizar o corpo. Na Índia, *P. grandifolia* é ainda utilizada para redução de edemas, enquanto no Panamá, *P. bleo* é usada para aliviar problemas gastrointestinais (SIM et al., 2010). No Brasil, *P. grandifolia* e *P. aculeata* são popularmente conhecidas como ora-pro-nóbis e suas folhas são empregadas na culinária regional. Na medicina tradicional são usadas como emolientes, por conta do alto conteúdo mucilaginoso que apresentam (FARAGO et al., 2004). Além disso, os frutos de *P. grandifolia* são tidos como expectorantes e antisifilíticos (TURRA et al., 2007).

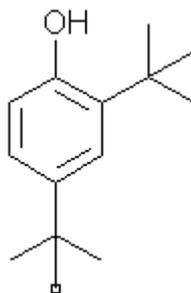


Figura 3 – Distribuição geográfica das espécies do gênero *Pereskia* (Fonte: adaptado de LEUENBERGER, 2008).

NURESTRI e colaboradores (2009) investigaram a atividade citotóxica do extrato metanólico e partições das folhas de *P. grandifolia* frente cinco diferentes linhagens de células de carcinoma humano. A partição hexânica apresentou notável atividade contra células de carcinoma epidermoide nasofaríngeo (linhagem KB), e a partição de acetato de etila demonstrou forte citotoxicidade diante de células KB e de células de adenocarcinoma de mama humano (linhagem MCF-7). Os autores ressaltaram que não foi encontrada citotoxicidade contra células de linhagem de fibroblastos humanos normais (linhagem MRC-5). As propriedades citotóxicas observadas foram atribuídas, principalmente, ao composto 2,4-di-terc-butilfenol (15), um antioxidante amplamente utilizado nas indústrias de plástico, cuja presença em plantas ainda não é bem elucidada do ponto de vista biogenético (MALEK et al., 2009). Alguns outros compostos também foram isolados, como o  $\beta$ -sitosterol e a vitamina E.

Um estudo realizado por TURRA e colaboradores (2007) objetivou avaliar as propriedades antioxidantes e antimicrobianas do extrato etanólico e partições das

folhas de *P. grandifolia*. Todavia, as propriedades antioxidantes se apresentaram relativamente baixas, e não foi observada atividade diante dos microorganismos testados.

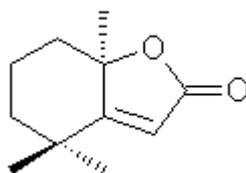


(15)

No estudo de SIM e colaboradores (2010), foram utilizados diferentes ensaios para a avaliação do potencial antioxidante do extrato e das partições das folhas de *P. grandifolia*. Foi observada significativa propriedade antioxidante da partição de acetato de etila no ensaio de inibição da formação de radicais de DPPH, enquanto a partição hexânica demonstrou possuir forte poder de redução. Os resultados obtidos foram atribuídos aos compostos 2,4-di-terc-butilfenol,  $\beta$ -sitosterol e vitamina E.

Além das atividades citotóxicas e antioxidantes de *P. grandifolia*, o extrato etanólico das folhas apresentou atividade analgésica (COSTA et al., 2003), ansiolítica e hipnótica sedativa (FANHANI et al., 2002) em modelos animais.

No caso da *P. bleo*, as atividades citotóxicas são tidas como as mais promissoras. O extrato metanólico das folhas demonstrou significativa citotoxicidade contra células do carcinoma mamário (linhagem T47-D), provavelmente por mecanismos via ativação da caspase-3, uma das enzimas ativadas durante o processo de apoptose, e do c-myc, um regulador do ciclo celular que quando expresso em excesso também induz a apoptose (TAN et al., 2005). A partição de acetato de etila das folhas demonstrou alta toxicidade contra células da linhagem KB, sem, no entanto, ser tóxica diante de fibroblastos normais. Essa citotoxicidade foi atribuída ao 2,4-di-terc-butilfenol e ao e fitol, isolados da partição em questão. Outros constituintes tóxicos para diferentes linhagens de células cancerígenas também já foram isolados da partição acetato de etila, como o diidroactinidiolideo (16) (MALEK et al., 2008; MALEK et al., 2009).



(16)

Além das propriedades citotóxicas de *P. bleo*, o estudo de WAHAB e colaboradores (2009) demonstrou que o extrato hexânico das folhas apresenta forte atividade antioxidante e antimicrobiana contra algumas estirpes de bactérias.

Outros estudos mostraram que de *P. grandifolia* foram isoladas duas saponinas do ácido oleanoico (SAHU et al., 1974). Em *P. aculeata* foram identificados os esteroides  $\beta$ -sitosterol e estigmasterol (SALT, TOCKLER e ADLER, 1987). Nesta mesma espécie e em *P. guamacho* foram encontrados biopolímeros polissacarídeos, como arabinogalactano e galactomananas (MERCÊ et al., 2001; TURRA et al., 2007). Mescalina e alguns outros alcaloides fenetilamínicos também já foram isolados de algumas plantas do gênero (DOETSCH, CASSADY e MCLAUGHLIN, 1980).

### **A espécie *Pereskia aculeata* Miller**

*Pereskia aculeata* Miller (sinonímia: *Pereskia pereskia* Karst.; *Cactus Pereskia* L.) é uma trepadeira arbustiva adaptada apenas a baixas altitudes, e habita preferencialmente as orlas e clareiras de florestas. Provavelmente, tem origem nas Índias Ocidentais, norte da América do Sul e Panamá (MORTON, 1987; ROSA e SOUZA, 2003). No Brasil está distribuída naturalmente pela Mata Atlântica, desde o Rio Grande do Sul até a Bahia (Figura 4) (MERCÊ et al., 2001).

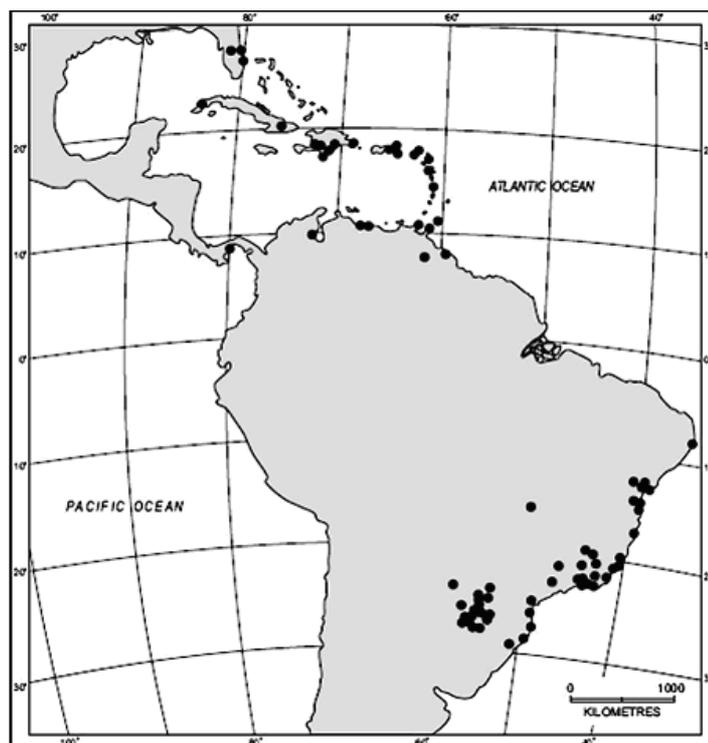


Figura 4 – Distribuição geográfica de *Pereskia aculeata* Miller (Fonte: adaptado de PETERSON et al., 2009).

Ainda quando jovem, *P. aculeata* é um arbusto ereto, mas se torna uma trepadeira semi-lenhosa quando adulta, podendo atingir até 10 metros de comprimento. Possui espinhos pequenos, curvos e geralmente aos pares nos ramos; enquanto são longos, finos e em grupos no caule. Este apresenta uma estrutura secundária incipiente, com epiderme unisseriada, parênquima cortical com numerosos amiloplastos, colênquima angular, calotas de fibras perivasculares e organização vascular colateral. São encontradas drusas de oxalato de cálcio no floema e em várias cavidades do córtex e da medula dotadas de um conteúdo mucilaginoso (DUARTE e HAYASHI 2005; MORTON, 1987).

O fruto pode ser redondo, oval ou piriforme, de coloração vermelha, amarelo-alaranjada ou verde. Possui de 1 a 2 cm de largura, e está envolvido por folhas lanceoladas e acúleos. É do tipo cactídeo, pomáceo e caracterizado por possuir hipanto carnoso, pericarpo e massa gelatinosa, onde estão presentes de uma a cinco sementes marrons ou pretas, de cerca de 4 mm de comprimento. Estas são exotestais e originam-se do óvulo crassinucelado, bitegmentado e anfítropo; possuem reserva perispérmica e resíduos de endosperma. O embrião é curvo,

apresenta dois cotilédones, mesófilo homogêneo e plúmula indiferenciada (MORTON, 1987; ROJAS e YANES, 2000; ROSA e SOUZA, 2003).

A flor possui de 2,5 a 4,5 cm de diâmetro, e, para muitos, tem aroma de limão. Pode se apresentar nas cores branca, amarela ou rosa. É perígina, de bractéolas verdes e acúleos no hipanto (MORTON, 1987; ROSA e SOUZA, 2003).

A folha, com cerca de 7 cm de comprimento e 3 cm de largura, é simples, elíptica, simétrica e de textura coriácea. A epiderme é uniestratificada, os estômatos são paracíticos, e o mesófilo apresenta várias drusas de oxalato de cálcio e células mucilaginosas. A base é aguda, o ápice é agudo-acuminado, a margem inteira e a nervação hipódroma, porém apenas a nervura central é bem visualizada. O pecíolo é curto, e duas a seis folhas com espinho axilar emergem agrupadas em ramos laterais alternos (ROSA e SOUZA, 2003).



Figura 5 – *Pereskia aculeata* Miller: a) Caule dotado de folhas largas peculiares do gênero e flores; b) Espinhos curvos nas axilas de folhas jovens e espinhos retos partindo da aréola; c) Fruto maduro (Fonte: adaptado de LEUENBERGER, 2008).

A espécie é conhecida por diferentes nomes populares, dependendo da região em que habita. Em Cuba é chamada de *grosellero* ou *ramo de novia*, no México de *huganvilla blanca*, na Venezuela de *guamacho*, e no Suriname de *bladappel*. Apresenta também diversos nomes em inglês: *Barbados gooseberry*, *West Indian gooseberry*, *Spanish gooseberry*, *lemon vine*, *sweet Mary*, *leaf cactus*, *blade apple*, e *gooseberry shrub* (MORTON, 1987). No Brasil é conhecida principalmente como ora-pro-nobis, mas também como lobrobrô, trepadeira-limão e “carne de pobre” (DUARTE e HAYASHI, 2005; GIRÃO et al., 2003; PEREIRA et al., 2007).

*P. grandifolia* e *P. aculeata* podem ser facilmente confundidas, principalmente quando não férteis. A distinção pode ser feita pela coloração das

flores: normalmente, *P. grandifolia* apresenta flores roxas, enquanto *P. aculeata* possui flores amarelas. Além disso, *P. grandifolia* é cultivada para fins ornamentais, especialmente para formar cercas vivas; já *P. aculeata* é tradicionalmente utilizada como um alimento, pois suas folhas são comestíveis e muito apreciadas em diversas regiões do país (FARAGO et al., 2004; PEREIRA et al., 2007).

O Instituto Nacional de Alimentação e Nutrição (INAN) incluiu a ora-pro-nobis entre os ingredientes de uma multimistura de consumo rotineiro que foi proposta e divulgada por esse órgão do Ministério da Saúde para auxiliar no combate à fome das populações mais carentes do país (FARFAN, 1998). O valor nutricional de *P. aculeata* está associado, principalmente, ao alto teor de proteínas encontrado nas folhas. Em muitas comunidades de baixo poder aquisitivo é tida como a principal fonte proteica, razão pela qual é apelidada de “carne de pobre” (GIRÃO et al., 2003; PEREIRA et al., 2007). Diversos estudos confirmaram os elevados teores de proteínas das folhas, calculados entre 19,6% e 25,5%, sendo a lisina e o triptofano os aminoácidos mais abundantes. Tais pesquisas ainda demonstraram notáveis teores de fibras dietéticas, de minerais como cálcio, ferro, zinco, manganês e magnésio; de vitaminas A, C e B9; e baixos níveis de lipídeos e calorias (GIRÃO et al., 2003; MERCÊ et al., 2001; ROCHA et al., 2008; TAKEITI et al., 2009). Muitos desses fatores nutricionais são encontrados em proporções superiores àquelas observadas em outros vegetais utilizados na alimentação humana, como o repolho, alface e espinafre (MORTON, 1987). Um estudo realizado por NATCHTIGALL e colaboradores (2007) demonstrou que a ora-pro-nobis é fonte rica de carotenoides, especialmente luteína, apresentando teores mais elevados do que muitas hortaliças comumente consumidas. Os autores ressaltam que a luteína é um potente antioxidante capaz de prevenir doenças dos olhos, como a degeneração macular relacionada à idade (DMRI) e a catarata.

Além de utilizadas na alimentação humana, as folhas de *P. aculeata* são empregadas na medicina popular como emolientes devido ao alto conteúdo mucilaginoso, na cicatrização de pele em casos de queimaduras e ainda no abrandamento de processos inflamatórios (BARROS et al., 2010; DUARTE e HAYASHI, 2005, SARTOR et al., 2010). Os frutos são tidos como expectorantes e antissifilíticos (ROSA e SOUZA, 2003).

Os estudos desenvolvidos por SARTOR e colaboradores (2010) e BARROS e colaboradores (2010) visaram avaliar, respectivamente, a ação

cicatrizante do extrato e de uma pomada contendo extrato das folhas de *P. aculeata* em ratos. Os resultados sugerem que deve haver uma contribuição do extrato no processo de cicatrização de feridas cutâneas nesses animais, porém em ambos os casos os autores ressaltam que é necessária uma amostragem maior de cobaias a fim de comprovar tal ação.

A arabinogalactana e as galactomananas encontradas nas folhas de *P. aculeata* possuem uma potencial aplicação comercial em função da possibilidade de serem associadas aos íons  $\text{Fe}^{+2}$ ,  $\text{Co}^{+2}$ ,  $\text{Cu}^{+2}$ ,  $\text{Mn}^{+2}$  e  $\text{Ni}^{+2}$ . Os biopolímeros obtidos de plantas têm sido alvos de diversos estudos, uma vez que dependendo da estrutura química podem ter utilidades em processos aditivos nas indústrias alimentícias, farmacêuticas, de papel e de tintas, por conta de suas propriedades reológicas e a peculiar capacidade de complexação com íons metálicos essenciais (MERCÊ et al., 2001; TURRA et al., 2007). Os heteropolissacarídeos das folhas de *P. aculeata* contêm unidades de arabinofuranose, arabinopirranose, galactopirranose, ácido galactopiranosil urônico, ramnopirranose e glicopirranose (SIERAKOWSKI et al., 1990).

Como anteriormente relatado, os esteroides  $\beta$ -sitosterol e estigmasterol foram identificados em *P. aculeata*. Os esteroides presentes nas plantas, ou fitoesteróis, são encontrados em uma variedade de famílias, incluindo diversos vegetais consumidos na dieta. Dentre eles, o  $\beta$ -sitosterol é o mais frequente, podendo representar até 65% do total de esteroides de uma planta. Muitas pesquisas têm demonstrado que fitoesteróis e seus derivados exercem efeitos protetores contra algumas doenças crônicas, como arteriosclerose, câncer, úlcera e inflamações. Estudos realizados em animais demonstraram que uma mistura de fitoesteróis frequentemente encontrados na dieta inibe o crescimento de células cancerígenas e reduz o tamanho de tumores e a incidência de câncer de cólon, mama e próstata induzidos por agentes carcinógenos específicos. Além disso, estudos *in vitro* mostram que esses esteroides em concentrações bem baixas, principalmente o  $\beta$ -sitosterol, inibem a proliferação celular e induzem a apoptose em linhagens de células de câncer de fígado, próstata, mama, cólon e de fibrosarcoma murino (ZHAO et al., 2009).

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVOS GERAIS

Caracterizar os constituintes químicos das folhas de *P. aculeata* e avaliar o seu potencial biológico e farmacológico através de ensaios *in vitro* e modelos experimentais *in vivo*.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Realizar ensaios *in vitro* com o extrato metanólico e partições a fim de:

- Identificar as principais classes de metabólitos especiais presentes;
- Determinar o teor de fenóis totais e flavonoides;
- Avaliar a atividade antitumoral pelo método do MTT frente às linhagens celulares HL60 e MCF-7;
- Avaliar a atividade antimicrobiana pelo ensaio de susceptibilidade de microdiluição em caldo;
- Avaliar a atividade leishmanicida pelo método do MTT;
- Avaliar a atividade citotóxica diante de células normais de mamíferos.

Desempenhar estudos *in vivo* a fim de avaliar as atividades:

- Anti-inflamatória pelo método de edema de orelha induzido pelo óleo de cróton para o extrato bruto metanólico;
- Antinociceptiva pelo método de contorções abdominais induzidas pelo ácido acético para o extrato bruto metanólico e partições hexânica, diclorometânica e hidrometanólica;
- Antinociceptiva pelos testes da formalina e da retirada da cauda (*tail-flick*) para a partição hidrometanólica;
- Verificar se o mecanismo de ação da atividade antinociceptiva da partição hidrometanólica envolve a síntese ou liberação de serotonina, por meio do tratamento com *p*-clorofenilalanina (PCPA) seguido do teste de contorções abdominais induzidas pelo ácido acético.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Material vegetal

As folhas de *P. aculeata* foram coletadas em Juiz de Fora, Minas Gerais, Brasil, em agosto de 2010 no período da manhã. Uma exsicata foi depositada no herbário Leopoldo Krieger CESJF da UFJF sob o número 57539 e identificada pela Dra. Daniela Zappi (Royal Botanic Gardens, Kew).

#### 3.2 Preparo do extrato bruto metanólico e partições

As folhas coletadas foram secas à sombra, em local ventilado e em temperatura ambiente (25°C), durante quinze dias. Depois de seco, o material (aproximadamente 1 kg) foi moído e submetido à extração por maceração estática com metanol, à temperatura ambiente, até a exaustão. Em seguida, o extrato foi concentrado à pressão reduzida utilizando-se evaporador rotatório para obtenção do extrato bruto metanólico (EBM - 156 g), um resíduo pastoso de coloração verde escura. Desta forma, o rendimento do extrato foi de 14%.

Após a completa remoção do solvente, 140 g do EBM foram ressuspensos em metanol:água (8:2; v/v) e, em seguida, particionados com solventes em ordem crescente de polaridade: hexano, diclorometano, acetato de etila e butanol. Esse processo gerou um remanescente hidrometanólico e um precipitado insolúvel. Os solventes foram evaporados utilizando-se evaporador rotatório e as partições hexânica (PHEX – 38 g), diclorometânica (PDCM – 12 g), em acetato de etila (PAC – 1 g), butanólica (PB – 7 g), hidrometanólica (PHM – 12 g) e o precipitado insolúvel (PPTi – 37 g) foram pesados e mantidos sob refrigeração. Os rendimentos para PHEX, PDCM, PAC, PB, PHM e PPTi foram, respectivamente, 27%; 8%; 0,7%; 5%; 9%; e 26% (Figura 6). O rendimento total do processo de partição foi de 76%.

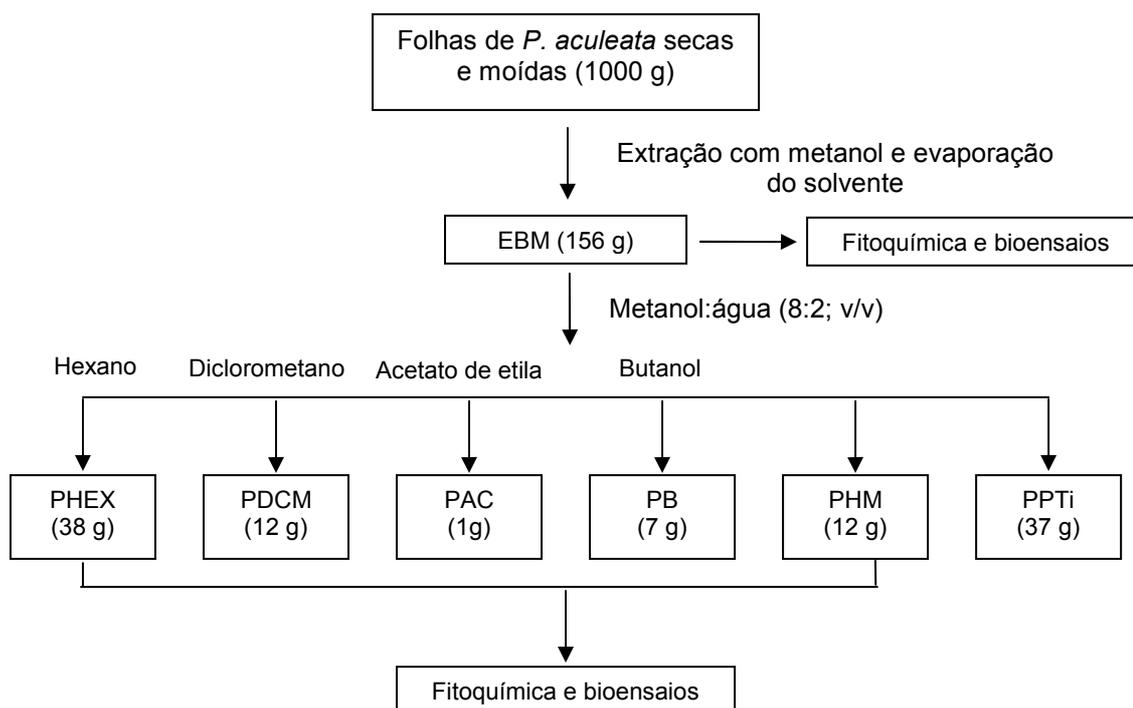


Figura 6 – Esquema da extração e partição das folhas de *P. aculeata*.

### 3.3 Caracterização fitoquímica preliminar

O EBM e partições foram submetidos à triagem fitoquímica preliminar em cromatografia de camada delgada (CCD) utilizando os métodos propostos por BLADT e colaboradores (1984) com modificações, a fim de verificar a presença das principais classes de metabólitos especiais. A CCD foi realizada em placas cromatográficas revestidas com silicagel 60 F<sub>254</sub> (Merck®). Foram aplicados na cromatoplaça 10 µL de cada amostra, e a eluição foi realizada com as seguintes fases móveis: diclorometano:metanol (9:1; v/v) para EBM, hexano:acetato de etila (7:3; v/v) para PHEX, hexano:acetato de etila (5:5; v/v) para PDCM, diclorometano:metanol (9:1; v/v) para PAC, diclorometano:metanol (7:3; v/v) para PB, e acetato de etila:metanol (5:5; v/v) para PHM. Após a evaporação do eluente, as cromatoplaças foram nebulizadas com soluções reveladoras específicas para a identificação dos metabólitos especiais.

