

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS  
FARMACÊUTICAS**

**Thiele Faccim de Brum**

**ESTUDO ETNOFARMACOLÓGICO, FITOQUÍMICO E BIOLÓGICO  
DE *Poikilacanthus glandulosus* (NEES) ARIZA**

Santa Maria, RS  
2016

**Thiele Faccim de Brum**

**ESTUDO ETNOFARMACOLÓGICO, FITOQUÍMICO E BIOLÓGICO DE**  
*Poikilacanthus glandulosus* (Nees) Ariza

Tese de Doutorado apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de Concentração em Controle e Avaliação de Insumos e Produtos Farmacêuticos, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Doutor em Ciências Farmacêuticas**.

Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Liliane de Freitas Bauermann

Santa Maria, RS  
2016

**Thiele Faccim de Brum**

**ESTUDO ETNOFARMACOLÓGICO, FITOQUÍMICO E BIOLÓGICO DE  
*Poikilacanthus glandulosus* (Nees) Ariza**

Tese de Doutorado apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de Concentração em Controle e Avaliação de Insumos e Produtos Farmacêuticos, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Doutor em Ciências Farmacêuticas**.

**Aprovado em 25 de agosto de 2016:**

---

**Liliane de Freitas Bauermann, Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. (UFSM)**  
(Presidente/Orientadora)

---

**Michele Rorato Sagrillo, Profa. Dra. (UNIFRA)**

---

**Gilberti Helena Hübscher Lopes, Profa. Dra. (UFSM)**

---

**Sydney Hartz Alves, Prof. Dr. (UFSM)**

---

**Michel Mansur Machado, Prof. Dr. (UNIPAMPA)**

Santa Maria, RS  
2016

Dedico este trabalho  
a **Deus** por me dar forças para que  
eu não desistisse de meus objetivos.

ao meu querido pai, **Ciro** (com saudades)

*“Minha estrela guia,  
Minha força maior,  
Minha lágrima e meu riso,  
Meu grande aprendizado,  
Minha maior saudade!*

*Voou*

*Como um pássaro...*

*Voou*

*Virou estrela...*

*A mais linda estrela do meu céu.”*

Mariú Zalaf

a minha orientadora, **Liliane**,  
pela amizade, confiança e incentivo,  
a professora **Margareth** (in memoriam),  
pela oportunidade, amizade e apoio  
a minha mãe **Marilêuza**  
pela incansável dedicação e incentivo.

Aos meus irmãos **Ígor** e **Thaís**  
e cunhados **Carolina** e **Remian**,  
pela força e incentivo.

Ao mais novo integrante da família, meu  
sobrinho, **Davi**, que mesmo tão  
pequeno, acrescentou em minha vida um  
motivo a mais para sorrir.

## AGRADECIMENTOS

A Deus, por ter me concedido à graça de viver e ter sido educada no seio do que há de mais belo na vida: uma família repleta do seu amor.

À minha orientadora Dr<sup>a</sup>. Liliane de Freitas Bauermann, pelo apoio concedido nos momentos mais difíceis, amizade e confiança na orientação deste trabalho e, em especial, pela sabedoria compartilhada de maneira incondicional.

À Universidade Federal de Santa Maria, pela oportunidade de receber o grau de Doutora em Ciências Farmacêuticas.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas pela oportunidade e subsídios necessários para que pudesse executar meus experimentos.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, pelos ensinamentos, apoio, disponibilidade e incentivo.

À FAPERGS pela bolsa concedida neste período de estudos.

Aos professores Luciane, Rosimar, Michele e Roberto do Centro Universitário Franciscano, pela amizade, ensinamentos, oportunidade e ajuda na realização dos experimentos que foram feitos nesta instituição.

Ao professor Dr<sup>a</sup> Renato Aquino Záchia, pela persistência na identificação do material vegetal.

Aos participantes do questionário, que foram essenciais para a realização do estudo etnofarmacológico, por fornecerem informações relevantes da espécie em estudo.

Meu muito obrigado, com muito carinho, aos meus colegas do laboratório de Fitoquímica, LABFITO, pela amizade, companheirismo, ensinamentos, reflexões e por sempre estarem ao meu lado em todos os momentos, aconselhando, incentivando e, inclusive na contribuição a este trabalho, em especial as minhas colegas e amigas Roberta e Bianca por estarem comigo até os últimos minutos da realização deste trabalho.

À querida professora Margareth, *in memoriam*, que abriu as portas para que eu pudesse realizar o mestrado e o doutorado, pela sua amizade, apoio incondicional nos momentos difíceis que passei durante a realização deste trabalho e pelos conhecimentos e experiências compartilhadas.

À minha mãe, Marileuza, pela sua dedicação, força, coragem exemplares e que junto ao meu pai, Ciro, *in memoriam*, que jamais mediram esforços para nos ensinar a importância do saber. Sem as suas forças e amor jamais estaria realizando mais esta etapa profissional.

Sempre acreditaram no estudo como a melhor herança. A vocês, meu eterno agradecimento e gratidão por todo o amor e dedicação aos teus filhos.

Aos meus irmãos Ígor e Thaís, que sempre estiveram ao meu lado e são exemplos de coragem, batalha e determinação.

A todos que, de alguma maneira, com seu apoio, tempo e atenção, transmitindo energia e confiança sem os quais a jornada seria mais difícil.

*“Feliz aquele que transfere o que sabe  
e aprende o que ensina.”*

Cora Coralina

## RESUMO

### ESTUDO ETNOFARMACOLÓGICO, FITOQUÍMICO E BIOLÓGICO DE *Poikilacanthus glandulosus* (Nees) Ariza

AUTORA: Thiele Faccim de Brum

ORIENTADORA: Liliane de Freitas Bauermann

*Poikilacanthus glandulosus* é um subarbusto, distribuída no Sudeste e Sul do Brasil, Paraguai, Argentina e Uruguai e pertence a família Acanthaceae. O objetivo deste estudo foi realizar um estudo etnofarmacológico, fitoquímico e investigar atividades biológicas dos extratos obtidos das folhas e dos galhos de *P. glandulosus*. O material vegetal foi coletado no município de Santiago, RS, Brasil, e está depositado no herbário do Departamento de Biologia da UFSM catalogado sob os números de registro SMDB 12.442 e 13.178. O material foi macerado com etanol (70%) e filtrado. Após, uma parte do extrato hidroalcolico (EH) foi reservada e a outra evaporada em evaporador rotatório para remoção do etanol (extrato aquoso - EA). Este foi particionado em ampolas de separação, utilizando solventes de polaridade crescente: diclorometano (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>), acetato de etila (AcOEt) e butanol (BuOH), sendo que o extrato bruto (EB) foi obtido pela secagem do EA. O estudo etnofarmacológico permitiu coletar dados sobre a espécie junto aos usuários da planta para fim medicinal, como nome popular, uso medicinal, tipo de extrato, entre outros. Através do estudo fitoquímico foi revelado a presença de triterpenoides e esteroides, cumarinas, catequinas, fenóis, ácidos orgânicos, amino-grupos, antocianinas, antocianidinas e flavonoides, heterosídeos antociânicos, heterosídeos cardioativos. A análise por CLAE revelou a presença de ácido gálico em todas as frações testadas (folhas e galhos). Além disso, foi revelada a presença de ácido maslínico, uvaol, sitosterol e  $\alpha$ -amirina nos extratos da espécie. O extrato bruto das folhas apresentou atividade anti-inflamatória e antiedematogênica *in vivo*. Os extratos das folhas não apresentaram cito e genotoxicidade nas concentrações testadas. A fração AcOEt apresentou o maior teor de polifenóis e flavonoides nas folhas e nos galhos de *P. glandulosus*. Na avaliação da capacidade antioxidante, a fração AcOEt dos galhos e o EB das folhas, se destacaram em relação à inibição pelo radical DPPH. A fração AcOEt das folhas e a fração CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> dos galhos reduziram significativamente a peroxidação lipídica comparado com as demais frações. Em relação ao teste da DCFH, a fração CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> das folhas e dos galhos se destacou. Na avaliação da atividade antimicrobiana, os extratos demonstraram boas atividades contra bactérias Gram-positivas e foram praticamente inativos contra Gram-negativas. Promissora atividade frente à micobactéria *M. smegmatis* foi encontrada para a fração CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. O EB e a fração AcOEt das folhas de *P. glandulosus* apresentaram redução na formação de biofilme formado por *S. aureus* e o EB dos galhos frente *S. mutans* e a *L. monocytogenes*. O extrato bruto das folhas e dos galhos apresentou efeito escolicida frente à *Echinococcus ortleppi* em um curto período de tempo. Através deste estudo, foi possível validar as informações sobre o uso medicinal de *P. glandulosus*, identificar a composição fitoquímica e avaliação das atividades biológicas pela primeira vez.

**Palavras-chave:** Etnofarmacologia. Gaiana. Folhas. Galhos. Metabólitos secundários.



## ABSTRACT

### ETHNOPHARMACOLOGICAL STUDY, PHYTOCHEMISTRY AND BIOLOGICAL OF *Poikilacanthus glandulosus* (Nees) Ariza

AUTHOR: THIELE FACCIM DE BRUM  
ADVISER: LILIANE DE FREITAS BAUERMAN

*Poikilacanthus glandulosus* is a subshrub distributed in Southeast and South of Brazil, Paraguay, Argentina and Uruguay and belongs to Acanthaceae family. The aim of this study was to perform a phytochemical study and investigate the biological activities of the extracts obtained from the leaves and twigs of *P. glandulosus*. The plant material was collected in the city of Santiago, RS, Brazil, and is deposited in the herbarium of the Department of Biology UFSM cataloged under the registration numbers SMDB 12.442 and 13.178. The material was macerated in ethanol (70%) and filtered. After, a part of the hydroalcoholic extract (HE) was reserved and the other evaporated in rotary evaporator to remove ethanol (aqueous extract - AE). This was partitioned in ampoules of separation using increasing polarity solvents: dichloromethane ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ), ethyl acetate (AcOEt) and butanol (BuOH), being the crude extract (CE) obtained by drying the AE. Through ethnopharmacological study it was possible to collect data on the species with the users of the plant for medicinal purpose, such as popular name, medical use, kind of extract, among others. Phytochemical study revealed the presence of triterpenoids and steroids, coumarins, catechins, phenols, organic acids, amino groups, anthocyanins, anthocyanidins and flavonoids, anthocyanin glycosides, cardioactive glycosides. HPLC analysis revealed the presence of gallic acid in all fractions tested (leaves and branches). Furthermore, the presence of maslinic acid uvaol, sitosterol and  $\alpha$ -amyrin species in the extracts was revealed. The CE of leaves showed anti-inflammatory activity and antiedematogenic *in vivo*. The extracts of leaves showed no cito and genotoxicity at the concentrations tested. The AcOEt fraction showed the highest content of polyphenols and flavonoids in the leaves and the branches of *P. glandulosus*. In the evaluation of the antioxidant capacity, the AcOEt fraction of branches and CE of leaves were highlighted in relation to inhibition by DPPH radical. The fractions AcOEt of the leaves and  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  of branches significantly reduced lipid peroxidation compared to other fractions. In relation to test DCFH, the  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  fraction of leaves and branches stood out. In evaluating the antimicrobial activity, the extracts showed good activity against Gram-positive bacteria and were practically inactive against Gram-negative bacteria. Promising activity against the mycobacterium *M. smegmatis* was found for the  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  fraction. The CE and the AcOEt fraction of *P. glandulosus* leaves decreased biofilm formation formed by *S. aureus* and CE of branches front *S. mutans* and *L. monocytogenes*. The crude extract of leaves and branches presented efeito escolicida contra *Echinococcus ortleppi* em um curto período de tempo. Through this study, was possible validate the information about medicinal use of *P. glandulosus*, identify the phytochemical composition and evaluation of biological activities for the first time.

**Key words:** Ethnopharmacology. Gaiana. Leaves. Branches. Secondary metabolites.

## LISTA DE FIGURAS

### REVISÃO DA LITERATURA

Figura 1 – <i>Poikilacanthus glandulosus</i> - Aspectos da planta.....	20
--	----

### CAPÍTULO 1

Figure 1 – Main medicinal uses of "Gaiana" by the population of the City of Santiago	41
Figure 2 – HPLC compounds of crude extract of <i>P. glandulosus</i> leaves. (1) maslinic acid, (2) uvaol and (3) sitosterol.....	41
Figure 3 – Effect of the crude extract (0.01-1000 ug/ear) from <i>P. glandulosus</i> or dexamethasone (Dexa; 100 ug/ear) administered topically on croton oil-induced ear edema (A) and Myeloperoxidase (MPO) enzyme activity (OD/mL sample) (B). Each bar represent the mean±S.E.M (n=6); ###P <0.05 when compared with the vehicle (A) and naïve (B) groups. ***P<0.05 when compared with the croton oil group (one-way ANOVA followed by post hoc Newman-Keuls).....	42
Figure 4 – Effect of the crude extract of <i>P. glandulosus</i> and dexamethasone (Dexa) administered topically on histopathological changes (haematoxylin-eosin 20x) in skin of croton oil treated mice (A) and on number polymorphonuclear cells per field (B). Each bar represent the mean±S.E.M (n=6); ###P <0.05 when compared with the vehicle (A) and naïve (B) groups. ***P<0.05 when compared with the croton oil group (one-way ANOVA followed by post hoc Newman-Keuls).....	43

### CAPÍTULO 2

Figure 1 – Method of fractionation of <i>P. glandulosus</i> branches extracts.....	64
Figure 2 – Effect of different concentrations fractions from the branches of <i>P. glandulosus</i> on Fe(II) (10 µM)-induced TBARS production in brain homogenates. Dates are expressed as means ± S.D., (n=3). Significant differences are indicated by * $p \leq 0.05$ when compared with FeSO <sub>4</sub> group.....	65
Figure 3 – Effect of the crude extract and fractions of the branches from <i>P. glandulosus</i> on scavenging of ROS in rat brain cells, by DCFH-DA method. * Data are expressed as means ± S.D., (n = 3). * Significant difference from the basal group ( $p < 0.05$ ).....	66
Figure 4 – <i>In vitro</i> effects on the viability of protoscolecies when submitted to CE 350 mg/mL, BuOH fraction 350 mg/mL of <i>P. glandulosus</i> and GA 7 mg/mL in different exposure times.....	66

### CAPÍTULO 3

Figure 1 – Effect of different concentrations of CE and fractions from the leaves of <i>P. glandulosus</i> on Fe(II) (10 µM)-induced TBARS production in brain homogenates. Dates are expressed as means ± S.D., (n=3). Significant differences are indicated by * $p \leq 0.05$ when compared with FeSO <sub>4</sub> group.....	79
Figure 2 – Effect of the crude extract and fractions of the leaves from <i>P. glandulosus</i> on scavenging of ROS in rat brain cells, by DCFH-DA method. *Data are expressed as means ± S.D. (n = 3). * Significant difference from the basal group ( $p < 0.05$ ).....	80
Figure 3 – Effect of CE and fractions of <i>P. glandulosus</i> on chromosomal instability incubation with H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> . Results are mean ± SD for $n = 3$ . Significant differences are indicated by * $p \leq 0.05$ using analysis of variance followed by Tukey test.....	82
Figure 4 – <i>In vitro</i> effects on the viability of protoscoleces when submitted to CE 350 mg/mL, BuOH fraction 350 mg/mL of <i>P. glandulosus</i> and GA 7 mg/mL in different exposure times.....	83

### CAPÍTULO 4

Figure 1 – Effect of CE and AcOEt fraction of <i>P. glandulosus</i> leaves against biofilm formation of <i>S. aureus</i> . Values are expressed as absorbance at 570 nm.....	102
Figure 2 – Effect of CE of <i>P. glandulosus</i> branches against biofilm formation of <i>S. mutans</i> and <i>L. monocytogenes</i> . Values are expressed as absorbance at 570 nm.....	103

## LISTA DE TABELAS

### CAPÍTULO 1

Table 1 – Description of variables of the questionnaire.....	39
--	----

### CAPÍTULO 2

Table 1 – Phytochemical analysis of AE and HE extracts of <i>P. glandulosus</i> branches.....	67
Table 2 – Total polyphenols and flavonoids for crude extract and fractions of <i>P. glandulosus</i> .....	67
Table 3 – Antioxidant capacity for crude extract and fractions of <i>P. glandulosus</i> .....	67

### CAPÍTULO 3

Table 1 – Total polyphenols and flavonoids for crude extract and fractions of <i>P. glandulosus</i> .....	77
Table 2 – Antioxidant capacity for crude extract and fractions of <i>P. glandulosus</i> by DPPH and TBARS methods.....	78
Table 3 – Karyotypes alteration in human health peripheral blood mononuclear cells exposed to different <i>P. glandulosus</i> extracts concentrations.....	81

### CAPÍTULO 4

Table 1 – Antibacterial activity of the crude extract and factions of the leaves and branches of <i>P.glandulosus</i> .....	101
Table 2 – Minimal inhibition concentration ( $\mu\text{g/mL}$ ) of crude extract and fractions of the leaves and branches of <i>P. glandulosus</i> against <i>M. smegmatis</i> , <i>M. tuberculosis</i> and <i>M. avium</i> .....	101

## LISTA DE SIGLAS, ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

Abs – absorvância  
AcOEt – acetato de etila  
AG – ácido gálico  
BuOH – butanol  
BHT – Butil- hidroxi-tolueno  
CIM - Concentração Inibitória Mínima  
DCM – diclorometano  
DMSO - dimetilsufóxido  
EH - extrato hidroalcóolico  
CLAE – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência  
DCFH - 2',7'- dichlorofluoresceína  
DCFH-DA - 2'-7'-dichlorofluoresceína diacetato  
DPPH – 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl  
EA - extrato aquoso  
EB – extrato bruto  
ERO – espécie reativa de oxigênio  
FS – fração seca  
Kg - Kilograma  
L - lipídio  
MDA - malondialdeído  
min - minuto  
mg/g – miligramas por grama  
nm - nanômetros  
R - rutina  
TBARS – substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico  
tR – tempo de retenção  
UV – ultravioleta  
 $\mu\text{L}$  – microlitros  
 $\mu\text{g/mL}$  – micrograma por mililitro

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	15
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	18
2.1 OBJETIVO GERAL.....	18
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	18
<b>3 REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	19
3.1 DESCRIÇÃO DA PLANTA .....	19
3.1.1 Família Acanthaceae Juss .....	19
3.1.2 Gênero <i>Poikilacanthus</i> .....	20
3.1.3 Espécie <i>Poikilacanthus glandulosus</i> (Nees) Ariza .....	20
3.2 A ABORDAGEM ETNOFARMACOLÓGICA NA PESQUISA COM PLANTAS MEDICINAIS.....	21
3.3 METABÓLITOS SECUNDÁRIOS: IMPORTÂNCIA E FUNCIONALIDADE .....	23
3.4 POTENCIAL ANTIOXIDANTE E ATIVIDADES BIOLÓGICAS RELACIONADAS .....	24
3.4.1 Papel dos radicais livres e o estresse oxidativo .....	24
3.4.2 Sistema de defesa antioxidante.....	27
3.4.3 Atividade anti-inflamatória .....	28
3.4.4 Atividades cito e genotóxica .....	30
3.4.5 Atividade antimicrobiana .....	32
3.4.5.1 <i>Micobactérias</i> .....	33
3.4.5.2 <i>Biofilme</i> .....	34
3.4.6 Atividade antiparasitária .....	36
<b>4 APRESENTAÇÃO</b> .....	38
<b>5 PUBLICAÇÕES CIENTÍFICAS</b> .....	39
5.1 CAPÍTULO 1 - ETHNOPHARMACOLOGICAL STUDY AND TOPICAL ANTIINFLAMMATORY ACTIVITY OF CRUDE EXTRACT FROM <i>POIKILACANTHUS</i> <i>GLANDULOSUS</i> (NEES) ARIZA LEAVES .....	39
5.2 CAPÍTULO 2 - EFFECT OF <i>POIKILACANTHUS GLANDULOSUS</i> (NEES) ARIZA BRANCHES AND GALLIC ACID AGAINST VIABILITY OF <i>ECHINOCOCCUS</i> <i>ORTLEPPI</i> PROTOSCOLECES .....	48
5.3 CAPÍTULO 3 - <i>POIKILACANTHUS GLANDULOSUS</i> LEAVES: PHYTOCHEMICAL, CYTO/GENOTOXIC AND ANTIPARASITIC EFFECTS .....	70
5.4 CAPÍTULO 4 - PHYTOCHEMICAL, ANTIMICROBIAL AND ANTIMYCOBACTERIAL POPERTIES IN VITRO: A COMPARISON BETWEEN LEAVES AND BRANCHES OF <i>P. GLANDULOSUS</i> (NEES) ARIZA. ....	95
<b>6 CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	108
<b>7 CONCLUSÃO</b> .....	126
<b>8 PERSPECTIVAS FUTURAS</b> .....	128
<b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	129
<b>APÊNDICE A – Questionário</b> .....	148
<b>ANEXO A – APROVAÇÃO DO PROJETO DE PESQUISA INTITULADO PELA PLATAFORMA BRASIL</b> .....	150
<b>ANEXO B – APROVAÇÃO DO PROJETO DE PESQUISA PELO COMITÊ DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA</b> .....	151
<b>ANEXO C – APROVAÇÃO DO MANUSCRITO NO PERIÓDICO JOURNAL OF APPLIED PHARMACEUTICAL SCIENCE</b> .....	152

## 1 INTRODUÇÃO

Desde os primórdios da existência humana, tem-se encontrado nas plantas uma fonte inesgotável de recursos, principalmente como alimento e remédio, resultantes de uma série de influências culturais como a dos colonizadores europeus, indígenas e africanos (DI STASI et al., 1989).

As plantas medicinais continuam ocupando lugar de destaque no arsenal terapêutico. No início da década de 1990, a Organização Mundial de Saúde (OMS), demonstrou que 65 a 80% da população dos países em desenvolvimento dependiam das plantas medicinais como única forma de acesso aos cuidados básicos de saúde. Apesar da grande evolução na medicina alopática, a partir da segunda metade do século XX, ainda existe o difícil acesso pelas populações carentes a esses medicamentos. Tal fato associado com a fácil obtenção e a grande tradição do uso de plantas medicinais contribui para sua utilização pelas populações dos países em desenvolvimento (WHO, 2011).

No Brasil, cerca de 82% da população brasileira utiliza produtos à base de plantas medicinais em tratamento de saúde, seja pelo conhecimento tradicional na medicina tradicional indígena, quilombola, entre outros povos e comunidades tradicionais, seja pelo uso popular, de transmissão oral entre gerações, ou nos sistemas oficiais de saúde, como prática de cunho científico, orientada pelo Sistema Único de Saúde (SUS) (RODRIGUES; SIMONI, 2010).

Apesar disso e de toda a diversidade de espécies existentes, o potencial de uso de plantas como fonte de novos medicamentos é ainda pouco explorado. Entre as 250 a 500 mil espécies de plantas estimadas no mundo, somente cerca de 5% têm sido estudadas fitoquimicamente e uma porcentagem ainda menor é avaliada sob aspectos biológicos (RATES, 2001). O Brasil é o país com a maior diversidade genética vegetal do mundo, contando com mais de 55 mil espécies catalogadas de um total estimado entre 350 a 550 mil, sendo que apenas 8% das espécies vegetais da flora brasileira foram estudadas em busca de compostos bioativos e 1.100 espécies vegetais foram avaliadas em suas propriedades medicinais (DIAS, 1996).

A vasta gama de informações sobre o uso de centenas de plantas como “remédios” em todos os lugares do mundo leva à necessidade de se desenvolver métodos que facilitem a enorme tarefa de avaliar cientificamente o valor terapêutico de espécies vegetais (SIMÕES et al., 2010).

Historicamente, as plantas medicinais são importantes como fitoterápicos e na descoberta de novos fármacos, estando no reino vegetal a maior contribuição de medicamentos (RODRIGUES; AMARAL, 2012). Estima-se que pelo menos 25% de todos os medicamentos modernos são derivados direta ou indiretamente de plantas medicinais, principalmente por meio da aplicação de tecnologias modernas ao conhecimento tradicional. No caso de certas classes de produtos farmacêuticos, como medicamentos antitumorais e antimicrobianos, essa percentagem pode ser maior que 60% (WHO, 2011).

A informação popular sobre o uso das plantas se constitui no mais importante critério de seleção de material para o estudo químico, visando à sua aplicação medicinal (MATOS, 2009). Dados da literatura revelam que é muito mais provável encontrar atividade biológica em plantas orientadas pelo seu uso na medicina popular do que em plantas escolhidas ao acaso. Cerca de 75% dos compostos puros naturais empregados na indústria farmacêutica foram isolados, seguindo recomendações da medicina popular (CECHINEL FILHO; YUNES, 1998).

As observações populares sobre o uso e a eficácia de plantas medicinais de todo mundo, mantêm em voga a prática do consumo de fitoterápicos, tornando válidas as informações terapêuticas que foram sendo acumuladas durante séculos. A partir desse conhecimento popular a cerca do uso das plantas medicinais, que serviu de embasamento para os estudos clínicos, farmacológicos e químicos das plantas, originaram-se os primeiros fármacos pelo homem, como atropina, artemísia, digoxina, morfina, reserpina, vincristina e vinblastina, dentre outros (GILANI; ATTA-UR-RAHMAN, 2005).

Segundo Miguel e Miguel (1999), os produtos naturais podem ser tão eficientes quanto os produzidos pela síntese química, contudo a transformação de uma matéria-prima vegetal em um medicamento deve visar à preservação da integridade química e farmacológica do vegetal, garantindo a constância de sua ação biológica e a sua segurança de utilização, além de valorizar seu potencial terapêutico. Para garantir esses objetivos, a produção de fitoterápicos requer, necessariamente, estudos prévios relativos a aspectos botânicos, agrônômicos, fitoquímicos, farmacológicos, toxicológicos, de desenvolvimento de metodologias analíticas e tecnológicas.

Neste sentido, destaca-se a etnofarmacologia, uma área da pesquisa que visa entre outros eixos temáticos, a exploração científica interdisciplinar de agentes biologicamente ativos, tradicionalmente empregados ou observados por determinado grupo humano (AMOROZO, 1996, p. 49). Dessa forma, todos os estudos realizados com plantas devem ser considerados de grande valia, não só pela descrição científica, mas também pelo registro dos



saberes populares que são fundamentais no direcionamento das pesquisas científicas (MING, 1996, p. 70).

Infelizmente, apesar de contar com uma vasta biodiversidade, quase a totalidade das plantas medicinais estudadas hoje e usadas na preparação de medicamentos não pertence à flora brasileira e isto acontece devido à falta de estudos científicos que comprovem suas ações (BRANDÃO, 2009).

Entre as plantas de interesse da flora medicinal brasileira pode-se citar a *Poikilacanthus glandulosus*, pertencente à família Acanthaceae e conhecida popularmente como gaiana na região de Santiago/RS, onde é muito utilizada na medicina tradicional para diversas enfermidades e sintomatologias e, no entanto, não possui validação a respeito do seu uso e principalmente, de seus efeitos medicinais e de toxicidade bem como de suas atividades biológicas e estudos fitoquímicos. Tendo em vista o crescente interesse e a necessidade pela pesquisa com plantas medicinais, especialmente aquelas espécies ainda não estudadas, e a necessidade do desenvolvimento de novos agentes no tratamento das mais diversas doenças, motivou-se a realização deste trabalho para que haja uma maior compreensão etnofarmacológica da espécie, dos constituintes químicos, da capacidade antioxidante e atividades cito e genotóxica, anti-inflamatória, antimicrobiana, antimicobacteriana, antibiofilme e antiparasitária de extratos obtidos das folhas e dos galhos de *P. glandulosus*.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Realizar um estudo etnofarmacológico, fitoquímico e investigar atividades biológicas dos extratos obtidos das folhas e dos galhos de *Poikilacanthus glandulosus*.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realizar estudo etnofarmacológico de *P. glandulosus* na região de Santiago, RS, Brasil;
- Pesquisar os principais metabólitos secundários presentes nas folhas e nos galhos de *P. glandulosus* através de screening fitoquímico preliminar;
- Identificar compostos no extrato bruto e frações das folhas e dos galhos de *P. glandulosus* por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência e quantificá-los quando possível;
- Determinar o teor de polifenóis e flavonoides no extrato bruto e frações das folhas e dos galhos de *P. glandulosus*;
- Avaliar a capacidade antioxidante de *P. glandulosus* do extrato bruto e frações das folhas e dos galhos;
- Verificar a possível atividade anti-inflamatória tópica do extrato bruto das folhas de *P. glandulosus*;
- Analisar o efeito do extrato bruto e frações das folhas de *P. glandulosus* frente a cito e genotoxicidade em células mononucleares de sangue periférico;
- Realizar a atividade antimicrobiana e antimicobacteriana *in vitro* do extrato bruto e frações das folhas e dos galhos de *P. glandulosus* frente a bactérias através de microdiluição em caldo, e determinar a concentração inibitória mínima (CIM);
- Verificar, através do ensaio de microdiluição em placa, a Concentração Mínima de Inibição de Biofilme (CIB) no extrato bruto e frações das folhas e dos galhos espécie;
- Analisar a atividade antiparasitária do extrato bruto das folhas e dos galhos de *P. glandulosus* frente à protoscolecês de *Echinococcus ortleppi*.

### 3 REVISÃO DA LITERATURA

#### 3.1 DESCRIÇÃO DA PLANTA

##### 3.1.1 Família Acanthaceae Juss.

A maioria das espécies pertencentes à família Acanthaceae são subarbustos, arbustivas ou trepadeiras, raramente pequenas árvores, e estima-se que existam cerca de 3.500 espécies compreendidas em cerca de 200 gêneros de ampla distribuição nas regiões tropicais e subtropicais e pouco representadas nas regiões temperadas (JOLY, 1998; WASSHAUSEN; WOOD, 2004).

Os principais centros de diversidade e de maior concentração de espécies da família são o Sudeste Asiático, Malásia, Índia, Madagascar, África Tropical, América Central, México, Andes e Brasil (DANIEL, 2000). O Brasil possui aproximadamente 41 gêneros e 432 espécies, distribuídos nas florestas do Sul e Centro-Oeste, principalmente nas matas secas (PROFICE et al., 2010).

A polinização nesta família, na grande maioria, é realizada por diferentes espécies de beija-flores. Os diferentes tipos morfológicos da corola das espécies, geralmente marcadamente tubulosos, favorecem a visita desses pássaros (EZCURRA, 1993).

As espécies pertencentes a essa família apresentam importância como ornamental, tanto por suas brácteas, como por suas flores, sendo representadas por espécies dos gêneros *Acanthus* L., *Ruellia* L., *Thunbergia* Retz, *Aphelandra* R. Br., *Eranthemum* L., *Justicia* L., *Odontonema* Nees dentre outros que são frequentemente cultivados. Algumas espécies possuem, também, importância econômica como forrageiras de emergência em épocas de escassez de gramíneas como *Justicia tweediana* (Nees) Griseb. e *Ruellia erythropus* (Nees) Lindau (BURKART, 1943). Entretanto, *Geissomeria longiflora* (Lindl.) e *Chaetothylax lythroides* Benth. & Hook. são popularmente consideradas tóxicas para o gado (PIO-CORRÊA, 1969). Existem espécies que também são importantes pelo seu valor medicinal, tais como *Phaulopsis fascisepala* C.B.Cl. pela sua atividade antioxidante (ADESEGUN et al., 2009), *Adathoda vasica* Nees, no combate de problemas respiratórios (SHINWARI et al., 2009), *Graptophyllum pictum* L., para doenças cutâneas e anti-inflamatória (OZAKI et al., 1989), *Asteracantha longifolia* (L.) Nees, como antioxidante, antimicrobiana, antitumoral, hepatoprotetora, hematopoiética, antioxidante e hipoglicemiante (CHAUHAN; DIXIT, 2010).

### 3.1.2 Gênero *Poikilacanthus*

O gênero abrange ervas ou arbustos com folhas pecioladas, inflorescências em espigas ou capituliformes e uma flor por nó. *Poikilacanthus* está representado por quatorze espécies, sendo que a maioria delas ocorre na América do Sul e cinco são encontradas no México e na América Central (DANIEL, 1991). É distinguido dos demais gêneros da família pelo pólen poliporado (4 poros), com exina recoberta de aréolas retangulares ou poligonais e distribuídas por toda a superfície ou unidas em faixas (LINDAU, 1895; RAJ, 1961; DANIEL, 1991, 1998).

A morfologia externa de *Poikilacanthus* é muito semelhante ao *Justicia*, sendo que muitas de suas espécies foram descritas pertencendo a esse gênero. Somente a partir da análise da morfologia polínica que foi possível manter *Poikilacanthus* como um gênero à parte. As características do pólen parecem ser o único meio de distinção entre os dois gêneros (DANIEL, 1991, 1998). O pólen de *Poikilacanthus* tem sido considerado único na família (RAJ, 1961).

### 3.1.3 Espécie *Poikilacanthus glandulosus* (Nees) Ariza

A espécie *P. glandulosus* (Figura 1) é um subarbusto, prefere lugares úmidos e está distribuída no Sudeste e Sul do Brasil, Paraguai, Argentina e Uruguai, apresentando como sinônimas *Justicia umbrosa* (Nees) Lindau, *Justicia flexuosa* (Nees) Wasshausen & Smith e *Poikilacanthus flexuosus* (Nees) Lindau (ARIZA, 1984; WASSHAUSEN; SMITH, 1969).

A planta em estudo está inserida na lista de espécies da flora brasileira e, no entanto, carece de estudos químicos, farmacológicos, biológicos, toxicológicos e fitoquímicos, bem como de informações etnobotânicas e etnofarmacológicas. Existe apenas um estudo na literatura que aborda sobre o screening antimicrobiano através do extrato acetônico de *P. glandulosus* que não apresentou inibição para os micro-organismos testados (BARNECHE et al., 2010).

Figura 1 – *Poikilacanthus glandulosus* - Aspectos da planta. Disponível em <<http://www.floraargentina.edu.ar/>>. Acesso em 12/02/2014.



### 3.2 A ABORDAGEM ETNOFARMACOLÓGICA NA PESQUISA COM PLANTAS MEDICINAIS

A prática do uso das plantas medicinais faz parte da evolução da humanidade, tendo grande importância tanto no que se refere aos aspectos medicinais, como também, a sua forte ligação a costumes ancestrais, onde a população continua a usá-las como principal medicamento (HOSTETTMANN et al., 2008).

A escolha da planta a estudar deve basear-se, essencialmente, na prospecção feita sobre as informações populares e bibliográficas do seu uso, embora, após sua identificação botânica se possa, pela posição filogenética da planta, obter dados complementares úteis para justificar essa escolha à custa de pesquisa bibliográfica (CUNHA, 2010).

Existem várias abordagens para a seleção de espécies vegetais, dentre elas, três tipos são alvo de maiores investigações:

- abordagem randômica: escolha da planta sem qualquer critério, tendo como fator determinante a disponibilidade da planta;

- abordagem quimiotaxonômica ou filogenética: seleção da espécie correlacionada com a ocorrência de uma dada classe química de substâncias em um gênero ou família;
- abordagem etnofarmacológica: seleção da espécie de acordo com o uso terapêutico evidenciado por um determinado grupo étnico (HOSTETTMANN et al., 2008).

Segundo Spjut e Perdue (1976), a seleção etnofarmacológica, no entanto, favorece com maior probabilidade à descoberta de novas substâncias bioativas, por apresentar alta porcentagem de acerto nos testes de investigação de respostas positivas. Tal fato pode ser verificado por esses autores quando analisaram drogas anticâncer e relataram que foram descobertas duas vezes mais plantas para essa doença, partindo-se das pesquisas etnofarmacológicas do que das recolhidas ao acaso. Ainda, conforme Balick (1990), 6% das amostras colhidas ao acaso e enviadas ao *US NCI (National Cancer Institute, dos Estados Unidos da América)* eram bioativas, enquanto as coletas direcionadas por pesquisas etnofarmacológicas indicaram 25% de plantas bioativas.

O resgate dos conhecimentos tradicionais junto à população pela pesquisa etnobotânica e etnofarmacológica tem merecido atenção especial devido à aceleração no processo de aculturação e perda de valiosas informações populares, desaparecimento de espécies ainda não estudadas, ampliação do mercado de plantas medicinais em virtude da preferência de muitos consumidores por produtos de origem natural, o difícil acesso da grande maioria da população brasileira ao medicamento tradicional e à assistência médica e o crescente interesse das indústrias na busca por novos fármacos (ANDRADE; CASALI, 2002).

A abordagem ao estudo de plantas medicinais a partir de seu emprego na medicina tradicional pode fornecer muitas informações úteis para a elaboração de estudos farmacológicos, fitoquímicos e agrônômicos sobre estas plantas. A partir desse conhecimento empírico já existente, e muitas vezes consagrado pelo uso contínuo destas plantas medicinais que poderão guiar os estudos científicos (AMOROZO, 1996, p. 50).

Diante disso, é necessário estudar o uso e obter o conhecimento das plantas dos vários grupos étnicos e, desta forma, captar informações que possam ser empregadas na descoberta de substâncias biologicamente ativas e utilizadas na produção de medicamentos. Neste contexto, a etnobotânica é uma área da pesquisa que consiste em registrar e documentar o conhecimento tradicional e a informação sobre os usos empíricos das plantas (MARTINEZ, 1997).

A etnobotânica aplicada ao estudo de plantas medicinais atua em cumplicidade com a etnofarmacologia, que visa designar a investigação das práticas tradicionais de preparação e uso de medicamentos à base de plantas usadas para tratamento das doenças que afetam as

populações indígenas. Os estudos etnofarmacológicos permitem inferir da eficácia provável dos remédios tradicionais, validando, desta forma, o conhecimento tradicional e, se realizados de acordo com uma metodologia científica correta, podem contribuir para melhorar a qualidade e estabilidade das preparações medicinais, ao fornecer dados sobre as substâncias ativas e sobre o tipo de atividade farmacológica que revelam (CUNHA, 2010).

Entretanto, o uso popular, e mesmo tradicional, não é suficiente para avaliar eticamente as plantas medicinais como medicamentos eficazes e seguros. Neste sentido, as plantas medicinais não se diferenciam de qualquer outro xenobiótico sintético e sua preconização ou a autorização oficial do seu uso medicamentoso devem ser fundamentadas em evidências experimentais comprobatórias de que o risco a que se expõem àqueles que utilizam é suplementado pelos benefícios que possam advir (SIMÕES et al., 2010).

A tendência observada para a fitoterapia é que essa, assim como no passado, desempenhará um papel cada vez mais importante na assistência à saúde da população, necessitando cada vez mais de estudos multidisciplinares, contribuindo para a preservação da multiplicidade de culturas humanas, explorando a biodiversidade brasileira e servindo de partida para o desenvolvimento de estudos científicos nas mais diversas áreas do conhecimento.

### 3.3 METABÓLITOS SECUNDÁRIOS: IMPORTÂNCIA E FUNCIONALIDADE

O metabolismo é um conjunto de reações químicas que continuamente estão ocorrendo em cada célula. Os compostos químicos formados, degradados ou simplesmente transformados é que são os metabólitos (SANTOS et al., 2010). Esses metabólitos variam de acordo com a espécie vegetal e a família e alguns são restritos à determinada família, gênero ou espécie, possibilitando o emprego como marcador taxonômico (BENETT; WALLSGROVE, 1994).

Outro aspecto relevante que pode interferir na produção de metabólitos secundários é a influência dos fatores ambientais, como clima, tipo de solo e época de coleta da planta. Geralmente, os efeitos medicinais e/ou tóxicos das plantas estão relacionados aos metabólitos secundários, os quais possuem como função adaptar o vegetal ao meio e representam a principal classe de substâncias vegetais de interesse farmacológico (VANHAELEN et al., 1991). As principais classes de compostos derivados do metabolismo secundário das plantas são: polifenóis, taninos, flavonoides, alcaloides, cumarinas, antraquinonas, óleos essenciais e saponinas (SIMÕES et al., 2010).

O aparecimento de metabólitos biologicamente ativos na natureza é determinado por necessidades ecológicas e possibilidades biossintéticas, sendo que a coevolução de plantas, insetos, micro-organismos e mamíferos conduz a síntese de metabólitos com funções de defesa ou atração, principalmente. Através dessa interação dos metabólitos secundários é que estes apresentam atividades biológicas interessantes (CUNHA, 2010).

A elevada diversidade desses metabólitos vegetais tem despertado o interesse de pesquisadores de diversas áreas da ciência, como a farmacêutica, alimentar, agrônômica, perfumaria, entre outras, que veem neles uma fonte promissora de novas moléculas (RHODES, 1994).

Quando não se dispõe de estudos químicos sobre a espécie de interesse, a análise fitoquímica preliminar pode indicar os grupos de metabólitos secundários relevantes na mesma para detectar as classes de compostos presentes na parte da planta usada na medicina popular e na própria preparação tradicional a fim de guiar outros estudos, tais como isolamento, atividades biológicas, tóxicas, farmacológicas entre outras (SIMÕES et al., 2010).

Segundo Farias (2010), a caracterização dos principais grupos de substâncias vegetais de interesse tem sido conseguida pela realização de reações químicas que resultem no desenvolvimento de coloração e/ou precipitado característico. As reações químicas permitem verificar a presença de substâncias, por exemplo, flavonoides, alcaloides, esteroides, entre outros, sendo métodos simples, de rápida execução e baixo custo. Elas são geralmente inespecíficas, ocorrendo através de grupos funcionais ou estruturas comuns a várias substâncias.

### 3.4 POTENCIAL ANTIOXIDANTE E ATIVIDADES BIOLÓGICAS RELACIONADAS

#### 3.4.1 Papel dos radicais livres e o estresse oxidativo

A oxidação é parte fundamental da vida aeróbia e do nosso metabolismo e os radicais livres são produzidos naturalmente nos processos fisiológicos ou por alguma disfunção biológica. No organismo, seus benefícios podem ser observados em baixas ou moderadas concentrações e encontram-se envolvidos na produção de energia, fagocitose, regulação do crescimento celular, sinalização intercelular e síntese de substâncias biológicas importantes (BARREIROS et al., 2006).



Normalmente, a produção endógena desses radicais livres é contrabalanceada por sistemas de defesa do próprio organismo. No entanto, devido a diferentes fatores, o aumento na produção e/ou a redução na eliminação desses radicais podem ultrapassar a capacidade protetora, gerando um desequilíbrio fisiológico, caracterizando o estresse oxidativo (EO) (CUNHA, 2010).

Uma quantidade substancial de evidências tem indicado o papel chave dos radicais livres e outros oxidantes como grandes responsáveis pelo envelhecimento e por doenças cardiovasculares, câncer (RICE-EVANS; PACKER, 1998), processos inflamatórios, patologias autoimunes, desordens do sistema digestivo (REPETTO; LIESUY, 2002) e enfermidades neuro-degenerativas como Parkinson e o Mal de Alzheimer (SCHROETER et al., 2002; YODIM et al., 2004).

Os radicais livres são compostos que possuem na estrutura química um ou mais elétrons desemparelhados, sendo desta forma muito instáveis, altamente reativos, e de meia vida curta. Diversos agentes e circunstâncias podem levar ao aumento desses radicais no organismo que podem ser de formação endógena (fosforilação oxidativa) ou exógena (radiação, fumo, substâncias tóxicas, como solventes, herbicidas e drogas) (SANTOS, 2006).

Já a terminologia Espécies Reativas de Oxigênio (EROs) inclui espécies radicalares como, hidroxila ( $\text{OH}^\bullet$ ), ânion superóxido ( $\text{O}_2^{\bullet-}$ ), peroxila ( $\text{ROO}^\bullet$ ) e oxigênio singlete ( $^1\text{O}_2$ ) e as não radicalares, como oxigênio ( $\text{O}_2$ ), peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), ácido hipocloroso ( $\text{HOCl}$ ), que apesar de não possuírem elétrons desemparelhados, também são altamente reativos em decorrência de sua instabilidade (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1999).

Além de EROs, os organismos também sofrem ação constante de Espécies Reativas de Nitrogênio (ERNs), como o óxido nítrico ( $\text{NO}^\bullet$ ), óxido nitroso ( $\text{N}_2\text{O}_3$ ), ácido nitroso ( $\text{HNO}_2$ ), nitritos ( $\text{NO}_2^-$ ), nitratos ( $\text{NO}_3^-$ ) e peroxinitritos ( $\text{ONOO}^-$ ) (BARREIROS et al., 2006). Ainda, os derivados de tióis ( $\text{RS}^\bullet$ ), as espécies reativas de cloro, as espécies reativas de carbono e complexos de metais de transição, principalmente Fe, Cu, Mn e Cr também são capazes de formar radicais livres no organismo (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007; VASCONCELOS et al., 2007).

O EO é uma condição celular ou fisiológica de elevada concentração dessas espécies reativas que causam danos moleculares às estruturas celulares ao reagir com lipídeos, proteínas, carboidratos e ácidos nucleicos, com consequente alteração funcional e prejuízo das funções vitais em diversos tecidos ou órgãos (HALLIWELL, 1992; GYAMFI et al., 1999; AL-MAMARY et al., 2002).

Esforços têm sido realizados no sentido de se identificar marcadores para a avaliação do EO, com o objetivo de sistematizar sua utilização no diagnóstico e controle dos efeitos adversos. Tais marcadores se baseiam na análise do processo de oxidação de lipídios, proteínas e DNA, sendo que os relacionados aos lipídios são mais amplamente estudados (MAYNE, 2003; BARBOSA et al., 2008).

A membrana plasmática é basicamente formada por uma dupla camada lipídica no qual se encontram proteínas integrais e periféricas associadas. As EROs podem prejudicar a função das membranas pela oxidação dos ácidos graxos poli-insaturados presentes nos lipídios e indiretamente pela inibição da síntese dos lipídios, dessaturação de ácidos graxos ou ativação das lipases, processo esse denominado peroxidação lipídica que serve de marcador do estresse oxidativo (GOETZ et al., 2008). Nesse sentido, a peroxidação lipídica causa modificações nas propriedades físicas e químicas das membranas, alterando a fluidez e permeabilidade, tanto da membrana plasmática quanto das membranas que delimitam as organelas com risco de ruptura que levam à morte celular (VASCONCELOS et al., 2007).

Por outro lado, assim como na formação de RLs e espécies reativas, a peroxidação lipídica pode ser um processo fisiológico nem sempre prejudicial, pois participa da resposta inflamatória liberando ácido araquidônico e, subsequentemente, prostaglandinas e distintos endoperóxidos (JAMIESON, 1989). Entretanto, a excessiva liberação destes produtos durante os danos oxidativos pode causar edema celular, modificações na permeabilidade celular, quimiotaxia e danos teciduais, implicando, por exemplo, na patogênese da aterosclerose (VAGIMIGLI et al., 2003).

A lipoperoxidação ocorre através de uma cascata de eventos bioquímicos resultante da ação dos radicais livres sobre a membrana plasmática. A reação inicia com a retirada de um átomo de hidrogênio de um grupo metileno do ácido graxo poli-insaturado da membrana celular, com consequente formação de radicais livres, que se propagam em uma reação em cadeia. Uma vez que estes peróxidos lipídicos são compostos instáveis, tendem a degradar-se rapidamente em uma variedade de produtos secundários, destacando-se o malondialdeído (MDA), um dos produtos mais conhecidos, que pode ser utilizado como indicador de dano oxidativo em tecidos e células (GROTTO et al., 2009; SHIBAMOTO, 2006).

### 3.4.2 Sistema de defesa antioxidante

Com a finalidade de contrabalançar o EO, inibindo ou reduzindo os danos causados pela ação deletéria das ERs, tem-se o sistema de defesa antioxidante, que pode ser dividido em enzimático e não-enzimático. O primeiro inclui as enzimas superóxido dismutase (SOD), glutatona peroxidase (GPx) e catalase (CAT), que agem por meio de mecanismos de prevenção, impedindo e/ou controlando o processo de propagação e amplificação do processo oxidativo. Já o sistema de defesa não-enzimático inclui substâncias diversas como a glutatona (GSH), bilirrubina, ceruloplasmina, melatonina, coenzima Q e, especialmente, antioxidantes obtidos da dieta, como a vitamina C, vitamina E, carotenoides e compostos fenólicos (GÜLÇİN, 2012; BARBOSA et al., 2010).

Além desse sistema de defesa, produtos naturais com atividade antioxidante são importantes para atenuar o dano oxidativo, desta maneira, complementando estas defesas (KANTER, 1998). Quando há limitação na disponibilidade de antioxidantes podem ocorrer lesões oxidativas de caráter cumulativo, no entanto, em quantidades satisfatórias, estes podem estabilizar ou desativar os radicais livres antes que ataquem os alvos biológicos nas células (ATOUI et al., 2005).

A preocupação com a substituição de aditivos sintéticos pelos naturais evidenciou os estudos sobre compostos com potencial efeito antioxidante de fontes naturais. As atividades antioxidantes e anti-radicalares são as que mais se relacionam com os constituintes fenólicos, como fenóis simples, ácidos fenólicos (derivados de ácidos benzóico e cinâmico), cumarinas, flavonoides, estilbenos, taninos condensados e hidrolisáveis, lignanas e ligninas (CUNHA, 2010).

A atividade dos antioxidantes está relacionada com compostos capazes de proteger um sistema biológico contra reações potencialmente nocivas que causam excessiva oxidação, impedindo que radicais livres danifiquem células e tecidos. O consumo diário destas substâncias pode fortalecer o sistema imunológico, além de reduzir o risco de uma série de doenças como o desenvolvimento de câncer através da ação prolongada dos radicais livres no organismo, os quais são combinados pelos antioxidantes (MENSOR et al., 2001; ROGINSKY; LISSI, 2005).

Neste contexto, há um interesse crescente pelos efeitos antioxidantes de produtos naturais e do seu papel na saúde e na doença. Estudos envolvendo o efeito de extrato bruto, frações ou de componentes isolados e/ou modificados vem apresentando um enorme

crescimento na investigação científica nas duas últimas décadas, especialmente em relação à atividade antioxidante (FILHO et al., 2001).

Os primeiros estudos com polifenóis relacionavam a sua fundamental importância na dieta devido aos seus efeitos nutricionais, como por exemplo, à diminuição na absorção e digestibilidade de alimentos devido à capacidade destes constituintes químicos se ligarem e precipitarem minerais e macromoléculas tais como proteínas e carboidratos (YANG et al., 2001). Contudo, o interesse principal tem recaído, pois dentre as diversas classes de substâncias antioxidantes de ocorrência natural, as substâncias com núcleo fenólico, como tocoferol, flavonoides e ácidos fenólicos, têm recebido muita atenção nos últimos anos, sobretudo por inibirem a peroxidação lipídica e a lipooxigenase *in vitro* (HASLAM, 1996; SOARES, 2002). Muitos flavonoides como a quercetina, luteonilina e catequinas, são melhores antioxidantes que a vitamina C, vitamina E e  $\beta$ -caroteno em uma mesma concentração molar (GAO et al., 1999).

De acordo com a habilidade destas substâncias em prevenir doenças conhecidamente associadas ao estresse oxidativo, tais como cardiopatias, processos inflamatórios, alguns tipos de câncer podem estar vinculadas às propriedades antioxidantes dos polifenóis reportadas (MAURÍCIO, 2006).

### **3.4.3 Atividade anti-inflamatória**

A reação inflamatória está presente em quase todas as lesões produzidas no organismo humano. Traumas, lesões térmicas, infecções, isquemia, reações imunitárias a agentes externos e processos autoimunes acompanham-se, em maior ou menor grau, de reações inflamatórias. As manifestações clínicas do processo inflamatório são dor, hiperalgesia, eritema, edema e limitação funcional (FUCHS et al., 2006).

A inflamação é uma reação complexa a vários agentes nocivos, como os microrganismos e células danificadas, geralmente necróticas, que consiste de respostas vasculares, migração e ativação de leucócitos e reações sistêmicas. A principal característica do processo inflamatório é a reação dos vasos sanguíneos, que leva ao acúmulo de fluido e leucócitos nos tecidos extravasculares (ROBBINS; COTRAN, 2005).

O processo inflamatório é fundamentalmente um mecanismo de defesa, cujo objetivo final é a eliminação da causa inicial da lesão celular, (p. ex., microrganismos, toxinas) e das consequências de tal lesão (p. ex., células e tecidos necróticos). Sem a inflamação, as infecções se desenvolveriam descontroladamente, as feridas nunca cicatrizariam e o processo

destrutivo nos órgãos atacados seria permanente. Entretanto, a inflamação e o reparo podem ser potencialmente prejudiciais. As reações inflamatórias são o pilar de doenças crônicas, como a artrite reumatoide, a aterosclerose e a fibrose pulmonar, assim como de reações de hipersensibilidade potencialmente fatais a picadas de insetos, drogas e toxinas (ROBBINS; COTRAN, 2005).

Como foi exposto anteriormente, os radicais livres são formados continuamente no nosso organismo por diversos fatores (exógenos e endógenos) e, podem desencadear um dano oxidativo, seja por aumento da produção desses radicais, seja pela diminuição dos componentes do sistema de defesa endógeno. Na reação inflamatória esse dano pode ser ainda mais severo em virtude de uma maior produção de citocinas. As células fagocitárias produzem superóxido como parte do mecanismo de defesa imunológica para eliminar micro-organismos patogênicos; nas doenças inflamatórias, esta produção torna-se excessiva, provocando lesões nos tecidos (BRIGANTI; RICARDO, 2003).

O desenvolvimento de fármacos que possuem atividade anti-inflamatória e também, antioxidante, como por exemplo, a Nimesulida, um fármaco bastante conhecido e que possui as duas atividades, é de grande valia, pois há o envolvimento da produção de radicais livres que contribuem na inflamação e dor, com posterior dano aos tecidos (VANE et al., 1998).

As características mais comuns a todos os anti-inflamatórios disponíveis no mercado e, em particular, os glicocorticoides, são seus efeitos colaterais indesejáveis e o alto custo. Muitas plantas têm sido utilizadas na medicina tradicional não só pela sua eficiência em atenuar ou mesmo eliminar os efeitos indesejáveis da resposta inflamatória, mas também pela facilidade de acesso e, principalmente, pelo seu baixo custo (BATISTA et al., 1996).

O modelo *in vivo* de edema de orelha é amplamente utilizado para demonstrar a atividade tópica de substâncias bioativas em inflamações cutâneas (BLAZSÓ; GÁBOR, 1995; GÁBOR, 2000). Esse modelo caracteriza - se por demonstrar resultados rápidos, simplicidade da técnica, reprodutibilidade e baixas possibilidades de erros quando bem aplicado, além de ser um modelo que minimiza uso de animais e de substâncias (GÁBOR, 2000).

Os agentes flogísticos ativam quimicamente um processo inflamatório. Diferentes substâncias com esse potencial podem ativar vias diversas da cascata inflamatória, desencadeando os sinais característicos como edema, aumento de permeabilidade, vasodilatação, eritema. Por ativar vias diversas, a aplicação de diferentes agentes flogísticos (óleo de Croton, ácido araquidônico, capsaicina, fenol e histamina) é justificada por seus mecanismos específicos, já conhecidos, na indução do processo inflamatório, cujos

resultados obtidos podem sugerir um provável mecanismo da ação antiinflamatória da substância em estudo (GÁBOR, 2000).

#### 3.4.4 Atividades cito e genotóxica

No Brasil, as plantas medicinais da flora nativa são consumidas com pouca ou nenhuma comprovação de suas propriedades farmacológicas e toxicológicas, propagadas por usuários ou comerciantes. Comparada à propriedade dos medicamentos usados nos tratamentos convencionais, a toxicidade de plantas medicinais e fitoterápicos pode parecer desprezível. Isto, entretanto, não é verdade (SIMÕES et al., 2010).

A toxicidade de plantas medicinais é problema sério de saúde pública. Os efeitos adversos dos fitomedicamentos, as possíveis adulterações e toxicidade, bem como a ação sinérgica (interação com outras drogas) ocorrem comumente. As pesquisas realizadas para avaliação do uso seguro de plantas medicinais e fitoterápicos no Brasil ainda são incipientes, assim como o controle da comercialização em feiras livres pelos órgãos oficiais, mercados públicos ou lojas de produtos naturais (VEIGA JUNIOR et al., 2005).