*Revelação com cloreto férrico (FeCl<sub>3</sub>) 1%*

Dissolveu-se 1 g de  $\text{FeCl}_3$  em 100 mL de etanol, e posteriormente a solução reveladora foi nebulizada nas placas cromatográficas, as quais foram observadas sob luz visível e luz UV 365 nm. Compostos fenólicos foram identificados por bandas escuras, taninos hidrolisáveis por bandas azuis e taninos condensados por bandas verdes.

*Revelação com hidróxido de potássio (KOH) 5%*

Dissolveu-se 5 g de KOH em 100 mL de metanol, e posteriormente a solução reveladora foi nebulizada nas placas cromatográficas, as quais foram observadas sob luz UV 365 nm. Bandas azuis indicaram a presença de cumarinas, bandas vermelhas de antraquinonas, e bandas amarelas de antronas e antranóis.

*Revelação com NP/PEG*

Preparou-se uma solução de ácido difenilbórico  $\beta$ -etilaminoéster (NP) 1% em metanol, e uma solução de polietilenoglicol (PEG) 5% em metanol. A primeira foi nebulizada nas placas cromatográficas, e, imediatamente após, foi nebulizada a segunda. Fluorescências amarelas e alaranjadas observadas sob luz UV 365 nm indicaram a presença de flavonoides.

*Revelação com cloreto de alumínio ( $\text{AlCl}_3$ ) 1%*

Foram adicionados 100 mL de etanol a 1 g de  $\text{AlCl}_3$  para se obter uma solução a 1%. A solução foi nebulizada nas placas cromatográficas, as quais foram observadas sob luz UV 365 nm. Fluorescências amarelas indicaram a presença de flavonoides.

*Revelação com reagente de Dragendorff*

Dissolveu-se 8 g de subnitrato de bismuto em 20 mL de ácido nítrico diluído a 30%. Separadamente, 22,8 g de iodeto de potássio foram dissolvidos em um volume mínimo de água deionizada. A primeira solução foi vertida pouco a pouco sobre a segunda. A solução foi então agitada, deixada em repouso por algumas

horas, filtrada e o volume completado com água deionizada para 100 mL. Posteriormente, a solução reveladora foi nebulizada nas placas cromatográficas, as quais foram observadas sob luz visível. Bandas amarelas, alaranjadas ou marrons indicaram a presença de alcaloides.

#### *Revelação com reagente de Liebermann-Burchard*

Em banho de gelo, misturou-se cuidadosamente 5 mL de anidrido acético e 5 mL de ácido sulfúrico 97%, e, em seguida, foram adicionados 50 mL de etanol. Posteriormente, a solução reveladora foi nebulizada nas placas cromatográficas, as quais foram aquecidas a 110 °C por 10 min e observadas sob luz visível. Bandas verdes indicaram a presença de esteroides, enquanto bandas de coloração vermelha a roxa indicaram a presença de triterpenos.

#### *Identificação de saponinas*

Em um tubo de ensaio foi colocado 1 mL da amostra solubilizada em metanol e aproximadamente 2 mL de água destilada. O tubo foi agitado vigorosamente e colocado em repouso por 20 min. A presença de espuma persistente com aproximadamente 1 cm de altura indicou a presença de saponinas (MATOS et al., 1997).

### **3.4 Determinação do conteúdo de fenóis totais**

O conteúdo de compostos fenólicos totais de EBM e partições foi determinado pelo método de Folin-Denis (DUH e YEN, 1997). Uma solução estoque em etanol de EBM e partições de 0,5 mg/mL foi preparada e 1 mL da mesma foi misturado com 1 mL do reagente de Folin-Denis e 8 mL de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 2% em tampão NaOH 0,1 N. A mistura foi agitada e após 60 min de incubação em banho-maria a 30 °C, foi centrifugada a 3000 rpm por 5 min. A absorbância do sobrenadante foi mensurada a 730 nm em espectrofotômetro. O branco foi preparado com 1 mL de etanol, 1 mL do reagente de Folin-Denis e 8 mL de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 2% em tampão NaOH 0,1 N. Para a preparação da curva de calibração foram misturados 0,05; 0,1; 0,2; 0,3; 0,4 e 0,5 mL de solução de ácido tânico (1 g/L), substância de referência, com

qsp 1 mL de etanol. Em seguida, foi realizado o mesmo procedimento descrito para EBM e partições e a curva de calibração foi construída. Todas as determinações foram realizadas em triplicata. O conteúdo de compostos fenólicos foi expresso em mg/g de extrato, em equivalentes de ácido tânico (EAT).

### **3.5 Determinação do conteúdo de flavonoides**

O conteúdo de flavonoides foi determinado pelo método descrito por MILIAUSKAS, VENSKUTONIS e VAN-BEEK (2004), com modificações. Uma solução estoque em etanol de EBM e partições 0,5 mg/mL foi preparada e 1 mL da mesma foi misturado com 1 mL de  $\text{AlCl}_3$  2% em etanol e 1 gota de ácido acético. O volume foi completado com etanol para 25 mL. Após incubação por 40 min a 20 °C e ao abrigo da luz, a absorbância foi mensurada a 415 nm. A curva de calibração foi preparada misturando-se 0,1; 0,25; 0,5; 1,0 e 2,0 mL de uma solução etanólica de rutina (0,5 mg/mL), substância de referência, com 1 mL de  $\text{AlCl}_3$  2% em etanol qsp 25 mL. Em seguida, foi realizado o mesmo procedimento descrito para o EBM e partições. O branco foi preparado com 1 mL da amostra em etanol qsp 25 mL e 1 gota de ácido acético. Todas as determinações foram realizadas em triplicata. O conteúdo total de flavonoides foi expresso em mg/g de extrato, em equivalentes de rutina (ER).

### **3.6 Determinação da presença de compostos indólicos**

Para a verificação da presença de compostos com grupamento indólico foi utilizada a reação de HOPKINS e COLE (1901). Em um tubo de ensaio, uma pequena quantidade de EBM ou partições foi solubilizada em uma solução de ácido glioxílico. Com o tubo inclinado, foi adicionada lentamente uma solução de ácido sulfúrico concentrada. A formação de um anel violeta indicou a presença de compostos indólicos.

### **3.7. Determinação do perfil cromatográfico por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência para a partição hidrometanólica**

O perfil cromatográfico de PHM foi determinado por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE). A análise foi realizada em coluna de fase reversa C<sub>18</sub> (25 cm x 4,6 cm x 5 µm) com gradiente linear de solventes A (acetonitrila:água; 5:95; v/v) e B (acetonitrila:água; 90:10; v/v) acidificadas com ácido fosfórico até pH 4, variando de 0 a 100% de B em 30 min; fluxo de 1 mL/min, concentração da amostra de 1 mg/mL, volume de injeção de 20 µL, e a temperatura de 25 °C; a detecção UV foi feita no comprimento de onda de 210 nm. O espectro UV foi determinado utilizando a varredura entre 190 e 400 nm.

### **3.8 Atividades biológicas *in vitro***

#### **3.8.1 Atividade antitumoral**

A determinação da atividade antitumoral foi avaliada pela inibição da viabilidade celular, através da metabolização do MTT. O ensaio foi realizado no Departamento de Fisiologia e Biofísica do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG.

Foram utilizadas duas linhagens de células tumorais: células HL60 (leucemia promielocítica humana) e células MCF-7 (células de adenocarcinoma de mama humano). As suspensões de células HL60 e MCF-7 foram utilizadas na concentração de 50.000 células/poço e 40.000 células/poço (placas de 96 poços), respectivamente. Todas as células foram incubadas por 24h a 37 °C, 5% de CO<sub>2</sub> para estabilização. Após esse período de estabilização, as células foram incubadas com EBM 100 µg/mL, partições 50 µg/mL, etoposídeo 10 µM (controle positivo) ou DMSO 0,05% (controle do solvente) por 48h em atmosfera de 5% CO<sub>2</sub> e 100% de umidade, 37 °C. Todas as soluções foram preparadas em DMSO 0,05%.

O ensaio para avaliação de viabilidade e proliferação celular é baseado na capacidade das células viáveis de realizarem a redução metabólica do brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium (MTT) em formazan, e permite avaliar tanto a proliferação quanto a viabilidade celular. A metodologia utilizada foi descrita por Monks e colaboradores (1991), com modificações. Faltando quatro horas para o final do período de 48h de incubação das culturas, foram adicionados a cada poço (contendo 200 µL finais), 20 µL de uma solução de MTT (2,5 mg/mL). Após as quatro horas restantes de incubação com formação dos cristais de formazan, o sobrenadante foi cuidadosamente retirado à vácuo. A cada poço foram adicionados

200 µL de uma solução de HCl 0,04 M em isopropanol. Após solubilização dos cristais de formazan, as placas foram lidas em leitor de ELISA a um comprimento de onda de 595nm. O experimento foi realizado em triplicata.

### 3.8.2 Atividade antimicrobiana

A atividade antimicrobiana foi avaliada para EBM e partições sobre estirpes das bactérias *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Shigella dysenteriae* ATCC 13313, *Salmonella typhimurium* ATCC 13311, *Escherichia coli* ATCC 10536, *Enterobacter cloacae* ATCC 23355 e *Enterococcus faecalis* ATCC 29212. Foi realizado em duplicata o ensaio de susceptibilidade de microdiluição em caldo, usando o método descrito pelo National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS, 2002). EBM e partições foram solubilizados em DMSO 0,3% e testados em diferentes diluições a partir de 1 mg/mL. Cloranfenicol foi utilizado como substância de referência.

### 3.8.3 Atividade leishmanicida

A avaliação da atividade leishmanicida foi realizada no Laboratório de Parasitologia no Instituto de Ciências Biológicas da UFJF. O ensaio foi realizado com o EBM e partições utilizando o método colorimétrico do MTT (MOSSMAN, 1983).

As cepas de referência utilizadas foram *L. major* (MRHO/SU/59/P), *L. braziliensis* (MHOM/BR/M2903), *L. chagasi* (MHOM/BR/PP75) e *L. amazonensis* (IFLA/BR/67/PH8). As formas promastigotas de *L. amazonensis* foram cultivadas em meio Warren (Infusão de coração e cérebro - BHI, acrescentado de hemina e ácido fólico) (WARREN, 1960); *L. major* e *L. braziliensis* foram cultivadas em meio BHI suplementado com L-glutamina (RODRIGUES et al., 2006); *L. chagasi* em meio 199, suplementados com 10% de soro bovino fetal e mantidas à 26 °C através de repiques realizados em intervalo de quatro dias, sendo coletadas em fase logarítmica de crescimento.

As formas promastigotas de *L. major*, *L. braziliensis*, *L. chagasi* e *L. amazonensis* obtidas a partir da fase logarítmica de crescimento foram contadas em câmara de Neubauer e concentradas a  $2 \times 10^6$  células/mL (*L. amazonensis*) e  $3 \times 10^6$

células/mL (*L. major*, *L. braziliensis*, *L. chagasi*) em placa de 96 poços e incubadas à 26 °C. As amostras testadas foram adicionadas em diferentes concentrações após diluição em água ou DMSO (100 a 6,25 µg/mL), sendo que a maior concentração utilizada de DMSO foi de 0,8% (v/v), que não é tóxica para os parasitos. Em alguns poços não houve adição de amostras, os quais foram utilizados como controle. Os testes foram realizados em três experimentos independentes, e cada concentração foi testada em duplicata. A concentração máxima utilizada foi de 100 µg/mL. Após 72 horas de incubação em estufa à 26 °C, adicionou-se 10 µL de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2-5 difenil tetrazólico (MTT) à 5 mg/mL em cada poço e a placa permaneceu incubada por mais quatro horas sob as mesmas condições. A reação foi interrompida pela adição de 100 µL de 2-propanol/ácido clorídrico (solução de 2-propanol/HCl a 0,4%) e o material dissolvido foi analisado em espectrofotômetro à 570 nm. Os resultados foram expressos em porcentagem de inibição em relação ao controle. A partir do teste de viabilidade celular foi determinada a concentração inibitória (CI<sub>50</sub>) para cada composto que representa a concentração molecular que inibe 50% do crescimento parasitário. Foram desempenhados três experimentos independentes realizados em duplicata. Anfotericina B nas concentrações de 5 µg/mL, 1 µg/mL e 0,5 µg/mL foi utilizada como fármaco de referência.

#### **3.8.4 Avaliação da citotoxicidade em células de mamíferos**

A fim de se verificar a citotoxicidade em células de mamíferos, utilizou-se macrófagos peritoneais de camundongos Balb/c estimulados com 1 mL de tioglicolato estéril (3%) por 72 h antes de serem eutanasiados. Os macrófagos foram obtidos após lavado peritoneal com 5 mL de solução de Hank's estéril. As células foram centrifugadas por 10 min a 1000 rpm, o sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuspendido em meio RPMI-1640, sendo retirada uma alíquota para a contagem em câmara de Neubauer. Após contagem, foram adicionados 100 µL de uma cultura de  $2 \times 10^6$  células/mL em meio RPMI-1640 contendo 10% de soro fetal bovino em cada poço de uma placa de 96 poços, a qual permaneceu por 24 h em estufa com 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C para os macrófagos aderirem à placa. Em seguida cada poço foi lavado com PBS estéril e foram novamente adicionados meio RPMI-1640 e soro bovino fetal. Na sequência, as amostras a serem testadas foram

adicionadas nas mesmas concentrações utilizadas no ensaio antipromastigota de *Leishmania*. As células foram mantidas em estufa à 37°C; 5% de CO<sub>2</sub>. Após 72 h de tratamento, a viabilidade dos macrófagos foi determinada pelo método do MTT como descrito anteriormente, e confirmada pela comparação da morfologia dos macrófagos tratados com o grupo controle (solvente), via microscópio óptico invertido. Cada concentração das amostras foi avaliada em duplicata e foram estimados os valores de CI<sub>50</sub>, que representam a concentração molecular que inibe 50% da proliferação celular. Anfotericina B nas concentrações de 5 µg/mL, 1 µg/mL e 0,5 µg/mL foi utilizada como fármaco de referência.

### **3.9 Atividades farmacológicas *in vivo***

#### **3.9.1 Animais**

Para avaliação das atividades antinociceptiva e anti-inflamatória foram utilizados camundongos albinos machos Swiss pesando entre 25 e 30 g, e para a avaliação da atividade cicatrizante utilizou-se ratos machos Wistar pesando entre 200 e 300 g. Os animais, provenientes do Centro de Biologia da Reprodução (CBR) da UFJF, foram alojados em gaiolas e mantidos sob condições controladas de temperatura (22°C) e iluminação (ciclo de claro/escuro de 12 h) com livre acesso à água e ração. Antes da realização de cada teste, os animais foram deixados em jejum por um período de 12 horas e com livre acesso à água. Os grupos foram constituídos de 6-8 animais. Todos os protocolos experimentais e procedimentos estão de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foram aprovados pela Comissão de Ética na Experimentação Animal (CEEA) da Pró-Reitoria de Pesquisa/UFJF (Protocolo COBEA nº 009/2009).

#### **3.9.2 Atividade antinociceptiva**

##### **3.9.2.1 Teste de contorções abdominais induzidas por ácido acético**

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

em água destilada. A administração de ácido acético por via intraperitoneal provoca irritação da membrana serosa, o que ocasiona movimentos estereotipados, os quais são caracterizados por contração da musculatura abdominal (contorções abdominais), juntamente com a extensão de uma das patas posteriores (KOSTER, ANDERSON e DE DEBEER, 1959).

Para o ensaio, foi utilizado um grupo controle negativo, ao qual foi administrado o veículo; um grupo controle positivo, tratado com indometacina 10 mg/kg; e um grupo teste, tratado com EBM, PHEX, PDCM ou PHM 100 mg/kg. Estudos mais profundos da atividade antinociceptiva foram realizados para PHM, também testada nas doses de 200 e 300 mg/kg. Todas as soluções foram preparadas em salina com 12% de Tween 80 (v/v), e administradas via oral no volume de 10 mL/kg com auxílio de uma cânula para gavage. Os animais receberam o tratamento e após 60 min foi administrada por via intraperitoneal uma solução de ácido acético a 0,6% no volume de 10 mL/kg. Durante 30 minutos o número total de contorções abdominais (movimentos repetidos e característicos de contração da parede abdominal, rotação do corpo e extensão das patas traseiras) foi observado e a intensidade da nocicepção foi quantificada pelo número total de contorções abdominais durante o período observado. Os resultados foram expressos como média do número acumulado de contorções.

### **3.9.2.2 Teste da formalina**

O procedimento usado para a indução de dor de mediação central e periférica foi uma adaptação do método de HUNSKAAR, FASMER e HOLE (1985). Uma hora antes do experimento, os animais foram tratados via oral com auxílio de uma cânula para gavage com salina contendo 12% de Tween 80 (v/v) (veículo), indometacina 10 mg/kg (controle positivo) ou com PHM nas doses de 100, 200 e 300 mg/kg. O volume de todas as soluções administradas via oral foi de 10 mL/kg. Uma solução de morfina 7,5 mg/kg diluída em salina (controle positivo) também foi administrada no volume de 10 mL/kg, porém via intraperitoneal e 45 min antes do experimento.

Após os tratamentos, foram aplicados 20 µL de uma injeção subcutânea subplatar de formalina (solução de formol a 2% em salina estéril) na pata posterior direita do animal. Após a injeção da formalina, os animais foram colocados

individualmente dentro de um funil de vidro invertido, com o auxílio de um espelho para facilitar a observação, e em seguida, o tempo de lambida da pata afetada foi cronometrado durante 30 min. Os 5 min iniciais, após a administração de formalina (1<sup>o</sup> fase), correspondem à dor de origem neurogênica desencadeada por esse agente nociceptivo. A 2<sup>a</sup> fase, que ocorre entre 15 a 30 min após a administração de formalina, representa a resposta tônica à nocicepção, acompanhada de uma resposta relacionada à liberação de mediadores inflamatórios. O tempo em que o animal permaneceu lambendo ou mordendo a pata injetada com formalina (*licking-time*) foi quantificado cumulativamente em segundos como índice de nocicepção.

### **3.9.2.3 Teste da retirada da cauda (*Tail-Flick*)**

A atividade antinociceptiva foi também analisada pelo teste da retirada da cauda, conhecido por *tail-flick*, como descrito previamente por D'AMOUR e SMITH (1941).

Neste teste, o camundongo foi imobilizado no interior de um pequeno cilindro de plástico rígido e com ventilação, de tal forma que a cauda permaneceu para o lado de fora do tubo. O terço medial da cauda foi imerso num banho-maria (55 °C ±1) e verificou-se o tempo de permanência da cauda na água, que não deve ser superior a 15 segundos para minimizar os danos tissulares. Assim, foram obtidos dois valores basais com intervalos de 20 min. Posteriormente, os camundongos foram tratados via oral com auxílio de uma cânula para gavage com veículo (salina com 12% de Tween 80 v/v) ou com PHM nas doses de 100, 200 e 300 mg/kg no volume de 10 mL/kg. Uma solução de morfina 7,5 mg/kg diluída em salina (controle positivo) também foi administrada, porém via intraperitoneal 10 mL/kg. Após 1h dos tratamentos via oral e 30 min da administração de morfina, a resposta foi novamente avaliada em intervalos de 20 min durante 120 min (tempos 0, 20, 40, 60, 80, 100 e 120 minutos).

### **3.9.2.4 Teste de contorções abdominais induzidas por ácido acético em animais pré-tratados com para-clorofenilalanina**

Para verificar se o mecanismo de ação de PHM envolve a síntese ou liberação de serotonina, o teste de contorções abdominais induzidas por ácido

acético foi novamente realizado. Todavia, os animais foram divididos em 4 grupos: veículo + salina, veículo + PCPA, PHM + salina e PHM + PCPA. Durante 3 dias consecutivos, uma vez por dia, os animais foram pré-tratados via intraperitoneal com salina ou com *p*-clorofenilalanina (PCPA) 100 mg/kg no volume de 10 mL/kg, um inibidor da síntese de serotonina (BEIRITH et al., 1998). No quarto dia os animais receberam novamente o pré-tratamento 20 min antes da administração via oral com auxílio de uma cânula para gavagem de veículo (salina com 12% de Tween 80) ou PHM 100 mg/kg. Na sequência, o teste de contorções abdominais induzidas por ácido acético foi realizado como descrito anteriormente no item 3.9.2.1 (WERNER et al., 2009).

### **3.9.3 Atividade anti-inflamatória**

#### **3.9.3.1 Edema de orelha induzido por óleo de cróton**

A atividade antiinflamatória foi avaliada pelo método do edema de orelha descrito por SCHIANTARELLI e colaboradores (1982). As soluções aplicadas topicamente foram preparadas em acetona, enquanto as administradas oralmente foram preparadas em salina com 12% de Tween 80.

##### **3.9.3.1.1 Tratamento tópico**

Aplicou-se topicamente 20 µL de uma solução fresca de óleo de cróton 2,5 % (v/v) no pavilhão auricular direito e o mesmo volume de acetona no pavilhão auricular esquerdo de cada animal. Quinze minutos após a aplicação do agente flogístico, os animais receberam tratamento tópico com 20 µL de EBM 50 mg/mL. O mesmo volume de dexametasona 0,1 mg/20 µL e de acetona (veículo) foi utilizado como controle positivo e controle negativo, respectivamente. Quatro horas após as aplicações, os animais foram sacrificados e, com o auxílio de um *punch* metálico, discos idênticos de 6 mm de diâmetro foram obtidos de ambas as orelhas de cada animal. Os discos foram pesados em balança analítica e a diferença de peso entre eles indicou a intensidade do edema. Os resultados foram representados como média ± e.p.m das diferenças de peso dentro de cada grupo.

### 3.9.3.1.2 Tratamento via oral

Os animais foram previamente tratados com EBM nas concentrações de 100 mg/kg e 300 mg/kg. Indometacina 10 mg/kg e solução salina com 12% de Tween 80 (veículo) foram utilizados como controle positivo e controle negativo, respectivamente. Todas as soluções foram administradas via oral com auxílio de uma cânula para gavage no volume de 10 mL/kg. Decorridos 60 min desde o tratamento, foram aplicados topicamente 20  $\mu$ L de uma solução fresca de óleo de cróton 2,5 % (v/v) no pavilhão auricular direito e o mesmo volume de acetona no pavilhão auricular esquerdo de cada animal. Seis horas após o início do experimento, os animais foram sacrificados e, com o auxílio de um *punch* metálico, discos idênticos de 6 mm de diâmetro foram obtidos de ambas as orelhas de cada animal. Os discos foram pesados em balança analítica e a diferença de peso entre eles indicou a intensidade do edema. Os fragmentos auriculares obtidos foram conservados em solução de formaldeído 10% para posterior análise histológica através da confecção de lâminas coradas com hematoxilina e eosina e azul de toluidina para evidenciar os mastócitos. Os resultados foram representados como média  $\pm$  e.p.m das diferenças de peso dentro de cada grupo.