Do ponto de vista toxicológico, deve-se considerar que uma planta medicinal ou um fitoterápico não tem somente efeitos imediatos e facilmente correlacionados com a sua ingestão, mas lembrar, principalmente os efeitos que se instalam a longo prazo e de forma assintomática, como os carcinogênicos, hepatotóxicos e nefrotóxicos, a exemplo do que ocorreu recentemente no Brasil com extratos de confrei (*Symphytum officinale* L.) (ABBOTT, 1988; BRASIL, 1992). Outro caso importante ocorrido é o do ácido aristolóquico encontrado em espécies de *Aristolochia*, usadas em casos de gota, artrites, reumatismo e doenças inflamatórias crônicas de pele. A exposição a esses ácidos tem resultado em um grande número de pacientes com deficiências renais chegando a alguns casos de morte (EMEA, 2000).

Portanto, o uso popular, e mesmo tradicional, não são suficientes para validar eticamente as plantas medicinais como medicamentos eficazes e seguros. Nesse sentido, as plantas medicinais não se diferenciam de qualquer outro xenobiótico sintético e sua preconização, ou a autorização oficial do seu uso medicamentoso, devem ser fundamentadas em evidências experimentais comprobatórias de que o risco a que se expõem aqueles que a utilizam é suplantado pelos benefícios que possam advir (BRASIL, 1995).

Diante disso, o uso indiscriminado de tinturas, chás, infusões, dentre outras formas de utilização das plantas medicinais, podem desencadear no desenvolvimento de patologias em

diversos órgãos, a exemplo, o fígado, que apresenta suscetibilidade natural a agentes externos e elevado número de metabólitos (MINCIS, 1985).

A ANVISA recomenda a realização de estudos não clínicos de segurança quando pretende-se desenvolver novos medicamentos, que incluem: estudos de toxicidade de dose única (Aguda), toxicidade de doses repetidas, toxicidade reprodutiva, genotoxicidade, tolerância local e carcinogenicidade além de estudos de interesse na avaliação da segurança farmacológica e toxicocinética (ANVISA, 2013).

Os ensaios *in vitro* são normalmente efetuados como um teste de triagem inicial na primeira fase da avaliação de citotoxicidade. Os métodos *in vitro* para avaliar a toxicidade de biomateriais, foram padronizados utilizando-se culturas celulares. Estes testes de citotoxicidade consistem em colocar o material direta ou indiretamente em contato com uma cultura de células de mamíferos, verificando-se as alterações celulares por diferentes mecanismos (ROGERO et al., 2003). A necessidade de estudos do comportamento celular *in vitro* sobre extratos de diferentes materiais é fundamental para o uso racional e seguro na prática médica. Neste método podem ser observados os processos de crescimento celular diretamente sobre as substâncias testadas (FRESHNEY, 2005).

Neste sentido, a citotoxicidade reflete os efeitos sobre as estruturas celulares. A maioria das células devem mostrar uma resposta semelhante, e também responder de maneira similar quando a toxicidade é medida por vários critérios de viabilidade (BABICH, ROSENBERG e BORENFREUD, 1991).

A viabilidade celular é um termo geral e pode ser investigada por ensaios que determinam um ou mais parâmetros celulares e que são geralmente adequados para medir efeitos tóxicos agudos de células cultivadas. Entre eles, encontram-se os seguintes ensaios 3-(4,5)-dimetilialzólil-2,5-difeniltetrazólio (MTT) (atividade mitocondrial), enzima lactato desidrogenase (LDH), Azul Tripán entre outros (SOENEN e DE CUYPER, 2009).

Além disso, quando um novo agente é incorporado ao ambiente celular, também pode ser analisado se este pode gerar genotoxicidade (dano diretamente ao DNA da célula). Agressões ao material genético podem resultar na indução ou promoção da carcinogênese, levar ao desenvolvimento de doenças genéticas, além de impactos na reprodução celular se o DNA de células germinativas for comprometido (DOAK et al., 2011). Estes agentes podem reagir com várias estruturas e organelas celulares, incluindo DNA, proteínas e lipídeos afetando vários processos celulares, como também pode resultar na formação de ERs, que implicam em disfunção celular, geração de mutações e envelhecimento (RILEY et al., 2008).

### 3.4.5 Atividade antimicrobiana

As doenças infecciosas continuam a ocupar posição de destaque como causa de morbidade e mortalidade em todo o mundo, apesar dos avanços técnico-científicos. Um dos principais fatores que explicam essa liderança é a capacidade que os micro-organismos possuem para a aquisição de mecanismos de resistência aos antimicrobianos. Tal habilidade impõe a necessidade permanente de pesquisas e o desenvolvimento de novos fármacos a serem utilizados no combate e/ou controle dos micro-organismos (AYRES et al., 2008).

Novas fontes de substâncias obtidas de espécies nativas do Brasil, que apresentem atividade antimicrobiana e baixa toxicidade, podem vir a ser uma alternativa viável, de baixo custo e de fácil acesso pelas comunidades carentes, da região onde tais espécies são encontradas (COSTA et al., 2005).

Muitas espécies vegetais apresentam atividades antimicrobianas devido às propriedades apresentadas pelos compostos sintetizados no metabolismo secundário. Os vegetais superiores são capazes de produzir substâncias antibióticas utilizadas como mecanismo de defesa contra predação por micro-organismos, fungos, parasitas, vírus, bactérias, insetos e herbívoros (GOTLIEB, 1981). Tais substâncias são denominadas de fitoalexinas, as quais são produzidas somente quando determinadas espécies vegetais sofrem a ação desses agentes agressores sendo capazes de inibir o crescimento dos mesmos (YUNES; CALIXTO, 2001).

Dentre as diversas substâncias oriundas do metabolismo vegetal e que atuam como fitoalexinas, os polifenóis, presentes em alimentos de origem vegetal e plantas medicinais têm sido extensivamente investigados contra uma ampla variedade de micro-organismos. Entre os polifenóis, destacam-se os flavan-3-óis, flavonóis e taninos, devido a seu largo espectro e maior atividade antimicrobiana em comparação com outros polifenóis, e ao fato de que a maioria destes são capazes de inibir fatores de virulência microbianos (tais como a inibição da formação de biofilme, redução da adesão e neutralização de toxinas bacterianas) e apresentam sinergismo com antibióticos (DAGLIA, 2012). Estas atividades se devem, provavelmente, à sua capacidade de complexar com proteínas extracelulares solúveis e com a parede celular bacteriana. Flavonoides mais lipofílicos também podem romper as membranas microbianas (COWAN, 1999).

Diversos estudos com várias espécies de plantas, incluindo extratos e substâncias isoladas, têm demonstrado atividade inibitória promissora, frente às bactérias Gram-negativas



e Gram-positivas, fungos, vírus e micobactérias (ELDEEN; STADEN, 2007; RAMOS et al., 2008; CHEN et al., 2010; TEKWU et al., 2012).

Extratos, óleos essenciais ou compostos biologicamente ativos isolados de espécies vegetais usados na medicina popular podem ser fontes promissoras para a pesquisa de novos agentes antimicrobianos (AL-FATIMI et al., 2007). Componentes de óleos essenciais derivados de terpenos, bem como seus derivados oxigenados (terpenoides), têm sido extensivamente avaliados, e estudos *in vitro* demonstraram inibição do crescimento bacteriano com resultados diversos (BURT, 2004).

Dentre as espécies de *Justicia*, pertencente à família Acanthaceae, *J. pectoralis* apresenta atividade antibacteriana, especialmente para *Escherichia coli*, *Staphylococcus epidermidis* e *Enterococcus faecalis* (LIZCANO et al., 2010; SSEGAWA e KASENENE, 2007). *J. adhatoda* possui potencial atividade antibacteriana contra o *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Serratia marcescens*, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa* (PA; MATHEW, 2012).

Neste sentido, destaca-se o estudo da atividade antimicrobiana de espécies vegetais, visto que o Brasil possui uma rica biodiversidade e, no entanto, enfrenta a rapidez com que muitas espécies não investigadas de plantas têm sido extintas nos últimos anos, sendo que várias estruturas promissoras podem estar sendo perdidas além da resistência dos microorganismos aos antibióticos tradicionalmente usados na prática médica, que aumenta a cada ano.

#### 3.4.5.1 Micobactérias

O gênero *Mycobacterium* é constituído de bacilos álcool-ácido resistentes (BAAR) e pertence à ordem dos Actinomicetales, subordem Corynebacteriacea, família Mycobacteriaceae. Neste incluem-se *Mycobacterium leprae*, espécies altamente patogênicas como do complexo *Mycobacterium tuberculosis*, causadores da tuberculose, e outras espécies denominadas micobactérias não tuberculosas (UEKI et al., 2005).

O estudo com micobactérias não tuberculosas e com *Mycobacterium tuberculosis*, principal agente etiológico da tuberculose, vem despertando o interesse de muitos pesquisadores devido ao seu poder letal em pacientes imunocomprometidos e às dificuldades encontradas no tratamento de infecções causadas por esses microrganismos (COPP, 2003; VAN INGEN, et al., 2012).

Esse interesse se deve, principalmente, ao surgimento de novos casos da doença, ao surgimento de cepas de *M. tuberculosis* resistentes, aos efeitos adversos do tratamento convencional, e ao aumento da incidência de tuberculose associada a infecções virais (vírus da imunodeficiência humana) (NEWTON, LAU e WRIGHT, 2000; GARCÍA et al., 2012).

Neste sentido, diversos estudos têm demonstrado atividade inibitória, frente à micobactérias, de extratos e substâncias isoladas de plantas com resultados promissores, especialmente devido a compostos como flavonóides (quercitina e quercitrina) e ácidos fenólicos (ácido gálico e ácido caféico) (BOLIGON et al., 2011, TEKWU et al., 2012; RAMOS et al., 2008; CHEN et al., 2010; ELDEEN e STADEN, 2007).

#### 3.4.5.2 Biofilme

Os biofilmes são o resultado de um ecossistema microbiológico aderido a uma superfície, formado por populações desenvolvidas a partir de uma única ou de múltiplas espécies, sendo assim, essas estruturas podem ser constituídas por bactérias, fungos e/ou protozoários. A partir da associação entre os microrganismos, ocorre a formação de uma matriz de polímeros orgânicos (KASNOWSKI et al., 2010)

Estima-se que 70% dos microrganismos que causam infecções hospitalares no Brasil são resistentes, pelo menos, a um antimicrobiano e grande parcela de todas as infecções microbianas em humanos estão relacionadas a biofilmes, segundo o Ministério da Saúde (VASCONCELLOS, 2009; MARCINKIEWICZ, 2013).

Bactérias e fungos na forma de biofilmes apresentam-se mais resistentes aos fármacos antimicrobianos e desinfetantes, dificultando ainda mais o tratamento das infecções. Quando os microrganismos estão aderidos a superfícies em forma de biofilmes, a quantidade para se formar um inóculo é 100 vezes menor e a CIM para microrganismos em biofilme podem ser de até 1000 vezes maior do que quando se apresentam na forma planctônica (DAVIES et al., 1998; DONLAN, 2001).

O difícil tratamento das infecções relacionadas com a formação do biofilme pode ser explicado devido a mecanismos de resistência física que este provoca, pois as substâncias poliméricas que o constituem, retardam a difusão dos antimicrobianos e desinfetantes, impedindo a penetração destes nas camadas mais profundas (STEWART e COSTERTON, 2001). Além disso, as células bacterianas estão em contato na vida em biofilme, o que facilita a troca de informações genéticas e, podendo se diferenciar em fenótipos mais resistentes e/ou a depleção de nutrientes ou acúmulo de resíduos poderia antagonizar os efeitos dos

antimicrobianos (KALIA, 2013). Diante disso, torna-se necessária a pesquisa de novos agentes de espécies vegetais efetivos contra os biofilmes, já que são estruturas complexas e geram alta resistência a antimicrobianos.

### 3.4.6 Atividade antiparasitária

Equinococose, também conhecida por Hidatidose, é uma infecção zoonótica comum aos animais e ao homem, causada por um metacestóide pertencendo ao gênero *Echinococcus* e família Taeniidae. Esta parasitose tem uma distribuição mundial e exerce vários danos à saúde pública além de perdas na indústria de carnes. Sua alta prevalência em humanos e hospedeiros animais é encontrada em países de clima temperado, principalmente na Eurásia, Austrália, América e no leste e norte da África (GROSSO et al., 2012).

No Brasil, a maioria dos casos de equinococose cística (EC) é originada no Rio Grande do Sul (RS), onde os primeiros casos foram conhecidos no início do século XX (DE LA RUE, 2006). No RS a equinococose cística é um importante problema de saúde pública, mais especificamente nas áreas que fazem fronteira com Uruguai e Argentina. Estas regiões possuem uma economia rural baseada na criação extensiva de bovinos e ovinos os quais tem um intenso contato com cães (MARAVILLA et al., 2004; HAAG et al., 2004; DE LA RUE et al., 2006; DE LA RUE et al., 2011).

O ciclo de vida do *E. granulosus* sensu lato compreende dois hospedeiros distintos o definitivo (canídeos) onde ocorre o desenvolvimento do parasito adulto e o intermediário (principalmente ovino, bovino e suíno) onde manifesta-se a fase larvária do parasito (cisto hidático) (ECKERT, et al., 2001, THOMPSON, 2006; MONTEIRO, 2014). Os cães liberam os ovos do *Echinococcus* spp., juntamente com as fezes que contaminam a alimentação e água dos hospedeiros intermediários (HI) e humanos, considerados hospedeiros acidentais, desenvolvendo o cisto hidático. O ciclo se completa quando o cisto hidático contendo milhares dos protoescóleces é ingerido pelo hospedeiro definitivo (HD) tornando-se parasitos adultos no seu intestino.

Devido ao lento crescimento do cisto hidático no organismo o diagnóstico desta parasitose torna-se difícil, já que a sintomatologia apresenta-se inespecífica (MORO et al., 2009; OIE, 2011; BALBINOTTI et al., 2012). O tratamento de escolha para EC em humanos é o procedimento cirúrgico, com a retirada total do cisto hidático do organismo. Outro método também utilizado para EC é o PAIR (punção/aspiração/introdução/reaspiração), onde ocorre a inativação do cisto hidático, sem sua completa retirada. O tratamento medicamentoso geralmente é associado com outros métodos de tratamento, a fim de evitar recidivas da doença (SILVA et al. 2001; BRUNETTI et al. 2010).

A utilização de plantas medicinais como terapias alternativas no controle de parasitoses vem crescendo nos últimos anos (MACHADO et al., 2010; MOAZENI et al.,

2012; GRESSLER, 2014). Os óleos e extratos de plantas e/ou seus componentes ativos estão frequentemente relatados na utilização como antibacterianos, antifúngicos, antivirais e antiparasitários (HAJHASHEMI et al., 2003; SILVA et al., 2003; PERRY et al., 2003; SAGAVE, 2014; SOUZA, 2014).

#### **4 APRESENTAÇÃO**

A tese, no seu todo, foi elaborada com introdução, objetivos, revisão de literatura, considerações finais (na qual estão inseridas as principais conclusões de toda a pesquisa), conclusão e as referências bibliográficas correspondentes a estes itens as quais constam no final deste trabalho.

Os materiais e métodos, resultados e discussão deste estudo apresentam-se na forma de artigos e manuscritos, que estão formatados de acordo com as normas dos periódicos os quais estão publicados, aceitos, submetidos ou por submissão, constituindo os capítulos 1 ao 4.

Na seção Apêndice, é apresentado o questionário elaborado para o estudo etnofarmacológico deste trabalho e no Anexo, a carta de aceite do manuscrito do capítulo 2 e as cartas de aprovação do comitê de ética.

## 5 PUBLICAÇÕES CIENTÍFICAS

### 5.1 CAPÍTULO 1 - ETHNOPHARMACOLOGICAL STUDY AND TOPICAL ANTIINFLAMMATORY ACTIVITY OF CRUDE EXTRACT FROM POIKILACANTHUS GLANDULOSUS (NEES) ARIZA LEAVES

Thiele Faccim de Brum, Camila Camponogara, Roberta da Silva Jesus, Bianca Vargas Belke, Mariana Piana, Aline Augusti Boligon, Fernanda Brum Pires, Sara Marchesan Oliveira, Marcelo Barcellos da Rosa and Liliane de Freitas Bauermann. Ethnopharmacological study and topical antiinflammatory activity of crude extract from *Poikilacanthus glandulosus* (Nees) Ariza leaves. **Journal of Ethnopharmacology**. n. 193, p. 60–67, 2016.

Artigo publicado no periódico: **Journal of Ethnopharmacology**



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Ethnopharmacology

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/jep](http://www.elsevier.com/locate/jep)

## Ethnopharmacological study and topical anti-inflammatory activity of crude extract from *Poikilacanthus glandulosus* (Nees) Ariza leaves



Thiele Faccim de Brum<sup>a,\*</sup>, Camila Camponogara<sup>b</sup>, Roberta da Silva Jesus<sup>a</sup>, Bianca Vargas Belke<sup>a</sup>, Mariana Piana<sup>a</sup>, Aline Augusti Boligon<sup>a</sup>, Fernanda Brum Pires<sup>a</sup>, Sara Marchesan Oliveira<sup>b</sup>, Marcelo Barcellos da Rosa<sup>a</sup>, Liliane de Freitas Bauermann<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Graduate Program in Pharmaceutical Sciences, Federal University of Santa Maria, Camobi Campus, Santa Maria, RS 97105-900, Brazil

<sup>b</sup> Graduate Program in Biological Sciences, Toxicological Biochemistry, Federal University of Santa Maria, Camobi Campus, Santa Maria, RS 97105-900, Brazil

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 30 April 2016  
Received in revised form  
26 July 2016  
Accepted 29 July 2016  
Available online 30 July 2016

#### Keywords:

Acanthaceae  
Gaiana  
Traditional knowledge  
Secondary metabolites  
Anti-inflammatory activity

### ABSTRACT

**Ethnopharmacological relevance:** Ethnopharmacological studies are important tools as records and documentation of the empirical uses of medicinal plants in traditional communities with the purpose of generating useful knowledge to lead to the development of new medicines, biodiversity conservation and enhancement of knowledge and local culture. *Poikilacanthus glandulosus* is widely used by the population of City of Santiago, in Brazil, nevertheless, it does not have any validation regarding its use and its medicinal effects.

**Aim:** The objective of this study was to perform one ethnopharmacological survey about *P. glandulosus* in the City of Santiago and determine the anti-inflammatory activity in order to prove its uses in popular medicine.

**Methods:** Personal and ethnopharmacological data were collected through a prepared questionnaire. The phytochemical analysis was performed observing the individual methodology for each reaction and by HPLC-UV. The antiedematogenic and anti-inflammatory (cell infiltration and histological procedure) activities of the *P. glandulosus* (0.01–1000 µg/ear) were evaluated in the ear edema model induced by topical application of croton oil.

**Results:** *P. glandulosus* is known in City of Santiago as "Gaiana" and its macerated leaves and branches are prepared with alcohol or sugarcane liquor especially for insect bites, cicatrization and inflammation. HPLC analysis revealed the presence of maslinic acid ( $2.024 \pm 0.10$  mg/g), uvaol ( $0.124 \pm 0.02$  mg/g) and sitosterol ( $0.502 \pm 0.05$  mg/g). The topical application of crude extract of *P. glandulosus* reduced in a dose-dependent manner the croton oil-induced ear edema and myeloperoxidase activity (neutrophils infiltration marker) with maximum inhibition of  $87 \pm 2\%$  and  $64 \pm 12\%$ , respectively at 1000 µg/ear. Dexamethasone (100 µg/ear), used as a positive control, inhibited croton oil-induced ear edema in  $89 \pm 3\%$  and decreased myeloperoxidase activity in  $50 \pm 3\%$ . Both *P. glandulosus* as dexamethasone reduced cell infiltration when evaluated by histological procedure.

**Conclusion:** This work allowed us to understand the specie *P. glandulosus* through ethnopharmacological study and it showed that the crude extract presented antiedematogenic and anti-inflammatory actions, proving their traditional use as anti-inflammatory.

© 2016 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

### 1. Introduction

Plants are important sources of therapeutic drugs and play a significant role in the survival of the tribal and ethnic communities (Rajakumar and Shivanna, 2009). Indigenous knowledge of plant species is the result of human interaction and selection of the most desirable, powerful and successful plant species found in the

instantaneous environment at a specific time period (Venkataswamy et al., 2010; Lulekal et al., 2013).

According Cotton (1996), the tribal healers usually administer decoction, pills, or paste of medicinal plants or plant parts as full or partial treatment of ailments. In fact, it has further been explained that the discovery of modern medicine was possible on the basis of the use of plants by traditional knowledge. Adequate documentation of healing practices by traditional healers of ethnic groups is a necessity, for such knowledge can become an important source for the discovery of newer drugs (Rahmatullah, et al., 2010).

\* Corresponding author.

E-mail address: [thichaim@gmail.com](mailto:thichaim@gmail.com) (T.F. de Brum).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2016.07.075>

0378-8741/© 2016 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.



In this regard, ethnopharmaceutical research involves the study of the identification and the classification of the natural material from which the remedies are produced, their preparation and the effects on humans and animals. Are search focused on ethnobotany of rural communities isolated from the main developed city centers allows to discover traces of traditional knowledge regarding the use of local plants as medicine (Menale and Muoio, 2014).

The knowledge of medicinal plants often represents the only therapeutic option for many communities and ethnic groups. The traditional medicine in poor countries is the most accessible practice and, in certain situations, the only treatment available (Revene et al., 2008).

The discovery and disclosure of medicinal flora properties, through the knowledge of traditional populations, is, therefore, an important tool in preserving the cultural richness of different regions (Oliveira et al., 2011).

The plants offer immense scope for researchers engaged in validation of traditional claims for the development of novel drugs (Schmidt et al., 2009). Since interest in traditional medicine has been increasing world over, ethnobotanical studies have gained prominence to explore the traditional knowledge particularly in developing countries (Joshi and Joshi, 2000).

In Brazil, the use of herbs for medicinal purposes is a widespread practice, enhanced by cultural differences, deriving from colonisation by the European and African populations, in addition to traditional indigenous knowledge (Gomes et al., 2008).

Among the plants of interest in Brazilian medicinal flora, it can be cited *Poikilanthus glandulosus*, which belongs to the Acanthaceae family and is widely used in traditional medicine for various diseases and symptomatology in the region of the City of Santiago in the State of Rio Grande do Sul, Brazil. However, this plant does not have any validation regarding its use, and especially for its medicinal effects and toxicity. The growing interest and need of research on medicinal plants, especially those species not yet studied, and the requirement to develop new agents in the treatment of several diseases, led to this work so that there is a greater understanding around this species, particularly to prove its medicinal effects about inflammatory skin processes.

## 2. Material and methods

### 2.1. Ethnopharmacological study

The field data have been collected from April to November 2015, with forty volunteers in the City of Santiago, who have used *P. glandulosus* for medicinal purposes. The choice of venue is due to the use of the species being studied for medicinal purposes by the population and the fact that it is found in the woods and backyards of the homes of some residents.

We interviewed forty informants of both sexes, at least 20 years old, chosen for a previous survey. Personal and ethnopharmacological data were collected during structured interviews and informal conversations as described by Etkin (1993) and Alexiades (1996), in order to get the highest number of information about the popular use of *P. glandulosus*. The interview was conducted through a prepared questionnaire divided into two parts (Table 1), the first of which contains information about the personal data of the interviewees (age, sex, level of education). The second part refers to ethnopharmacological data of the species under study (collection site, period of collection, cultivation, source of knowledge, way of preparation, parts used, popular name, form of use, therapeutic indication, results obtained, reason for use, conservation, solvent maceration, side effects and single plant or associated), to the main illnesses and/or symptoms. The identification

**Table 1**  
Description of variables of the questionnaire.

Personal data	Answer options
Age	( ) 0–20, ( ) 21–30, ( ) 31–40 ( ) 41–50, ( ) 51–60 ( ) > 60
Sex	( ) female, ( ) male
Instruction degree	( ) literate, ( ) illiterate, ( ) complete primary education, ( ) incomplete primary education, ( ) finished high school, ( ) incomplete high school, ( ) higher education, ( ) postgraduate
Ethnopharmacological data	Answer options
Collection site	( ) in the backyard, ( ) thicket, ( ) unknown
Period of collection	( ) summer, ( ) autumn, ( ) winter, ( ) spring, ( ) indifferent
Cultivate	( ) yes, ( ) no
Source of knowledge	( ) family, ( ) health professionals, ( ) known
Way of preparation	( ) fresh, ( ) after drying ( ) infusion, ( ) maceration
Used parts	( ) leaf, ( ) branches, ( ) root, ( ) flowers, ( ) all parts, ( ) leaf and branch, ( ) leaf, branch and root, ( ) leaf and flower
Popular name	( ) gaiana, ( ) other
Form of use	( ) external use, ( ) orally, other ( )
Results obtained	( ) satisfactory, regular, ( ) no effect
Reason for use	( ) cheaper, ( ) It does not harm health, ( ) good result
Conservation	( ) dried plant, ( ) fresh plant, ( ) macerated
Solvent maceration	( ) alcohol, ( ) cachaça, ( ) alcohol/cachaça
Side effects	( ) yes, ( ) no
Single plant or associated	( ) yes, ( ) no

of this plant was confirmed by comparison to the specimen stored in the herbarium of the Federal University of Santa Maria (RS, Brazil).

### 2.2. Plant collection

The leaves of *P. glandulosus* were collected in the City of Santiago, State of Rio Grande do Sul, Brazil, in May of 2013, (coordinates 29°11'31"S and 54°52'1"W). A voucher specimen is preserved in the herbarium of the Department of Biology at Federal University of Santa Maria by register numbers SMBD 12.442 and 13.178.

### 2.3. Plant extraction

Plant material was dried at room temperature and powdered in a knife mill. The leaves (1.217 kg) were macerated at room temperature with 70% ethanol for a week with daily shaking; the solvent was renewed several times. After filtration, the hydro-alcoholic extract (HE) was evaporated under reduced pressure at a temperature below 40 °C, in order to obtain the aqueous extract (AE); part of this AE was evaporated to dryness on a rotary evaporator furnish a crude extract (CE).

### 2.4. Qualitative analysis of compounds

The phytochemical analysis was performed according to specialized literature (Moreira, 1979; Matos, 2009), observing the individual methodology for each reaction and verifying the possible presence of the chemical groups of secondary metabolism in the plant drug.

### 2.5. Quantitative analysis of non-polar compounds by HPLC

For identification and quantification of the non-polar compounds was using the method of Schmidt (2016), which uses reverse phase chromatography with ultraviolet detection (UV-vis). The chromatographic system Dionex used has pump P680 model,

UVD- 170 detector and manual injection with handle of 100  $\mu\text{L}$ . The chromatographic separation was carried out with a C18 Kinetex –250 mm  $\times$  4,6 mm (Phenomenex), packed with 5  $\mu\text{m}$  diameter particles, with precolumn of the same nature. The isocratic elution was conducted using mobile phase consists of Acetonitrile (ACN) and Tetrahydrofuran (THF) in the proportion of 90:10. Chromatographic operations were carried out at ambient temperature and in triplicate. The flow used was 0.5 mL  $\text{min}^{-1}$  and the peaks were detected at 210 nm.

## 2.6. Anti-inflammatory activity

### 2.6.1. Animals

Male Swiss mice (25–30 g) were kept in a temperature-controlled room ( $22 \pm 2^\circ\text{C}$ ) under a 12 h light-dark cycle. Animals were acclimatized to the laboratory for at least 1 h before the experiments and were used only once. All of the experiments were carried out between 8:00a.m. and 5:00p.m. The data reported in this study were carried out in accordance with current ethical guidelines for the investigation of experimental pain in conscious animals (Zimmermann, 1983) and were approved by the Ethics Committee of the Federal University of Santa Maria (process 5786050215/2015). The number of animals and the amount of irritant agent were the minimum necessary to demonstrate the consistent effects of the drug treatments.

### 2.6.2. Treatments

The irritant agent croton oil (1000  $\mu\text{g}/\text{ear}$ ), dexamethasone (100  $\mu\text{g}/\text{ear}$ ; used as a positive control) and the CE of *P. glandulosus* (0.01–1000  $\mu\text{g}/\text{ear}$ ) were all applied topically on the right ear of each mouse.

### 2.6.3. Ear edema measurements

Skin dermatitis was induced by croton oil and the inflammatory response was evaluated through edema formation and leukocyte infiltration. The edema was assessed by the increase in ear thickness of mice upon inflammatory challenge with croton oil. Ear thickness was measured before and after induction of the inflammatory response using a digital micrometer (Digimess) in animals anesthetized with isoflurane (Silva et al., 2011; Piana et al., 2016). The micrometer was applied near the tip of the ear just distal to the cartilaginous ridges. The thickness was expressed in  $\mu\text{m}$ . To minimize variation, a single investigator performed the measurements throughout each experiment. The acetone was used as vehicle group. The irritant agent, positive control and the CE of *P. glandulosus* were dissolved and applied topically in a constant volume of 20  $\mu\text{L}$  of acetone to the right ear of each animal.

### 2.6.4. Croton oil-induced ear edema

Acute inflammation model was induced by a single topical application of croton oil at a concentration of 1000  $\mu\text{g}/\text{ear}$  in the right ear of the mice according to Piana et al. (2016). The CE (0.01–1000  $\mu\text{g}/\text{ear}$ ) or dexamethasone (100  $\mu\text{g}/\text{ear}$ ), used as positive control, was applied topically before the croton oil treatment. Ear thickness was measured prior to and 6 h after the induction of inflammation (Piana et al., 2016). Six hours after the application of croton oil, the animals were sacrificed and ear samples (circles of tissue 6 mm in diameter) were collected for further analysis.

### 2.6.5. Myeloperoxidase activity (MPO) assay

MPO is an enzyme found in cells of myeloid origin and has been used as a biochemical marker of granulocyte (mainly neutrophil) infiltration to the tissue. MPO activity was determined using an assay described previously (Silva et al., 2011; Oliveira et al., 2014), with some modifications. Six hours after applying the croton oil,

the MPO enzyme activity was assessed in the ear samples. Tissue samples were homogenized with a motor-driven homogenizer in acetate buffer (8 mM, pH 5.4) containing HTAB. The assay was carried out as previously described (Silva et al., 2011; Oliveira et al., 2014) and the results were expressed as optical density (OD)/mL of the sample.

### 2.6.6. Histological assessment of skin tissue

To verify histological changes in the mouse ear after croton oil or croton oil plus treatments, ear samples were collected six hours after the induction of inflammation. Mice were euthanized and ear tissue was removed and fixed in alcian solution (a 16:2:1 mixture of ethanol 80%, formaldehyde 40% and acetic acid). Each sample was embedded in paraffin wax, sectioned at 5  $\mu\text{m}$  and stained with hematoxylin-eosin. A representative area was selected for qualitative light microscopic analysis of the inflammatory cellular response with a 20 $\times$  objective lens (Oliveira et al., 2014). To minimize a source of bias, the investigator analyzed the specimens blindly.

## 2.7. Statistical analysis

A descriptive statistical analysis was performed on the response variables of the questionnaire (JMP (v.12)). The results are presented as mean  $\pm$  SEM with exception of the  $\text{ID}_{50}$  values (dose required a reduction of the responses of the treated groups by 50% in relation to the control group), which are reported as geometric means plus their respective 95% confidence limits. The maximum effect ( $E_{\text{max}}$ ) was calculated based on the response of the control groups. The statistical significance between the groups was assessed by one-way analysis of variance (ANOVA) followed by a post hoc Newman-Keuls test (GraphPad Prisma 5.0 software). The accepted level of significance for the test was  $P < 0.05$ .

## 3. Results

### 3.1. Ethnopharmacological study

In the present study, forty informants of the City of Santiago participated in the survey. Among them, 65.0% were female and 35.0% male, prevailing age of 60 years old or older (38.0%) and higher education (35.0%), as level of education.

Of the informants, 65.0% collect *P. glandulosus* in the backyard and 18.0% get the scrubland and the same percentage do not know where the gathering was performed. Furthermore, 53.0% cultivate species in their homes and most of the interviewees do not care about the season of collection (93.0%). The form of transmission of knowledge on the use of *P. glandulosus* predominant was the information by family members, with percentage of 83.0%. According to users, the use of the species for therapeutic purposes can be prepared only in the form of maceration, various parts of the plant can be employed for medical use. The most used are: leaves and branches prepared together (65.0%), followed by the use of the leaf alone and all plant parts, both with 13.0%, leaf, branch and root (8%) and leaf and flower (3%). Regarding the popular name of the species, all informants have reported that they know it only as "Gaiana". As for the form of administration, two types of use were reported only: external (98.0%) and oral (2.0%).

Through the information obtained by the interviewees, it was possible to verify a high number of therapeutic indications. The larger percentages are shown in Fig. 1, insect bite (67.5%), cicatrization (50.0%) and inflammation (27.5%). Furthermore, in a lower percentage, were also reported for the use of "Gaiana" for fever, spider bite, contusion, phlebitis, nail fungus, spine, burn, and as a repellent and disinfectant. No adverse effects have been

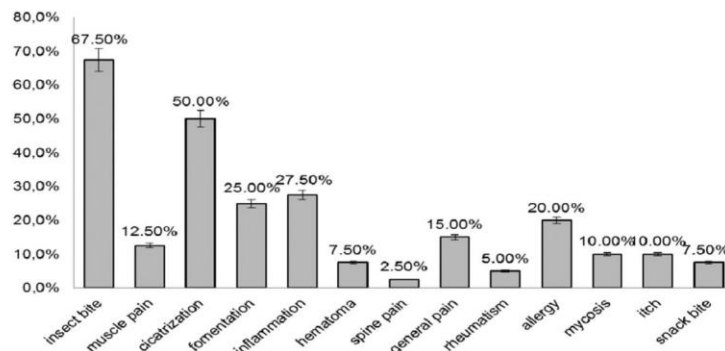


Fig. 1. Main medicinal uses of "Gaiana" by the population of the City of Santiago.

reported by users of the plant macerated.

Considering the medicinal effects generated by *P. glandulosus*, satisfactory results were evidenced for all users, being the main reason for the use the good results achieved (88.0%), 8.0% report that it does not do any harm and 5.0% consider the use to be cheap. The maceration is the most used form of conservation (95.0%) and 5% preserve the dried plant, and the sugarcane liquor is the most widely used solvent (40.0%), followed by alcohol (35.0%). In relation to using the plant *P. glandulosus* alone or in combination with other medicinal plants or drugs, 95.0% reported that use it alone and 5% use interspersing the macerate of "Gaiana" with other medication.

### 3.2. Phytochemical analysis

In the present study, it was possible to verify the presence of main secondary metabolites, such as: coumarins, phenols, cardio-tonic glycosides, triterpenes and steroids, and organic acids. HPLC analysis revealed the presence of two triterpenes in crude extract of *P. glandulosus*: maslinic acid ( $2.024 \pm 0.10$  mg/g) and uvaol ( $0.124 \pm 0.02$  mg/g) and a phytosterol: sitosterol ( $0.502 \pm 0.05$  mg/g). The chromatogram of the compounds are shown in Fig. 2.

### 3.3. Crude extract of *P. glandulosus* on croton-oil induced cutaneous inflammation

We assessed the antiedematogenic and anti-inflammatory activity of the CE of *P. glandulosus* in an acute contact dermatitis model induced by croton oil. A single topical application of croton oil to the right ear increased ear thickness with an  $E_{max}$  of  $130 \pm 9 \mu\text{m}$  when evaluated at 6 h after croton oil application, while topical application of the vehicle (acetone) alone did not change ear thickness (Fig. 3A). This parameter is indicative of a number of processes that occur during skin inflammation, including increased vascular permeability, edema and swelling within the dermis (De Vry et al., 2005).

Upon application of the CE of *P. glandulosus* croton oil-induced ear edema and cellular migration in mice were both reduced effectively. The topically applied crude extract (0.01–1000  $\mu\text{g}/\text{ear}$ ) resulted in a dose-dependent inhibition of croton oil-induced ear edema, with an  $ID_{50}$  value of 0.09 (0.02–0.38)  $\mu\text{g}/\text{ear}$  and a maximum inhibition of  $87 \pm 2\%$  (at 1000  $\mu\text{g}/\text{ear}$ ). Dexamethasone, used as positive control, inhibited croton oil-induced ear edema in  $89 \pm 3\%$  (Fig. 3A).

MPO is a marker of polymorphonuclear leukocytes, especially neutrophil infiltration, which is indicative of an inflammatory

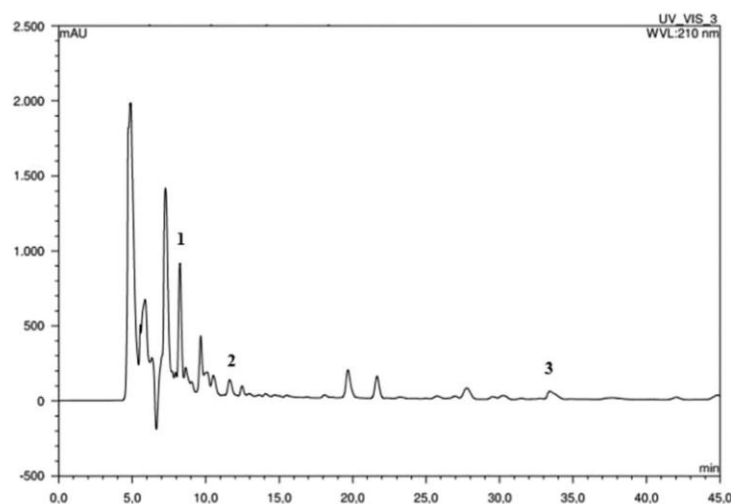
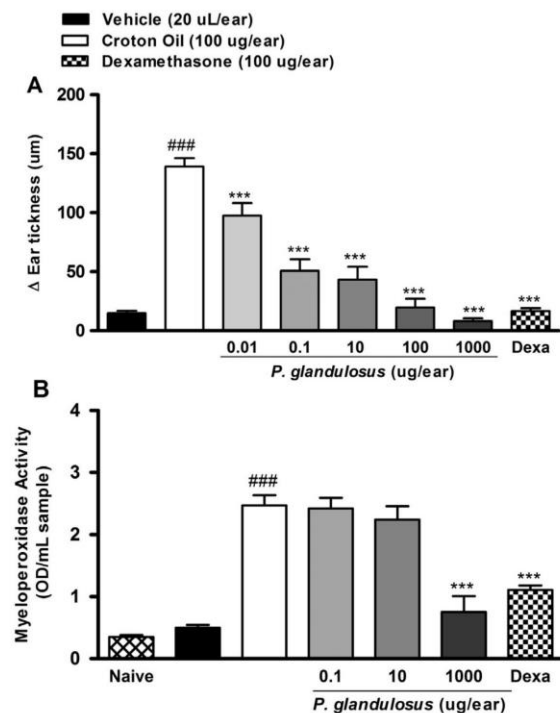


Fig. 2. HPLC compounds of crude extract of *P. glandulosus* leaves. (1) maslinic acid, (2) uvaol and (3) sitosterol.



**Fig. 3.** Effect of the crude extract (0.01–1000  $\mu\text{g}/\text{ear}$ ) from *P. glandulosus* or dexamethasone (Dexa; 100  $\mu\text{g}/\text{ear}$ ) administered topically on croton oil-induced ear edema (A) and Myeloperoxidase (MPO) enzyme activity (OD/mL sample) (B). Each bar represent the mean  $\pm$  S.E.M (n=6); ###p < 0.05 when compared with the vehicle (A) and naïve (B) groups. \*\*\*p < 0.05 when compared with the croton oil group (one-way ANOVA followed by post hoc Newman-Keuls).

reaction. In order to verify the effects of the extract on croton oil-induced neutrophil infiltration, MPO activity was assessed. Croton oil caused an increase in MPO activity when compared with the naïve group, and the application of CE of *P. glandulosus* inhibited the MPO activity with a maximum inhibition of  $64 \pm 12\%$  (1000  $\mu\text{g}/\text{ear}$ ), while dexamethasone decreased MPO activity in  $50 \pm 3\%$  (Fig. 3B).

Once we observed an increase in the leukocyte infiltration by the measurement of the MPO (marker for neutrophil) enzyme activity, we carried out histological analysis to confirm the cell infiltration. Histological sections of the mice ears submitted to single topical application of croton oil (Fig. 4A) revealed the presence edematous ears characterized by an intense increment of thickness, especially at the dermis and expressive cell migration (polymorphonuclear leukocytes) when compared to naïve or vehicle group. The topical application of *P. glandulosus* (1000  $\mu\text{g}/\text{ear}$ ) (Fig. 4A) and the positive control, dexamethasone (100  $\mu\text{g}/\text{ear}$ ) (Fig. 4A), decreased ear thickness and inflammatory cells infiltration in comparison to the croton oil group. Moreover, the presence of inflammatory cells was evaluated quantitatively, and demonstrated that the results are in accordance with demonstrative figures (Fig. 4B).

#### 4. Discussion

In this study, most of the interviewees were female. Similar results were presented in other studies by De Oliveira et al. (2010),

Albertasse et al. (2010) and Siew et al. (2014). Women hold more knowledge on medicinal plants and have an important function in the transmission process (Rodrigues and Casali, 2002). According to Müller-Schwarze (2006), who studied differentiations of the knowledge between women and men in daily activities, it was verified that the women were responsible for the culture and the preparation of the medicinal plants, as well as for the food preparation and care of the family, children and others.

In relation to the age of the participants, the prevalence of older individuals demonstrated that knowledge about *P. glandulosus* is passed from generation to generation. The main way of knowledge transmission in traditional societies is verbal, and the transmission between generations requires intense contact between younger and older members of the society (Amorozo, 1996). The fact that the majority of the interviewees have completed higher education, leads us to believe that the use of medicinal plants no longer happens only in the lower classes.

According to the interviewees, most of them cultivate and collect the plant in the backyard of their home and do not care about the time of collection. This is due to the fact that the plant is easily available and accessible. It is noticed that the domestic cultivation assists in the preservation and transmission of knowledge related to medicinal plants.

As for the means to obtain information and the consequent use of *P. glandulosus* for medicinal purposes, family was the most prevalent, showing the strong influence of these people in the transmission of knowledge, which remains being transmitted from generation to generation.

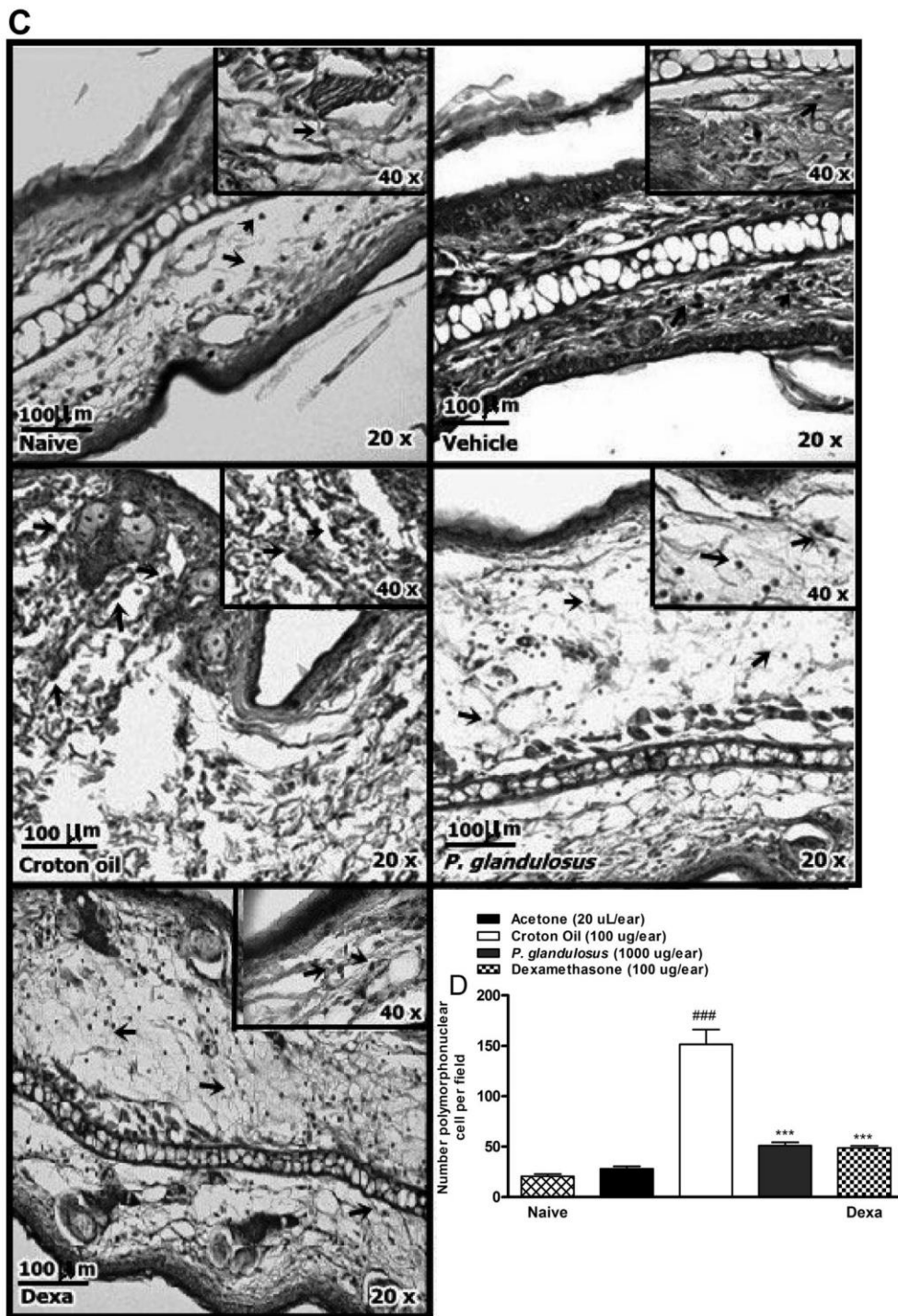
The only way to prepare *P. glandulosus* for use reported by respondents was the maceration in alcohol or sugarcane liquor, being leaves and branches together the parts most used by respondents. The probable explanation for the greater use of these parts is that the harvest is easier and they are available all year, since the removal of the leaves does not cause damage to the plant (Castellucci et al., 2000). It is important to have knowledge of the vegetal part employed, because the active principles are distributed in different parts of the plant distinctly, being possible to find pharmacological and toxic substances in some parts (Calábria et al., 2008).

According to Lorenzi and Matos (2002), one of the most delicate aspects in herbal medicine concerns the identity of the plants. Being strongly based in popular names, the true identity of a plant recommended can vary considerably from region to region. Some plants accumulate a large number of popular names within the same species, this does not occur with *P. glandulosus* in the region of the City of Santiago, where it is known only as "Gaiana".

The external use was the most used administration, reflecting the form of preparation most frequently cited, maceration in alcohol or sugarcane liquor, being these the predominant form of conservation and, also, because of the therapeutic indications, which consisted mainly of skin diseases. Oral administration is the dominating mode for all herbal preparations, but topical administration also accounts for a considerable proportion of application (Mood, 2008; Brandao et al., 2012; Sadeghi et al., 2014). The medicinal effects of *P. glandulosus* reported in this study are related to skin diseases, such as cicatrization, inflammation, hematoma, insect bites, among others, and no undesirable effect was reported.

It is believed that the major reasons for the use of medicinal plants by the population are the fact that they present more affordable prices and the belief that they result in less side effects than allopathic drugs (Parasuraman et al., 2014). The reason pointed for the use of *P. glandulosus* is the good results obtained by the same, followed by the fact of the informants believing that its use does not cause any harm.

When one intends to work with plants, the first step to be performed is the identification of the species, followed by a



**Fig. 4.** Effect of the crude extract of *P. glandulosus* and dexamethasone (Dexa) administered topically on histopathological changes (haematoxylin-eosin 20x) in skin of croton oil treated mice (A) and on number polymorphonuclear cells per field (B). Each bar represent the mean  $\pm$  S.E.M (n=6); ###P < 0.05 when compared with the vehicle (A) and naive (B) groups. \*\*\*P < 0.05 when compared with the croton oil group (one-way ANOVA followed by post hoc Newman-Keuls).

preliminary phytochemical research to know the main groups of secondary metabolites present in it (Matos, 2009). The secondary metabolites found in this study beckon to various biological activities, phenols are antioxidants, anti-inflammatory, antibacterial, antiviral, among others, the coumarins have anticoagulant action, immunosuppressive, relaxing vascular, hypolipidemic, hypotensive and antioxidant (Martín-Aragon et al., 1996), triterpenes and steroids are marked by their anti-inflammatory, analgesic, cardiovascular and anti-tumor effects (Patočka, 2003; Ikeda et al., 2008). Based on empirical knowledge about the medicinal effects of *P. glandulosus*, associated with inflammatory skin diseases, it was demonstrated in this work, for the first time, the anti-inflammatory action of the CE of *P. glandulosus* leaves in an inflammatory skin model. This activity corroborates its popular uses reported in this work. The use of aerial parts and leaves is safe for sustainability of plant communities, so this work was performed with crude extract obtained from the leaves, due to the ease of access to this part of the plant.

The direct topical administration in the area of inflammation allows a higher response of the compounds responsible for the anti-inflammatory activity, since a dermal absorption is more adequate to reach specific areas of skin and obtaining better pharmacological effects (Gábor, 2000). The crude extract of *P. glandulosus* applied topically reduces the ear edema of mice and the MPO activity. The effectiveness of the crude extract of *P. glandulosus* leaves suggests that the phytochemicals compounds present can be inhibiting the edema formation cell inflammatory infiltration. In the work realized by Locklear et al., (2010), suggests that coumarin exerts its anti-inflammatory effects through the inhibition of the activity of the COX-2 enzyme. Phenolic compounds have a strong anti-inflammatory effect when applied locally at the site of inflammation, their effect on leukocyte migration to the inflamed site (Fernandez et al., 1998).

The anti-inflammatory action is a common property of many triterpenes (Herrera et al., 2006). Some triterpenes have anti-inflammatory effect by reducing both the edema and cell infiltration (Ríos, 2010) and abolish of skin prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) levels by mechanisms involving the suppression of cyclooxygenase (COX)-2 expression, via inhibition of protein kinases (Medeiros et al., 2007). Furthermore, the anti-inflammatory effects of pentacyclic triterpenoids, such as maslinic acid and uvaol found in this study, are largely ascribed to their ability to inhibit molecular targets such as 5-lipoxygenase (LOX), inducible nitric oxide synthase (iNOS) and nuclear factor-kappa B (NF-κB) activities (Yap and Lim, 2015). The oral and topical administration of triterpenes as uvaol, is significantly effective in edemas induced by TPA or carrageen (Recio, 1995). In a study performed by Nirmal et al. (2012), the sitosterol showed comparable anti-inflammatory activity with standard drug ibuprofen, in the carrageenan-induced rat paw edema method.

These results suggest that the inhibitory mechanism of the crude extract of *P. glandulosus* on chemotaxis involves the inhibition of chemotactic mediators released by activation of phospholipase A<sub>2</sub> in the inflamed area, especially by presence of this compounds founded in these specie that can be responsible in part by anti-inflammatory activity.

## 5. Conclusions

In this study, the ethnopharmacological survey of *P. glandulosus* was performed through a questionnaire applied in the municipality of the City of Santiago, where it is widely used by the population. Furthermore, it was demonstrated that the crude extract of the *P. glandulosus* leaves showed anti-edematogenic and anti-inflammatory activities in a contact dermatitis model croton oil-

induced, confirming the traditional use of this species as anti-inflammatory.

## Conflict of interest disclosure

The authors report no conflict of interest.

## Acknowledgments

The authors would like to thank Prof. Dra. Margareth Linde Athayde for orientation and support for this work be performed, Prof. Dr. Renato Aquino Záchia for providing the identification of *P. glandulosus*, those who participated in the questionnaire, Dra. Carolina Bremm for the statistical analysis of the questionnaire data. We also acknowledge fellowships from FAPERGS (Grant no. 3448-2551/11-3).

## References

- Albertasse, P.D., Thomaz, L.D., Andrade, M.A., 2010. Plantas medicinais e seus usos na comunidade da Barra do Jucu, Vila Velha, ES. Rev. Bras. Plantas Med. 12, 250–260.
- Alexiades, M.N. (Ed.), 1996. Selected Guidelines for Ethnobotanical Research: A Field Manual. The New York Botanical Garden, New York.
- Amorozo, M.C.M. 1996. A abordagem etnobotânica na pesquisa de plantas medicinais. In: Plantas Medicinais: Arte e Ciência. Um guia de estudo interdisciplinar. São Paulo: UNESP.
- Brandao, M.G.L., et al., 2012. Useful Brazilian plants listed in the field books of the French naturalist Auguste de Saint-Hilaire. J. Ethnopharmacol. 143, 488–500.
- Calábria, L., 2008. Levantamento etnobotânico e etnofarmacológico de plantas medicinais em Indianópolis, Minas Gerais, Brasil. Rev. Bras. Plantas Med. 10, 49–63.
- Castellucci, S., et al., 2000. Plantas medicinais relatadas pela comunidade residente na Estação Ecológica de Jataí, município de Luís Antônio – SP: uma abordagem etnobotânica. Rev. Bras. Plantas Med. 3, 51–60.
- Cotton, C.M. 1996. Ethnobotany: Principles and Applications. New York.
- De Oliveira, H.B., Kffuri, C.W., Casali, V.W.D., 2010. Ethnopharmacological study of medicinal plants used in Rosário da Limeira, Minas Gerais, Brazil. Braz. J. Pharm. 20, 256–260.
- De Vry, C.G., et al., 2005. Topical application of a novel immunomodulatory peptide, RDP58, reduces skin inflammation in the phorbol ester-induced dermatitis model. J. Investig. Dermatol. 125, 473–481.
- Etkin, N., 1993. Anthropological methods in ethnopharmacology. J. Ethnopharmacol. 38, 93–104.
- Fernandez, M.A., Saenz, M.T., Garcia, M.D., 1998. Anti-inflammatory Activity in Rats and Mice of Phenolic Acids Isolated from *Scrophularia frutescens*. J. Pharm. Pharmacol. 50, 1183–1186.
- Gábor, M., 2000. Mouse Ear Inflammation Models and Their Pharmacological Applications. Akadémiai Kiadó, Budapest.
- Gomes, H.H.S., et al., 2008. Plantas medicinais: sua utilização nos terreiros de umbanda e candoblé na zona leste de cidade de Campina Grande-Pb. BioFar 3, 110–129.
- Herrera, M.D., Rodríguez-Rodríguez, R., Ruiz-Gutiérrez, V., 2006. Functional properties of pentacyclic triterpenes contained in "Orujo" olive oil. Curr. Nutr. Food Sci. 2, 45–49.
- Ikeda, Y., Murakami, A., Ohigashi, H., 2008. Ursolic acid: an anti- and pro-inflammatory triterpenoid. Mol. Nutr. Food Res. 52, 26–42.
- Joshi, A.R., Joshi, K., 2000. Indigenous knowledge and uses of medicinal plants by local communities of the Kali Gandaki Watershed area, Nepal. J. Ethnopharmacol. 73, 175–183.
- Locklear, T.D., et al., 2010. Estrogenic and progestagenic effects of extracts of *Justicia pectoralis* Jacq., an herbal medicine from Costa Rica used for the treatment of menopause and PMS. Maturitas 66, 315–322.
- Lorenzi, H., Matos, F.J.A. 2002. Plantas Medicinais no Brasil. Nova Odessa/SP.
- Lulekal, E., Asfaw, Z., Kelbessa, E., Van Damme, P., 2013. Ethnomedicinal study of plants used for human ailments in Ankober District, North Shewa Zone, Amhara Region, Ethiopia. J. Ethnobiol. Ethnomed. 63, 1–13.
- Martín-Aragón, S., Benedí, J., Villar, A., 1996. Oxygen active species-scavenger properties of coumarins. Phytother. Res. 10, S75–S78.
- Matos, F.J.A. 2009. Introdução a fitoquímica experimental. 3 Ed. Fortaleza: Editora da Universidade federal do Ceará - UFC.
- Medeiros, R., et al., 2007. Mechanisms underlying the inhibitory actions of the pentacyclic triterpene α-amyrin in the mouse skin inflammation induced by phorbol ester 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate. Eur. J. Pharmacol. 559, 227–235.
- Menale, B., Muoio, R., 2014. Use of medicinal plants in the South-Eastern area of the