### 3.10 Análise estatística

Os ensaios para verificação da atividade antitumoral e os testes *in vivo* tiveram os resultados expressos como média  $\pm$  erro padrão médio (e.p.m). Foram realizadas análises de variância (ANOVA) e teste de Tukey ou de Newman-Keuls como *post-hoc*. Diferenças entre as médias dos tratamentos no nível de 5% ( $p < 0,05$ ) comparadas ao controle negativo, foram consideradas significativas. Para a análise estatística foi utilizado o programa GraphPad Prism 5.0.

Nos ensaios para as atividades leishmanicida e citotóxica, os valores de  $CI_{50}$  foram estimados a partir dos valores médios de três experimentos independentes, realizados em duplicata, por interpolação gráfica utilizando o programa estatístico Grafit 5.

## 4 RESULTADOS

### 4.1 Caracterização fitoquímica preliminar

Os resultados da análise fitoquímica preliminar estão representados no quadro 1.

Quadro 1: Análise fitoquímica preliminar do extrato bruto metanólico e partições.

Amostras	Classes de constituintes químicos <sup>a</sup>										
	F	Tc	Th	C	Atq	Atn	Fl	A	E	Tr	S
EBM	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
PHEX	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-
PDCM	+	+	-	+	-	+	+	+	+	-	+
PAC	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-
PB	+	+	-	+	-	+	+	+	+	-	-
PHM	+	-	+	+	-	+	+	+	-	-	-

<sup>a</sup> Constituintes químicos: F - fenóis; Tc - taninos condensados; Th - taninos hidrolisáveis; C - cumarinas; Atq - antraquinonas; Atn - antronas; Fl - flavonoides; A - alcaloides; E - esteroides; Tr - triterpenos; S - saponinas. A análise foi realizada para o extrato bruto metanólico (EBM), partição hexânica (PHEX), partição diclorometânica (PDCM), partição em acetato de etila (PAC), partição butanólica (PB) e partição hidrometanólica (PHM).

### 4.2 Teor de fenóis e flavonoides

Os teores de fenóis e flavonoides de EBM e partições foram calculados e representados na tabela 1.

Tabela 1: Teor de fenóis e flavonoides do extrato bruto metanólico e partições.

<b>Amostra</b>	<b>Fenóis totais como equivalentes a ácido tânico (mg/g de extrato)<sup>a</sup></b>	<b>Flavonoides como equivalentes a rutina (mg/g de extrato)<sup>a</sup></b>
EBM	17,27 ± 3,94	13,10 ± 2,16
PHEX	0	27,75 ± 2,54
PDCM	49,11 ± 3,30	54,58 ± 4,73
PAC	3,95 ± 1,66	18,53 ± 0,94
PHM	2,45 ± 0,81	10,40 ± 2,36

<sup>a</sup> Média das concentrações ± desvio padrão em ensaios realizados em triplicata para o extrato bruto metanólico (EBM), partição hexânica (PHEX), partição diclorometânica (PDCM), partição em acetato de etila (PAC) e partição hidrometanólica (PHM).

### 4.3 Determinação da presença de compostos indólicos

Foi detectada a presença de compostos com grupamento indólico tanto em EBM quanto em todas as partições.

### 4.4 Determinação do perfil cromatográfico por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência para a partição hidrometanólica

O perfil cromatográfico de PHM está representado na Figura 7. Os espectros UV referentes aos picos de tempo de retenção 5,85; 6,68 e 9,92 min são semelhantes aos espectros de compostos indólicos, a exemplo do triptofano e serotonina (Figuras 8 e 9).

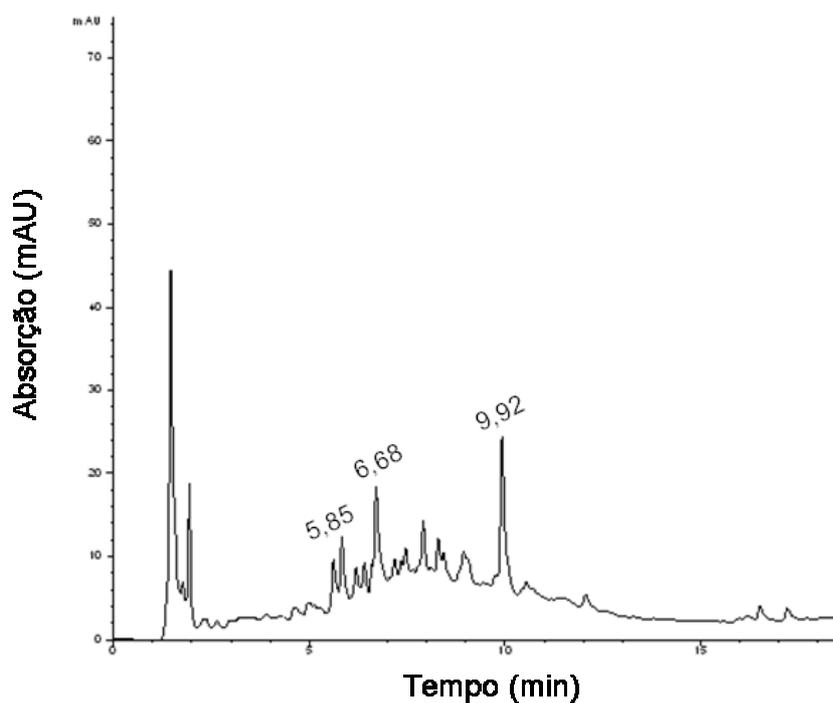


Figura 7 - **Cromatograma da partição hidrometanólica.** A análise foi realizada nas seguintes condições: coluna de fase reversa C18 (25 cm x 4,6 cm x 5  $\mu$ m); Gradiente linear de solventes A (ACN:H<sub>2</sub>O, 5:95, v/v, pH = 4 com H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>) e B (ACN:H<sub>2</sub>O, 90:10, v/v, pH = 4 com H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>); 0 a 100% de B em 30 min; fluxo de 1 mL/min; concentração de amostra de 1 mg/mL; volume de injeção de 20  $\mu$ L; temperatura de 25  $^{\circ}$ C; detecção UV a 210nm.

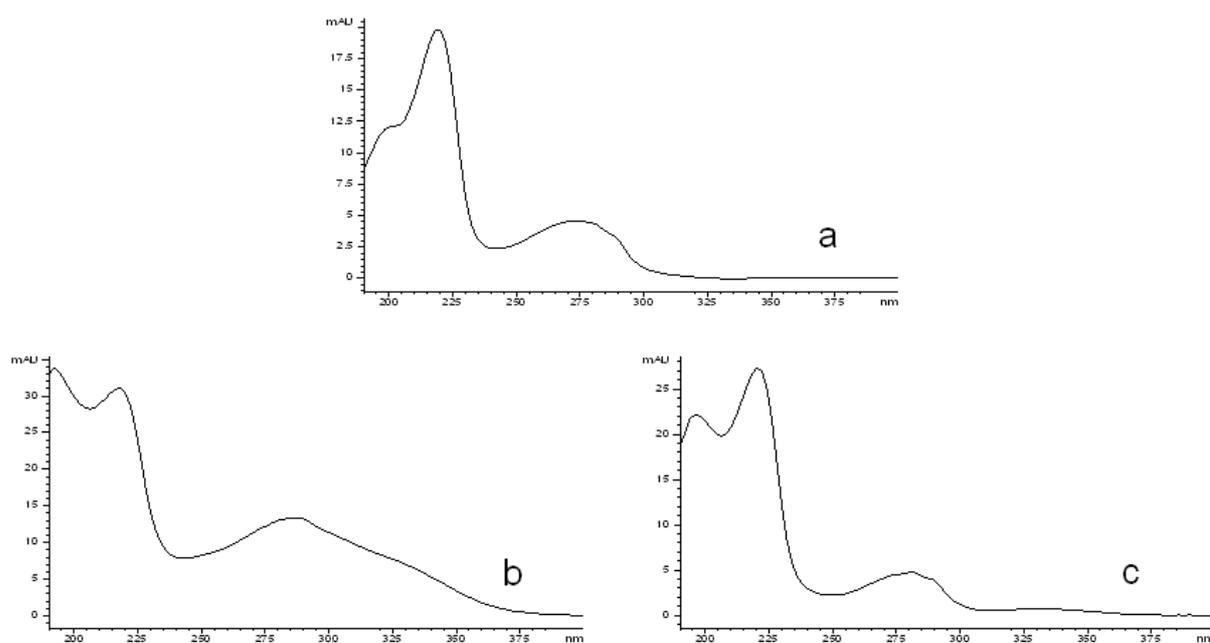


Figura 8 – Espectros UV em PHM: a) tempo de retenção de 5,85 min; b) tempo de retenção de 6,68 min; c) tempo de retenção de 9,92 min.

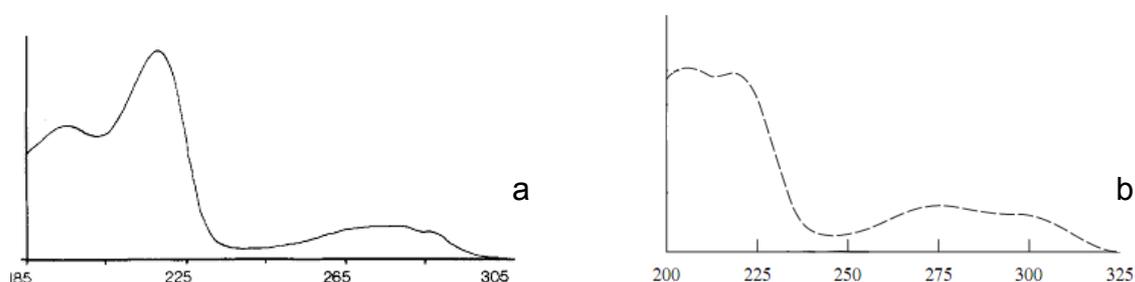


Figura 9 – Exemplos de espectros UV de compostos indólicos: a) triptofano e b) serotonina (Fonte: adaptado de FU et al., 2006; SWEENEY e ASHER, 1990).

## 4.5 Atividades biológicas *in vitro*

### 4.5.1 Atividade antitumoral

Os resultados obtidos para EBM e partições diante das células HL60 e MCF-7 estão representados nas figuras 10 e 11.

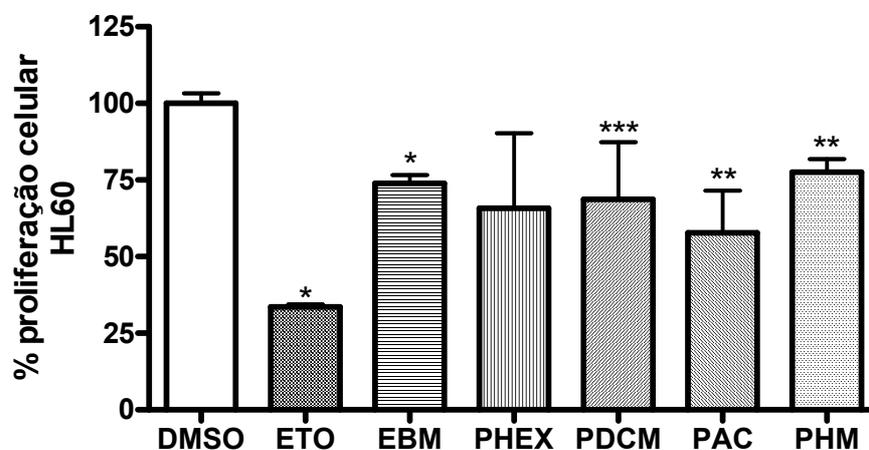


Figura 10 - Atividade antitumoral de EBM, PHEX, PDCM, PAC e PHM frente à linhagem HL60. O extrato bruto metanólico (EBM) foi utilizado na concentração de 100 µg/mL, as partições hexânica (PHEX), diclorometânica (PDCM), em acetato de etila (PAC) e hidrometanólica (PHM) foram avaliadas na concentração de 50 µg/mL. DMSO 0,05% e etoposídeo (ETO) 10 µM foram usados como controles negativo e positivo, respectivamente. Os valores obtidos são referentes à média ± e.p.m. do percentual da proliferação celular (triplicata) calculada em relação ao controle do solvente. ANOVA, seguida pelo teste de Newman-Keuls, utilizado como *post-hoc*. Valores significativos: \* $p < 0,001$ , \*\* $p < 0,01$  e \*\*\* $p < 0,05$  vs controle negativo.

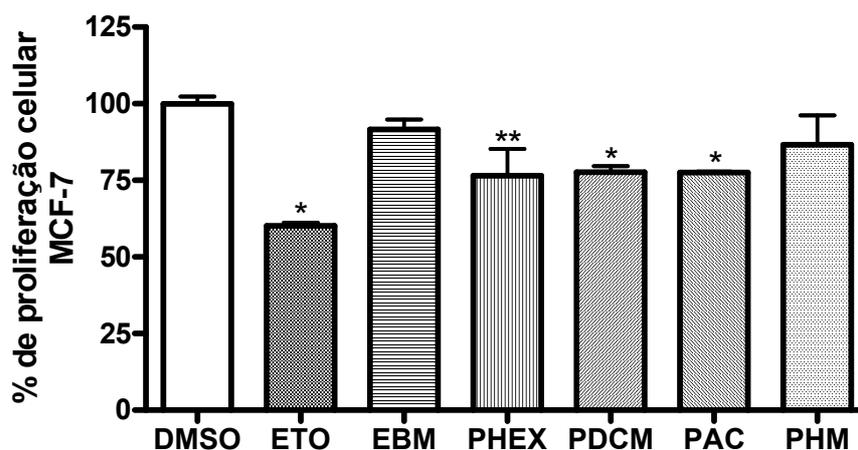


Figura 11 - **Atividade antitumoral de EBM, PHEX, PDCM, PAC e PHM frente à linhagem MCF-7.** O extrato bruto metanólico (EBM) foi utilizado na concentração de 100 µg/mL, as partições hexânica (PHEX), diclorometânica (PDCM), em acetato de etila (PAC) e hidrometanólica (PHM) foram avaliadas na concentração de 50 µg/mL. DMSO 0,05% e etoposídeo (ETO) 10 µM foram usados como controles negativo e positivo, respectivamente. Os valores obtidos são referentes à média ± e.p.m. do percentual da proliferação celular (triplicata) calculada em relação ao controle do solvente. ANOVA, seguida pelo teste de Newman-Keuls, utilizado como *post-hoc*. Valores significativos: \* $p < 0,001$  e \*\* $p < 0,01$  vs controle negativo.

#### 4.5.2 Atividade antimicrobiana

O EBM e partições não apresentaram atividade antimicrobiana perante as estirpes testadas.

#### 4.5.3 Atividade leishmanicida

O EBM e partições não apresentaram toxicidade perante as formas promastigotas de *L. major*, *L. braziliensis*, *L. chagasi* e *L. amazonensis* ( $CI_{50} > 100$  µg/mL)

#### 4.5.4 Avaliação de citotoxicidade em células de mamíferos

O EBM e partições não apresentaram toxicidade perante macrófagos normais de mamíferos ( $CI_{50} > 150$  µg/mL).

#### 4.6 Atividades farmacológicas *in vivo*

## 4.6.1 Atividade antinociceptiva

### 4.6.1.1 Teste de contorções abdominais induzidas por ácido acético

Nota-se que na dose testada (100 mg/kg), o EBM administrado via oral foi capaz de inibir o estímulo da dor induzido pelo ácido acético (Figura 12). Vale ressaltar que não houve diferença significativa entre indometacina e EBM ( $p > 0,05$ ). A indometacina e o EBM reduziram o número de contorções em 90% e 72%, respectivamente, quando comparados com o controle negativo. O mesmo foi observado para PHM, que reduziu o número de contorções em 78%. Não foram encontradas diferenças significativas para as partições PHEX e PDCM em relação ao controle negativo.

Verificou-se que a atividade antinociceptiva de PHM é inversamente proporcional à dose, pois com o aumento da mesma a resposta tende a diminuir, como está demonstrado na Figura 13. A inibição do número de contorções para PHM 200 e 300 mg/kg foi de 64% e 41%, respectivamente.

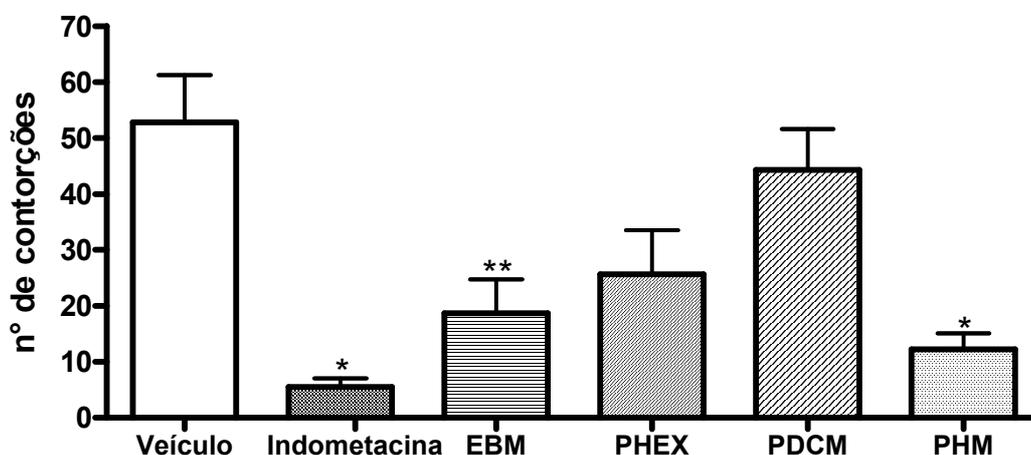


Figura 12 - Efeito de EBM, PHEX, PDCM e PHM via oral diante do teste de contorções abdominais induzidas por ácido acético em camundongos. Controle negativo (veículo), indometacina 10mg/kg, extrato bruto metanólico (EBM), partição hexânica (PHEX), partição diclorometânica (PDCM) e partição hidrometanólica (PHM) 100 mg/kg foram administrados 60 min antes da injeção intraperitoneal de ácido acético 0,6%, e o número de contorções abdominais foi avaliado durante 30 min. Os valores em cada coluna representam a média  $\pm$  e.p.m. do número de contorções abdominais. ANOVA, seguida pelo teste de Newman-Keuls, utilizado como *post-hoc*. Valores significativos: \* $p < 0,001$  ; \*\* $p < 0,01$  vs controle negativo.

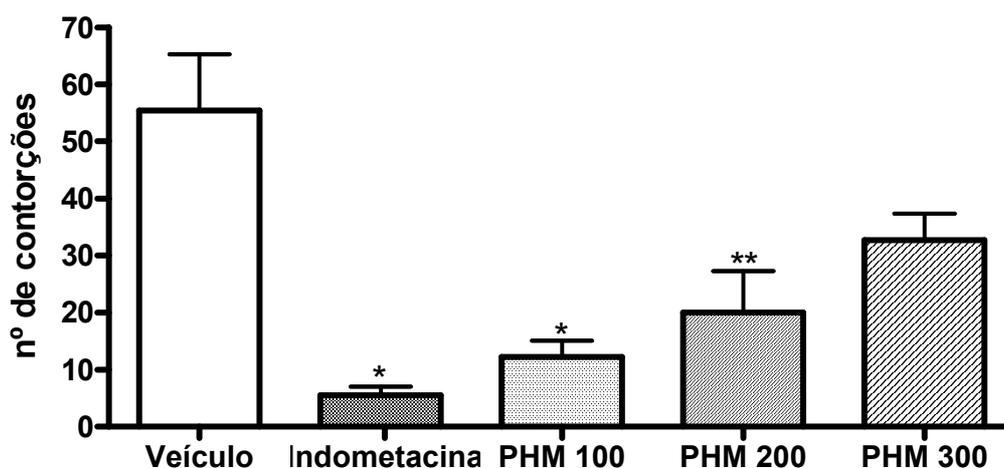


Figura 13 - Efeito de PHM via oral em diferentes doses diante do teste de contorções abdominais induzidas por ácido acético em camundongos. Controle negativo (veículo), indometacina 10mg/kg e partição hidrometanólica (PHM) 100, 200 e 300 mg/kg foram administrados 60 min antes da injeção intraperitoneal de ácido acético 0,6%, e o número de contorções abdominais foi avaliado durante 30 min. Os valores em cada coluna representam a média  $\pm$  e.p.m. do número de contorções abdominais. ANOVA, seguida pelo teste de Newman-Keuls, utilizado como *post-hoc*. Valores significativos: \* $p < 0,001$  ; \*\* $p < 0,05$  vs controle negativo.

#### 4.6.1.2 Teste da formalina

Observa-se que na primeira fase do teste da formalina (0-5 min), PHM na dose de 300 mg/kg foi a mais eficaz, reduzindo em cerca de 50% o tempo de lambida da pata afetada em comparação com o controle negativo. As doses de 200 e 100 mg/kg inibiram a nocicepção em 45% e 15%, respectivamente (Figura 14). A dose de 300 mg/kg também foi a mais ativa na segunda fase (15-30 min), inibindo a nocicepção em 86% quando comparada com o veículo. A indometacina, controle positivo da segunda fase, reduziu o estímulo em 75%. As doses de 100 e 200 mg/kg inibiram a nocicepção em 48% e 62%, respectivamente (Figura 15).

Neste ensaio, a atividade antinociceptiva de PHM demonstrou ser dose dependente. Ao contrário do ocorrido no teste de contorções abdominais, a atividade tende a diminuir com a redução da dose.

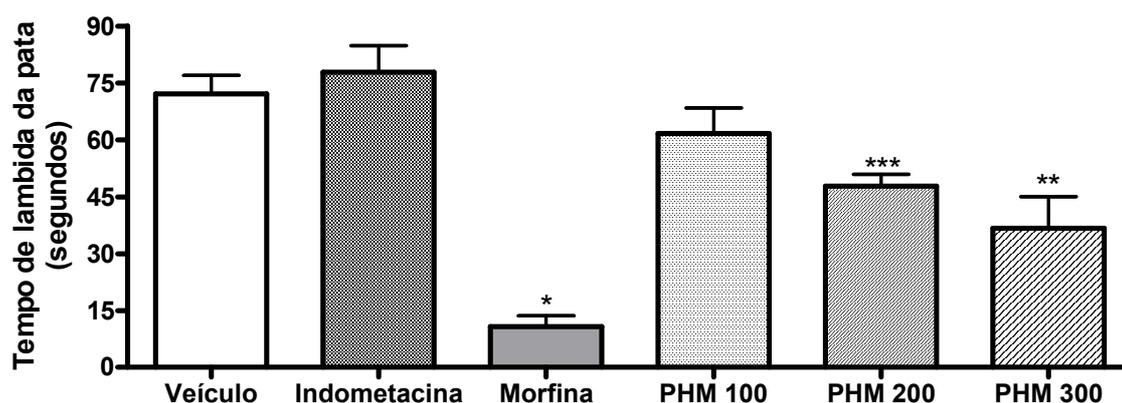


Figura 14 - Efeito de PHM via oral diante da primeira fase do teste da formalina em camundongos. Controle negativo (veículo), indometacina 10mg/kg, morfina 7,5 mg/kg e partição hidrometanólica (PHM) 100, 200 e 300 mg/kg foram administrados 30 ou 60 min antes da injeção subplantar de formalina e o tempo de lambida da pata foi avaliado entre 0 e 5 min após a administração do agente irritante. Os valores em cada coluna representam a média  $\pm$  e.p.m. do tempo em segundos de lambida da pata. ANOVA, seguida pelo teste de Newman-Keuls, utilizado como *post-hoc*. Valores significativos: \* $p < 0,001$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,05$  vs controle negativo.