- Partenio Regional Park (Campania, Southern Italy). *J. Ethnopharmacol.* 153, 297–307.
- Mood, S.G., 2008. Contribution to some ethnobotanical aspects of Birjand flora (Iran). *Pak. J. Bot.* 40, 1783–1791.
- Moreira, E.A., 1979. Contribuição para o estudo fitoquímico de *Lobelia hassleri* A. ZAHLB e *Lobelia stellfeldii* R. BRAGA. *Companulaceae*. *Tribuna Farmac.* 47, 13–39.
- Müller-Schwarze, N.K., 2006. Antes and Hoy Día: plant knowledge and categorization as adaptations to life in Panama in the twenty-first century. *Econ. Bot.* 60, 321–334.
- Nirmal, S.A., Pal, S.C., Mandal, S.C., Patil, A.N., 2012. Analgesic and anti-inflammatory activity of  $\beta$ -sitosterol isolated from *Nyctanthes arbortristis* leaves. *Inflammopharmacology* 20, 219–224.
- Oliveira, A.K.M., et al., 2011. Ethnobotany and traditional medicine of the inhabitants of the Pantanal Negro sub-region and the raizeiros of Miranda and Aquidauna, Mato Grosso do Sul, Brazil. *Braz. J. Biol.* 71, 283–289.
- Oliveira, S.M., et al., 2014. Antinociceptive effect of 3-(4-fluorophenyl)-5-trifluoromethyl-1H-1-tosylpyrazole. A Celecoxib structural analog in models of pathological pain. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 124, 396–404.
- Parasuraman, S., Thing, G.S., Dhanaraj, S.A., 2014. Polyherbal formulation: concept of ayurveda. *Pharmacogn. Rev.* 8, 73–80.
- Patočka, J., 2003. Biologically active pentacyclic triterpenes and their current medicine signification. *J. Appl. Biomed.* 1, 7–12.
- Piana, M., et al., 2016. Topical anti-inflammatory activity of *Solanum corymbiflorum* leaves. *J. Ethnopharmacol.* 17, 16–21.
- Rahmatullah, M., et al., 2010. A Pharmacological and phytochemical evaluation of medicinal plants used by the Harbang Clan of the Tripura Tribal community of Mirsharai Area, Chittagong District, Bangladesh. *J. Altern. Complement. Med.* 7, 769–785.
- Rajakumar, N., Shivanna, M.B., 2009. Ethno-medicinal application of plants in the eastern region of Shimoga district, Karnataka, India. *J. Ethnopharmacol.* 126, 64–73.
- Recio, M.C., Giner, R.M., Máñez, S., Rios, J.L., 1995. Structural requirements for the anti-inflammatory activity of natural triterpenoids. *Planta Med.* 61, 182–185.
- Revene, Z., et al., 2008. From Sierra to Coast: tracing the supply of medicinal plants in Northern Peru – a plant collector's tale. *Ethnobot. Res. Appl.* 6, 15–22.
- Ríos, J., 2010. Effects of triterpenes on the immune system. *J. Ethnopharmacol.* 128, 1–14.
- Rodrigues, A.G., Casali, V.W.D., 2002. Plantas medicinais, conhecimento popular e etnociência. In: Rodrigues, A.G., Andrade, F.M.C., Coelho, F.M.G., et al. (Eds.), *Plantas Medicinais e Aromáticas: Etnoecologia e etnofarmacologia*. UFV, Viçosa, pp. 25–76.
- Sadeghi, Z., et al., 2014. Ethnopharmacological studies of indigenous medicinal plants of Saravan region, Baluchistan, Iran. *J. Ethnopharmacol.* 153, 111–118.
- Schmidt, M., 2016. Distribuição de compostos triterpênicos por HPLC-UV em espécies de *Cecropia* e *Bauhinia*. Dissertação de mestrado do PPGQ, Universidade Federal de Santa Maria, RS, pp. 75.
- Schmidt, C., et al., 2009. Biological studies on Brazilian plants used in wound healing. *J. Ethnopharmacol.* 122, 523–532.
- Siew, Yin-Yin, et al., 2014. Ethnobotanical survey of usage of fresh medicinal plants in Singapore. *J. Ethnopharmacol.* 155, 1450–1466.
- Silva, C.R., et al., 2011. The involvement of TRPA1 channel activation in the inflammatory response evoked by topical application of cinnamaldehyde to mice. *Life Sci.* 88, 1077–1087.
- Venkataswamy, R., et al., 2010. Ethnobotanical study of medicinal plants used by Malasar tribals in Coimbatore district of Tamil Nadu (South India). *Asian J. Exp. Biol. Sci.* 1, 387–392.
- Yap, W.H., Lim, Y.M., 2015. Mechanistic perspectives of maslinic acid in targeting inflammation. *Biochem. Res. Int.* 9.
- Zimmermann, M., 1983. Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. *Pain* 16, 109–110.

## 5.2 CAPÍTULO 2 - EFFECT OF POIKILACANTHUS GLANDULOSUS (NEES) ARIZA BRANCHES AND GALLIC ACID AGAINST VIABILITY OF ECHINOCOCCUS ORTLEPPI PROTOSCOLECES

Thiele Faccim de Brum, Roberta da Silva Jesus, Bianca Vargas Belke, Danieli Urach Monteiro, Natalia Jank Mossmann, Mariana Piana, Sílvio Terra Stefanello, Félix Alexandre Antunes Soares, Mário Luiz De La Rue and Liliane de Freitas Bauermann. Effect of *Poikilacanthus glandulosus* (Nees) Ariza branches and gallic acid against viability of *Echinococcus ortleppi* protoscoleces. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 2016.

Manuscrito aceito no periódico: **Journal of Applied Pharmaceutical Science**



**Effect of *Poikilacanthus glandulosus* (Nees) Ariza branches and gallic acid against viability of *Echinococcus ortleppi* protoscoleces**

Thiele Faccim de Brum<sup>a,\*</sup>, Roberta da Silva Jesus<sup>a</sup>, Bianca Vargas Belke<sup>a</sup>, Danieli Urach Monteiro<sup>c</sup>, Natalia Jank Mossmann<sup>b</sup>, Mariana Piana<sup>a</sup>, Sílvio Terra Stefanello<sup>d</sup>, Félix Alexandre Antunes Soares<sup>d</sup>, Mário Luiz De La Rue<sup>c</sup> and Liliane de Freitas Bauermann<sup>a</sup>

<sup>a</sup>*Post-Graduate Program in Pharmaceutical Sciences, Federal University of Santa Maria (UFSM). Department of Fisiology and Farmacology, Federal University of Santa Maria, Build 21, Santa Maria, RS 97105-900, Brazil;*

<sup>b</sup>*Pharmacy Course, Federal University of Santa Maria (UFSM). Department of Pharmacy Industrial, Santa Maria, Brazil.*

<sup>c</sup>*Post-Graduate Program in Pharmaceutical Sciences, Federal University of Santa Maria (UFSM). Department of Microbiology and Parasitology, Santa Maria, Brazil.*

<sup>d</sup>*Post-Graduate Program in Biochemical Toxicology, Federal University of Santa Maria (UFSM). Department of Biochemistry and Molecular Biology, Santa Maria, Brazil.*

\*Correspondence: Tel.: +55-55-3220-9380.

E-Mail address: thichaim@gmail.com (Thiele Faccim de Brum)

**ABSTRACT**

The aim of this study was to assess the antioxidant capacity and to evaluate effect of *P. glandulosus* on the viability of protoscoleces of *Echinococcus* spp. as well as determine the possible substance in charge for this action. *Echinococcus ortleppi* protoscoleces were exposed front of the crude extract and butanol fraction and gallic acid at different times. Phytochemical study revealed the presence of triterpenoids, steroids, coumarins, catechins, phenols, anthocyanins, anthocyanidins and cardioactive heterosides. The highest polyphenol

and flavonoids content was found in the ethyl acetate ( $151.34 \pm 1.71$  mg/g) and dichlorometane ( $123.30 \pm 1.46$  mg/g), respectively. For assays with DPPH the ethyl acetate fraction was highlighted ( $IC_{50}$   $95.48 \pm 0.35$   $\mu$ g/mL) and the dichlorometane fraction significantly reduced lipid peroxidation ( $IC_{50}$   $135.75 \pm 2.39$   $\mu$ g/mL) and also the oxidation of DCFH ( $15.6$   $\mu$ g/mL). The crude extract, butanol fraction and gallic acid showed scolicidal action of 100% at 15, 10 and 15 minutes, respectively.

**Key words:** Acanthaceae; antioxidant; gallic acid; protoscoleces; scolicidal agent.

## INTRODUCTION

*Poikilacanthus glandulosus* (Nees) Ariza belong to the family Acanthaceae, is a shrub and is distributed in South and Southeast of Brazil, Paraguay, Argentina and Uruguay, presenting as synonyms *Justicia umbrosa*, *Justicia flexuosa* and *Poikilacanthus flexuosus* (Wasshausen and Smith, 1969; Ariza, 1984; Mabberley, 1997; Wasshausen and Wood, 2004).

The external morphology of *Poikilacanthus* is very similar to the genus *Justicia* and many of their species have been described belonging to this. Only from the analysis of pollen morphology that was possible to maintain *Poikilacanthus* as a genus the part. Pollen characteristics seem to be the only form of distinction between the two genus (Daniel, 1991, 1998).

The plant under study lacks chemical studies, pharmacological, biological, toxicological, phytochemical, etc. There is only one study in the literature which addresses about the antimicrobial screening through the acetone extract of *P. glandulosus* that showed no inhibition for the tested microorganisms (Barneche *et al.*, 2010).

The phytochemical compounds of the plant extracts are the major basis of pharmacological activities of natural products (Oloyede, 2005) whereas flavonoids and polyphenols are antioxidants (Pietta, 1998; Mau *et al.*, 2002) and play significant roles in

many processes taking place in living systems. The antioxidant activity of phenolic compounds is mainly due to their redox properties, which can play an important role in absorbing and neutralizing free radicals, quenching singlet and triplet oxygen, or decomposing peroxides (Osawa, 1994). Synthetic antioxidants are used in foods to prevent lipid oxidation. However, some studies suggest synthetic antioxidants are harmful to human health (Valentao *et al.*, 2002). Consequently, there is increasing interest in finding naturally occurring alternatives from plants for use in food and medicines.

According to Turrens, (2004) all aerobic organisms are exposed to reactive oxygen species (ROS) generated by their metabolism and so, the redox system plays an important role in the survival of the parasite in the host. Parasitic protozoa not only have to eliminate their endogenous toxic metabolites but they should also cope with the oxidative (or respiratory) burst of the host immune system. In general, antiparasitic drugs, which have the ability to inhibit vital redox reactions or promote oxidative stress in parasites, are considered redox-active antiparasitic drugs (Seeber *et al.*, 2005).

Considering the growing interest and the need for research on medicinal plants, especially those species not yet studied, and the need for the development of new agents in the treatment of several diseases, led to development of this work so there is a greater understanding about the chemical constituents, antioxidant capacity and scolicidal effect of *P. glandulosus* branches front *Echinococcus* spp. protoscoleces, as well as determine the possible substance in charge for this action.

## **MATERIAL AND METHODS**

### **Animals**

Male Wistar rats (3.0–3.5 months of age and weighing 270–320 g) were maintained in groups of 3–4 rats per cage. They had continuous access to food and water in a room with controlled temperature ( $22\pm 3^{\circ}\text{C}$ ) and on a 12-h light/dark cycle with lights on at 7:00 am. The

animals were maintained in accordance to the guidelines of the Brazilian Association for Laboratory Animal Science (COBEA) (project number 030/2012).

### **Plant Collection and Extractions**

The branches of *P. glandulosus* were collected in Santiago, RS, Brazil in May of 2012. A voucher specimen is preserved in the herbarium of the Department of Biology at UFSM (SMBD 12.442 and 13.178). Plant material was dried at room temperature and powdered in a knife mill. The branches (2.061 Kg) were macerated at room temperature with 70% ethanol for a week with daily shaking; the solvent was renewed several times. After filtration, the hydroalcoholic extract (HE) was evaporated under reduced pressure at a temperature below 40°C, in order to obtain the aqueous extract (AE); part of this AE was evaporated to dryness to furnish a crude extract (CE). The remaining AE was partitioned with solvents of increasing polarity: dichloromethane (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-F), ethyl acetate (AcOEt-F) and *n*-butanol (BuOH-F). Finally, the fractions obtained were concentrated to dryness on a rotary evaporator. The fractionation method is illustrated in the Figure 1.

### **Phytochemical analysis**

#### ***Qualitative Analysis of Compounds***

The phytochemical analysis was realized in according with literature specialized (Moreira, 1979; Matos, 2009), observing the individual methodology for each reaction and verify the possible presence of the chemical groups of secondary metabolism in the plant drug.

#### ***Determination of Total Phenolics***

Total phenolic contents were measured using Folin–Ciocalteu method, slightly modified as described by Chandra *et al.*, (2004). Total phenolic content was expressed in milligrams equivalents of gallic acid (GAE) per gram of each fraction, using GA as standard.

### ***Determination of Total Flavonoids***

Total flavonoids were determined according to the colorimetric method described by Woisky and Salatino (1998), using a 2% aluminum chloride solution. The flavonoid content was established in milligrams equivalents of rutin (RE) per gram of each fraction, using R as standard.

### ***HPLC/DAD Analysis of GA***

The CE and fractions of the *P. glandulosus* were analyzed by HPLC performed with a Prominence Auto-Sampler (SIL-20A) equipped with Shimadzu LC-20AT reciprocating pumps connected to a DGU-20A5 degasser and CBM-20A integrator, UV–VIS detector DAD SPD-M20A and LC Solution 1.22 SP1 software. Reversed phase chromatographic analyses were carried out under gradient conditions using a C-18 column (250 mm×4.6 mm). The GA analysis was carried out using a gradient system using Solvent A (water containing 2% acetic acid) and Solvent B (acetonitrile), according to Boligon *et al.*, (2012). The flow rate was 0.6 mL/min and the injection volume was 40 µL, with 60 minutes of time duration of analysis. Identification of compounds was performed by comparing retention times and the Diode-Array-UV spectra with those of standards.

### ***Antioxidant Capacity Methods***

#### ***DPPH Assay***

The antioxidant capacity of the fractions and the CE was evaluated by monitoring its ability in quenching the stable free radical DPPH, according to Choi *et al.*, (2002). The DPPH quenching ability was expressed as IC<sub>50</sub> and a solution of DPPH (1 mL; 0.3 mM) in ethanol (2.5 mL) was used as a negative control and AA in the same concentrations used for the samples provided the positive control.

### ***TBARS Assay***

TBARS production was determined as described by Ohkawa *et al.*, (1979). Rats were killed and the encephalic tissue was rapidly dissected and placed on ice. Tissues were immediately homogenized in cold 10 mM Tris-HCl, pH 7.5 (1/10, w/v). The homogenate was centrifuged for 10 min at  $4,000 \times g$  to yield a pellet that was discarded and a low-speed supernatant (S1). An aliquot of 100  $\mu$ L of S1 was incubated for 1 h at 37 °C with freshly prepared FeSO<sub>4</sub> (10  $\mu$ M), in the presence of *P. glandulosus* fractions.

### ***DCFH-DA Method***

The substrate DCFH-DA was utilized to measure intracellular formation of reactive oxygen species, according to Myrhe *et al.*, (2003). The supernatant of rat brain homogenate was incubating at 37°C with different concentrations of *P. glandulosus* fractions. The fluorescence was measured using 488 nm for excitation and 520 nm for emission. ROS levels (expressed as  $\mu$ mol of oxidized 2',7'-dichlorofluorescein (DCF) per mg protein) were calculated by interpolation in a standard curve of oxidized DCF (constructed in parallel), corrected by the content of protein (Lowry *et al.*, 1951). Ethanol was used as negative control.

### **Effect of CE, BuOH-F and GA on the protoscoleces viability of *E. ortleppi***

#### ***Biological samples and molecular analysis***

Hydatid cysts in lungs and livers of naturally infected bovine were collected in a slaughterhouse in the central region of RS. The protoscoleces viability was assessed with 0.1% eosin (Moazeni *et al.*, 2012). The percentage considered suitable for the development of our experimental test was 100% of viability.

DNA extraction was performed using an aliquot of the liquid containing hydatid protoscoleces, using a commercial kit (QIAamp tissue) (QIAGEN Inc. Chatsworth, CA) according to the manufacturer's instructions. After extraction it was performed the polymerase

chain reaction using a pair of primers (5' TTTTTTGGGCATCCTGAGGTTTAT 3' 5' TAAAGAAAGAACATAATGAAAATG 3') to amplify a fragment of COX-I gene (Bowles *et al.*, 1992). To detect the pattern of bands, the electrophoresis in 1% agarose gel was performed, stained with ethidium bromide and visualized under UV light. The samples were submitted to DNA sequencing using a pair of primers (cox I) gene. The similarity of DNA sequencing samples was carried out with using BLAST program (Basic Local Alignment Search Tool).

### ***Scolicidal and viability assay***

In this study, it was used CE and BuOH-F in concentrations of 350 mg/mL of *P. glandulosus* and GA in 7 mg/mL. Distilled water was used as dilution vehicle of the agents. In each experiment, 500 µL of the solution was placed in a test tube, to which 7 µL of protoscolex rich sediment (about 1000 protoscolecocytes) was added. The contents of the tube was gently mixed, this procedure was repeated in times of 5, 10, 15 and 30 minutes for each concentration tested. At the end of each incubation the upper phase was removed and 500 µL of 0,1% eosin stain was then added to the protoscolecocytes and mixed gently. After 15 min of incubation the pellet of protoscolecocytes was examined in microscope optic. The percentages of viability were determined by counting minimum of 700 protoscolecocytes (Moazeni *et al.*, 2012).

The viability was evaluated by the same optical microscope, at different times described, observing motility and eosin staining, performing a count of 500 protoscolecocytes (7 µL hydatid cyst fluid) each evaluation. The protoscolecocytes were considered viable, when they presented motility and unstained, and not viable with no motility and stained (Yones *et al.*, 2011; Moazeni *et al.*, 2012).

### **Statistical Analysis**

The results obtained for DPPH, TBARS, scavenging of ROS, total phenolics and flavonoids assays were analyzed statistically by one-way analysis of variance (ANOVA),

followed by Tukey test using the statistical package SAS (2001). For viability protoscoleces analysis, survival curves were plotted using Kaplan-Meier and differences were analyzed using the chi-square test. The experiments were performed in triplicate and when appropriate  $p < 0.05$ ,  $p < 0.01$  or  $p < 0.001$  were considered significant. Data were expressed as mean  $\pm$  SD.

## RESULTS AND DISCUSSION

In the present work, was possible verify the presence of the main secondary metabolites (Table 1). Among the secondary metabolites found this phytochemical analysis, the coumarins possess several pharmacological activities, such as antithrombotic, anti-inflammatory, antiviral, antitumor and antioxidant properties (Martín-Aragón *et al.*, 1996). The presence of phenols was verified, being reported among many other activities, the antioxidant and anti-inflammatory, cardioactive heterosides as the hypotensive (Simões *et al.*, 2010), triterpenoids and steroids have a variety of medicinal properties, highlighting anti-inflammatories, analgesics, cardiovascular and antitumor effects (Niero and Malheiros, 2009). Note that negative results do not necessary imply in his absence, it is possible that the quantity of these are small to be detected.

Total polyphenols and flavonoids values are given in Table 2. The highest concentration of polyphenols in the AcOEt-F found in this study was expected, because according to the scheme proposed by Cechinel Filho and Yunes (1998) and studies qualitative composition of plant extracts second Canadovic *et al.*, (2008) show that phenolic compounds in general, tend to concentrate in this fraction when working with fractions of different polarities. The findings of this work are higher than studies with species of the genus *Justicia*, as *J. gangetica* (16.513 mg/g) (Stewart *et al.*, 2013), *J. gendarussa* (12.68 mg/g) (Amid *et al.*, 2011) and *J. pectoralis* (1.18 mg/g) (Lizcano *et al.*, 2010).

The CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-F showed the highest concentration of flavonoids in a very significantly front the other fractions, following the AcOEt-F. In the extractor solvent, dichloromethane,



can be found the methoxylated flavonoids, which can explain the largest content of flavonoids in this fraction (Cechinel Filho and Yunes, 1998), The BuOH-F and CE obtained the lowest values, there being no significant difference between them. In a study conducted by John *et al.*, (2013) with six species of *Justicia*, they verified the flavonoid content in different parts of the plant, whereas the maximum value was found in the leaves of *J. betonica* (2.86 mg/g). Lizcano and collaborators (2010), reported the flavonoid content of the leaves and stem *J. pectoralis* (0.75 and 0.12 mg/g), respectively. These results were lower than those found for all extracts of *P. glandulosus* used in this study for polyphenols and flavonoids.

Through HPLC/DAD analysis was verify the presence of GA in all extracts of *P. glandulosus* branches, showing  $5.09 \pm 0.12$  mg/g,  $0.68 \pm 0.02$  mg/g,  $2.17 \pm 0.15$  and  $6.72 \pm 1.06$  mg/g for CE, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-F, AcOEt-F and BuOH-F, respectively. According Ferguro and Harris (1999), the antioxidant activity of the phenolic acids is generally determined by the number of hydroxyl groups present in the molecule. Besides the proven antioxidant activity of this compound, preclinical studies have shown that the GA has a variety of pharmacological actions, such as anti-inflammatory, antimicrobial, antiviral and antitumor activities (Kim, 2007; Özçelik *et al.*, 2011). The GA was found by the first time in *P. glandulosus* and others compounds can be investigated, once through this study was observed the significant presence of others peaks in the chromatograms that were not identified.

The DPPH assay is the most common methods to determine antioxidant capacity in a practical, rapid and sensitive manner (Arnao *et al.*, 2000). The best sequestrant capabilities of DPPH in this study were observed in the AcOEt-F (IC<sub>50</sub> 95.48 µg/mL), followed by BuOH-F (IC<sub>50</sub> 118.92 µg/mL). The CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-F and CE showed weaker antioxidant capacity (IC<sub>50</sub>  $144.05 \pm 0.23$  and  $409.5 \pm 0.76$  µg/mL), respectively (Table 3).

The results are in agreement with the content of polyphenols found in the fractions, so is possible to attribute the antioxidant capacity seen in the DPPH assay to the presence of

these compounds. This positive correlation can be explained on the basis of the similarity between compounds with high antioxidant activity extracted by these organic solvents (Silva *et al.*, 2006; Schubert *et al.*, 2007). The CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-F showed highest antioxidant capacity, it may be suggested by the high flavonoid content found for this fraction. Our results show that *P. glandulosus* was more potent in sequestering the DPPH radical when compared with *J. gendarussa* (IC<sub>50</sub> 482.5 µg/mL) (Krishma *et al.*, 2010) and *J. spicigera* (IC<sub>50</sub> of 944.67 µg/mL) (Sepúlveda-Jiménez *et al.*, 2009).

For the TBARS analysis, the CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-F was the one that presented significant reduction in lipid peroxidation compared to baseline, from the concentration of 31.2 µg/mL and IC<sub>50</sub> of 135.75 µg/mL (Table 3 and Figure 2). However, this correlation was not possible to check with other fractions that showed values polyphenols and flavonoids relatively high. By linear regression analysis, was possible to perceive that the other fractions were not capable of reducing the lipid peroxidation, requiring largest concentrations, which may produce a toxic effect.

There are several methods to analyze the antioxidant capacity, mainly because there are different mechanisms that plant extracts can exert this action. The fluorogenic compound DCFH-DA has been utilized extensively as a marker for oxidative stress, and is suggested to reflect the overall oxidative status of the cell (Wang and Joseph, 1999).

In this work, the CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-F significantly decreased the oxidation of DCFH at a concentration of 15.6 µg/mL (Figure 3). The BuOH-F was able to significantly reduce levels of oxidation of DCFH from the concentration of 125 µg/mL and the AcOEt-F, only in the most concentration tested (250 µg/mL). The CE was not able to reduce significantly the oxidation of DCFH. The results of this study suggest that *P. glandulosus* was able to reduce the levels of malondialdehyde and also the basal ROS generation in rat brains, especially CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-F.

Echinococcosis is a zoonotic infection caused by cestode species of the genus *Echinococcus*. This neglected disease is distributed worldwide and causes illnesses in humans and animals (Cardona and Carmena, 2013). *Echinococcus ortleppi* is found in southern Brazil (Balbinotti *et al.*, 2012) and in determined parts of Europe, Africa, South Asia and the Americas (Dinkel *et al.*, 2004). There are also reports of *E. ortleppi* causing cystic echinococcosis in humans (Maravilla *et al.*, 2004; Sharma *et al.*, 2013).

To date, many scolicial agents have been used for inactivation of the hydatid cyst content, but there is no ideal agent that is both effective and safe. An ideal scolicial agent is defined as being potent in low concentrations, acting in a short period time, being stable in cyst fluid, not affected by dilution with the cyst fluid, being able to kill the protoscoleces in the cyst, being non-toxic, having low viscosity, and being readily available and easily prepared, as well as being inexpensive (Moazeni and Nazer, 2010).

The mainstay of treatment for hydatid disease is surgery. Surgical approaches depend on the parasitized organ and cyst size. In order to prevent recurrence of secondary hydatid cysts, inactivation of protoscoleces with scolicial agents before the cyst removal is recommended. As it is also indicated the use of powerful scolicial the alternative method of treatment puncture, aspiration, injection and recirculation (Park *et al.*, 2009).

For this study, the protoscoleces were identified molecularly as the specie *E. ortleppi*. GA was found in all fractions of *P. glandulosus*, but in larger quantities in the CE and BuOH-F, which led us to conduct this study with the standard and these extracts in an attempt to justify this activity. The effect of *P. glandulosus* front *E. ortleppi* protoscoleces revealed that CE and BuOH-F at concentration of 350 mg/mL can kill all protoscoleces acting in a short period time (10 at 15 minutes of application, respectively). The GA was able to kill all protoscoleces in 15 minutes of exposure at concentration 7 mg/mL (Figure 4). This significant effect of *P. glandulosus* extracts can be explained by good activity of GA standard that was

identified by HPLC-DAD analysis in this specie. The GA has a variety of pharmacological actions, but as far as we know, this is the first report on the scolicedal activity this compound. The relation between antiparasitic and antioxidant activities of natural compounds have long been under investigation and discussed, especially on the generation of ROS, but remains unclear (Ribeiro *et al.*, 1997; Moazeni *et al.*, 2012).

## CONCLUSION

This study showed the antioxidant activity of *P. glandulosus* branches by different methods, the scolicedal effect and contributed to reveal some phytochemical compounds of this species for the first time. Taking into account that natural substances can be responsible for the protective effect against the risk of many disease processes, our results suggest that *P. glandulosus* has antioxidant potential and can be a promising source of natural antioxidants. Furthermore, was possible described the significant potential *in vitro* scolicedal activity of CE and BuOH-F of *P. glandulosus* front the protoscoleces of *E. orteppi*. The results of this study allowed us to suggest that GA can be the responsible in part by scolicedal effect of *P. glandulosus*, for the reasons cited above. The present study open the possibility of more investigations of *in vivo* scolicedal effect of this traditional medicine.

## ACKNOWLEDGMENTS

The authors would like to thank Prof. Dra. Margareth Linde Athayde by orientation and support for this work be realized, the Prof. Dr. Renato Aquino Záchia for providing the identification of *Poikilacanthus glandulosus*, Dra. Carolina Bremm by statistical analysis and financial support of FAPERGS (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul)/Brazil.