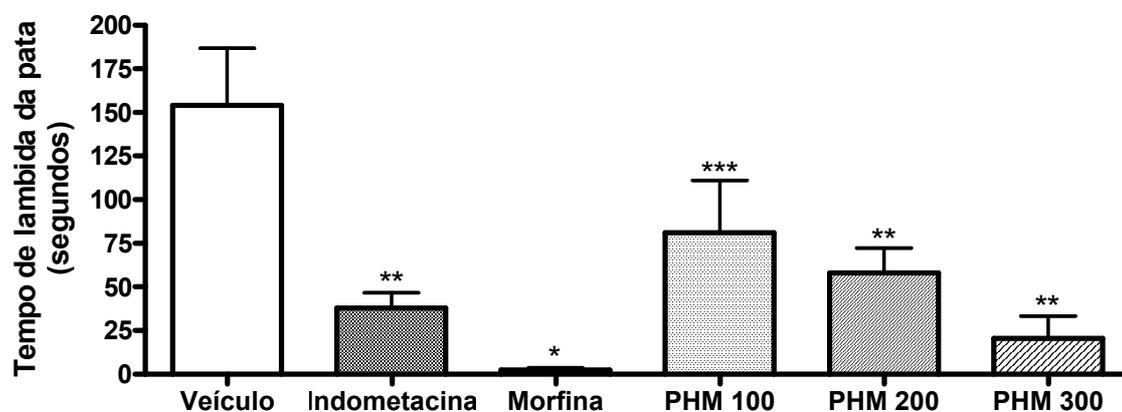


Figura 15 - Efeito de PHM via oral diante da segunda fase do teste da formalina em camundongos. Controle negativo (veículo), indometacina 10mg/kg, morfina 7,5 mg/kg e partição hidrometanólica (PHM) 100, 200 e 300 mg/kg foram administrados 30 ou 60 min antes da injeção subplantar de formalina e o tempo de lambida da pata foi avaliado entre 15 e 30 min após a administração do agente irritante. Os valores em cada coluna representam a média  $\pm$  e.p.m. do tempo em segundos de lambida da pata. ANOVA, seguida pelo teste de Newman-Keuls, utilizado como *post-hoc*. Valores significativos: \* $p < 0,001$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,05$  vs controle negativo.

#### 4.6.1.3 Teste da retirada da cauda (*Tail-Flick*)

Observa-se na figura 16 que PHM não foi ativa em nenhuma das doses testadas.

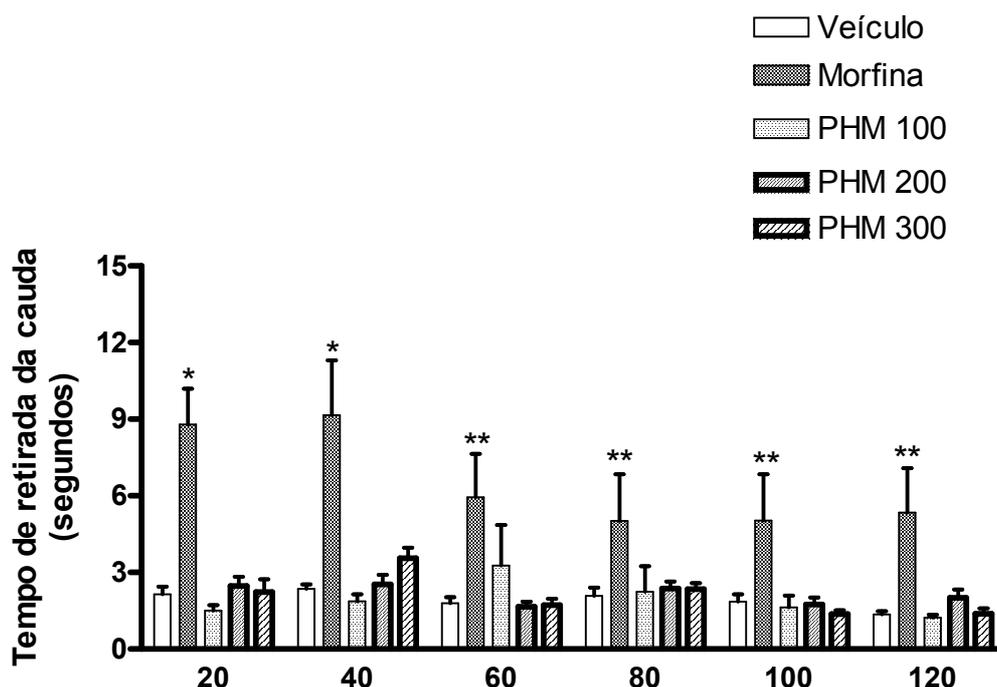


Figura 16 - Efeito de PHM via oral diante do teste da retirada da cauda em camundongos. Controle negativo (veículo), morfina 7,5 mg/kg e partição hidrometanólica (PHM) 100, 200 e 300 mg/kg foram administrados 30 ou 60 min antes da imersão do terço medial da cauda em banho a  $55 \pm 1$  °C, e o tempo de permanência da cauda na água foi mensurado em intervalos de 20 min durante 2h. Os valores em cada coluna representam a média  $\pm$  e.p.m. do tempo de permanência da cauda na água. ANOVA, seguida pelo teste de Newman-Keuls, utilizado como *post-hoc*. Valores significativos: \* $p < 0,001$ ; \*\* $p < 0,05$  vs controle negativo.

#### 4.6.1.4 Teste de contorções abdominais induzidas por ácido acético em animais pré-tratados com para-clorofenilalanina (PCPA)

Como previsto, não foram observadas diferenças entre os grupos controle (veículo + salina e veículo + PCPA). No entanto, os grupos PHM + salina e PHM + PCPA também não foram diferentes entre si, isto é, PHM permaneceu ativa mesmo após o pré-tratamento com um inibidor da síntese de serotonina.

#### 4.6.2 Atividade anti-inflamatória

##### 4.6.2.1 Edema de orelha induzido pelo óleo de cróton

Pode-se observar que o tratamento tópico com EBM 50 mg/mL não reduziu significativamente o edema de orelha induzido pelo óleo de cróton, ao contrário da

dexametasona (redução de 84%). O tratamento via oral de EBM 300 mg/kg e 100 mg/kg aumentou o edema em 80% e 36%, respectivamente. A indometacina, por sua vez, reduziu o edema em 79%.

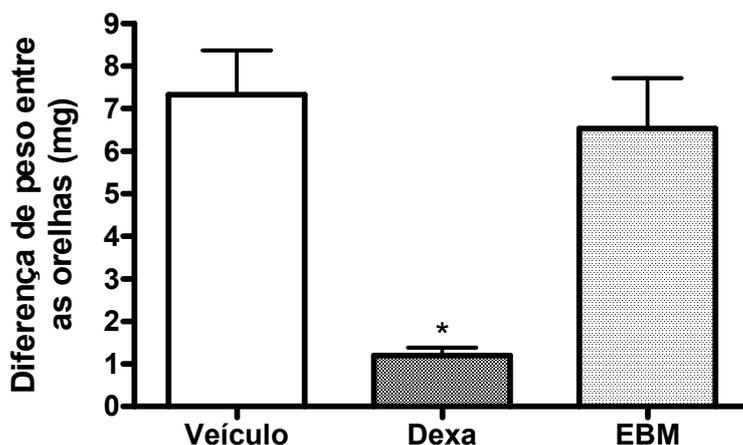


Figura 17 - Efeito de EBM via tópica diante do estímulo inflamatório induzido pelo óleo de cróton em camundongos. Controle negativo (veículo), dexametasona (Dexa) 0,10 mg/20 $\mu$ L e extrato bruto metanólico (EBM) (50 mg/mL) foram administrados topicamente 15 min após a aplicação tópica de óleo de cróton 2,5%. Os valores em cada coluna representam a média  $\pm$  e.p.m. da diferença de peso entre orelhas (mg). ANOVA, seguida pelo teste de Newman-keuls, utilizado como post-hoc. Valores significativos: \* $p < 0,001$  vs controle.

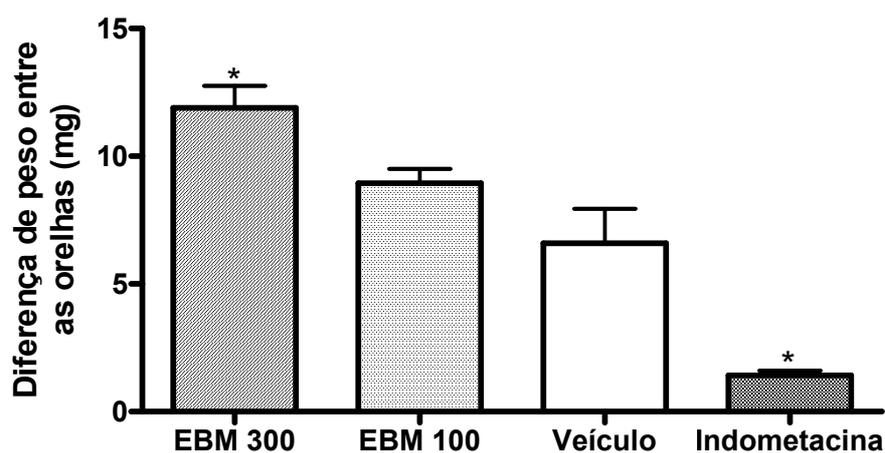


Figura 18 - Efeito de EBM via oral diante do estímulo inflamatório induzido pelo óleo de cróton em camundongos. Controle (veículo), Indometacina 10mg/kg, extrato bruto metanólico (EBM) 100 mg/kg e 300 mg/kg foram administrados via oral 60 min antes da aplicação tópica de óleo de cróton 2,5%. Os valores em cada coluna representam a média  $\pm$  e.p.m. da diferença de peso entre orelhas (mg). ANOVA, seguida pelo teste de Newman-keuls, utilizado como post-hoc. Valores significativos: \* $p < 0,001$  vs controle.

#### 4.6.2.2 Análise histológica dos fragmentos de orelhas

A análise histológica dos fragmentos obtidos das orelhas dos animais foi realizada a fim de se compreender melhor os resultados observados no teste do edema de orelha induzido pelo óleo de cróton em que foi administrado EBM via oral.

Como esperado, observou-se microscopicamente a presença de intenso edema nos fragmentos de orelha dos animais que receberam o tratamento com EBM. No entanto, visualmente, a presença de células inflamatórias não foi diferente quando comparada com o controle negativo.

Para efeitos de comparação, a Figura 19 mostra a microscopia de uma orelha normal de camundongo com ambas as colorações utilizadas. Nota-se que mesmo em uma orelha normal ocorre a presença de mastócitos, importantes células envolvidas em processos inflamatórios.

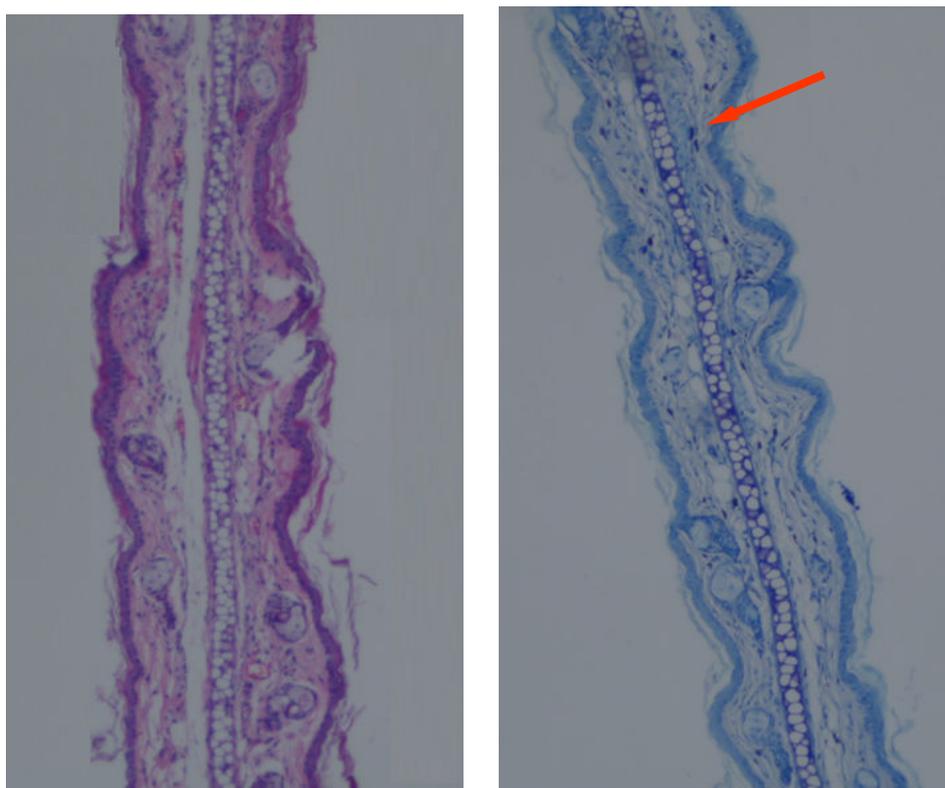


Figura 19 – **Microscopia de um fragmento de orelha normal de camundongo.** À esquerda a fotografia de uma lâmina corada com hematoxilina-eosina e à direita a fotografia de uma lâmina corada com azul de toluidina, evidenciado a presença de mastócitos (aumento de 10x).

A Figura 20 evidencia o edema de orelha de um camundongo tratado com veículo. Na própria coloração de hematoxilina-eosina, nota-se a presença de células

inflamatórias e de hemácias. Na figura 21 é possível observar a presença de mastócitos.

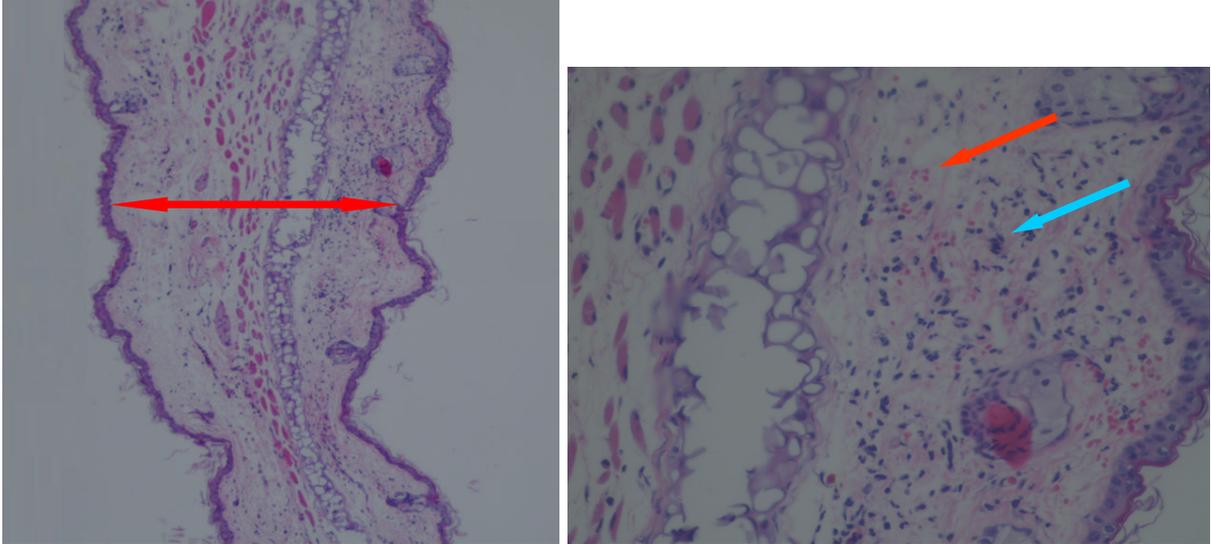


Figura 20 – **Microscopia com coloração de hematoxilina-eosina de um fragmento de orelha de um camundongo que recebeu o tratamento com veículo.** À esquerda, fotografia de uma lâmina que evidencia o edema gerado pelo óleo de cróton (aumento de 10x). À direita, fotografia de uma lâmina que evidencia a presença de células inflamatórias (seta azul) e hemácias (seta vermelha) (aumento de 40x).

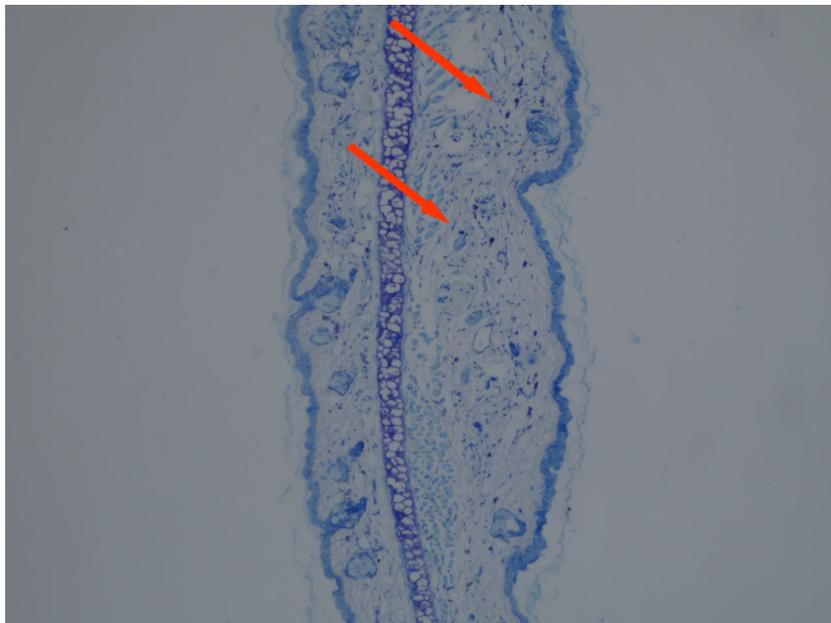


Figura 21 – **Microscopia com coloração de azul de toluidina de um fragmento de orelha de um camundongo que recebeu o tratamento com veículo.** As setas evidenciam a presença de mastócitos (aumento de 10x).

A Figura 22 evidencia o edema em um fragmento de orelha de um camundongo tratado com EBM 100 mg/kg. Observa-se na Figura 23 a presença de

vasos sanguíneos bem dilatados. Nas figuras seguintes é possível visualizar que a presença de mastócitos não foi maior nos grupos tratados com EBM 100 e 300 mg/kg do que aquela observada em animais tratados com veículo.



Figura 22 – **Microscopia com coloração de hematoxilina-eosina de um fragmento de orelha de um camundongo que recebeu o tratamento com EBM 100 mg/kg. A seta evidencia o edema (aumento de 10x).**

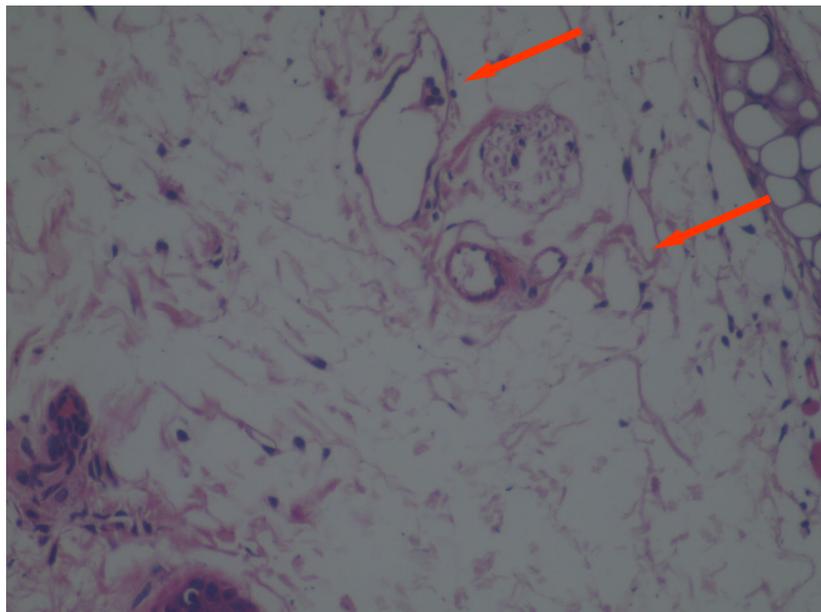


Figura 23 – **Presença de vasodilatação em um fragmento de orelha de um camundongo que recebeu o tratamento com EBM 100 mg/kg. Coloração de hematoxilina-eosina. As setas evidenciam a presença de vasodilatação (aumento de 40x).**

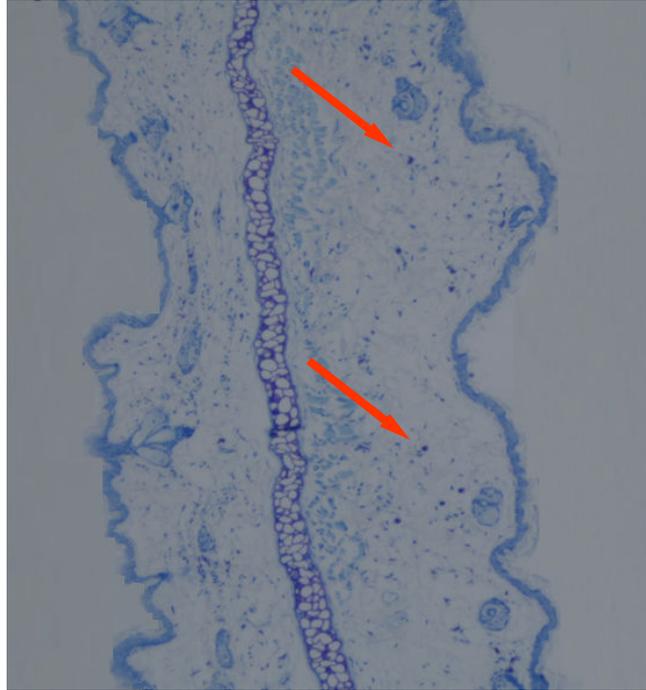


Figura 24 – Microscopia com coloração de azul de toluidina de um fragmento de orelha de um camundongo que recebeu o tratamento com EBM 100 mg/kg. As seta evidenciam a presença de mastócitos (aumento de 10x).