## REFERENCES

- Amid A, Johan NN, Jamal P, Zain WNW Mohd. Observation of antioxidant activity of leaves, callus and suspension culture of *Justicia gendarusa*. *Afr J Biotechnol*, 2011; 10:18653-18656.
- Ariza LE. Notas sobre Acanthaceae. El Genero *Poikilacanthus* II. *Kurtziana*, 1984; 17: 157-161.
- Arnao MB, Cano A, Acosta M. A method to measure antioxidant activity in organic media: application to lipophilic vitamins. *Redox Rep*, 2000; 5: 365–370.
- Balbinotti H, Santos GB, Badaraco J, Arend AC, Graichen DAS, Haag KL, Zaha A. *Echinococcus ortleppi* (G5) and *Echinococcus granulosus sensu stricto* (G1) loads in cattle from Southern Brazil. *Vet Parasitol*, 2012; 188: 255-260.
- Barneche S, Bertucci A, Haretche F, Olivaro C, Cerdeiras MP, Vázquez A. Prospección química y microbiológica del bosque de galería del río Uruguay. *Braz J Pharmacog*, 2010; 20: 878-885.
- Boligon AA, Brum TF, Frohlich JK, Froeder ALF, Athayde ML. HPLC/DAD profile and determination of total phenolics, flavonoids, tannins and alkaloids contents of *Scutia buxifolia* Reissek stem bark. *Res J Phytochem*, 2012; 3: 84-91.
- Bowles J, Blair D, Mcmanus DP. Genetic variants within the genus *Echinococcus* identified by mitochondrial DNA sequencing. *Mol Biochem Parasitol*, 1992; 54: 165-174.
- Canadovic BJ, Cetkovic G, Dilas S, Tumbas V, Bogdanovic G, Mandic A, Markov S, Cvetkovic D, Canadanovic V. Radical scavenging, antibacterial, and antiproliferative activities of *Melissa officinalis* L. extracts. *J Med Food*, 2008; 11: 133-143.
- Cardona GA, Carmena D. A review of the global prevalence, molecular epidemiology and economics of cystic echinococcosis in production animals. *Vet Parasitol*, 2013; 192: 10–32.

Cechinel FV, Yunes RA. Estratégias para a obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais. Conceitos sobre modificação estrutural para otimização da atividade. *Quím Nova*, 1998; 21: 99-105.

Chandra S, Mejia EG. Polyphenolic compounds, antioxidant capacity and quinone reductase activity of an aqueous extract of *Ardisia compressa* in comparison to Mate (*Ilex paraguayensis*) and Green (*Camellia sinensis*) Teas. *J Agric Food Chem*, 2004; 52: 3583-3589.

Choi CW, Kim SC, Hwang SS, Choi BK, Ahn HJ, Lee MY, Park SH, Kim SK. Antioxidant activity and free radical scavenging capacity between Korean medicinal plants and flavonoids by assay-guided comparison. *Plant Sci*, 2002; 163: 1161–1168.

Daniel TF. A synopsis of *Poikilacanthus* (Acanthaceae) in Mexico. *Bull Torrey Bot Club*, 1991; 118: 451-458.

Daniel TF. Pollen Morphology of Mexican Acanthaceae: diversity and systematic significance. *Proceedings of the California Academy of Sciences*, 1998; 50: 217-256.

Dinkel A, Njoroge EM, Zimmermann A, Wälz M, Zeyhle E, Elmahdi IE, Mackenstedt U, Romig T. A PCR system for detection of species and genotypes of the *Echinococcus granulosus* - complex, with reference to the epidemiological situation in eastern Africa. *Int J Parasitol*, 2004; 34: 645-653.

Ferguro LR, Harris PJ. Protection against cancer by wheat bran: role of dietary fibre and phytochemicals. *Eur Cancer Prev Org*, 1999; 8: 17-25.

John B, Reddy VRK, Sulaiman CT. Total Phenolics and Flavonoids in Selected *Justicia* Species. *J Pharmacog Phytochem*, 2013; 2: 72-73.

Kim, Y.J. Antimelanogenic and antioxidant properties of gallic acid. *Biol Pharm Bull*, 2007; 6: 1052-5.

Krishma KL, Mruthunjaya K, Patel JA. Antioxidant and hepatoprotective potential of stem methanolic extract of *Justicia gendarussa* Burn. *Int J Pharm*, 2010; 2: 72-80.

Lizcano LJ, Bakkali MF, Ruiz-Larrea B, Ruiz-Sanz JI. Antioxidant activity and polyphenol content of aqueous extracts from Colombian Amazonian plants with medicinal use. *Food Chem*, 2010; 119: 1566–1570.

Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*, 1951; 193: 265–275.

Mabberley DJ. 1997. *The plant book*, 2nd edition. Cambridge: Cambridge University Press, 520–521.

Maravilla P, Thompson RCA, Palacios-Ruiz JA, Estcourt A, Ramirez-Solis E, Mondragon-de-la-Peña C, Moller-Moreno M, Cardenas-Mejia A, Mata-Miranda P, Aguirre-Alcantara MT, Bonilla-Rodriguez C, Flisser A. *Echinococcus granulosus* cattle strain identification in an autochthonous case of cystic echinococcosis in central Mexico. *Acta Trop*, 2004; 92: 231-236.

Martín-Aragón S, Benedí J, Villar A. Oxygen active species-scavenger properties of coumarins. *Phytother Res*, 1996; 10: S75-S78.

Matos, FJA. *Introdução a fitoquímica experimental*. 3 Ed. Fortaleza: Editora da Universidade Federal do Ceará - UFC, p. 20, 2009.

Mau JL, Lin HC, Chen CC. Antioxidant properties of several medicinal mushrooms. *J Agric Food Chem*, 2002; 50: 6072–6077.

Moazeni M, Nazer A. *In vitro* effectiveness of garlic (*Allium sativum*) extract on scolices of hydatid cyst. *World J Plast Surg*, 2010; 34: 2677–2681.

Moazeni M, Saharkhiz MJ, Hoseini AA, Alavi AM. *In vitro* scolicidal effect of *Satureja khuzistanica* (Jamzad) essential oil. *Asian Pac J Trop Biomed*, 2012; 8: 616-620.

Moreira EA. Contribuição para o estudo fitoquímico de *Lobelia hassleri* A. ZAHLB e *Lobelia stellfeldii* R. Braga. *Companulaceae*. Tribuna Farm, 1979; 47: 13-39.

Myrhe O, Andersen JM, Aarnes H, Fonnum F. Evaluation of the probes 2',7'-dichlorofluorescein diacetate, luminol, and lucigenin as indicators of reactive species formation. *Biochem Pharmacol*, 2003; 65: 1575–1582.

Niero R, Malheiros A. 2009. Principais aspectos químicos e biológicos de terpenos. In: Yunes, R.A., Filho, C.V (Orgs.). *Química de produtos naturais, novos fármacos e a moderna farmacognosia*, 2nd edition. Itajaí: Universidade do Vale do Itajaí, 259-278.

Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem*, 1979; 95: 351–358.

Oloyede OI. Chemical Profile of Unripe Pulp of *Carica papaya*. *J Nutr*, 2005; 4: 379–381.

Osawa T. 1994. *Novel natural antioxidants for utilization in food and biological systems*. In: Uritani I, Garcia VV, Mendoza EM (Eds.). *Postharvest biochemistry of plant food-materials in the tropics*. Tokyo, Japan: Japan Scientific Societies Press, 241–251.

Özçelik B, Kartal M, Orhan I. Cytotoxicity, antiviral and antimicrobial activities of alkaloids, flavonoids, and phenolic acids. *Pharm Biol*, 2011; 49: 396-402.

Park K, Jung S, Jang HC, Shin J. First Successful Puncture, Aspiration, Injection, and Re-Aspiration of Hydatid Cyst in the Liver Presenting with Anaphylactic Shock in Korea. *Yonsei Med J*, 2009; 5: 717-720.

Pietta PG. 1998. *Flavonoids in medicinal plants*. In: Rice-Evans CA, Packer L (Eds.), *Flavonoids in health and disease*. New York: Dekker, 61– 110.

Ribeiro A, Pilo-Veloso D, Romanha AJ, Zani CL. Trypanocidal flavonoids from *Trixis vauthieri*. *J Nat Prod*, 1997; 60: 836–841.



Schubert A, Pereira DF, Zanin FF, Alves SH, Beck RCR, Athayde ML. Comparison of antioxidant activities and total polyphenolic and methylxanthine contents between the unripe fruit and leaves of *Ilex paraguariensis* A. St. Hil. *Pharmazie*, 2007; 62: 876–880.

Sepúlveda-Jiménez G, Reyna-Aquino C, Chaires-Martínez L, Bermúdez-Torres K, Rodríguez-Monroy M. Antioxidant activity and content of phenolic compounds and flavonoids from *Justicia spicigera*. *J Biol Sci*, 2009; 6: 629-632.

Sharma M, Sehgal R, Fomda BA, Malhotra A, Malla N. Molecular Characterization of *Echinococcus granulosus* Cysts in North Indian Patients: Identification of G1, G3, G5 and G6 Genotypes. *PLoS Negl Trop Dis*, 2013; 7: 2262.

Silva DA, Silva TMS, Lins ACS, Costa DA, Cavalcante JMS, Matias WN, Souza MFV, Filho BR. Chemical constituents and antioxidant activity of *Sida galheirensis* Ulbr. (Malvaceae). *Quim Nova*, 2006; 29: 1250–1254.

Simões CMO, Schenkel EP, Gosmann G, Mello JCP de, Mentz LA, Petrovick PR. 2010. *Farmacognosia: da planta ao medicamento*, 6nd edition. Porto Alegre/ Florianópolis: Ed. UFRGS/Ed. UFSC, 229-615.

Seeber F, Aliverti A, Zanetti G. 2005. The plant-type ferredoxin-NADP + reductase/ferredoxin redox system as a possible drug target against apicomplexan human parasites. *Curr Pharm Des*, 11: 3159–3172.

Stewart P, Boonsiri P, Puthong S, Rojpiulstitt P. 2013. Antioxidant activity and ultrastructural changes in gastric cancer cell lines induced by Northeastern Thai edible folk plant extracts. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, v. 13, n. 60, p. 1-11.

Turrens JF. Oxidative stress and antioxidant defenses: a target for the treatment of diseases caused by parasitic protozoa. *Mol Aspects Med*, 2004; 25: 211–220.

Valentao P, Fernandes E, Carvalho F, Andrade PB, Seabra RM, Bastos ML. Antioxidative properties of cardoon (*Cynara cardunculus* L.) infusion against superoxide radical, hydroxyl radical and hypochlorous acid. *J Agric Food Chem*, 2002; 50: 4989–4993.

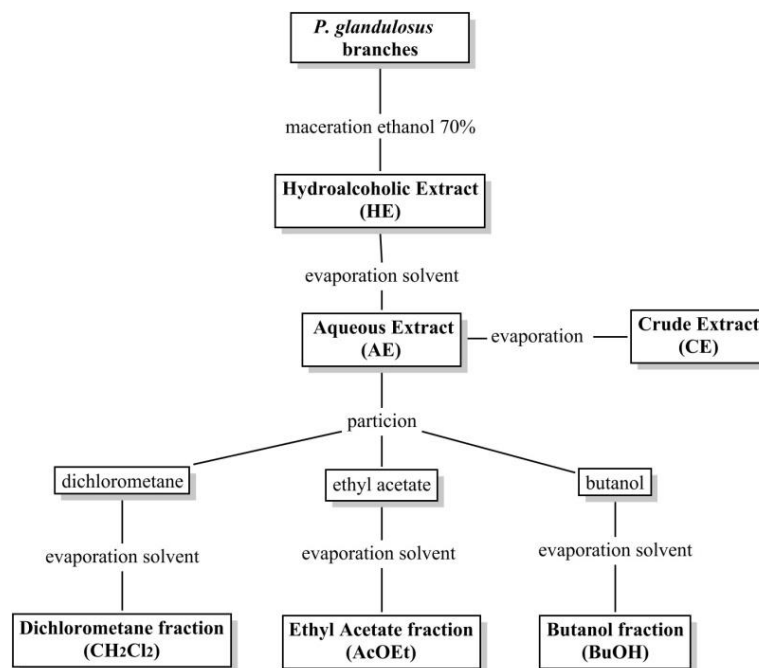
Wang H, Joseph JA. Quantifying cellular oxidative stress by dichlorofluorescein assay using microplate reader. *Free Rad Biol Med*, 1999; 27: 612–6.

Wasshausen DC, Smith LB. 1969. *Acantáceas*. Itajaí, SC: Ed. Herbário Barbosa Rodrigues, Flora Ilustrada Catarinense, 100-117.

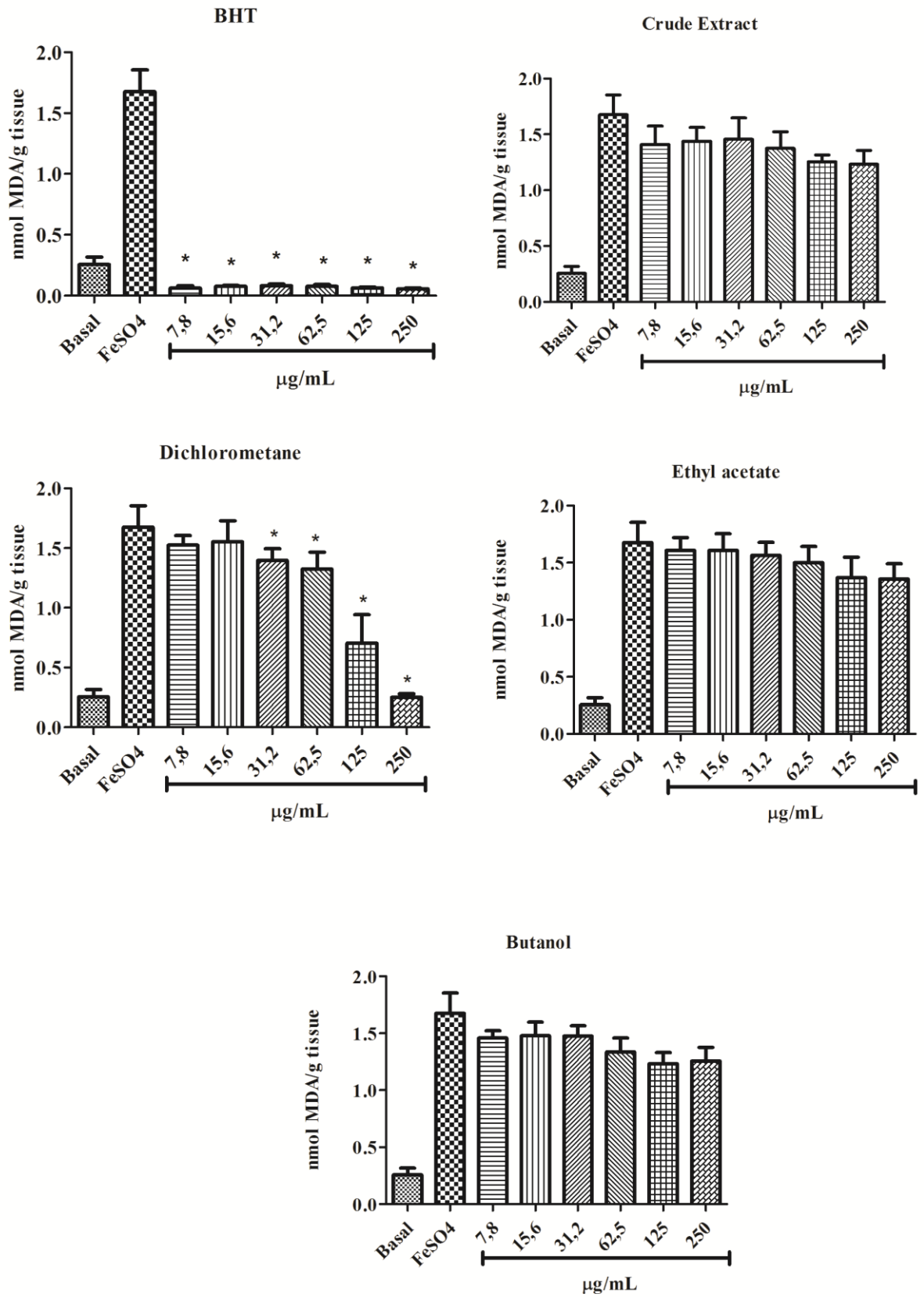
Wasshausen DC, Wood JRI. Acanthaceae of Bolivia. Contributions from the *US National Herbarium*, 2004; 49: 1-152.

Woisky RG, Salatino A. Analysis of propolis: some parameters and procedures for chemical quality control. *J Apic Res*, 1998; 37: 99–105.

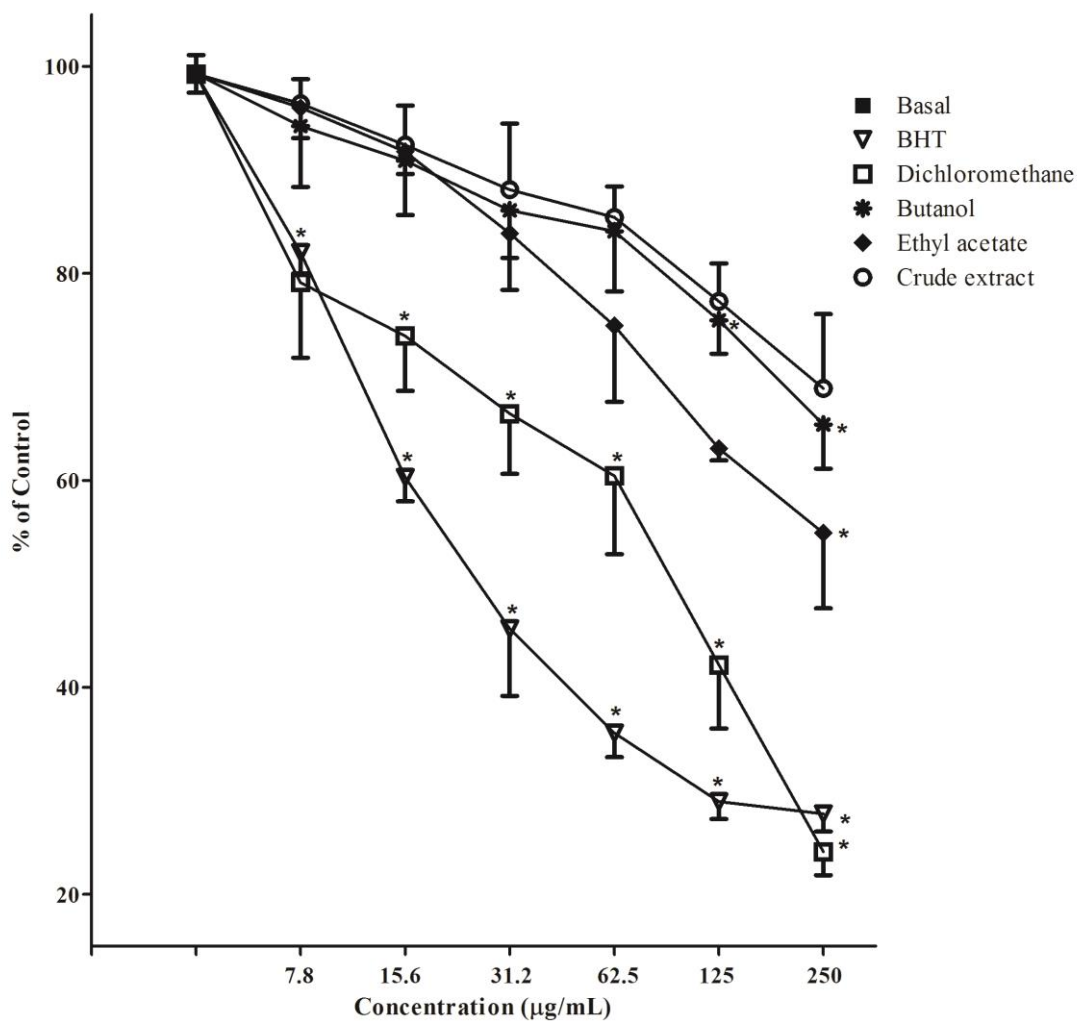
Yones D, Taher GA, Ibraheim ZZ. *In vitro* effects of some herbs used in egyptian traditional medicine on viability of protoscolices of hydatid cysts. *Korean J Parasitol*, 2011; 49: 255-263.



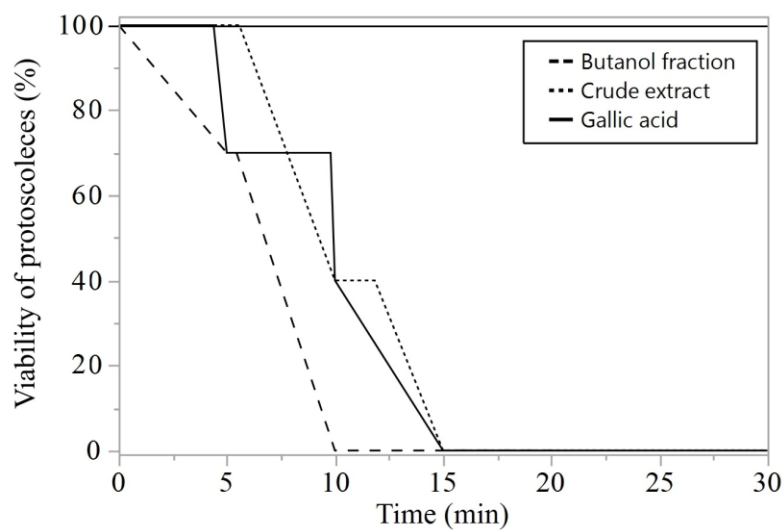
**Fig. 1:** Method of fractionation of *P. glandulosus* branches extracts.



**Fig. 2:** Effect of different concentrations fractions from the branches of *P. glandulosus* on Fe(II) (10 µM)-induced TBARS production in brain homogenates. Dates are expressed as means ± S.D., (n=3). Significant differences are indicated by \*  $p \leq 0.05$  when compared with FeSO<sub>4</sub> group.



**Fig. 3:** Effect of the crude extract and fractions of the branches from *P. glandulosus* on scavenging of ROS in rat brain cells, by DCFH-DA method. \* Data are expressed as means  $\pm$  S.D., (n = 3). \* Significant difference from the basal group ( $p < 0.05$ ).



**Fig. 4:** *In vitro* effects on the viability of protoscolecetes when submitted to CE 350 mg/mL, BuOH fraction 350 mg/mL of *P. glandulosus* and GA 7 mg/mL in different exposure times.

**Table 1:** Phytochemical analysis of AE and HE extracts of *P. glandulosus* branches

<b>Secondary metabolites</b>	<b>AE</b>	<b>HE</b>
Heterosides anthocyanic	+	+
Heterosides cyanogenic	-	-
Amino-groups	+	+
Volatile acids	-	-
Tannins	-	-
Anthocyanins, anthocyanidins and flavonoids	+	+
Leucoanthocyanidins and flavones	-	-
Flavonols, flavanones, flavanonóis and xanthones	-	-
Triterpenes	+	+
Catechins	+	+
Resins	-	-
Heterosides cardiotonics	+	+
Fenols with ortho and meta free	+	+
Fenols with the position para free	+	+
Coumarins	+	+
Organic acids	+	+
Fenols	+	+

+ Presence, - Absence.

**Table 2:** Total polyphenols and flavonoids for crude extract and fractions of *P. glandulosus*.

<b>Extract/fraction</b>	<b>TP ± SD (mg GAE/g)</b>	<b>TF ± SD (mg RE/g)</b>
Crude extract	90.37 ± 0.49 <sup>d</sup>	27.68 ± 0.85 <sup>c</sup>
Dichloromethane	118.65 ± 2.34 <sup>c</sup>	123.30 ± 1.46 <sup>a</sup>
Ethyl acetate	151.34 ± 1.71 <sup>a</sup>	51.02 ± 1.53 <sup>b</sup>
Butanolic	136.98 ± 1.30 <sup>b</sup>	27.28 ± 0.76 <sup>c</sup>

Values are expressed as mean ± standard deviation. <sup>a-d</sup> Means with the different letters in each column are significantly different ( $p < 0.001$ ) according to the Tukey test (n = 3).

**Table 3:** Antioxidant capacity for crude extract and fractions of *P. glandulosus*.

<b>Extract/fraction</b>	<b>IC<sub>50</sub> ± SD (µg/mL)</b>	
	<b>DPPH</b>	<b>TBARS</b>
Crude extract	409.5 <sup>a</sup> ± 0.76	#
Dichloromethane	144.05 <sup>b</sup> ± 0.23	135,75 ± 2,39
Ethyl acetate	95.48 <sup>d</sup> ± 0.35	#
Butanolic	118.92 <sup>c</sup> ± 0.28	#
<b>Standarts</b>		
Ascorbic acid	15,98 ± 0,42 <sup>e</sup>	-
BHT	-	*

Values are expressed as mean ± standard deviation. <sup>a-e</sup> Means with the different letters in each column are significantly different ( $p < 0.05$ ) according to the Tukey test (n = 3). The IC<sub>50</sub> value found by linear regression corresponding to a value smaller than the concentrations tested. # The value of IC<sub>50</sub> found by linear regression corresponding to a value higher than the concentrations tested.

### 5.3 CAPÍTULO 3 - POIKILACANTHUS GLANDULOSUS LEAVES: PHYTOCHEMICAL, CYTO/GENOTOXIC AND ANTIPARASITIC EFFECTS

Thiele Faccim de Brum, Danieli Urach Monteiro, Roberta da Silva Jesus, Bianca Vargas Belke, Pablo Sebastian Britto de Oliveira, Priscila Markezan Copetti, Sílvio Terra Stefanello, Michele Rorato Sagrillo, Mário Luiz de La Rue, Félix Alexandre Antunes Soares, Liliane de Freitas Bauermann. *Poikilacanthus glandulosus* Leaves: phytochemical, cyto/genotoxic and antiparasitic effects. **Toxicology Letters**. 2016

Manuscrito submetido: **Toxicology Letters**

***Poikilacanthus glandulosus* Leaves: phytochemical, cyto/genotoxic and antiparasitic effects**

Thiele Faccim de Brum<sup>a\*</sup>, Danieli Urach Monteiro<sup>b</sup>, Roberta da Silva Jesus<sup>a</sup>, Bianca Vargas Belke<sup>a</sup>, Pablo Sebastian Britto de Oliveira<sup>c</sup>, Priscila Marquezan Copetti<sup>c</sup>, Sílvio Terra Stefanello<sup>d</sup>, Michele Rorato Sagrillo<sup>c</sup>, Mário Luiz de La Rue<sup>b</sup>, Félix Alexandre Antunes Soares<sup>d</sup>, Liliane de Freitas Bauermann<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Post-Graduate Program in Pharmaceutical Sciences, Federal University of Santa Maria (UFSM). Department of Industrial Pharmacy, Santa Maria, Brazil.

<sup>b</sup> Post-Graduate Program in Pharmaceutical Sciences, Federal University of Santa Maria (UFSM). Department of Microbiology and Parasitology, Santa Maria, Brazil.

<sup>c</sup> Biomedicine Course, Franciscan University Center (UNIFRA). Health Sciences Center, Santa Maria, Brazil.

<sup>d</sup> Post-Graduate Program in Biochemical Toxicology, Federal University of Santa Maria (UFSM). Department of Biochemistry and Molecular Biology, Santa Maria, Brazil.

**Highlights**

- The safety of the crude extract and fractions from *P. glandulosus* leaves
- Reduced lipid peroxidation of the crude extract and fractions from *P. glandulosus*
- Scolicidal potential of the *P. glandulosus*

\*Corresponding author:

Thiele Faccim de Brum, Graduate Program in Pharmaceutical Sciences, Federal University of Santa Maria, Avenida Roraima 1000, Cidade Universitária, Santa Maria, RS, 97105-900, Brazil. Tel.: +55 55 3220 9618; Fax: +55 55 3220 8248. E-mail: thichaim@gmail.com

**Abstract**

The purpose of the present study was to investigate the safety of the crude extract and fractions from *P. glandulosus* leaves by analyzing its cyto/genotoxic and antioxidative properties. In addition, we performed the content of secondary metabolites as well as scolicidal effect. The gallic acid was quantified by HPLC/DAD in all extracts and the ethyl acetate fraction had the highest content of polyphenol and flavonoids (156.88±1.55 and 216.03±1.56 mg/g), respectively. This fraction was also highlighted for assays with DPPH (150.27±0.21 µg/mL) and significantly reduced lipid peroxidation (IC<sub>50</sub> 45.28±7.81 µg/mL). The CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> fraction at a concentration of 31.2 µg/mL was able to significantly reduce the oxidation of DCFH and CE and others fractions from the concentration of 62.5 µg/mL. The results found revealed that extracts of *P. glandulosus* leaves showed not *in vitro* cyto and genotoxicity at concentrations tested. For this study, the crude extract and butanol fraction of gaiana showed scolicidal action of 100% at 5 minutes of application and gallic acid in 15 minutes of exposure front protoscoleces of *E. orteppi*. Our results demonstrate that *P. glandulosus* has antioxidant and scolicidal action and yet, showed no cyto/genotoxicity suggesting these actions by their content of phenolic compounds and terpenes.

**Keywords:** Leaves. Gallic acid. Chromosomes damage. *Echinococcus orteppi*. Scolicidal agent.

## 1. Introduction

Epidemiological studies have shown that medicinal plants may be involved in preventing or delaying the development of various diseases (Dahech et al., 2013; Hasnat, Pervin and Lim, 2013). These plants may act on different targets in signal transduction pathways that may modulate gene expression, cell cycle progression, cellular proliferation, and/or apoptosis (Büchner et al., 2010; Soerjomataram et al., 2010). However, adverse effects, such as genotoxicity, mutagenicity and carcinogenicity (Akaneme and Amaefule, 2012; Munari et al., 2012), can also occur. These effects may be triggered by compounds that interact with deoxyribonucleic acid (DNA), which would cause cellular toxicity and/or genotoxicity (Rietjens et al., 2005).

Reactive oxygen species (ROS), produced in the course of several biochemical reactions, are extremely reactive intermediates and can cause damage to various biologic targets, such as proteins, DNA, and lipids (Block et al., 1992; Nakatani, 2000). Phenolic phytochemicals are thought to promote health partly via their antioxidant and free radical scavenging effects there by protecting cellular components against free radical induced damage. But due to their diverse chemical structures, they are likely to possess different antioxidant capacities (Ferguson, 2001; Noguchi and Niki, 2000; Undeğer et al., 2009). But on the other hand it is suggested that various phenolic antioxidants can display pro-oxidant properties at high doses (Wong and McLean, 1999).

*Poikilacanthus glandulosus* (Nees) Ariza (Acanthaceae) is a shrub and is popularly known as “gaiana” and has been empirically used for therapeutic purposes, such as insect bites, cicatrization, inflammation, spider bite, contusion, phlebitis, nail fungus, spine, burn, and as a repellent and disinfectant (Brum et al., 2016). There are few reports in the literature on this species. Barneche et al., (2010) realized the antimicrobial screening through the acetone extract of *P. glandulosus* that showed no inhibition for the tested microorganisms.



Recently, Brum et al., (2016) reported antiedematogenic and anti-inflammatory actions with the leaves of *P. glandulosus* and HPLC analysis revealed the presence of maslinic acid, uvaol and sitosterol (Brum et al., 2016). However, there are no studies related to toxicity this specie.

Thus, the purpose of the present study was to investigate the safety of the crude extract and fractions from *P. glandulosus* leaves by analyzing its mutagenic, genotoxic and antioxidative properties. In addition, we performed the identification of secondary metabolites as well as scolicidal effect.

## **2. Material and Methods**

### **2.1. Plant of collect and extract preparation**

Leaves of *P. glandulosus* were collected in Santiago (Rio Grande do Sul State of Brazil) in May of 2012. A dried voucher specimen is preserved in the herbarium of the Department of Biology at Federal University of Santa Maria by registers numbers SMBD 12.442 and 13.178. Plant material was dried at room temperature and powdered in a knife mill. The leaves (1.217 Kg) were macerated at room temperature with 70% ethanol for a week with daily shaking; the solvent was renewed several times. After filtration, the hydroalcoholic extract was evaporated under reduced pressure at a temperature below 40°C, in order to obtain the aqueous extract; part of this aqueous extract was evaporated to dryness to furnish a crude extract (CE). The remaining aqueous extract was partitioned with solvents of increasing polarity: dichloromethane (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>), ethyl acetate (AcOEt) and n-butanol (BuOH). Finally, the fractions obtained were concentrated to dryness on a rotary evaporator.

## 2.2. Phytochemical analysis

### 2.2.1. Determination of total phenolics

Total phenolic contents were measured using Folin–Ciocalteu method, slightly modified as described by Chandra et al. (2004). Total phenolic content was expressed in milligrams equivalents of gallic acid (GAE) per gram of each fraction, using GA as standard.

### 2.2.2. Determination of total flavonoids

Total flavonoids were determined according to the colorimetric method described by Woisky and Salatino (1998), using a 2% aluminum chloride solution. The flavonoid content was established in milligrams equivalents of rutina (RE) per gram of each fraction, using R as standard.

### 2.2.3. Quantification of gallic acid by HPLC-DAD

The CE and fractions of the *P. glandulosus* were analyzed by HPLC performed with a Prominence Auto-Sampler (SIL-20A) equipped with Shimadzu LC-20AT, UV–VIS detector DAD SPD-M20A and LC Solution 1.22 SP1 software. Reversed phase chromatographic analyses were carried out under gradient conditions using a C-18 column (250 mm×4.6 mm). The GA analysis was carried out using a gradient system using Solvent A (water containing 2% acetic acid) and Solvent B (acetonitrile), according to Boligon et al. (2012). The flow rate was 0.6 mL/min and the injection volume was 40 µL. Identification of compounds was performed by comparing retention times and the Diode-Array-UV spectra with the standard.

## 2.3. Antioxidant capacity assays

### 2.3.1. Animals

Male Wistar rats (3.0–3.5 months of age and weighing 270–320 g) were maintained in groups of 3–4 rats per cage. They had continuous access to food and water in a room with controlled temperature (22±3°C) and on a 12-h light/dark cycle with lights on at 7:00 am. The animals were maintained in accordance to the guidelines of the Brazilian Association for

Laboratory Animal Science (COBEA) (project number 030/2012). The rats were killed by decapitation and the brain tissue was rapidly dissected, weighed and immediately homogenized in Tris-HCl 10 mM, pH 7.5 (1/10, w/v) for DCFH-DA and TBARS methods.

#### 2.3.2. Radical-scavenging activity—DPPH method

The antioxidant capacity of the fractions and the CE was evaluated by monitoring its ability in quenching the stable free radical DPPH, according to Choi et al. (2002). The DPPH quenching ability was expressed as  $IC_{50}$  and a solution of DPPH (1 mL; 0.3 mM) in ethanol (2.5 mL) was used as a negative control and AA in the same concentrations used for the samples provided the positive control.

#### 2.3.3. DCFH-DA method

The substrate DCFH-DA was utilized to measure intracellular formation of reactive oxygen species (ROS), according to Myrhe et al., (2003). The supernatant of rat brain homogenate was incubated at 37°C with different concentrations of *P. glandulosus* fractions. The fluorescence was measured using 488 nm for excitation and 520 nm for emission. ROS levels (expressed as  $\mu\text{mol}$  of oxidized 2',7'-dichlorofluorescein (DCF) per mg protein) were calculated by interpolation in a standard curve of oxidized DCF (constructed in parallel), corrected by the content of protein (Lowry et al., 1951). Ethanol was used as negative control.

#### 2.4.4. Fe (II)-Induced lipid peroxidation (TBARS Assay)

To analyze the inhibition of lipid peroxidation, an aliquot of 100  $\mu\text{L}$  of rat brain homogenate supernatant was incubated for 1 h at 37 °C with the pro-oxidant freshly prepared ferrous sulphate ( $\text{FeSO}_4$  10  $\mu\text{M}$ ), in the presence or absence of different concentrations of CE and fractions of *P. glandulosus*. Then, TBARS production was determined by the colorimetric method as described by Ohkawa et al. (1979).

## 2.5. Cytotoxic and genotoxic effects

### 2.5.1. Blood collection and lymphocyte culture

In this work, peripheral blood samples were obtained from three discard of samples of School Laboratory of Clinical Analysis of Franciscan University, under approval by the Ethics Committee for Research with Human Beings of the institution (CAAE: 31211214.4.0000.5306) without identification. The samples were collected after 12 h and obtained by venipuncture a top Vacutainer® (BD Diagnostics, Plymouth, UK) and heparin tubes, which were used to separate the peripheral blood mononuclear cells (PBMC) and subsequent treatments and cell cultures.

### 2.5.2. Treatments

To evaluate the protective effects of cytotoxic and genotoxic of CE and fractions of *P. glandulosus* on cell viability and chromosome damage in human lymphocytes, was carried a similar experimental protocol described by Wilms et al. (2005) in PBMC. Cell cultures were exposed at different concentrations of crude extract and fractions of *P. glandulosus* (250, 125, 62.5, 31.25, 15.62 and 7.81 µg/mL). The culture medium containing the cells was used as negative control and the culture medium with 100 mM of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, as a positive control.

The separations of the PBMC occurred by density gradient (Histopaque® - 1077) through of centrifugation and the concentration of  $2 \times 10^5$  cells was obtained by counting in Neubauer chamber with 0.4% Trypan blue. Cell viability by MTT, TBARS, mitotic index and chromosomal instability were analyzed.

### 2.5.3. Cell viability by MTT assay

The cell viability was evaluated according a method described by Mosman (1983), using the MTT assay. The cytotoxic activity in PBMC was determined by colorimetric method that measures the reduction of yellow 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl) -2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) by mitochondrial succinate dehydrogenase (Choi et al., 2002). To

perform the MTT assay was dissolved in a 5 mg/mL phosphate buffer (PBS, 0.01 mol/L; pH 7.4), added into a 96-well microplate containing the CE and fractions of *P. glandulosus* and controls, and incubated for 4 h. In addition, the supernatant was removed from the wells and the cells were resuspended in DMSO. The absorbance at 560 nm was read in a TP-Reader (Thermoplate, China). This assay was performed in triplicate for each treatment and the results were expressed as a percentage of the control value.

#### 2.5.4. Evaluation of mitotic index and chromosomal instability

The evaluation of chromosomal instability was performed according to Souza Filho et al. (2013). The PBMC were resuspended in culture medium to an atmosphere of 37°C and 5% CO<sub>2</sub> for 72 h. The metaphases were analyzed in objective 1000x, evaluating the the core size, the presence of chromosomal instability and metanucleares changes.

### 3.1. Effect of CE, BuOH fraction and GA on the protoscolecis viability of *E. ortleppi*

#### 3.1.2. Biological samples

Hydatid cysts in lungs and livers of naturally infected bovine were collected in a slaughterhouse in the central region of RS. The protoscolecis viability was assessed with 0.1% eosin (Moazeni et al., 2012). The percentage considered suitable for the development of our experimental test was 100% of viability.

#### 3.2. Scolicidal assay

In this study, it was used CE in concentration of 350 mg/mL of *P. glandulosus*. Distilled water was used as dilution vehicle of the agents. In each experiment, 500 µL of the solution was placed in a test tube, to which 7 µL of protoscolex rich sediment (about 1000 protoscolecis) was added. The contents of the tube was gently mixed, this procedure was repeated in times of 5, 10, 15 and 30 minutes for each concentration tested. At the end of each incubation the upper phase was removed and 500 µL of 0,1% eosin stain was then added to the protoscolecis and mixed gently. After 15 min of incubation the pellet of protoscolecis

was examined in microscope optic. The percentages of viability were determined by counting minimum of 700 protoscoleces (Moazeni et al., 2012).

### 3.3. Viability assay

The viability was evaluated by the same optical microscope, at different times described, observing motility and eosin staining, performing a count of 500 protoscoleces (7  $\mu$ L hydatid cyst fluid) each evaluation. The protoscoleces were considered viable, when they presented motility and unstained, and not viable with no motility and stained (Moazeni et al., 2012; Yones et al., 2011).

## 4. Statistical Analysis

The results obtained for DPPH, TBARS, scavenging of ROS, total phenolics and flavonoids assays and cytotoxic were analyzed statistically by one-way analysis of variance (ANOVA), followed by Tukey test using the statistical package SAS (2001). For viability protoscoleces analysis, survival curves were plotted using Kaplan-Meier and differences were analyzed using the chi-square test. The experiments were performed in triplicate and when appropriate  $p < 0.05$ ,  $p < 0.01$  or  $p < 0.001$  were considered significant. Data were expressed as mean  $\pm$  SD.

## 5. Results

### 5.1. Phytochemical analysis

In this work, the quantification of total polyphenols and flavonoids in the CE and fractions  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , AcOEt and BuOH obtained from *P. glandulosus* leaves are described in Table 1. Polyphenols and flavonoids content varied significantly between the extracting solvent. The AcOEt fraction stood out for presenting the highest concentration of both classes of secondary metabolites studied, polyphenols and flavonoids (156.88 mg/g and 216.03 mg/g), respectively. The CE presented the second highest content of polyphenols (132.30 mg/g), followed by BuOH and  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  fractions. To analyze of flavonoids, the  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$

fraction showed the second biggest concentration and of intermediate form for CE and the lowest in BuOH fraction.

**Table 1**

Total polyphenols and flavonoids for crude extract and fractions of *P. glandulosus*.

<b>Extract/fraction</b>	<b>TP ± SD (mg GAE/g)</b>	<b>TF ± SD (mg RE/g)</b>
<b>CE</b>	132.30 <sup>d</sup> ± 1.26	146.80 <sup>c</sup> ± 1.08
<b>CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub></b>	79.56 <sup>c</sup> ± 1.76	169.43 <sup>a</sup> ± 1.94
<b>AcOEt</b>	156.88 <sup>a</sup> ± 1.55	216.03 <sup>b</sup> ± 1.56
<b>BuOH</b>	100.03 <sup>b</sup> ± 2.79	108.27 <sup>c</sup> ± 1.31

Values are expressed as mean ± standard deviation. <sup>a-d</sup> Means with the different letters in each column are significantly different ( $p < 0.05$ ) according to the Tukey test ( $n = 3$ ).

By HPLC analysis, it was possible to identify and quantify the presence of gallic acid in all fractions obtained from leaves of *P. glandulosus* being that the highest content was found in the butanol fraction ( $10.37 \pm 1.24$  mg/g), followed by the crude extract and dichloromethane fraction showed the same value ( $1.79 \pm 0.05$  mg/g) and ethyl acetate fraction ( $0.78 \pm 0.03$  mg/g).

## 5.2. Antioxidant capacity

Table 2 show the values of IC<sub>50</sub> of the crude extract and fractions from *P. glandulosus* leaves in the antioxidant capacity assay by DPPH and TBARS methods.

In this study, the best capabilities sequestrant DPPH radical were observed in CE (IC<sub>50</sub>:132.57 µg/mL), followed by EtOAc fraction (IC<sub>50</sub>:150.27 µg/mL). The BuOH fraction exhibited a moderate activity (IC<sub>50</sub>:187.95 µg/mL) and the CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> fraction showed weak antioxidant capacity (IC<sub>50</sub>: 207.39 µg/mL).

The EtOAc fraction had a significant reduction in lipid peroxidation in the concentration range between 62.5 and 250 µg/ml, presenting the best results compared to other fractions (IC<sub>50</sub> of  $45.28 \pm 7.81$  µg/mL), as can be seen in Table 2, Fig. 1.

The CE and CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> fraction showed a significant antioxidant effect only at the highest concentration tested (250 µg/ml), showing an IC<sub>50</sub> of  $162.42 \pm 4.20$  and  $242.80 \pm 5.64$  µg/ml,

respectively. The BuOH fraction no significantly reduced the production of ROS in relation to baseline (non-induced group) at the concentrations tested (Table 2, Fig. 1).

In this study, the CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> fraction at a concentration of 31.2 µg/mL was able to significantly reduce the oxidation of DCFH and consequently reduce the oxidative stress observed in supernatant of rat brain homogenate, compared to the basal group, demonstrating pronounced antioxidant activity and CE and others fractions from the concentration of 62.5 µg/mL (Fig. 2). BHT, used as control, reduced in a significant manner the oxidation of DCFH-DA, at 15.6 µg/mL.

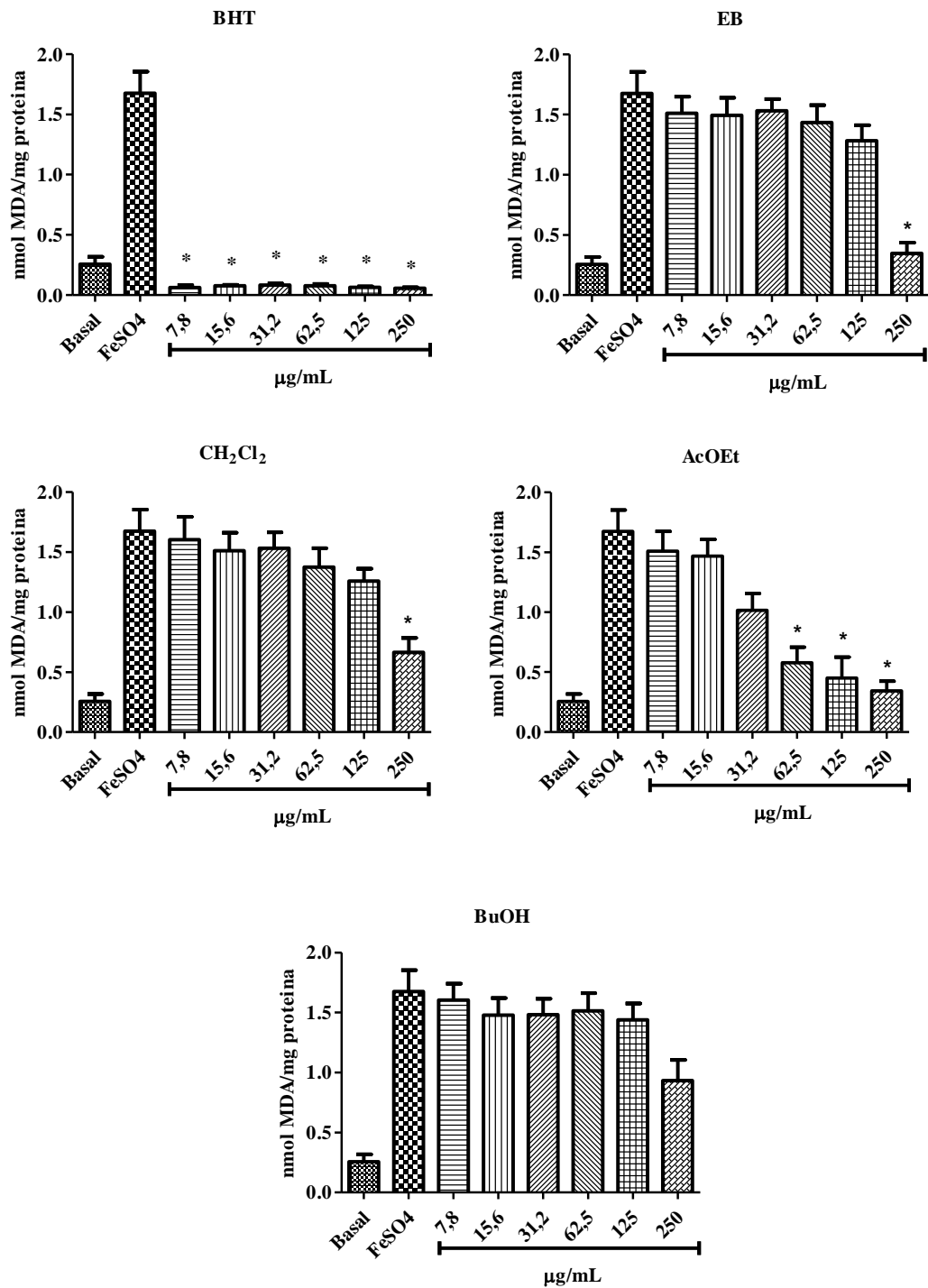
**Table 2**

Antioxidant capacity for crude extract and fractions of *P. glandulosus* by DPPH and TBARS methods

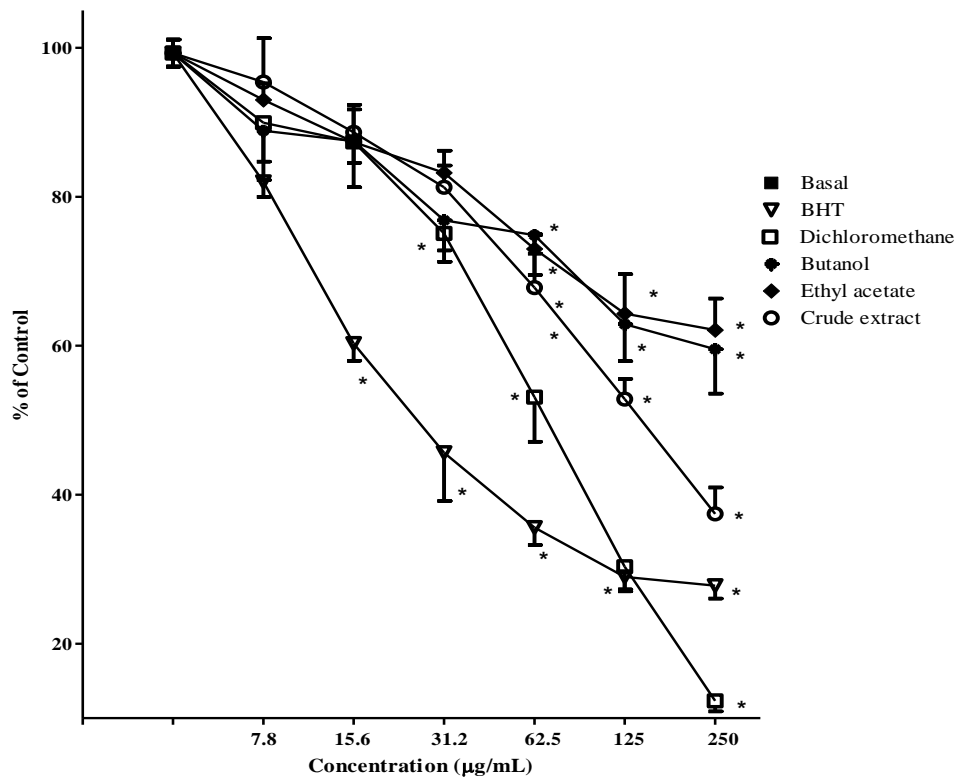
Extract/fraction	IC <sub>50</sub> ± SD (µg/mL)	
	DPPH	TBARS
<b>CE</b>	132.57±0.25 <sup>a</sup>	162.42 ± 4.20 <sup>a</sup>
<b>CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub></b>	207.39±0.48 <sup>b</sup>	242.80 ± 5.64 <sup>b</sup>
<b>AcOEt</b>	150.27±0.21 <sup>d</sup>	45.28 ± 7.81 <sup>c</sup>
<b>BuOH</b>	187.95±0.25 <sup>c</sup>	#
<b>Ascorbic acid</b>	15.98 ± 0,42 <sup>e</sup>	-
<b>BHT</b>	-	*

Values are expressed as mean ± standard deviation. <sup>a-e</sup> Means with the different letters in each column are significantly different ( $p < 0.05$ ) according to the Tukey test (n = 3). The IC<sub>50</sub> value found by linear regression corresponding to a value smaller than the concentrations tested. # The value of IC<sub>50</sub> found by linear regression corresponding to a value higher than the concentrations tested.





**Fig. 1.** Effect of different concentrations of CE and fractions from the leaves of *P. glandulosus* on Fe(II) (10  $\mu$ M)-induced TBARS production in brain homogenates. Dates are expressed as means  $\pm$  S.D., (n=3). Significant differences are indicated by \*  $p \leq 0.05$  when compared with FeSO<sub>4</sub> group.



**Fig. 2.** Effect of the crude extract and fractions of the leaves from *P. glandulosus* on scavenging of ROS in rat brain cells, by DCFH-DA method. \*Data are expressed as means  $\pm$  S.D. (n = 3). \* Significant difference from the basal group ( $p < 0.05$ ).

#### 4.3. Cytotoxic and genotoxic effects

In the table 3 is represented the potential cytotoxicity and genotoxic of the crude extract and fractions from *P. glandulosus* leaves in at different concentrations. The chromosome instability was not detected in the concentrations tested. Also, it was not observed karyiopyknosis e Karyorrhesis.

The effect on cell viability of crude extract and fractions of *P. glandulosus* was determined for MTT assay at peripheral blood mononuclear cells, in order to investigate its cytotoxic effects (Fig. 3). This effect was evaluated using the hydrogen peroxide as the cytotoxic agent. The extract was added after it, to assess the cytotoxic effects on cell viability against  $H_2O_2$  of *P. glandulosus* extracts.

**Table 3**

Karyotypes alteration in human health peripheral blood mononuclear cells exposed to different *P. glandulosus* extracts concentrations

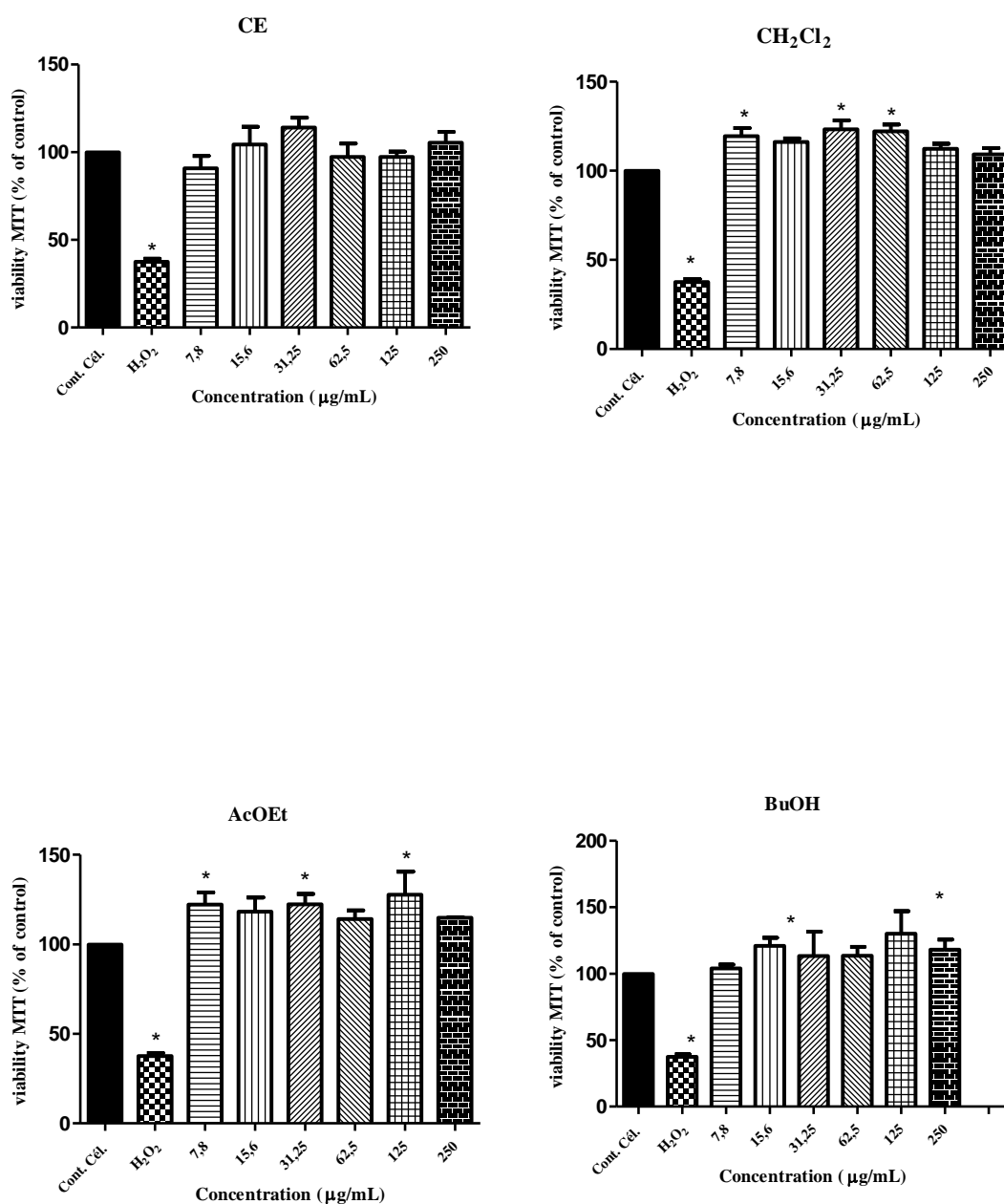
Extracts/concentration ( $\mu\text{g/mL}$ )	Total nuclei (n)	Intact metaphase s (%)	Instability chromosomal markers (%)		
			Broken chromosome s	Karyopyknosis	Karyorrhexis/ Karyolysis
<b>Control</b>	500 $\pm$ 3	150 $\pm$ 3	-	-	-
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	200 $\pm$ 3	50 $\pm$ 3	50 chromatid and centromeric		
<b>Crude extract</b>					
7.8	490 $\pm$ 3	144 $\pm$ 6	-	-	-
15.6	502 $\pm$ 2	151 $\pm$ 3	-	-	-
31.25	507 $\pm$ 3	155 $\pm$ 5	-	-	-
62.5	506 $\pm$ 4	154 $\pm$ 3	-	-	-
125	510 $\pm$ 3	150 $\pm$ 4	-	-	-
250	501 $\pm$ 2	150 $\pm$ 3	-	-	-
<b>Dichlorometane</b>					
7.8	498 $\pm$ 3	141 $\pm$ 6	-	-	-
15.6	460 $\pm$ 2	125 $\pm$ 3	-	-	-
31.25	501 $\pm$ 3	150 $\pm$ 5	-	-	-
62.5	454 $\pm$ 4	150 $\pm$ 3	-	-	-
125	467 $\pm$ 3	157 $\pm$ 4	-	-	-
250	461 $\pm$ 2	150 $\pm$ 3	-	-	-
<b>Ethyl Acetate</b>					
7.8	530 $\pm$ 3	180 $\pm$ 6	-	-	-
15.6	502 $\pm$ 2	130 $\pm$ 3	-	-	-
31.25	515 $\pm$ 3	170 $\pm$ 5	-	-	-
62.5	512 $\pm$ 4	164 $\pm$ 3	-	-	-
125	510 $\pm$ 3	158 $\pm$ 4	-	-	-
250	510 $\pm$ 2	159 $\pm$ 3	-	-	-
<b>Butanol</b>					
7.8	490 $\pm$ 3	144 $\pm$ 6	-	-	-
15.6	515 $\pm$ 2	154 $\pm$ 3	-	-	-
31.25	503 $\pm$ 3	145 $\pm$ 5	-	-	-
62.5	501 $\pm$ 4	144 $\pm$ 3	-	-	-
125	518 $\pm$ 3	158 $\pm$ 4	-	-	-
250	504 $\pm$ 2	149 $\pm$ 3	-	-	-

n, number of nuclei counted in each treatment present in central region of glass slide.