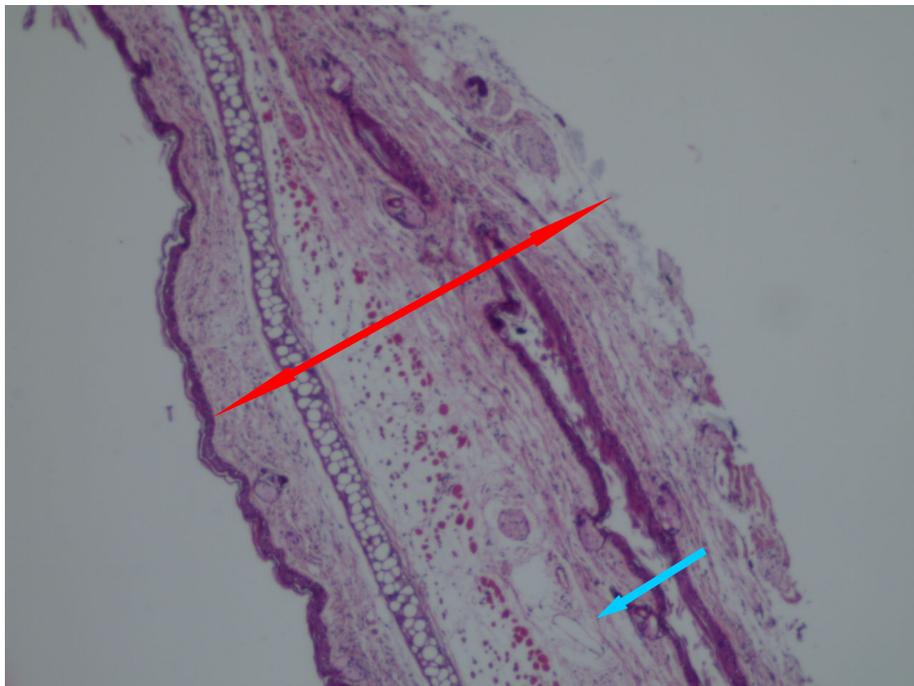


Figura 25 – Microscopia com coloração de hematoxilina-eosina de um fragmento de orelha de um camundongo que recebeu o tratamento com EBM 300 mg/kg. A seta vermelha evidencia o edema e a seta azul a presença de vasodilatação (aumento de 10x).

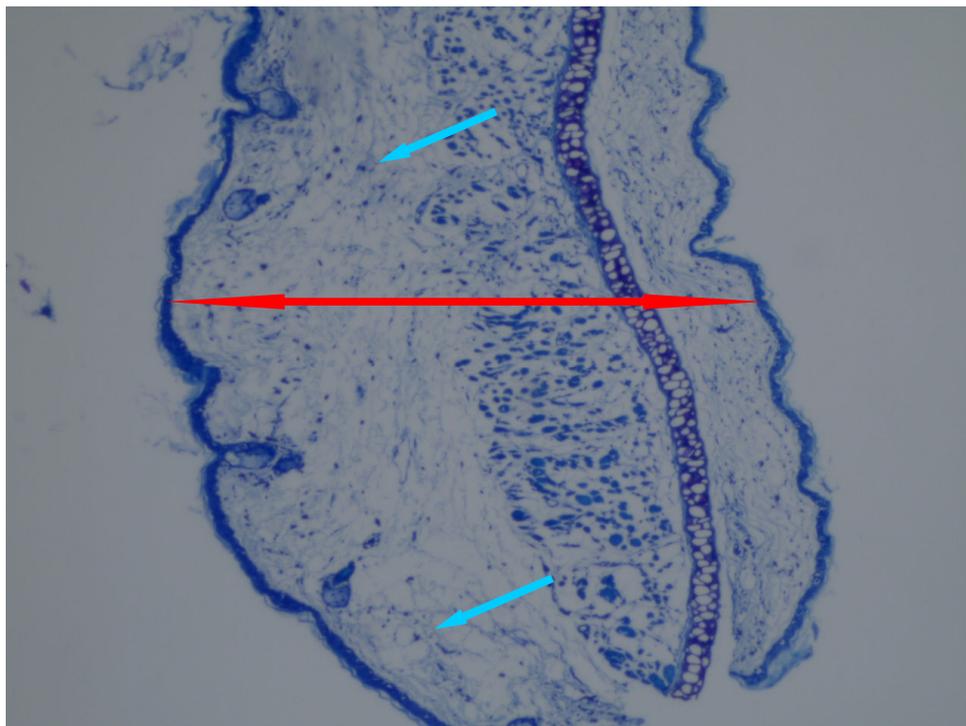


Figura 26 – Microscopia com coloração de azul de toluidina de um fragmento de orelha de um camundongo que recebeu o tratamento com EBM 300 mg/kg. A seta vermelha evidencia o edema e a seta azul a presença de mastócitos (aumento de 40x).

## 5 DISCUSSÃO

Todos os constituintes químicos pesquisados na análise fitoquímica preliminar foram detectados no EBM, à exceção de triterpenos e saponinas. Apesar disso, foram encontradas saponinas em PDCM, provavelmente esteroidais, visto que não foram encontrados triterpenos. Saponinas não puderam ser detectadas em EBM, provavelmente, por estarem pouco concentradas. Esteroides, constituintes já relatados na espécie, foram identificados em EBM, PHEX, PDCM e PAC (Quadro 1, p. 59).

As concentrações de fenóis e flavonoides foram maiores em PDCM, porém flavonoides foram detectados em todas as amostras, e compostos fenólicos foram encontrados em EBM, PAC, PB e PHM (Tabela 1, p. 60). Esses constituintes químicos, em muitos casos, favorecem a redução do estresse oxidativo, o qual está associado ao desenvolvimento de câncer e ao processo inflamatório (BERRA, MENCK e MASCIO, 2006; LIU, 2010; VALENTE et al., 2010). Assim, os resultados encontrados para os teores de fenóis e flavonoides reforçam a importância de realizar ensaios para a verificação de uma possível atividade antitumoral e anti-

inflamatória das folhas de *P. aculeata*. Além disso, os efeitos antioxidantes de fenóis e flavonoides também podem contribuir na analgesia. Através de modelos experimentais de indução de nocicepção por lesões neuropáticas e pela administração de substâncias álgicas, foi demonstrado que os neurônios nociceptivos são sensibilizados por radicais livres e que a propagação da dor depende de mecanismos espinhais envolvendo a geração de espécies reativas do oxigênio (ERO) (LEE, 2007; VIGGIANO et al., 2005).

EBM e todas as partições, com exceção de PHM apresentaram citotoxicidade diante de células MCF-7, porém foram mais ativos contra células HL60, especialmente PAC (Figuras 10 e 11, p. 62 e 63). Em estudos com outras plantas do mesmo gênero, as partições de acetato de etila também apresentaram considerável atividade citotóxica, porém contra outras linhagens celulares que não a HL60 (MALEK et al., 2008; NURESTRI; SIM e NORHANOM, 2009; TAN et al., 2005). Os constituintes químicos comuns a todas as amostras estudadas foram os alcaloides e os flavonoides. Vale ressaltar que alguns alcaloides são utilizados na prática médica como quimioterápicos, a exemplo da camptotecina e os alcaloides da vinca, vincristina e vimblastina (GORDALIZA, 2007). Vários alcaloides do tipo isoquinolínicos, quinolínicos e indólicos demonstraram induzir apoptose em células HL60 (ROSENKRANZ e WINK, 2007).

Em relação aos flavonoides, compostos polifenólicos amplamente distribuídos no reino vegetal, a eles são atribuídas diversas atividades biológicas de plantas, sendo bem documentada a ação antitumoral desses constituintes *in vitro* e em modelos animais. Diversos estudos reportam que muitos flavonoides presentes em vegetais consumidos na dieta apresentam uma redução da proliferação de células tumorais. Aliado a isso, a menor incidência de câncer de cólon, próstata e de mama nos países asiáticos, onde o consumo de vegetais, frutas e chás é bem maior do que nos países ocidentais, leva ao questionamento se esses alimentos podem estar exercendo algum efeito quimiopreventivo (KANADASWAMI, et al., 2005). Há relatos de alguns flavonoides que exercem considerável ação citotóxica diante de células HL60 sem, no entanto, demonstrarem toxicidade frente células normais (HIRANO; GOTOH e OKA, 1994).

Não foi observada qualquer atividade de EBM e partições contra as estirpes bacterianas testadas. Em um estudo realizado por TURRA e colaboradores (2007), as folhas de *Pereskia grandifolia*, também conhecida como ora-pro-nobis,

não apresentaram atividade antimicrobiana. Apesar disso, WAHAB e colaboradores (2009) encontraram atividade antimicrobiana no extrato hexânico de *P. bleo* contra *P. aeruginosa* e *S. choleraesuis*, e no extrato diclorometânico contra MRSA.

Além disso, nenhuma das amostras estudadas demonstrou toxicidade diante das formas promastigotas dos parasitos do gênero *Leishmania* testados, tampouco foi observada qualquer atividade contra macrófagos de mamíferos. Somado a isso, as folhas de *P. aculeata* são amplamente utilizadas na alimentação humana e não há relatos de toxicidade. Essas informações sugerem que pode haver uma possível seletividade da atividade citotóxica para células tumorais, ao menos para as linhagens celulares testadas.

O teste de contorções abdominais induzidas pelo ácido acético é um experimento simples e bastante sensível para avaliar a resposta antinociceptiva. O modelo consiste na injeção do agente irritante na cavidade peritoneal de camundongos, levando-os a uma resposta frente ao estímulo doloroso caracterizada pela contração da musculatura abdominal seguida da extensão dos membros posteriores. Assim, a nocicepção pode ser avaliada em razão do número total de contorções observadas durante um dado período de tempo (MIRANDA et al., 2007). Apesar de ser um ensaio mais apropriado para opioides, é amplamente utilizado como um modelo de indução da dor de origem inflamatória, já que o ácido acético favorece a síntese e a liberação de metabólitos do ácido araquidônico e de outros mediadores da inflamação, como a bradicinina e a histamina (LIMA et al., 2010; WHITTLE, 1964). Dessa forma, os efeitos antinociceptivos de anti-inflamatórios não esteroidais e de analgésicos de ação periférica também podem ser observados a partir deste modelo. Além disso, drogas que atuam em receptores dopaminérgicos, antidepressivos tricíclicos e inibidores seletivos da recaptação de serotonina também respondem a este teste, o que mostra a participação de neurônios dopaminérgicos, serotoninérgicos e noradrenérgicos na modulação da dor desencadeada pelo ácido acético (DICKENSON e GHANDEHARI, 2007; DUARTE, NAKAMURA e FERREIRA, 1987).

Uma vez que diversos mecanismos de antinocicepção respondem ao teste de contorções abdominais induzidas pelo ácido acético, tanto EBM quanto partições de diferentes polaridades foram testadas na mesma concentração (100 mg/kg) a fim de determinar quais amostras apresentam atividade e qual dentre elas é dotada de maior potencial antinociceptivo para posteriormente ser estudada mais

profundamente. Os resultados dessa triagem demonstraram que PHM é a amostra mais ativa (Figura 12, p. 64) e, por isso, julgou-se necessário realizar o mesmo experimento com diferentes doses dessa partição com o intuito de verificar se tal atividade é dose-dependente. Os resultados sugerem que quanto menor a dose, maior a resposta da droga frente ao estímulo doloroso causado pelo ácido acético. Para compreender melhor os possíveis mecanismos envolvidos na antinocicepção foram realizados os testes da formalina e de retirada da cauda.

O teste da formalina é um modelo químico de indução da dor que permite determinar se a ação de uma substância analgésica se dá a nível central ou periférico. A injeção subplantar de formalina em ratos ou camundongos provoca uma resposta comportamental bifásica caracterizada pela lambida da pata: uma fase inicial que ocorre por cerca de 5 minutos após a injeção, a qual está relacionada com a sensibilização direta de nociceptores de fibras aferentes do tipo C e do tipo A $\delta$  (dor neurogênica); e uma segunda fase que ocorre após um período de quiescência, avaliada entre 15 e 30 minutos desde a injeção e associada à liberação de mediadores inflamatórios, como prostaglandinas, histamina, bradicinina, entre outros (dor inflamatória) (HUNSKAAR; FASMER e HOLE, 1985).

Analgésicos opioides, como a morfina, inibem a nocicepção causada pela formalina em ambas as fases, enquanto corticosteroides e AINES, como a indometacina, são capazes de suprimir apenas a segunda fase, especialmente quando a formalina é injetada em maiores concentrações (LE BARS; GOZARIU e CADDEN, 2001). Analgésicos não opioides que atuam central e periféricamente respondem em ambas as fases do teste da formalina, porém são mais eficazes na segunda fase, na qual, geralmente, são necessárias doses menores da droga para causar o efeito antinociceptivo (SHIBATA et al., 1989).

Os resultados demonstraram que PHM na dose de 300 mg/kg foi capaz de inibir o estímulo doloroso em ambas as fases do teste da formalina, no entanto apresentou maior atividade na segunda fase, onde a dose de 200 mg/kg também foi ativa de maneira significativa (Figura 13, p. 65). Essa informação sugere que o mecanismo de ação não envolve a ativação de receptores opioides, mas está associado a uma ação central e, provavelmente, periférica.

O teste da retirada da cauda consiste em avaliar a resposta de uma substância em consequência de um estímulo nociceptivo termogênico. A imersão da cauda do animal na água quente provoca um movimento abrupto da mesma e, em

alguns casos, o recolhimento de todo o corpo. Os mecanismos associados a essa resposta ainda não são totalmente esclarecidos, porém reconhece-se que, como em toda resposta reflexa, deve haver um envolvimento de estruturas supra-espinhais. Entretanto, as informações disponíveis na literatura sugerem que mecanismos muito mais complexos estão envolvidos. Além disso, é consenso de que esse teste é eficaz apenas para determinar a atividade analgésica de agonistas opioides, sendo bem adequado para prever a analgesia dessas drogas em seres humanos (LE BARS; GOZARIU e CADDEN, 2001). Não foi observada atividade para PHM no teste de retirada da cauda em nenhuma das doses testadas, o que reforça o resultado encontrado no teste da formalina, pois em ambos os casos a amostra não demonstrou apresentar ação opioide.

O modelo do edema de orelha induzido pelo óleo de cróton ou por outros agentes flogísticos permite a avaliação da atividade anti-inflamatória em nível de pele, de extratos vegetais ou substâncias isoladas, quando administrados topicamente ou mesmo de maneira sistêmica. Apesar de variados modelos de inflamação já terem sido desenvolvidos, o edema de orelha apresenta vantagens importantes, por ser um método rápido, simples, que requer pouca quantidade de amostra e fornece resultados bem reprodutíveis, com baixa probabilidade de erros (GÁBOR, 2003). O óleo de cróton contém o 12-*o*-tetradecanoilforbol-13-acetato (TPA) e outros ésteres de forbol, responsáveis por seu efeito irritante. O TPA é ativador da proteína quinase C (PKC) que, por sua vez, ativa proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPK) e a enzima fosfolipase A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>), a qual favorece a liberação do fator de ativação plaquetária (PAF) e de ácido araquidônico (AA). Esses mecanismos induzem ao aumento da permeabilidade vascular, vasodilatação, migração leucocitária, liberação de histamina e serotonina, e produção de eicosanoides sintetizados pelas enzimas ciclooxigenase (COX) e 5-lipoxigenase (5-LPOX) (SARAIVA et al., 2010).

O EBM não foi capaz de reduzir o edema de orelha quando aplicado topicamente, mas aumentou o edema quando administrado via oral (Figuras 17 e 18, p. 68). Apesar desse aumento, o EBM não demonstrou ser dotado de atividade pró-inflamatória no teste de contorções abdominais, pois, do contrário, teria potencializado a dor de origem inflamatória induzida pelo ácido acético.

Além disso, a análise histológica dos fragmentos de orelha obtidos após o experimento revelou que, visualmente, não há diferenças quanto a presença de

células inflamatórias nas orelhas dos animais tratados com veículo, EBM 100 e 300 mg/kg (Figuras 20 a 26, p. 70 a 73). Isso sugere que o intenso edema causado pelo extrato não decorreu de um aumento da resposta inflamatória, mas sim de uma atividade edematogênica que deve estar relacionada exclusivamente a uma ação vasodilatadora, o que confere com a presença de vasos sanguíneos bem dilatados em orelhas de animais tratados com EBM.

Uma hipótese para explicar tais resultados está no fato de que as folhas de *P. aculeata* são ricas em proteínas abundantes em triptofano (TAKEITI, et al., 2009). Esse aminoácido é precursor da serotonina, que no processo inflamatório é liberada pelas plaquetas e aumenta a permeabilidade vascular e a vasodilatação sem exercer papel quimiotático para leucócitos, ao mesmo tempo em que possui ação analgésica em nível de medula espinhal, nas vias descendentes da dor (KAPCZINSKI et al., 1998; MILLAN, 2002; RYAN e MAJNO, 1977). O triptofano pode ser obtido pela dieta, e após sua absorção no trato gastrintestinal é transformado em serotonina pelos neurônios serotoninérgicos e pelas células cromafins do intestino, através das quais as plaquetas captam a serotonina com o auxílio de um transportador específico, já que estas não possuem as enzimas necessárias para sintetizar e liberar essa substância na região inflamada (RANG, DALE e RITTER, 1995; SUNDERS-BUSH e MAYER, 2001). A diminuição da disponibilidade de triptofano, conseqüentemente de serotonina, está consistentemente associada com a depressão, ansiedade, distúrbios do apetite e hipersensibilidade à dor crônica e aguda. A serotonina, por sua vez, é precursora do hormônio pineal melatonina, um potente antioxidante e imunoestimulador utilizado como adjuvante no tratamento de síndromes dolorosas, como cefaléias e fibromialgias. Dessa forma, a suplementação com triptofano funciona como auxiliar no tratamento da dor, ao aumentar não somente os níveis de serotonina antinociceptiva, mas também de melatonina (BRIOSCHI et al., 2009).

Nas plantas, o triptofano não é apenas o precursor da serotonina, amplamente distribuída no reino vegetal, mas também é a matéria prima para a biossíntese de alcaloides indólicos. Por possuírem semelhanças com as aminas bioativas quanto à estrutura química, a maioria dos alcaloides indólicos afeta os sistemas adrenérgicos, serotoninérgicos, dopaminérgicos ou colinérgicos, quando são dotados de atividades biológicas. Como exemplo, pode-se citar a triptamina, harmina, estricnina, psilocibina, reserpina, entre tantos outros (DEWICK, 2002;

OLIVEIRA et al., 2009). Muitos alcaloides indólicos são conhecidos, por exemplo, como vasodilatadores (OZAKI, 1990). Uma vez que dados na literatura sugerem que as folhas de *P. aculeata* são abundantes em triptofano, é possível que alcaloides indólicos sejam biossintetizados na espécie e estejam envolvidos nas respostas antinociceptiva e edematogênica de EBM e antinociceptiva de PHM.

Dessa forma, para detectar na espécie a presença de compostos contendo o grupo indólico, foi realizada a reação de Hopkins-Cole, na qual a amostra é colocada em contato com uma solução de ácido glioxílico e outra de ácido sulfúrico concentrado. A formação de um anel violeta indica a presença de compostos indólicos. Tanto o EBM quanto as partições positivaram, sugerindo que, de fato, compostos indólicos estejam entre os constituintes químicos encontrados nas folhas de *P. aculeata*. Vale ressaltar que o reagente de Dragendorff detectou a presença de alcaloides em todas as amostras (Quadro 1, p. 59). Além disso, o cromatograma da análise de PHM por CLAE revelou constituintes cujos espectros UV são típicos de compostos indólicos (Figura 7, p. 61).

Assim, uma vez que PHM apresenta uma atividade antinociceptiva de ação central desprovida de efeitos opioides, que a serotonina é a única amina bioativa que apresenta o grupo indólico, e que esse neurotransmissor é o principal mediador envolvido no controle descendente da modulação da dor (MILLAN, 2002; RANG et al., 2004), foi realizado o teste de contorções abdominais induzidas pelo ácido acético em animais pré-tratados com PCPA. Essa substância é uma inibidora da síntese de serotonina e permite avaliar se existe a participação de uma droga no aumento da produção ou liberação desse neurotransmissor. Uma droga que apresente uma atividade antinociceptiva decorrente desse mecanismo terá seu efeito perdido, visto que sua ação está bloqueada pela PCPA (WERNER et al., 2009). O pré-tratamento com PCPA foi incapaz de reverter o efeito de PHM, sugerindo que sua atividade não está relacionada com componentes pré-sinápticos serotoninérgicos, o que não descarta a possibilidade dos efeitos estarem associados com a ativação direta dos receptores de serotonina.

Vale ressaltar que as atividades edematogênica de EBM e antinociceptiva de EBM e PHM não necessariamente estão associadas a uma ação serotoninérgica, uma vez que outros mecanismos podem estar envolvidos na vasodilatação e outras diversas substâncias e neurotransmissores, como a noradrenalina e a dopamina, participam na propagação e modulação da dor.

## 6 CONCLUSÃO

A caracterização fitoquímica preliminar demonstrou que as folhas de *Pereskia aculeata* Miller apresentam os seguintes constituintes químicos: fenóis, taninos condensados, taninos hidrolisáveis, cumarinas, antraquinonas, antronas, flavonoides, alcaloides e esteroides. A partição diclorometânica apresentou os maiores teores de fenóis e flavonoides dentre as amostras estudadas.

As folhas dessa espécie possuem substâncias tóxicas para células tumorais das linhagens MCF-7 e HL60, porém não foi observada toxicidade perante outros tipos celulares, como células bacterianas, de parasitos do gênero *Leishmania* e células de mamíferos. Além disso, as folhas da planta são comumente utilizadas na alimentação humana e não há relatos de toxicidade. Essas informações sugerem que pode haver uma possível seletividade da atividade citotóxica para células tumorais, ao menos para as linhagens celulares testadas.

O efeito edematogênico encontrado para o extrato bruto metanólico das folhas da planta não parece estar associado a uma atividade pró-inflamatória, mas sim vasodilatadora. No entanto, ressalta-se a necessidade da realização de experimentos específicos com o intuito de confirmar essa premissa.

Dentre as amostras estudadas, a partição hidrometanólica apresentou o maior potencial antinociceptivo, cujo mecanismo de ação não está relacionado à ativação de receptores opioides, apesar de haver um componente central. Uma vez que os picos observados em CLAE de tempo de retenção 5,85; 6,68 e 9,92 min possuem espectro UV típico de compostos indólicos, constituintes químicos estruturalmente semelhantes à serotonina, levanta-se a hipótese de que a atividade antinociceptiva da partição em questão esteja relacionada com uma ação serotoninérgica na via descendente da modulação da dor. Os resultados sugerem que não há qualquer participação das substâncias ativas na síntese ou liberação desse neurotransmissor, o que não exclui a possibilidade de atuação direta em receptores de serotonina.

Os resultados apresentados demonstram que as folhas de *Pereskia aculeata* Miller são dotadas de constituintes químicos com potencial antitumoral e analgésico, e abrem perspectivas futuras para estudos químicos e farmacológicos mais profundos a fim de identificar as substâncias bioativas responsáveis pelos efeitos observados bem como esclarecer o seu mecanismo de ação.

## REFERÊNCIAS

- AGURELL, S. Cactaceae alkaloids VIII: N-methyl-4-methoxyphenethylamine from *Lepidocoryphantha runyonii* (Br. and R.) Backbg. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 25, n.1, jun. 1969.
- AGURELL, S.; LUNDSTRÖM, J.; MASOUD, A. Cactaceae alkaloids VII: alkaloids of *Echinocereus merkeri*. **Journal of Pharmaceutical Science**, v. 58, n. 11, p. 1413-1414, nov. 1969.
- ALMEIDA, N. F. L.; SILVA, S. R. de S e; SOUZA, J. M. de; QUEIROZ, A. P. N.; MIRANDA, G. da S.; OLIVEIRA, H. B. de. Levantamento etnobotânico de plantas medicinais na cidade de Vinosa – MG. **Revista Brasileira de Farmácia**, v. 90, n. 4, p. 316-320, 2009.
- ALMEIDA, O. L. S.; SANTOS, J. B. Avanços no tratamento da leishmaniose tegumentar do novo mundo nos últimos dez anos: uma revisão sistemática da literatura. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 86, n. 3, p. 497-506, 2011.
- ALMEIDA, V. L. de; LEITÃO, A.; REINA, L. del C. B.; MONTANARI, C. A.; DONICCI, C. L.; LOPES, M. T. P. Câncer e agentes antineoplásicos ciclo-celular específicos e ciclo-celular não específicos que interagem com o DNA: uma introdução. **Química Nova**, v. 28, n. 1, p. 118-129, 2005.
- ARIAS, S.; PÉREZ, M. E. V. Diversidad y distribución de las Cactáceas en Guatemala. In: CANO, E. **Biodiversidad de Guatemala**. Guatemala: Universidad del Valle de Guatemala, 2006. v.1, p. 229-238.
- BARREIRO, E. J.; BOLZANI, V. da S. Biodiversidade: fonte potencial para a descoberta de fármacos. **Química Nova**, v. 32, n. 3, p. 679-688, 2009.
- BARREIRO, E. J. Produtos naturais bioativos de origem vegetal e o desenvolvimento de fármacos. **Química Nova**, v. 13, n. 1, p. 29-39, 1990.
- BARROS, K, N.; GUIMARÃES, H. E. T.; SARTOR, C. F. P.; CORTEZ, L. E. R.; AMARAL, V. do.; FELIPE, D. F. desenvolvimento de formulação de uso tópico com ação cicatrizante contendo extrato de *Pereskia aculeata*. **Cesumar**, v. 12, n. 1, p. 29-37, jan./jun. 2010.
- BEIRITH, A.; SANTOS, A. R.; RODRIGUES, A. L.; CRECZYNSKI-PASA, T. B.; CALIXTO, J. B. Spinal and Supraspinal antinociceptive action of dipyrone in formalin, capsaicin and glutamate tests: study of mechanism of action. **European Journal of Pharmacology**, v. 345, n. 3, p. 233-245, mar. 1998.
- BELOW, L. E.; LEUNG, A. Y.; MCLAUGHLIN, J. L.; PAUL, A. G. Cactus alkaloids IV: macromerine from *Coryphantha runyonii*. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 57, n. 3, p. 515-516, mar. 1968.

BERRA, C. M.; MENCK, C. F. M.; MASCIO, P. D. Estresse oxidativo, lesões no genoma e processos de sinalização no controle do ciclo celular. **Química Nova**, v. 29, n. 6, p. 1340-1344, 2006.

BLADT, S.; WAGNER, H.; ZGAINSKI, E.M. **Plant Drug Analysis: A thin layer chromatography atlas**. Spring – Verlag, 1984.

BONICA, J. J. **The management of pain**. 2. ed. Philadelphia: Lea & Febiger, 1990. 2178 p.

BRANDÃO, H. N.; DAVID, J. P.; COUTO, R. D.; NASCIMENTO, J. A. P.; DAVID, J. M. Química e Farmacologia de quimioterápicos antineoplásicos derivados de plantas. **Química Nova**, v. 33, n. 6, p. 1359-1369, 2010.

BRASIL, Ministério da Saúde. **Manual de vigilância da leishmaniose tegumentar americana**. 2ª ed. Brasília: Editora do Ministério da Saúde, 2007. 180 p.

BRIOSCHI, E. F. C.; BRIOSCHI, M. L.; YENG, L. T.; TEIXEIRA, M. J. Nutrição funcional no paciente com dor crônica. **Revista Dor**, v. 10, n. 3, p. 276-285, 2009.

BRUHN, J.G.; AGURELL, S. Cactaceae alkaloids XVIII: Two new alkaloids from *Coryphantha calipensis* H. Bravo. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 63, n. 4, p. 574–576, abr. 1974.

BRUHN, J. G.; BRUHN, C. Alkaloids and ethnobotany of Mexican peyote cacti and related species. **Economic Botany**, v. 27, n. 2, p. 241-251, 1971.

BUTTERWORTH, C. A.; WALLACE, R. S. Molecular phylogenetics of the leafy cactus genus *Pereskia* (Cactaceae). **Systematic Botany**, v. 30, n. 4, p. 800-808, 2005

CAI, W.; GU, X.; TANG, J. Extraction, purification and characterisation of the flavonoids from *Opuntia milpa alta* skin. **Czech of Food Science**, v. 28, n. 2, p. 108-116, 2010.

CASADO, R.; URIARTE, I.; CAVERO, R. Y.; CALVO, M. I. LC-PAD determination of mescaline in cactus “peyote” (*Lophophora williamsii*). **Chromatographia**, v. 67, n. 7/8, p. 665-667, abr. 2008.

COSTA, D. S. M. et al. Estudo preliminar da atividade analgésica do extrato bruto etanólico de *Pereskia grandifolia* Haw. (Cactaceae). In: REUNIÃO ANUAL DA FEDERAÇÃO DE SOCIEDADES DE BIOLOGIA EXPERIMENTAL, 18., 2003, Curitiba. Resumos... Curitiba: FESBE, 2003. p.12.010.

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

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

DAVET, A. **Estudo fitoquímico e biológico do Cacto - Cereus jamacaru De Candolle, Cactacea**. 2005. 121 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2005.

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

DICKENSON, A. H.; GHANDEHARI, J. Anti-convulsants and anti-depressants. In: STEIN, C. **Handbook of experimental pharmacology: analgesia**. Berlin: Springer, 2007. v. 177, p. 145-177.

DOETSCH, P. W.; CASSADY, J. M.; MCLAUGHLIN, J. L. Cactus alkaloids : XL. Identification of mescaline and other  $\beta$ -phenethylamines in *Pereskia*, *Pereskopsis* and *Islaya* by use of fluorescamine conjugates. **Journal of Chromatography A**, v. 189, p. 79-85, fev. 1980.

DUARTE, I. D.; NAKAMURA, M.; FERREIRA, S. H. Participation of the sympathetic system in acetic acid-induced writhing in mice. **Brazilian Journal of Medical Biological Research**, v. 21, n. 2, p. 341-343, 1987.

DUARTE, M. R.; HAYASHI, S. S. Estudo anatômico de folha e caule de *Pereskia aculeata* Mill. (Cactaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 15, n. 2, abr./jun. 2005.

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

EDWARDS, E. J.; DIAZ, M. Ecological physiology of *Pereskia guamacho*, a cactus with leaves. **Plant, Cell and Environment**, v. 29, p. 247-256, 2006.

EDWARDS, E. J.; NYFFELER, R.; DONOGHUE, M. J. basal cactus phylogeny: implications of *Pereskia* (Cactaceae ) paraphyly for the transition to the cactus life form. **American Journal of Botany**, v. 92, n. 7, p. 1177-1188, 2005.

FANHANI, R. F. et al. Avaliação da atividade farmacológica central de *Pereskia grandifolia* Hars (Cactaceae). ENCONTRO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA E FÓRUM DE PESQUISA, 1., 2002, Umuarama. Anais... Umuarama: UNIPAR, p. 45, 2002.

ELLER, G. J.; JAQUES, A. E. O enfermeiro e as terapias complementares para o alívio da dor. **Arquivos de Ciência da Saúde da UNIPAR**, v. 10, n. 3, p. 185-190, set./out. 2006.

FARAGO, P. V.; TAKEDA, I. J. M.; BUDEL, J. M.; DUARTE, M. R. Análise morfo-anatômica de folhas de *Pereskia grandifolia* haw., Cactaceae. **Acta Farmaceutica Bonaerense**, Argentina, v. 23, n. 3, p. 323-327, 2004.

FARFAN, J. A. Alimentação alternativa: análise crítica de uma proposta de intervenção nutricional. **Caderno de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 14, n. 1, p. 205-212, jan./mar. 1998.

FERRIGNI, N. R.; NICHOLS, D. E.; MCLAUGHLIN, J. L. BYE, R. A. Cactus alkaloids. XLVIII. *N, N*-dimethylhistamine, a hypotensive component of *Echinocereus triglochidiatus* **Journal of Ethnopharmacology**, v. 5, n. 3, p. 359-364, mai. 1982.

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

FREITAS, M. de F. Cactaceae da área de proteção ambiental de Massambaba, Rio de Janeiro, Brasil. **Rodriguésia**, Rio de Janeiro v. 42-44, p. 67-91, 1990-1992.

FU, H. Y.; CHEN, S. J.; CHEN, R. F.; DING, W. H.; KUO-HUANG, L. L.; HUANG, R. N. Identification of oxalic acid and tartaric acid as major persistent pain-inducing toxins in the stinging hairs of the nettle, *Urtica thurbengiana*. **Annals of Botany**, v. 98, p. 57-65, 2006.

GÁBOR, M. Models of acute inflammation in the ear. In: WINYARD, P. G.; WILLOUGHBY, D. A. **Methods in molecular biology**. Totowa, 2003. v. 225, p. 129-137.

GIL, E. S.; PAULA, J. R.; NASCIMENTO, F. R. F.; BEZERRA, J. C. B. Produtos naturais com potencial leishmanicidade. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplica**, v. 29, n. 3, p. 223-230, 2008.

GIRÃO, L. V. C.; FILHO, J. C. S.; PINTO, J. E. B. P.; BERTOLUCCI, S. K. V. Avaliação da composição bromatológica de ora-pro-nóbis. In: Congresso Brasileiro de Olericultura, 43, 2003, Recife. **ANAIS CBO**. Recife: Associação Brasileira de Horticultura, 2003.

GONZÁLEZ, U.; PINART, M.; RENGIFO-PARDO, M.; MOCAYA, A.; ALVAR, J.; TWEED J. A. Interventions for American cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. **Cochrane Database of Systematic Reviews**, v. 2, abr. 2009.

GONZÁLEZ, U.; PINART, M.; REVEIZ, L.; ALVAR, J. Interventions for Old World cutaneous leishmaniasis. **Cochrane Database of Systematic Reviews**, v. 4, out. 2008.

GORDALIZA M. Natural Products as leads to anticancer drugs. **Clinical and Tanslational Oncology**, v. 9, n. 12, p. 767-776, 2007.

GUINSBURG, R. Avaliação e tratamento da dor no recém nascido. **Jornal de Pediatria**, v. 75, n. 3, p. 149-160, 1999.

HEARST, C.; MCCOLLUM, G.; NELSON, D.; BALLARD, L. M.; MILLAR, B. C.; GOLDSMITH, C. E.; ROONEY, P. J.; LOUGHREY, A.; MOORE, J. E.; RAO, J. R.

Antibacterial activity of elder (*Sambucus nigra* L.) flower or berry against hospital pathogens. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 4, n. 17, p. 1805-1809, set. 2010.

HIRANO, T.; GOTOH, M.; OKA, K. Natural flavonoids and lignans are potent cytostatic agents against human leukemic HL-60 cells. **Life Science**, v. 5, n. 13, p. 1061-1069, 1994.

HOPKINS, F. G.; COLE, S. W. **Proceedings of the Royal Society**, v. 68, n. 21, p. 21-33, 1901.

HORNEMANN, K. M. K.; NEAL, J. M.; MCLAUGHLIN, J. L. C. Cactus alkaloids XII:  $\beta$ -Phenethylamine alkaloids of the genus *Coryphantha*. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 61, n. 1, p. 41-45, jan. 1972.

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

IWALEWA, E. O.; MCGAW, J. L.; NAIDOO, V.; ELOFF, J. N. Inflammation: the foundation of diseases and disorders. A review of phytomedicines of South African origin used to treat pain and inflammatory conditions. **African Journal of Biotechnology**, v. 6, n. 25, p. 2868-2885, 2007.

JEMAL, A.; SIEGEL, R.; XU, J.; WARD, E. Global cancer statistics. **CA A Cancer Journal for Clinicians**, v. 61, n. 2, p. 69-90, mar./abr. 2011.

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

KANADASWAMI, C.; LEE, L.T.; LEE, P.P.H.; HWANG, J.J.; KE, F.C.; HUANG, Y.T.; LEE, M.T. The antitumor activities of flavonoids. **In vivo**, v. 19, n. 5, p. 895-910, 2005.

KAYE, P.; SCOTT, P. Leishmaniasis: complexity at the host-pathogen interface. **Nature Reviews**, v. 9, p. 604-615, ago. 2011.

KAPCZINSKI, F.; BUSNELLO, J.; ABREU, M. R. de.; CARRÃO, A. D. Aspectos da fisiologia do triptofano. **Revista de Psiquiatria Clínica**, v. 25, n. 4, jul./ago. 1998.

KELLER, W. J.; MACLAUGHLIN, J. L.; BRADY, L. R. Cactus alkaloids XV:  $\beta$ -phenethylamine derivatives from *Coryphantha macromeris* var. *runyonii*. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 62, n. 3, p. 408-411, mar. 1973.

KLEIN, H. Biological control of three cactaceous weeds, *Pereskia aculeata* Miller, *Harrisia martinii* (Labouret) Britton and *Cereus jamacaru* de Candolle in South Africa. **African Entomology**, n. 1, p. 3-14, jun. 1999.

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

LAPA, A. J.; SOUCCAR, C.; LANDMAN, M. T. L.; CASTRO, M. S. de A.; LIMA, T. M. de L. **Métodos de avaliação da atividade farmacológica de plantas medicinais**. 5. ed. Campinas: Sociedade Brasileira de Plantas Medicinais, 2008. 143 p.

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

LEE, I.; KIM, H. K.; KIM, J. H.; CHUNG, K.; CHUNG, J. M. The role of reactive oxygen species in capsaicin-induced mechanical hyperalgesia and in the activities of dorsal horn neurals. **Pain**, v. 133, p. 9-17, dez. 2007.

LEUENBERGER, B. E. *Pereskia*, *Maihuenia* e *Blossfeldia*: taxonomic history, updates and notes. **Haseltonia**, n. 14, p. 54-93, 2008.

LIMA, G. M.; BONFIM, R. R.; SILVA, M. R.; THOMAZZI, S. M.; SANTOS, M. R. V.; QUINTANS-JÚNIOR, L. J.; BONJARDIM, L. R.; ARAÚJO, A. A. S. Assessment of antinociceptive and anti-inflammatory activities of *Porophyllum ruderale* (Jacq.) Cass., Asteraceae, aqueous extract. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 21, n. 3, p. 486-490, 2010.

LIN, R. C.; PEYROUX, J.; SEGUIN, E.; KOCH, M. Hypertensive effect of glycosidic derivatives of hordenine isolated from *Selaginella doederleinii* hieron and structural analogues in rats. **Phytotherapy Research**, v. 5, n. 4, p. 188-190, 1991.

LIU, Z. Q. Chemical Methods to evaluate antioxidant ability. **Chemical Reviews**, v. 110, n. 10, p. 5675-5691, 2010.

MACÍA, M. J.; GARCÍA E.; VIDAURRE, P. J. An ethnobotanical survey of medicinal plants commercialized in the markets of La Paz and El Alto, Bolivia. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 97, p. 337-350, 2005.

MALEK, S. N. A.; SHIN, S. K.; WAHAB, N. A.; YAACOB, H. Cytotoxic components of *Pereskia bleo* (Kunth) DC. (Cactaceae) leaves. **Molecules**, v. 14, p. 1713-1724, 2009.

MALEK, S. N. A.; WAHAB, N. A.; YAACOB, H.; SHIN, S. K.; LAI, H. S.; SERM, L. G.; RAHMAN, S. N. S. A. Cytotoxic activity of pereskia bleo (cactaceae) against selected human cell lines. **International Journal of Cancer Research**, v. 4, n. 1, p. 20-27, 2008.

MANN, J. Natural products in cancer chemotherapy: past, present and future. **Nature Reviews**, v. 2, p. 143-148, fev. 2002.

MATA, R.; MCLAUGHLIN, J. L. Tetrahydroisoquinoline alkaloids of the Mexican columnar cactus *Pachycereus Weberi*. **Phytochemistry**, v. 19, n. 4, p. 673-678, 1980.

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

MENOSSE, M. J.; LIMA, R. A. G. de. A problemática do sofrimento: percepção do adolescente com câncer. **Revista da Escola de Enfermagem da USP**, v. 34, n. 1, p. 45-41, 2006.

MERCÊ, A. N. R.; LANDALUZE, J. S.; MANGRICH, A. S.; SZPOGANICZ, B.; SIERAKOWSKI, M. R. Complexes of arabinogalactan of *Pereskia aculeata* and  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ , and  $\text{Ni}^{2+}$ . **Bioresource Technology**, v. 76, p. 29-37, 2001.

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

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

MIRANDA, H. F.; PUIG, M. M.; DURSTELER, C.; PRIETO, J. C.; PINNARDI, G. Dexketoprofen-induced antinociception in animal models of acute pain: synergy with morphine and paracetamol. **Neuropharmacology**, v. 52, n. 2, p. 231-196, fev. 2007.

MONKS, A.; SCUDIERO, D.; SKEHAN, P.; SHOEMAKER, R.; PAULL, K.; VISTICA, D.; HOSE, C.; LANGLEY, J.; CRONISE, P.; VAIGRO-WOLFF, A.; GRAY-GOODRICH, M.; CAMPBELL, H.; MAYO J.; BOYD, M. Feasibility of a High-Flux Anticancer Drug Screen Using a Diverse Panel of Cultured Human Tumor Cell Lines. **Journal of National Cancer Institute**, v. 83, n. 11, p. 757-766, 1991.

MOORE, R.; CLARK, W.; VODOPICH, D. **Botany**. 2. ed. New York: WCB/MacGraw-Hill, 1998.

MORTON, J. F. Barbados Gooseberry. In: MORTON, J. F. **Fruits of warm climates**. Miami, 1987, p. 349-351.

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

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

NACHTIGALL, A. M.; STRINGHETA, P. C.; FIDELIS, P. C.; NACHTIGALL F. M. Determinação do teor de luteína em hotaliças. **B. CEPPA**, v. 25, n. 2, p. 181-192, jul./dez. 2007.

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

NCUBE, N. S.; AFOLAYAN, A. J.; OKOH, A. I. Assessment techniques of antimicrobial properties of natural compounds of plant origin: current methods and

future trends. **African Journal of Biotechnology**, v. 7, n. 12, p. 1797-1806, jun. 2008.

NOBEL, P. S.; HARTSOCK, T. L. Leaf and stem CO<sub>2</sub> uptake in the three subfamilies of the Cactaceae. **Plant Physiology**, v. 80, p. 913-917, 1986.

NOGUEIRA, L. J.; MONTANARI, C. A.; DONNICI, C. L. Histórico da evolução da química medicinal e a importância da lipofilia: de Hipócrates e Galeno a Paracelsus e as contribuições de Overton e de Hansch. **Revista Virtual de Química**, v. 1, n. 3, jul./set. 2009.

NURESTRI, A. M. S.; SIM, K. S.; NORHANOM, A. W. Phytochemical and cytotoxic investigations of *Pereskia grandifolia* Haw (Cactaceae) leaves. **Journal of Biological Sciences**, v. 9, n. 5, p. 488-493, 2009.

NYFFELER, R. Phylogenetic relationships in the cactus family (Cactaceae) based on evidence from trnK/matK and trnL-trnF sequences. **American Journal of Botany**, v. 82, n. 2, p. 312-326, 2002.

OLIVEIRA, V. B.; FREITAS, M. S. M.; MATHIAS, L.; BRAZ-FILHO, R.; VIEIRA, I. J. C. Atividade biológica e alcalóides indólicos do gênero *Aspidosperma* (Apocynaceae): uma revisão. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 11, n. 1, p. 92-99, 2009.

OGBURN, R. M.; EDWARDS, E. J. Anatomical variation in Cactaceae and relatives: trait lability and evolutionary innovation. **American Journal of Botany**, n. 96, v. 2, p. 391-408, 2009.

OKAZAKI, S.; KINOSHITA, K.; ITO, S.; KOYAMA, K.; YUASA, H.; TAKAHASHI, K. Triterpenoid saponins from *Echinopsis macrogona* (Cactaceae). **Phytochemistry**, 2010.

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

ORTEGA-BAES, P.; SÜHRING, S.; SAJAMA, J.; SOTOLA, E.; ALONSO-PEDANO, M.; Diversity and conservation in the cactus family. In: RAMAWAT, K. G. **Desert Plants: biology and biotechnology**. Heidelberg, 2010, p.157-173.

OZAKI, Y. Vasodilative effects of indole alkaloids obtained from domestic plants *Uncaria rhynchophylla* Miq. and *Amsonia elliptica* Roem. et Schult]. **Nippon Yakurigaku Zasshi**, v.95, n.2, p.47-54, fev. 1990.

PEREIRA, O. L.; BARRETO, R. W.; CAVALLAZZI, J. R. P.; BRAUN, U. The mycobiota of the cactus weed *Pereskia aculeata* in Brazil, with comments on the life-cycle of *Uromyces pereskiae*. **Fungal Diversity**, v. 25, p. 127-140, abr. 2007.

PETERSON, I. D.; DOWNIE D. A.; HILL, M. P. Using molecular methods to determine the origin of weed populations of *Pereskia aculeata* in South Africa and its relevance to biological control. **Biological Control**, v. 48, p. 84-91, 2009.

PIMENTA, C. A. de M.; TEIXEIRA, M. J.; SIMÕES, P.; SIMÕES, C.; CRUZ, D. A. L. M. da.; OKADA, M. Liga de dor: uma experiência de ensino extracurricular. **Revista da Escola de Enfermagem da USP**, v. 32, n. 3, p. 281-289, 1998.

PINTO, A. C.; SILVA, D. H. S.; BOLZANI, V. S. da. LOPES, N. P.; EPIFANIO, R. de A. Produtos naturais: atualidade, desafios e perspectivas. **Química Nova**, v. 25, 9. 45-61, 2002.

POWELL, C. E. CHEN, K. K. Pilocereine, a cactus alkaloid. **Journal of the American Pharmaceutical Association**, v. 45, n. 8, p. 559-561, ago. 1956.

PUPO, M. T.; GALLO, M. B. C. Biologia química: uma estratégia moderna para a pesquisa em produtos naturais. **Química Nova**, v. 30, n. 6, p. 1446-1455, 2007.

RANG, H.P.; DALE, M.M.; RITTER, J.M.; MOORE, P.K. **Farmacologia**. 5 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2004. 904 p.

RANG, H.P.; DALE, M.M.; RITTER, J.M. Outros mediadores periféricos: 5-hidroxitriptamina e purinas In: RANG, H.P.; DALE, M.M.; RITTER, J.M.; MOORE, P.K. **Farmacologia**. 5 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2004. p. 139-141.

REDDY, L.; ODHAV, B.; BHOOLA, K. D. Natural products for cancer prevention: a global perspective. **Pharmacology and Therapeutics**, v. 99, p. 1-13, 2003.

ROCHA, D. R. da C.; JÚNIOR, G. A. P.; VIEIRA, G.; PANTOJA, L.; SANTOS, A. S. dos; PINTO, N. A. V. D. Macarrão adicionado de ora-pro-nóbis (*Pereskia aculeata* Miller) desidratado. **Alimentos e Nutrição**, Araraquara, v. 19, n. 4, p. 459-465, out./dez. 2008.

RODRIGUES, E.; CARLINI, E. A. Possíveis efeitos sobre o sistema nervoso central de plantas utilizadas por duas culturas brasileiras (quilombolas e índios). **Arquivos Brasileiros de de Fitomedicina Científica**, v. 1, n. 3, p. 147-154, 2003.

RODRIGUES, E.; ALMEIDA, J. M. D.; PIRES, J. M. Perfil farmacológico e fitoquímico de plantas indicadas pelos caboclos do Parque Nacional do Jaú (AM) como potenciais analgésicos: parte I. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, n. 6, p. 981-991, 2010.

ROJAS, M. A.; YANES, C. V. Cactus seed germination: a review. **Journal of Arid Environments**, v. 44, p. 85-104, 2000.

ROSA, S. M. da. SOUZA, L. A. Morphology and anatomy of the fruit (hypanthium, pericarp and seed) development of *Pereskia aculeata* Miller (Cactaceae). **Acta Scientiarum Biological Sciences**, Maringá, v. 25, n. 2, p. 415-428, 2003.

ROSENKRANZ, V.; WINK, M. Induction of apoptosis by alkaloids, non-protein amino acids, and cardiac glycosides in human promyelotic HL-60 cells. **Zeitschrift für Naturforschung C**, v. 62, n. 5-6, p. 458-466, 2007.

RYAN, G. B.; MAJNO, G. Acute inflammation: a review. **American Journal of Phatology**, v. 86, n. 1, p. 185-274, 1977.

SALT, T. A.; TOCKER, J. E.; ADLER, J. H. Dominance of  $\Delta^5$ -sterols in eight species of the cactaceae. **Phytochemistry**, v. 26, p. 731-733, 1987.

SAHU, N. P.; BANERJI, N.; CHAKRAVA, R. N. New saponin of oleanolic acid from *Pereskia grandifolia*, **Phytochemistry**, v.13, n. 2, p. 529-530, 1974.

SANTOS, D. O.; COUTINHO, C. E. R.; MADEIRA, M. F.; BOTTINO, C. G.; VIEIRA, R. T.; NASCIMENTO, S. B.; BERNARDINO, A.; BOURGUIGNON, S. C.; CORTE-REAL, S.; PINHO, R. T.; RODRIGUES, C. R.; CASTRO, H. C. Leishmaniasis treatment – a challenge that remains: a review. **Parasitology Research**, v. 103, p. 1-10, 2008.

SANTOS, R.I. Metabolismo Básico e origem dos metabólitos secundários. In: SIMÕES C. et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Porto Alegre/Florianópolis, 2007. 6ª Ed.

SARAIVA, R. A.; ARARUNA, M. K. A.; OLIVEIRA, R. C.; MENEZES, K. D. P.; LEITE, G. O.; KERNTOPF, M. F.; COSTA, J. G. M.; ROCHA, J. B. T.; TOMÉ, A. R.; CAMPOS, A. R.; MENEZES, I. R. A. Topical anti-inflammatory effect of *Caryocar coriaceum* Wittm. (*Caryocaraceae*) fruit pulp fixed oil on mice ear edema induced by different irritant agents. **Journal of Ethnopharmacology**, v 136, n. 3, p. 504-510, jul. 2010.

SARTOR, C. F. P.; AMARAL, V. do; GUIMARÃES, H. E. T.; BARROS, K. N.; FELIPE, D. F.; CORTEZ, L. E. R.; VELTRINI, V. C. Estudo da ação cicatrizante de folhas de *Pereskia aculeata*. **Revista Saúde e Pesquisa**, v. 3, n. 2, p. 149-154, mai./ago. 2010.

SCHIANTARELLI, P.; CADEL, S.; ACERBI, D.; PAVESI, L. Antiinflammatory activity and Bioavailability of percutaneous piroxican. **Arzneimittel Forschung/Drug Research**, v. 32, p. 230-235, 1982.

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

SIERAKOWSKI, M. R.; GORIN, P. A. J.; REICHER, F.; CORRÊA, J. B. C. Location of *O*-acetyl groups in the heteropolysaccharide of the cactus *Pereskia aculeata*. **Carbohydrate Research**, v. 201, p. 277-284, jul. 1990.

SILVA, C. V. da.; REIS, A. L. V.; FERRER, S. R.; GUERREIRO, H. M. N.; BARROS, T. F.; VELOZO, E. da S. Avaliação da atividade antimicrobiana de duas espécies de Rutaceae do Nordeste Brasileiro. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, n. 3, p. 355-360, jun./jul. 2010.

SIM, K. S.; NURESTRI, A. M. S.; SINNIHAH, S. K.; KIM, K. H.; NORHANOM, A. W. Acute oral toxicity of *Pereskia bleo* and *Pereskia grandifolia* in mice. **Pharmacognosy Magazine**, v. 6, n. 21, p. 67-70, jan./mar. 2010.

SIM, K. S.; NURESTRI, A. M. S.; NORHANOM, A. W. Phenolic content and antioxidant activity of *Pereskia grandifolia* Haw. (Cactaceae) extracts. **Pharmacognosy Magazine**, v. 6, n. 23, p. 248-254, 2010.

SUNDERS-BUSH, E.; MAYER, S.E. In: Goodman & Gilman's the pharmacological basis of therapeutics. **5-Hydroxytryptamine (serotonin): receptor agonists and antagonists**. 10 ed. New York:: McGraw-Hill, 2001

SWEENEY, J. A.; ASHER, S. A. Tryptophan UV resonance raman excitation profiles. **Journal of physical chemistry**, v. 94, n. 12, p. 4784-4791, 1990.

TAKEITI, C. Y.; ANTONIO, G. C.; MOTTA, E. M. P.; COLLARES-QUEIROZ, F. P.; PARK, K. J. Nutritive evaluation of a non-conventional leafy vegetable (*Pereskia aculeata* Miller). **International Journal of Food Sciences and Nutrition**, v. 60, p. 148-160, 2009.

TAN, M. L.; SULAIMAN, S.F.; NAJIMUDDIN, N.; SAMIAN, M. R.; MUHAMMAD, T. S. T. Methanolic extract of *Pereskia bleo* (Kunth) DC. (Cactaceae) induces apoptosis in breast carcinoma, T47-D cell line. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 96, p. 287-294, 2005.

TURRA, A. F.; MARÇAL, F. J. B.; BARETTA, I. P.; TAKEMURA, O. S.; JÚNIOR, A. L. Avaliação das propriedades antioxidantes e susceptibilidade antimicrobiana de *Pereskia grandifolia* haworth (Cactaceae). **Arquivos de Ciências da Saúde da Unipar**, Umuarama, v. 11, n. 1, p. 9-14, jan./abr. 2007.

USTULIN, M.; FIGUEIREDO, B. de B; TREMEA, C.; POTT, A.; POTT, V. J.; BUENO, N. R.; CASTILHO, R. O. Plantas medicinais comercializadas no mercado municipal de Campo Grande – MS. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 19, n. 3, p. 805-813, jul./set. 2009.

VALENTE, L. M. M.; PAIXÃO, D. da; NASCIMENTO, A. C. do; SANTOS, P. F. P. dos; SCHEIVAR, L. A.; MOURA, M. R. L.; TINOCO, L. W.; GOMES, L. N. F.; SILVA, J. F. M. da. Antiradical activity, nutritional potential and flavonoids of the cladodes of *Opuntia monacantha* (Cactaceae). **Food Chemistry**, v. 123, p. 1127-1131, 2010.

VIGGIANO, A.; MONDA, M.; VIGGIANO, A.; VIGGIANO, D.; VIGGIANO, E.; CHIEFARI, M.; AURILIO, C.; DE LUCA, B. Trigeminal pain transmission requires reactive oxygen species production. **Brain Research**, v. 1050, p. 72-78, jul. 2005.

WAHAB, S. I. A.; ABDUL, A.B.; MOHAN, S. M.; AL-ZUBAIRI, A. S.; ELHASSAN, M. M.; IBRAHIM, M. Y. Biological activities of *Pereskia bleo* extracts. **International Journal of Pharmacology**, v. 5, n.1, p. 71-75, 2009.

WANNMACHER, L. Uso indiscriminado de antibióticos e resistência microbiana: uma guerra perdida? **Uso racional de medicamentos**, v. 1, n. 4, mar. 2004.

WERNER, J. A. T.; OLIVEIRA, S. M.; MARTINS, D. F.; MAZZARDO, L.; DIAS, J. F. G.; LORLDELLO, A. L. L; MIGUEL, O. G.; ROYES, L. F.; FERREIRA, J.; SANTOS, A. R.S. Evidence for a role of 5-HT<sub>1A</sub> receptor on antinociceptive action from *Geissospermum vellosii*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 125, p. 163-169, 2009.

WINYARD, P. G. Key stages in the acute inflammatory response and their relevance as therapeutic targets In: WINYARD, P. G.; WILLOUGHBY, D. A. **Methods in Molecular Biology: inflammation protocols**. Totowa: Humana Press Inc., 2003. v. 225, p. 3-6.

WHEDON, M.; FERREL, B. R. Professional and ethical considerations in the use of high-tech pain management. **Oncology Nursing Forum** , v. 18, n. 7, p.135-43, 1991.

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

ZHAO, Y.; CHANG, S. K. C.; QU, G. ; LI, T. ; CUI, H.  $\beta$ -sitosterol inhibits cell growth and induces apoptosis in SGC-7901 human stomach cancer cells. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, n. 12, p. 5211-5218, mai. 2009.

**ANEXO**

Artigo submetido à revista Food Chemistry, intitulado "*Pereskia aculeata* Miller, a vegetable with antinociceptive activity".

Elsevier Editorial System(tm) for Food Chemistry  
Manuscript Draft

Manuscript Number: FOODCHEM-D-12-02342

Title: *Pereskia aculeata* Miller, a vegetable with antinociceptive activity

Article Type: Research Article (max 7,500 words)

Keywords: *Pereskia aculeata*; antinociception; indole alkaloids, serotonin

Corresponding Author: Dr Elita Scio, PhD

Corresponding Author's Institution: Federal University of Juiz de Fora

First Author: Nicolas C Pinto, MSc

Order of Authors: Nicolas C Pinto, MSc; Ana Paula N Duque, MSc; Natalia R Pacheco, MSc; Renata F Mendes, Undergraduate student; Erick Vicente S Motta, MSc; Paula Maria Q Bellozi, MSc; Antonia Ribeiro, PhD; Elita Scio, PhD

Abstract: *Pereskia aculeata* Miller is a climbing cactus naturally distributed from south to northeast of Brazil, where its succulent leaves are commonly used by natives as a vegetable. There are reports that leaves of *P. aculeata* are also used in Brazilian folk medicine as emollients, in skin wound healing, and to treat inflammation. In this work, it was realized a phytochemical characterization and evaluated the antinociceptive activity of hydromethanolic fraction obtained by solvent partition from methanol crude extract of *P. aculeata* leaves, performing the acetic acid-induced writhing, formalin, and tail-flick tests in mice. The results showed the presence of phenols, tannins, coumarins, anthrones, flavonoids, alkaloids, and indole compounds. A significative antinociceptive activity, comparative to the standard drugs, was also observed, probably related to peripheral and central components. This study is the first report on the antinociceptive effect of this plant.

12<sup>th</sup> June, 2012

Dear Editor,

I, Elita Scio, corresponding author of the manuscript, am sending the manuscript entitled "***Pereskia aculeata* Miller, a vegetable with antinociceptive activity**" submitted to "**Food Chemistry**" for possible evaluation.

*P. aculeata* is a cactus naturally distributed from south to northeast of Brazil, where its succulent leaves are commonly used by natives as a vegetable in traditional cuisine. In many low-income communities, leaves of *P. aculeata* are used as the main proteins source, so this vegetable is also known as "meat of the poor" Besides used in food, there are reports that the leaves of *P. aculeata* are also used in Brazilian folk medicine as emollients due to their high mucilaginous content, in skin wound healing, and to treat inflammation. Nevertheless, there are only few studies about their phytochemicals and therapeutic potential, although plants used in traditional cuisine/medicine consists of valuable resource in search for new therapeutic agents. So, the purpose of the present study was to investigate the chemical composition and the antinociceptive effect of *P. aculeata*. To the best of our knowledge it is the first time those information are provided.

With the submission of this manuscript I would like to undertake that:

- All authors of this research paper have directly participated in the planning, execution, or analysis of this study;
- All authors of this paper have read and approved the final version submitted;
- The contents of this manuscript have not been copyrighted or published previously;
- The contents of this manuscript are not now under consideration for publication elsewhere;
- The contents of this manuscript will not be copyrighted, submitted, or published elsewhere, while acceptance by the Journal is under consideration;

- There are no directly related manuscripts or abstracts, published or unpublished, by any authors of this paper;
- This study was performed according to the biodiversity rules.

This research was fully sponsored by Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG CEX APQ 01137-09) and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior (CAPES).

Sincerely,

Elita Scio

Laboratory of Bioactive Natural Products. Department of Biochemistry. Institute of Biological Science of Federal University of Juiz de Fora, Juiz de Fora, MG 36036-900, Brazil

Tel: 55 xx 32 32293217.

E-mail address: [elita.scio@ufjf.edu.br](mailto:elita.scio@ufjf.edu.br) (E. Scio).

- We evaluated the antinociceptive activity of *Pereskia aculeata* Miller leaves.
- We found indoles alkaloids, among other phytochemicals.
- The activity is not related to opioid effects or to serotonin synthesis and release.
- We hypothesized that indole alkaloids may be responsible for this activity.

1 ***Pereskia aculeata* Miller, a vegetable with antinociceptive activity**

2

3 Nicolás de Castro Campos **Pinto**, Ana Paula do Nascimento **Duque**, Natália

4 Ramos **Pacheco**, Renata de Freitas **Mendes**, Erick Vicente da Silva **Motta**,

5 Paula Maria Quaglio **Bellozi**, Antônia **Ribeiro** and Elita **Scio**\*

6

7

8 Laboratory of Bioactive Natural Products. Department of Biochemistry. Institute

9 of Biological Science of Federal University of Juiz de Fora, Juiz de Fora, MG

10 36036 900, Brazil

11

12

13 \*Corresponding author: Elita Scio. Tel: 55 xx 32 32293217.

14 E-mail adress: [elita.scio@ufjf.edu.br](mailto:elita.scio@ufjf.edu.br) (E. Scio).

15

16

17

18

19

20

21

22

23

24 **ABSTRACT**

25 *Pereskia aculeata* Miller is a climbing cactus naturally distributed from south to  
26 northeast of Brazil, where its succulent leaves are commonly used by natives as  
27 a vegetable. There are reports that leaves of *P. aculeata* are also used in  
28 Brazilian folk medicine as emollients, in skin wound healing, and to treat  
29 inflammation. In this work, it was realized a phytochemical characterization and  
30 evaluated the antinociceptive activity of hydromethanolic fraction obtained by  
31 solvent partition from methanol crude extract of *P. aculeata* leaves, performing  
32 the acetic acid-induced writhing, formalin, and tail-flick tests in mice. The results  
33 showed the presence of phenols, tannins, coumarins, anthrones, flavonoids,  
34 alkaloids, and indole compounds. A significative antinociceptive activity,  
35 comparative to the standard drugs, was also observed, probably related to  
36 peripheral and central components. This study is the first report on the  
37 antinociceptive effect of this plant.

38

39

40 **Keywords:** *Pereskia aculeate*; antinociception; indole alkaloids; serotonin

41

42

43

44

45

46

47 **1. Introduction**

48

49 *Pereskia aculeata* Miller is a climbing plant native to South America and  
50 adapted only at low altitudes. It is a cactus naturally distributed from south to  
51 northeast of Brazil, where its succulent leaves are commonly used by natives as  
52 a vegetable in traditional cuisine (Morton, 1987; Peterson, Rosa & Souza, 2003;  
53 Downie & Hill, 2009).

54 The nutritional value of the leaves of *P. aculeata* is related mainly to the  
55 high content of proteins (25.5% m/m), which is much higher when compared to  
56 lettuce (1.3% m/m), kale (1.6% m/m), common corn (7.6-10.0% m/m), or bean  
57 (18-20% m/m), for example (Mercê, Landaluze, Mangrich, Szpoganicz &  
58 Sierakowski, 2001). In many low-income communities, leaves of *P. aculeata* are  
59 used as the main proteins source, so this vegetable is also known as “meat of  
60 the poor” (Mahan & Escott-Stamp, 2002; Takeiti, Antonio, Motta, Collares-  
61 Queiroz & Park, 2009). Tryptophan is the most abundant amino acid in these  
62 proteins. The leaves also contain high levels of total dietary fiber, vitamins A, C,  
63 and folic acid, in addition to minerals such as calcium, magnesium, manganese,  
64 and zinc (Takeiti et al., 2009)

65 *P. aculeata* also have a potential industrial application, since the  
66 arabinogalactan biopolymer found in the leaves is capable of binding to  $Fe^{2+}$ ,  
67  $Co^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$  and  $Ni^{2+}$  ions. Complexes of ions and polysaccharides are  
68 widely used as additives for food, pharmaceuticals, paper, and paint. Moreover,  
69 polysaccharides such as arabinogalactan have well-known physical properties

70 that can provide additional enforcement in food and pharmaceutical technology  
71 (Mercê et al., 2001).

72 Besides used in food, there are reports that the leaves of *P. aculeata* are  
73 also used in Brazilian folk medicine as emollients due to their high mucilaginous  
74 content, in skin wound healing, and to treat inflammation (Duarte & Hayashi,  
75 2005; Sartor et al., 2010). Nevertheless, there are only few studies about their  
76 phytochemicals and therapeutic potential, although plants used in traditional  
77 medicine consists of valuable resource in search for new therapeutic agents  
78 (Fabricant & Farnsworth, 2001).

79 In our laboratory, we performed some preliminary screening tests to  
80 evaluate the therapeutic potential of this vegetable, using methanol crude extract  
81 and its fractions obtained by solvent partitions. The most promising results we  
82 considered are related to the antinociceptive effects, especially for  
83 hydromethanolic fraction of the leaves which contains the most polar  
84 compounds. So, the aims of this study were to report the phytochemical  
85 characterization and antinociceptive activity of hydromethanolic fraction from  
86 methanol crude extract of *P. aculeata*.

87

## 88 **2. Materials and Methods**

89

### 90 *2.1. Plant material and preparation of hydromethanolic fraction*

91

92 Leaves of *P. aculeata* were collected in Juiz de Fora (MG, Brazil) in  
93 August, 2010, in the morning. The plant was identified by the herbarium  
94 Leopoldo Krieger of Federal University of Juiz de Fora, where a voucher  
95 specimen (No. 57539) was deposited for future evidence.

96 The leaves were air-dried in a well-ventilated place at room temperature  
97 (25 °C) for fifteen days. Once dried, the material (approximately 1 kg) was  
98 powdered using a knife mill and then extracted by maceration with methanol until  
99 exhaustion. The extract was concentrated on a rotatory evaporator to obtain the  
100 crude methanol extract (140 g), which was dissolved in water/methanol (8:2 v/v)  
101 and then fractioned with different solvents in order of increasing polarity: hexane,  
102 dichloromethane, ethyl acetate and butanol. This process resulted in a remaining  
103 hydromethanolic fraction (HMF - 12 g) which was stored in a refrigerator at 4°C.

104

## 105 *2.2. Phytochemical characterization*

106

107 The phytochemical characterization of HMF was performed by thin-layer  
108 chromatography on chromatoplates coated with silica gel 60 F 254 which were  
109 sprayed by the following reagents: FeCl<sub>3</sub> 1% (phenols, condensed and  
110 hydrolysable tannins), KOH 5% (coumarins, anthraquinones, and anthrones),  
111 NP/PEG or AlCl<sub>3</sub> 1% (flavonoids), Dragendorff reagent (alkaloids), and  
112 Liebermann-Burchard reagent (steroids and triterpenes), and also visualized  
113 under 365 nm UV light or visible light (Bladt, Wagner & Zgainski, 1984). Ten µL

114 of HMF were applied on chromatoplates for elution with ethyl acetate/methanol  
115 5:5 (v/v).

116

### 117 *2.3. Search for indole compounds*

118

119 Hopkins and Cole reaction (Hopkins & Cole, 1901) was used to verify the  
120 presence of indole compounds. Briefly, a small amount of HMF was solubilized  
121 in a glyoxylic acid solution, and then concentrated sulfuric acid was added  
122 slowly. A violet ring appears when sample contains indole compounds.

123

### 124 *2.4. Animals*

125

126 Male Swiss mice (20-30 g) bred in Center of Reproductive Biology  
127 (Federal University of Juiz de Fora, Brazil) were used. The animals were kept  
128 under standard temperature (22 °C), 12/12 h light/dark cycle, and had food and  
129 water *ad libitum*. Before performing each test, the animals were kept without food  
130 for a period of 12 hours. The groups consisted of 6-8 mice. All experimental  
131 procedures are in accordance with the Ethical Principles of Animal Research  
132 adopted by Brazilian College of Animal Experimentation (COBEA- Protocol no  
133 009/2009).

134

### 135 *2.5. Acetic acid-induced writhing test*

136

137           This test was carried out according to the method described by Koster,  
138 Anderson and de Debeer (1959). Groups of mice received HMF in different  
139 doses (100, 200, or 300 mg/kg), vehicle (negative control), or indomethacin 10  
140 mg/kg, used as reference drug. All solutions were prepared in saline with Tween  
141 80 12% (v/v) and administered orally at 10 ml/kg. One hour after administration  
142 of respective treatments, mice were ip injected with acetic acid 0.6% 10 ml/kg.  
143 For 30 minutes the number of writhings (constriction of abdominal wall with  
144 extension of hind paws) was counted.

145

#### 146 *2.6. Formalin test*

147

148           This test was carried out according to the method described by Hunskaar,  
149 Fasmer and Hole (1985). One hour after oral administration of vehicle,  
150 indomethacin, HMF in different doses (100, 200, or 300 mg/kg), or 30 min after  
151 ip administration of morphine 7.5 mg/kg (10 ml/kg); 20 µl of 2% formalin (v/v)  
152 were injected into the subplantar tissue of the right hind paw. The licking paw  
153 time was determined during 5 min (first phase) and between 15 and 30 min  
154 (second phase) after formalin injection.

155

#### 156 *2.7. Tail-flick test*

157

158           Antinociception was also determined by the tail-flick test (D'Amour &  
159 Smith, 1941). Firstly, each mouse was immobilized inside a small plastic tube

160 with ventilation, so that the tail remained outside the tube. One-third of the tail  
161 was immersed in a 55 °C ± 1 water bath and the baseline reaction time was  
162 measured twice at 20 min intervals. Then, one hour after oral administration of  
163 vehicle, HMF in different doses (100, 200, or 300 mg/kg), or 30 min after ip  
164 injection of morphine 7.5 mg/kg (10 ml/kg), the reaction time was measured  
165 again at 20 min intervals up to 2 hours. A 15 s cut-off time was used to prevent  
166 tissue damage.

167

### 168 *2.8. Acetic acid-induced writhing test in animals pretreated with PCPA*

169

170 To verify if HMF mechanism of action involves synthesis or release of  
171 serotonin, mice were treated with *p*-chlorophenylalanine (PCPA) 100 mg/kg, an  
172 inhibitor of serotonin synthesis, or saline at 10 mL/kg ip for 4 consecutive days,  
173 once a day. On the fourth day, mice were pretreated 20 min before oral  
174 administration of vehicle (saline containing Tween 80 12%) or HMF 100 mg/kg.  
175 Then, the acetic acid-induced writhing test was performed again as previously  
176 described (Werner et al., 2009).

177

### 178 *2.9. Statistical analysis*

179

180 The results were expressed as mean ± S.E.M. and One-way ANOVA  
181 followed by Newman-Keuls test were used for statistical analysis. Two-way

182 ANOVA followed by Bonferroni test were used for tail-flick test.  $p < 0.05$  was  
183 considered significant.

184

### 185 **3. Results and Discussion**

186

187         The acetic acid-induced writhing test showed that the antinociceptive  
188 activity of HMF was inversely proportional to the administered doses, since the  
189 dose of 100 mg/kg was the most active, reducing by 78% the number of  
190 writhings, while the doses of 200 and 300 mg/kg inhibited the painful stimulus by  
191 64% and 41%, respectively, as shown in Fig. 1. In spite of being a more  
192 appropriate assay for opioids, this test is widely used as a model for induction of  
193 inflammatory origin pain, since the acetic acid induces the synthesis of  
194 arachidonic acid metabolites and other inflammation mediators (Whittle, 1964;  
195 Lima et al. 2010). Thus, the antinociceptive effects of non-steroidal anti-  
196 inflammatories and peripheral analgesics may also be observed from this model.  
197 Moreover, drugs that act in dopaminergic receptors, tricyclic antidepressants and  
198 selective serotonin reuptake inhibitors also respond to this test, which shows the  
199 participation of serotonergic and noradrenergic neurons at pain modulation  
200 induced by acetic acid (Duarte, Nakamura & Ferreira, 1987; Dickenson &  
201 Ghandehari, 2007). So, to better understand the possible mechanisms involved  
202 in the antinociceptive activity of HMF, the formalin and tail-flick tests were  
203 accomplished.

204           The formalin test is a chemical model of pain induction that may  
205 determine if the mechanism of action of an analgesic drug occurs centrally or  
206 peripherally. The subplantar injection of formalin in mice or rats causes a  
207 biphasic behavioral response characterized by paw licking during an initial phase  
208 that occurs about 5 minutes after the injection, which is related to the direct  
209 activation of nociceptors in C and A $\delta$  afferent fibers (neurogenic pain), and  
210 during a second phase that occurs between 15 and 30 minutes after the formalin  
211 injection, associated to inflammatory mediators release, such as prostaglandins,  
212 histamine, bradykinin, and others (inflammatory pain) (Hunskaar et al., 1985).  
213 Opioid analgesics, like morphine, inhibit the nociception caused by formalin in  
214 both phases while anti-inflammatories, such as indomethacin, are capable of  
215 suppress only the second phase (Le Bars, Gozariu & Cadden, 2001). Non  
216 opioid analgesics that act centrally and peripherally are active in both phases of  
217 the formalin test, however they are more effective in the second phase, in which,  
218 generally, lower doses of the drug are sufficient to cause the antinociceptive  
219 effect (Shibata, Ohkubo, Takahashi & Inoki, 1989).

220           The results showed that the antinociceptive activity of HMF was dose-  
221 dependent in the formalin test, unlike occurred in the acetic acid-induced writhing  
222 test. In the first phase of the formalin test, the dose of 300mg/kg was the most  
223 effective, reducing about 50% the licking paw time compared to the negative  
224 control, while the doses of 200 and 100 mg/kg inhibited the nociceptive effect by  
225 45% and 15%, respectively (Fig.2). The dose of 300 mg/kg was also the most  
226 active in the second phase, inhibiting the nociception in 86%, while the doses of

227 200 and 100 mg/kg reduced the painful stimulus by 62% and 48%, respectively  
228 (Fig. 3). Those results suggested that the mechanism of action of HMF did not  
229 involve opioids receptors activation, but it was probably associated to a central  
230 and peripheral activity.

231 The tail-flick test consists in evaluating the response of a drug in  
232 consequence of a thermogenic stimulus. The immersion of the tail in hot water  
233 causes an abrupt movement of the tail and, in some cases, the contraction of the  
234 whole body. The mechanisms associated to this response are not totally clear  
235 yet, however it is recognized that this test is effective only to determine the  
236 analgesic activity of opioid agonists (Le Bars et al., 2001). No activity was  
237 observed for HMF in the tail-flick test in none of the tested doses, which  
238 reinforced the results found in the formalin test, as HMF did not demonstrate  
239 opioid action in both cases.

240 The phytochemical characterization revealed the presence of phenols,  
241 tannins, coumarins, anthrones, flavonoids and alkaloids that are possibly indole  
242 alkaloids, since a violet ring appeared in Hopkins and Cole reaction, revealing  
243 the presence of indole compounds. According to the literature, *P. aculeata*  
244 leaves are abundant in protein rich in tryptophan, an indole amino acid (Takeiti et  
245 al., 2009). In plants, tryptophan is the precursor of indole alkaloids, compounds  
246 containing the indole group that presents structural similarities to bioactive  
247 amines. Most of these alkaloids, when biologically active, affect the adrenergic,  
248 serotonergic, dopaminergic or cholinergic systems, such as tryptamine, harmine,  
249 strychnine, psilocybin, reserpine, among many others (Dewick, 2002; Oliveira,

250 Freitas, Mathias & Braz-Filho, 2009). These systems are directly related to  
251 spinal cord pain control (Millan, 2002). Thus, it is possible that indole alkaloids  
252 might be involved in the antinociceptive activity of HMF. Once HMF presented a  
253 central action devoid of opioid effects and serotonin is the only bioactive amine  
254 that presents the indole group, the acetic acid-induced writhing test was  
255 accomplished after the pre-treatment with PCPA, in order to verify if the HMF  
256 activity is related to the synthesis or release of serotonin. PCPA is an inhibitor of  
257 the serotonin synthesis and allows evaluating if a compound could increase the  
258 serotonin synthesis or enhance the release of this neurotransmitter in the  
259 synaptic cleft, once the reversion of the antinociceptive activity indicates that the  
260 compound is acting by this mechanism which is blocked by PCPA (Werner et al.,  
261 2009). The results showed that PCPA was unable to revert the antinociceptive  
262 effects of HMF, suggesting that its activity was not related to the synthesis or  
263 release of serotonin, however it was not discarded the possibility that this activity  
264 was associated to direct activation of serotonin receptors.

265

#### 266 **4. Conclusion**

267

268 This study showed that the leaves of *Pereskia aculeata* Miller are not only  
269 a vegetable of high nutritional value, but are also endowed with chemical  
270 constituents with analgesic potential, which effects are likely to occur at  
271 peripheral and central level, although they are not related to opioid receptors  
272 activation or to the serotonin synthesis and release. It is possible that the

273 presence of indole alkaloids in HMF might be involved in its antinociceptive  
274 activity. This study is the first report on the antinociceptive effect of this plant.

275

## 276 **Acknowledgments**

277 This work was supported by the grant from Fundação de Amparo a  
278 Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG CEX APQ 01137-09) and  
279 Coordenação de Aperfeiçoamento de Profissional de Ensino Superior (CAPES).

280 The authors are grateful to Dr Daniela Zappi for the botanical identification of the  
281 species, to Delfino Antônio Campos for technical assistance and to the  
282 Reproduction Biology Center of the Federal University of Juiz de Fora for  
283 providing the mice.

284

## 285 **References**

286

287 Bladt, S., Wagner, H., & Zgainski, E. M. (1984). *Plant Drug Analysis: A thin layer*  
288 *chromatography atlas*. (2nd ed.). Berlin: Springer Verlag.

289 D'amour, F. E., & Smith, D. L. (1941). A method for determining loss of pain  
290 sensation. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 72(1), 74-  
291 79.

292

293 Dewick, P. M. (2002). *Medicinal Natural Products: a biosynthetic approach*. (2nd  
294 ed.). Chichester: John Wiley & Sons Ltd.

295

296 Dickenson, A. H., & Ghandehari, J. (2007) Anti-convulsants and anti-  
297 depressants. 2007. In C. Stein, *Handbook of experimental pharmacology:*  
298 *analgesia* (pp. 147-177). Berlin: Springer.

299

300 Duarte, I. D., Nakamura, M., & Ferreira, S. H. (1987). Participation of the  
301 sympathetic system in acetic acid-induced writhing in mice. *Brazillian Journal of*  
302 *Medical Biological Research*, 21(2), 341-343.

303

304 Duarte, M. R., & Hayashi, S. S. (2005). Estudo anatômico de folha e caule de  
305 *Pereskia aculeata* Mill. (Cactaceae). *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 15(2),  
306 103-109.

307

308 Fabricant, D. S., & Farnsworth, N. R. (2001). The value of plants used in  
309 traditional medicine for drug discovery. *Environmental Health Perspectives*,  
310 109(1), 69-75.

311

312 Hopkins, F. G.; & Cole, S. W. (1901). *Proceedings of the Royal Society*, 68(21),  
313 21-33.

314

315 Hunskar, S., Fasmer, O. B., & Hole, K. (1985). The formalin test in mice, a  
316 useful technique for evaluating mild analgesia. *Journal of Neuroscience*  
317 *Methods*, 14(1), 69-76.

318

319 Koster, R., Anderson, M., & de Debeer, E. J. (1959). Acetic acid for analgesic  
320 screening. *Federation Proceedings*, 18, 412-418.

321

322 Le Bars, D., Gozariu, M., & Cadden, S. W. (2001). Animal models of nociception.  
323 *Pharmacological Reviews*, 53(4), 597-652.

324

325 Lima, G. M., Bonfim, R. R., Silva, M. R., Thomazzi, S. M., Santos, M. R. V.,  
326 Quintans-Júnior, L. J., et al. (2010). Assessment of antinociceptive and anti-  
327 inflammatory activities of *Porophyllum ruderale* (Jacq.) Cass., Asteraceae,  
328 aqueous extract. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, 21(3), 486-490.

329

330 Mahan, L. K., & Escott-Stamp, S. (2002). *Krause: alimentos, nutrição e*  
331 *dietoterapia*. (10th ed.). São Paulo: Roca.

332

333 Mercê, A. N. R., Landaluze, J. S., Mangrich, A. S., Szpoganicz, B., &  
334 Sierakowski, M. R. (2001). Complexes of arabinogalactan of *Pereskia aculeata*  
335 and  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ , and  $\text{Ni}^{2+}$ . *Bioresource Technology*, 76(1), 29-37.

336

337 Millan, M. J. (2002). Descending control of pain. *Progress in Neurobiology*,  
338 66(6), 355-474.

339

340 Morton, J. F. (1987). Barbados Gooseberry. In: J. F. Morton. *Fruits of warm*  
341 *climates* (pp. 249-351). Miami: Florida Flair Books.

342

343 Oliveira, V. B., Freitas, M. S. M., Mathias, L., Braz-Filho, R., & Vieira I. J. C.  
344 (2009). Atividade biológica e alcalóides indólicos do gênero *Aspidosperma*  
345 (Apocynaceae): uma revisão. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, 11(1),  
346 92-99.

347

348 Peterson, I. D., Downie, D. A., & Hill, M. P. (2009). Using molecular methods to  
349 determine the origin of weed populations of *Pereskia aculeata* in South Africa  
350 and its relevance to biological control. *Biological Control*, 48(1), 84-91.

351

352 Rosa, S. M., & Souza, L. A. (2003). Morphology and anatomy of the fruit  
353 (hypanthium, pericarp and seed) development of *Pereskia aculeata* Miller  
354 (Cactaceae). *Acta Scientiarum Biological Science*, 25(2), 415-428.

355

356 Sartor, C. F. P, Amaral, V., Guimarães, H. E. T., Barros, K. N., Felipe, D. F.,  
357 Cortez, L. E. R., et al. (2010). Estudo da ação cicatrizante de folhas de *Pereskia*  
358 *aculeata*. *Revista Saúde e Pesquisa*, 3(2), 149-154.

359

360 Shibata, M., Ohkubo, T., Takahashi, H., & Inoki, R. (1989). Modified formalin  
361 test: characteristic biphasic pain response. *Pain*, 38(3), 347-352.

362

363 Takeiti, C. Y., Antonio, G. C., Motta, E. M. P., Collares-Queiroz, F. P., & Park, K.  
364 J. (2009). Nutritive evaluation of a non-conventional leafy vegetable (*Pereskia*

365 *aculeata* Miller). *International Journal of Food Science and Nutrition*, 60(1), 148-  
366 160.

367

368 Werner, J. A. T., Oliveira, S. M., Martins, D. F., Mazzardo, L., Dias, J. F. G.,  
369 Loridello, A. L. L, et al.. (2009). Evidence for a role of 5-HT<sub>1A</sub> receptor on  
370 antinociceptive action from *Geissospermum vellosii*. *Journal of*  
371 *Ethnopharmacology*, 125(1), 163-169.

372

373 Whittle, B. A. (1964). Release of a kinin by intraperitoneal injection of chemical  
374 agents in mice. *Journal of Neuropharmacology*, 3, 369-378.

375

376

377

378

379

380

381

382

383

384

385

386

387

388

389

390

391 **Captions**

392

393 **Fig. 1.** Effect of HMF oral administration on acetic acid-induced writhing test in  
394 mice. Vehicle, indomethacin 10 mg/kg and HMF 100, 200 and 300 mg/kg were  
395 administered orally 60 min before acetic acid 0.6% injection. The number of  
396 writhings was counted for 30 min. The values of each column represent the  
397 mean  $\pm$  SD. ANOVA followed by Newman-Keuls, used as *post-hoc*. Significant  
398 values: \* $p < 0.001$  and \*\* $p < 0.05$  compared to vehicle.

399

400 **Fig. 2.** Effect of HMF oral administration on the first phase of formalin test in  
401 mice. Vehicle, indomethacin 10 mg/kg and HMF 100, 200 and 300 mg/kg were  
402 administered orally while morphine 7.5 mg/kg was administered intraperitoneally  
403 60 and 30 min respectively before formalin injection. The licking paw time was  
404 counted for 5 min after formalin injection. The values of each column represent  
405 the mean  $\pm$  SD. ANOVA followed by Newman-Keuls, used as *post-hoc*.  
406 Significant values: \* $p < 0.001$ , \*\* $p < 0.01$  and \*\*\* $p < 0.05$  compared to vehicle.

407

408 **Fig. 3.** Effect of HMF oral administration on the second phase of formalin test in  
409 mice. Vehicle, indomethacin 10 mg/kg and HMF 100, 200 and 300 mg/kg were  
410 administered orally while morphine 7.5 mg/kg was administered intraperitoneally  
411 60 and 30 min respectively before formalin injection. The licking paw time was  
412 counted between 15 and 30 min after formalin injection. The values of each  
413 column represent the mean  $\pm$  SD. ANOVA followed by Newman-Keuls, used as

414 *post-hoc*. Significant values: \* $p < 0.001$ , \*\* $p < 0.01$  and \*\*\* $p < 0.05$  compared to  
415 vehicle.

416

Figure 1  
[Click here to download high resolution image](#)

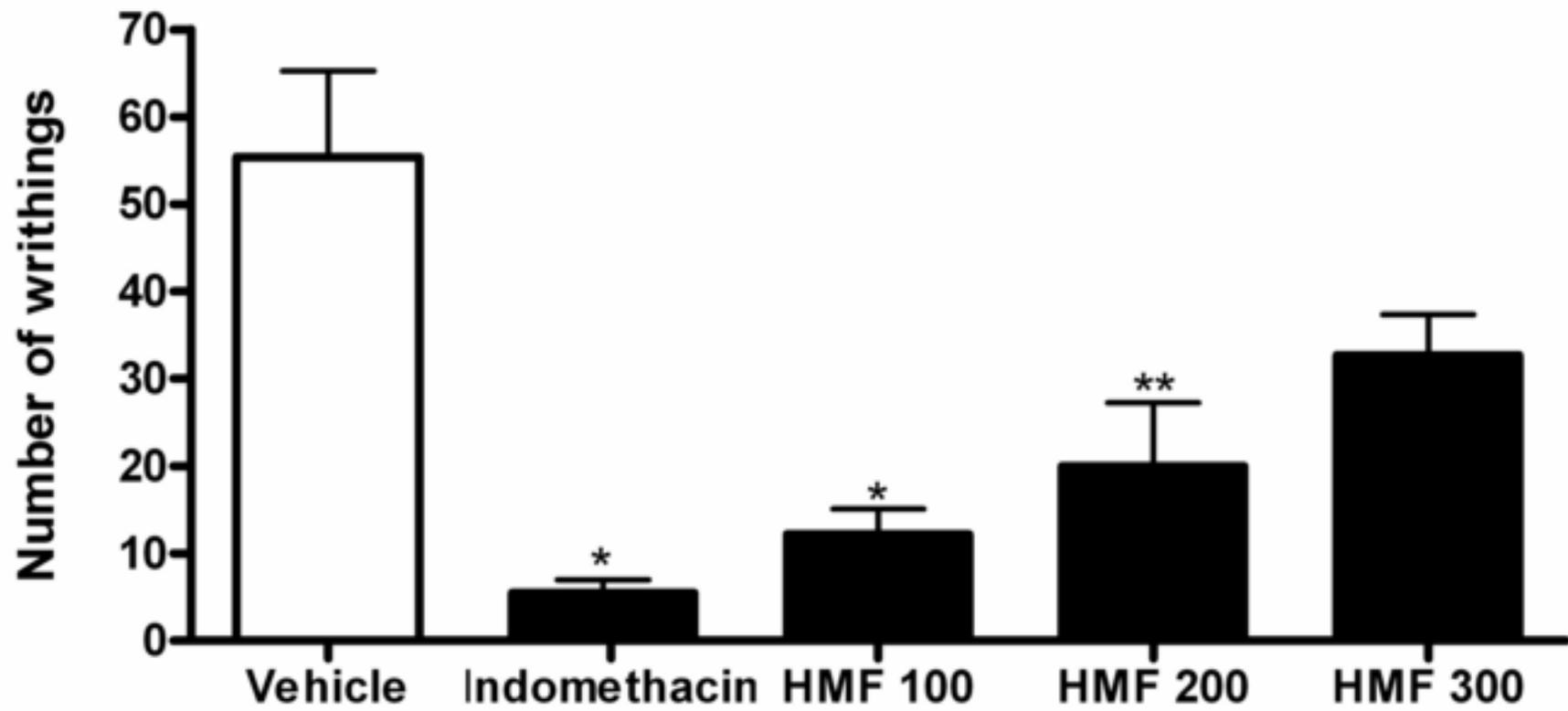


Figure 2  
[Click here to download high resolution image](#)

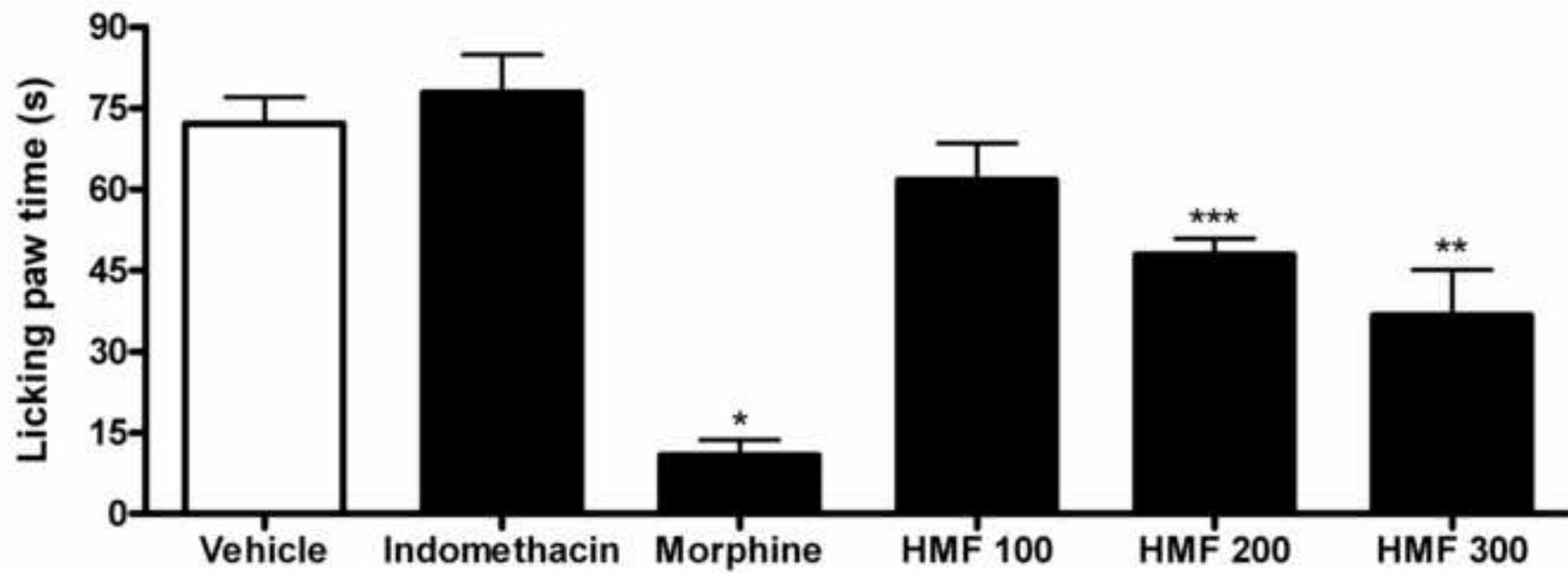


Figure 3  
[Click here to download high resolution image](#)