<sup>a</sup>Percentage of cells in the metaphase phase divided by total nuclei.

The effect on cell viability of crude extract and fractions of *P. glandulosus* was determined for MTT assay at peripheral blood mononuclear cells, in order to investigate its cytotoxic effects (Fig. 3). This effect was evaluated using the hydrogen peroxide as the cytotoxic agent. The extract was added after it, to assess the cytotoxic effects on cell viability against H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> of *P. glandulosus* extracts.

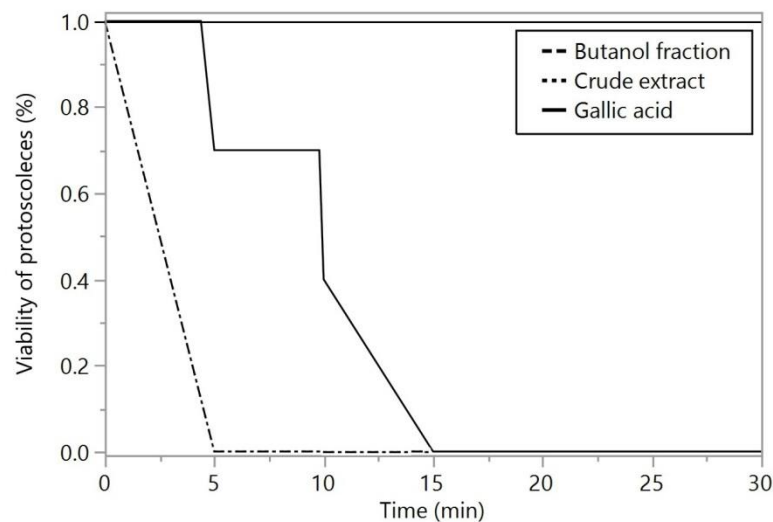
All concentrations tested (7.8 at 250  $\mu\text{g/mL}$ ) of the crude extract and fractions of *P. glandulosus* did not show a significant decrease in cell viability, different of the control  $\text{H}_2\text{O}_2$  that showing cytotoxicity. In addition, it was revealed cell proliferation in some tested concentrations of the  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (7.8, 31.25 and 62.5  $\mu\text{g/mL}$ ), AcOEt (7.8, 31.25 and 125  $\mu\text{g/mL}$ ) and BuOH (15.6 and 125  $\mu\text{g/mL}$ ) fractions.



**Fig. 3.** Effect of CE and fractions of *P. glandulosus* on chromosomal instability incubation with  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Results are mean  $\pm$  SD for  $n = 3$ . Significant differences are indicated by \*  $p \leq 0.05$  using analysis of variance followed by Tukey test.

#### 4.4. Effect of CE on the protoscolecus viability of *E. ortleppi*

For this study, the protoscolecus were identified molecularly as the specie *E. ortleppi*. The effect of *P. glandulosus* front *E. ortleppi* protoscolecus revealed that CE and BuOH fraction at concentration of 350 mg/mL can kill all protoscolecus acting in 5 minutes of application (Fig. 4). GA was found in larger quantities in the CE and BuOH-F of *P. glandulosus* leaves by HPLC/DAD analysis, which led us to conduct this study with the standard and these extracts in an attempt to justify this activity. The GA was able to kill all protoscolecus in 15 minutes of exposure at concentration 7 mg/mL.



**Fig. 4.** *In vitro* effects on the viability of protoscolecus when submitted to CE 350 mg/mL, BuOH fraction 350 mg/mL of *P. glandulosus* and GA 7 mg/mL in different exposure times.

## 5. Discussion

The present study investigated the content phenols, antioxidant capacity, effect of extracts of gaiana on lymphocyte cells exposed to the toxic effect of  $H_2O_2$  and the scolicidal action.

The high content of polyphenols and flavonoids was performed in the ethyl acetate fraction. Similar findings were related by Brum et al., (2013), analyzing different fractions of *Vitex megapotamica*, Boligon et al., (2013) with *Tabernaemontana catharinensis* and Marathakam et al., (2012) at *Justicia beddomei*. According Canadovic et al. (2008), extracts

obtained with polar solvents, reveal the presence of high concentrations of phenolic compounds.

To verify the presence of GA in the CE and fractions of *P. glandulosus*, the samples were subjected to HPLC/DAD analysis. Phenolic acids are considered efficient hydrogen donors due to their characteristic carboxylic acid group, which is easily ionized, determining their antioxidant activity (Palafox et al., 2012). In this study, the GA was identified in all fractions, presenting higher content in the BuOH fraction. Besides of the antioxidant activity, the GA has a variety of pharmacological actions, such as anti-inflammatory, antimicrobial, antiviral and antitumor activities (Kim, 2007; Özçelik *et al.*, 2011). This compound also was found in the branches of *P. glandulosus* by our research group (results not showed).

Phenolic compounds, such as flavonoids and phenolic acids exert a wide variety of biological effects, including anticarcinogenic, antimutagenic and antioxidative activities (Kilani et al., 2005, Yilmaz et al., 2007, Bhourri et al., 2010). According Amarowicz et al., (2010) the antioxidant activity of these compounds is mainly due to their redox properties, which allow them to act as reducing agents or hydrogen-atom donors.

DPPH is a stable free radical used for analyzing the antioxidant ability of extracts and pure substances and also indicates the presence of phenolic and flavonoid compounds (Rice-Evans, Miller and Paganga, 1996). The crude extract and AcOEt fraction showed the best results in the antioxidant capacity measured by this method and also the high level of polyphenols and flavonoids. So is possible to attribute the antioxidant capacity seen in the DPPH assay to the presence of these compounds. This relationship has been described by other authors and is already well established, using similar assay systems (Zadra et al., 2012; Fröhlich et al., 2013).

The antioxidant capacity of the crude extract and fractions were tested on TBARS production in brain, induced by Fe(II), a known pro-oxidant. The AcOEt fraction was also a

highlight in this test and it is suggested that this effect is due to the large amounts of polyphenols and flavonoids found in this fraction, because are known to inhibit lipid peroxidation and lipoxygenase *in vitro* (Sousa et al., 2007). In addition, the DCFH assay as realized to evaluate the antioxidant capacity of the crude extract and fractions of *P. glandulosus* leaves. This method is widely used to determine oxidative stress in cells (Wang and Joseph, 1999). This assay is to evaluate the ability of antioxidant molecules in the extract to scavenge ROS produced by normal metabolism by cells, and then inhibit the oxidation of DCFH to DCF, observed by the decrease in fluorescence intensity. Our results suggest that crude extract and fractions were able to significantly reduce the oxidation of DCFH in low concentrations, demonstrating pronounced antioxidant activity.

The determination of cyto/genotoxicity activity *in vitro* of CE and fractions of *P. glandulosus* was performed in the same concentrations that DPPH, TBARS and DCFH assay. In general, the results showed a beneficial effect of *P. glandulosus* extracts on the cyto and genotoxicity lymphocytes exposed to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

Unrepaired DNA damage, as well as to elevated ROS concentrations can be related with the development of the various human diseases like diabetes, neurodegenerative diseases and many cancers (Waris and Ahsan, 2006; Klaunig et al., 2010). Studies have been showing that plants, vegetables and fruits are rich in flavonoids and polyphenols, allowing an extra protection to the chromosomes and DNA against oxidative damage and cancer (Lin et al, 2012; Boligon et al., 2012; Chen et al, 2011). Antioxidants can avoid DNA damage and its consequences, through cell detoxification processes from ROS. The cells, by themselves, have an antioxidant system, but there are several compounds present in natural products which present the ability of reacting with ROS and inactivate them without generating further radicals (Silva and Coutinho, 2010).

The results found in this study revealed that extracts of *P. glandulosus* leaves showed not cytotoxicity and genotoxicity at concentrations tested. The higher content polyphenols and flavonoids and the GA present in crude extract and fractions of *P. glandulosus* leaves probably are in charge of these results and antioxidant capacity verified.

An ideal scolicial agent is define as being potent in low concentrations, acting in a short period time, being stable in cyst fluid, not affected by dilution with the cyst fluid, being able to kill the protoscolecetes in the cyst, being non-toxic, having low viscosity, and being readily available and easily prepared, as well as being inexpensive (Moazeni and Nazer, 2010).

In this study, the protoscolecetes were identified molecularly as the specie *E. ortleppi*. The tests with *P. glandulosus* extracts showed highly significant scolicial effects of the CE and BuOH fraction in a short period time. This action can be explained by good activity of GA standard that was identified by HPLC-DAD analysis in this specie that also able to kill all protoscolecetes. Furthermore, other compounds can be acting, such as polyphenols and flavonoids, as well the compounds identified: maslinic acid, uvaol and sitosterol by Brum and collaborators (2016) and other yet unidentified.

Some studies have shown that uvaol and maslinic acid has a variety of pharmacological actions, acting specially to prevent lipid peroxidation (Montilla et al., 2003; Perona et al., 2005), protect low-density lipoproteins (LDL) against oxidation (Allouche et al., 2010; Andrikopoulos et al., 2002), and suppress superoxide anion generation (Leu et al., 2004) and were active to inhibit the growth of tumor cell lines from various human cancers (Ruan et al., 2008; Martín et al., 2007,2009; Rufino-Palomares et al., 2015). These compounds can be responsible in part for the activities described for *P. glandulosus* in our study.



Our group of study demonstrated in other *in vitro* experiments, the antioxidant activity, the significant potential scolicial action and revealed the presence of gallic acid by HPLC and a preliminary phytochemical analysis verified the presence of the coumarins, phenols, cardioactive heterosides and triterpenoids and steroids with branches of *P. glandulosus* (results not showed). The results of *P. glandulosus* leaves were similar to those demonstrated by the branches of this species.

## 6. Conclusions

The present study demonstrated that crude extract and fractions of *P. glandulosus* leaves showed not *in vitro* cytotoxicity and genotoxicity at concentrations tested, possibly by decreasing oxidative stress by their antioxidant capacity verified. These activities along with effective action scolicial from *E. ortleppi* can suggest promising and inexpensive alternative. It is necessary to investigate the action mechanism(s) and the different scolicial effects of *P. glandulosus in vivo*. Besides that, studies *in vivo* of efficacy and safety this specie are necessary to determine the concentration that is effective and safe dose.

## Acknowledgments

The authors would like to thank Prof. Dra. Margareth Linde Athayde by orientation and support for this work be realized, the Prof. Dr. Renato Aquino Záchia for providing the identification of *Poikilacanthus glandulosus* and Dra. Carolina Bremm by statistical analysis. The authors thank fellowships from FAPERGS (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul) /Brazil.

## References

- Barneche, S., Bertucci, A., Haretche, F., Olivaro, C., Cerdeiras, M.P., Vázquez, A.,2010. Prospección química y microbiológica del bosque de galería del río Uruguay. Braz. J. Pharmcog. 20, 878-885.
- Boligon, A.A., Brum, T.F., Frohlich, J.K., Froeder, A.L.F., 2012. HPLC/DAD profile and determination of total phenolics, flavonoids, tannins and alkaloids contents of *Scutia buxifolia* Reissek stem bark. Res. J. Phytochem. 3, 84-91.

- Boligon, A.A., Freitas, R.B., Bum, T.F., Piana, M., Belke, B.V., Rocha, J.B.T., Athayde, M.L., 2013. Phytochemical constituents and in vitro antioxidant capacity of *Tabernaemontana catharinensis* A. DC. *Free Radicals and Antioxidants*. 3, 77-80.
- Brum, T.F., Zadra, M., Piana, M., Boligon, A.A., Fröhlich, J.K., Freitas, R.B., Stefanello, S.T., Froeder, A.L.F., Belke, B.V., Nunes, L.T., Jesus, R.S., Machado, M.M., Rocha, J.B.T., Soares, F.A.A., Athayde, M.L., 2013. HPLC Analysis of Phenolics Compounds and Antioxidant Capacity of Leaves of *Vitex megapotamica* (Sprengel) Moldenke. *Molecules*. 18, 8342-8357.
- Brum, T.F., Camponogara, C., Jesus, R.S., Belke, B.V., Piana, M., Boligon, A.A., Pires, F.B., Oliveira, S.M., Rosa, M.B., Bauermann, L.F., 2016. Ethnopharmacological study and topical anti-inflammatory activity of crude extract from *Poikilacanthus glandulosus* (Nees) Ariza leaves. *Journal of Ethnopharmacology*. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2016.07.075>.
- Canadovic, B.J., Cetkovic, G., Dilas, S., Tumbas, V., Bogdanovic, G., Mandic, A., Markov, S., Cvetkovic, D., Canadanovic, V., 2008. Radical scavenging, antibacterial, and antiproliferative activities of *Melissa officinalis* L. extracts. *J. Med. Food*. 11, 133-143.
- Chandra, S., Mejia, E.G., 2004. Polyphenolic compounds, antioxidant capacity and quinone reductase activity of an aqueous extract of *Ardisia compressa* in comparison to *Mate (Ilex paraguayensis)* and *Green (Camellia sinensis)* Teas. *J. Agric. Food Chem*. 52, 3583-3589.
- Choi, C.W., Kim, S.C., Hwang, S.S., Choi, B.K., Ahn, H.J., Lee, M.Y., Park, S.H., Kim, S.K., 2002. Antioxidant activity and free radical scavenging capacity between Korean medicinal plants and flavonoids by assay-guided comparison. *Plant. Sci*. 163, 1161-1168.
- Dahech, I., Farah, W., Trigui, M., Hssouna, A.B., Belghith, H., Belghith, K.S., Abdallah, F., B., 2013. Antioxidant and antimicrobial activities of *Lycium shawii* fruits extract. *International Journal of Biological Macromolecules*. 60, 328-333.
- Hartmann, A., Agurell, E., Beevers, C., Brendler-Schwaab, S., Burlinson, B., Clay, P., Collins, A., Smith, G. Speit, G., Thybaud, V., Tice, R. R., 2003. Recommendations for conducting the *in vivo* alkaline comet assay. *Mutagenesis*. 18, 45-51.
- Kumar, R., Hemalatha, S. 2011. *In-vitro* antioxidant activity of alcoholic leaf extract and subfractions of *Alangium lamarckii* Thwaites. *J. Chem. Pharm. Res*. 3, 259-267.
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., Randall, R.J., 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Biol. Chem*. 193, 265-275.
- Marathakam, A., Kannappan, N., Jasemine, S., Santhiagu, A., Sreejith, M., Ajith, M.P., 2012. Studies on phytochemical and *In-Vitro* antioxidant potential of *Justicia beddomei* (Clarke) Bennett. *Free Radicals and Antioxidants*. 2, 26-31.
- Moorhead, P. S., Nowell, P. C., Mellman, W. J., Battips, D. M., Hungerford, D. A., 1960. Chromosomes preparations leucocytes cultured from human peripheral blood. *Experimental Cell Research*. 20, 613-616.

- Morrison, I. M., Asiedu, E. A., Stuchbury, T., Powell, A. A., 1995. Determination of lignin and tannin contents of Cowpea seed coats. *Ann. Bot. London.* 76, 287–290.
- Mosman, T., 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal Immunology Methods.* 65, 55-63.
- Myrhe, O., Andersen, J.M., Aarnes, H., Fonnum, F., 2003. Evaluation of the probes 2',7'-dichlorofluorescein diacetate, luminol, and lucigenin as indicators of reactive species formation. *Biochem. Pharmacol.* 65, 1575–1582.
- Ohkawa, H., Ohishi, N., Yagi, K., 1979. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem.* 95, 351–358.
- Singh, N., McCoy, M., Tice, R., Schneider, E., 1988. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp. Cell Res.* 175, 184–191.
- Speit, G., Hanelt, S., Helbig, R., Seidel, A., Hartmann, A., 1996. Detection of DNA effects in human cells with the comet assay and their relevance for mutagenesis. *Toxicol. Lett.* 88, 91–98.
- Tice, R. R., Agurell, D., Anderson, D., Burlinson, B., Hartmann, A., Kobayashi, H., Miyamae, Y., Rojas, E., Ryu, J. C., Sasaki, Y. F., 2000. Single cell gel/comet assay: Guidelines for *in vitro* and *in vivo* genetic toxicology testing. *Environ. Mol. Mutagen.* 35, 206–221.
- Wilms, L. C., Hollman, P. C. H., Boots, A. W., Kleinjans, J. C. S., 2005. Protection by quercetin and quercetin-rich fruit juice against induction of oxidative DNA damage and formation of BPDE-DNA adducts in human lymphocytes. *Mutation Research.* 582, 155-162.
- Woisky, R.G., Salatino, A., 1998. Analysis of propolis: some parameters and procedures for chemical quality control. *J. Apicult. Res.* 37, 99–105.
- Hasnat, M. A., Pervin, M., Lim, B.O., 2013. Acetylcholinesterase inhibition and *in vitro* and *in vivo* antioxidant activities of *Ganoderma lucidum* grown on germinated brown rice. *Molecules.* 18, 6663–6678.
- Büchner, F.L., Bueno-de-Mesquita, H. B., Linseisen, J et al., 2010. Fruits and vegetables consumption and the risk of histological subtypes of lung cancer in the European prospective investigation into cancer and nutrition (EPIC). *Cancer Causes and Control.* 21, 357–371.
- Soerjomataram, I., Oomen, D., Lemmens, V., Oenema, A., Benetou, V., Trichopoulou, A., Coebergh, J.W., Barendregt, J., de Vries, E., 2010. Increased consumption of fruit and vegetables and future cancer incidence in selected European countries. *European Journal of Cancer.* 46, 2563–2580.
- Akaneme, F. I., Amaefule, C. C., 2012. Evaluation of the cytotoxicity and genotoxicity of aqueous leaf extracts of *Azadirachta indica* A. Juss using the *Allium test*. *Journal of Medicinal Plants Research.* 6, 3898–3907.

- Munari, C.C., Oliveira, P.F., Lima, I. M. S., Martins, P. L. S., Costa, C. J., Bastos, J. K., Tavares, D. C., 2012. Evaluation of cytotoxic, genotoxic and antigenotoxic potential of *Solanum lycocarpum* fruits glicoalkaloid extract in V79 cells. *Food and Chemical Toxicology*. 50, 3696–3701.
- Rietjens. I. M. C. M., Martena, M.J., Boersma, M. G., Spiegelenberg, W., Alink, G. M., 2005. Molecular mechanisms of toxicity of important food-borne phytotoxins. *Molecular Nutrition & Food Research*. 49, 131–158.
- Block, G., Patterson, B., Subar, A., 1992. Fruit, vegetables, and cancer prevention: a review of the epidemiological evidence. *Nutr. Cancer* 18, 1–29.
- Nakatani, N., 2000. Phenolic antioxidants from herbs and spices. *Biofactors* 13,141–146.
- Wong, W.S., McLean, A.E., 1999. Effects of phenolic antioxidants and flavonoids on DNA synthesis in rat liver, spleen, and testis in vitro. *Toxicology* 139, 243–253.
- Ferguson, L.R., 2001. Role of plant polyphenols in genomic stability. *Mutat. Res.* 475, 89–111.
- Noguchi, N., Niki, E., 2000. Phenolic antioxidants: a rationale for design and evaluation of novel antioxidant drug for atherosclerosis. *Free Radic. Biol. Med.* 28, 1538–1546.
- Undeğer, U., Başaran, A., Degen, G., Başaran, N., 2009. Antioxidant activities of major thyme ingredients and lack of (oxidative) DNA damage in V79 Chinese hamster lung fibroblast cells at low levels of carvacrol and thymol. *Food Chem. Toxicol.* 47, 2037–2043.
- Zadra, M., Piana, M., Brum, T. F., Boligon, A. A., Freitas, R. B., Machado, M. M., Stefanello, S. T., Soares, F. A. A., Athayde, A. L., 2012. Antioxidant activity and phytochemical composition of the leaves of *Solanum guaraniticum* A. St.-Hil. *Molecules*. 17, 12560–12574.
- Fröhlich, J. K., Froeder, A. L. F., Janovik, V., Venturini, T. P., Pereira, R. P., Boligon, A. A., Brum, T. F., Alves, S. H., Rocha, J. B. T., Athayde, M. L., 2012. Antioxidant capacity, antimicrobial activity and triterpenes isolated from *Jatropha isabellei* Müll. *Arg. Nat. Prod. Res.* 2, 27, 1049–1059.
- Rice-Evans, C. A., Miller, N.J., Paganga, G., 1996. Structure–antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radical Biology and Medicine*. 20, 933–956.
- Kilani, S., Ben Ammar, R., Abdelwahed, A., Hayder, N., Mahmoud, A., Ben Chibani, J., Chekir-Ghedira, L., Ghedira, K., 2005. Evaluation of the antimutagenic and antiradical potentials of extracts from the tubers of (Tunisian) *Cyperus rotundus*. *Environ. Toxicol. Chem.* 87, 415–425.
- Yilmaz, O., Keser, S., Tuzcu, M., Cetintas, B., 2007. Resveratrol (trans-3,40,5-trihydroxystilbene) decreases lipid peroxidation level and protects antioxidant capacity in sera and erythrocytes of old female Wistar rats induced by the kidney carcinogen potassium bromate. *Environ. Toxicol. Pharm.* 24, 79–85.

- Bhourri, W., Derbel, S., Skandrani, I., Boubaker, J., Bouhlel, I.; Sghaier, M.B.; Kilani, S.; Mariotte, A.M.; Dijoux-Franca, M.G.; Ghedira, K.; Chekir-Ghedira, L., 2010. Study of genotoxic, antigenotoxic and antioxidant activities of the digallic acid isolated from *Pistacia lentiscus* fruits. *Toxicol. In Vitro.* 24, 509–515.
- Amarowicz, R., Pegg, R. B., Rahimi-Moghaddam, P., Barl, B., Weil, J. A., 2010. Free radical scavenging capacity and antioxidant activity of selected plant species from the Canadian prairies. *Food Chem.* 84, 551–562.
- Palafox-Carlos, H., Yahia, E. M., Gonzáles-Aguilar, G. A., 2012. Identification and quantification of major phenolic compounds (*Mangifera indica*, cv. Ataulfo) fruit by HPLC-DAD-MS/MS-ESI and their individual contribution to the antioxidant activity during ripening. *Food Chem.* 135, 105–111.
- Kim, Y.J., 2007. Antimelanogenic and antioxidant properties of gallic acid. *Biol. Pharm. Bull.* 6, 1052-1055.
- Özçelik, B., Kartal M., Orhan, I., 2011. Cytotoxicity, antiviral and antimicrobial activities of alkaloids, flavonoids, and phenolic acids. *Pharm. Biol.* 49, 396-402.
- Wang, H., Joseph, J. A., 1999. Quantifying cellular oxidative stress by dichlorofluorescein assay using microplate reader. *Free Radic. Biol. Med.* 27, 612–616.
- Allouche, Y., Beltran, G., Gaforio, J. J., Uceda, M., Mesa, M. D., 2010. Antioxidant and antiatherogenic activities of pentacyclic triterpenic diols and acids. *Food Chem. Toxicol.* 48, 2885-2890.
- Montilla, M. P., Agil, A., Navarro, M. C., Jimenez, M. I., Garcia-Granados, A., Parra, A. Cabo, M. M., 2003. Antioxidant activity of maslinic acid, a triterpene derivative obtained from *Olea europaea*. *Planta Med.* 69, 472-474.
- Perona, J. S., Arcemis, C., Ruiz-Gutiérrez, V., Catalá, A., 2005. Effect of dietary high oleic acid oils that are rich in antioxidants on microsomal lipid peroxidation in rats. *J. Agric. Food Chem.* 53, 730-735.
- Andrikopoulos, N. K., Kaliora, A. C., Assimopoulou, A. N., Papageorgiou, V. P., 2002. Inhibitory activity of minor polyphenolic and nonpolyphenolic constituents of olive oil against in vitro low-density lipoprotein oxidation. *J. Med. Food.* 5, 1-7.
- Leu, Y. L., Kuo, S. M., Hwang, T. S., Chu, S. H., 2004. The inhibition of superoxide anions generations by neutrophils from *Viscum articulatum*. *Chem. Pharm. Bull.* 2, 58-60.
- Juan, M. E., Wenzel, U., Daniel, H., Planas, J., M., 2008. Erythrodiol, a natural triterpenoid from olives, has antiproliferative and apoptotic activity in HT-29 human adenocarcinoma cells. *Mol. Nutr. Food Res.* 52, 595-599.
- Martín, R., Carvalho, J., Ibeas, E., Hernandez, M., Ruiz-Gutiérrez, V., Nieto, M. L., 2007. Acidic triterpenes compromise growth and survival of astrocytoma cell lines by regulating reactive oxygen species accumulation. *Cancer Res.* 67, 3741-3751.

Rufino-Palomares, E. E., Perez-Jimenez, F. J., Reyes-Zurita., 2015. Anti-cancer and anti-angiogenic properties of various natural pentacyclic tri-terpenoids and some of their chemical derivatives. *Current Organic Chemistry*. 19, 919–947.

Martín, R., Ibeas, E., Carvalho-Tavares, J., Hernández, M., Ruiz-Gutierrez, V., Nieto, M. L., 2009. Natural triterpenic diols promote apoptosis in astrocytoma cells through ROS-mediated mitochondrial depolarization and JNK activation. *PLoS One*. 22, 59–75.

Niura, N., Matsumoto, Y., Miyairi S., Nishiyama S., Naganuma A., 1999. Protective effects of triterpene compounds against the cytotoxicity of cadmium in HepG2 cells. *Mol. Pharmacol*. 56, 1324-13282.

5.4 CAPÍTULO 4 – PHYTOCHEMICAL, ANTIMICROBIAL AND ANTIMYCOBACTERIAL PROPERTIES *IN VITRO*: A COMPARISON BETWEEN LEAVES AND BRANCHES OF *P. glandulosus* (Nees) Ariza.

Thiele Faccim de Brum, Roberta da Silva Jesus, Camilla Filippi dos Santos Alves, Tanise Vendruscolo Dalmolin, Pauline Cordenonsi Bonez, Carolina Dolwitsch, Marli Matiko Anraku Campos, Roberto Christ Vianna, Marcelo Barcellos da Rosa, Liliane de Freitas Bauermann. Phytochemical, Antimicrobial and Antimycobacterial properties *in vitro*: a comparison between leaves and branches of *P. glandulosus* (Nees) Ariza.

Resultados preliminares a serem publicados em periódico de impacto na área abordada

**Phytochemical, Antimicrobial and Antimycobacterial properties *in vitro*: a comparison between leaves and branches of *P. glandulosus* (Nees) Ariza**

Thiele Faccim de Brum<sup>1</sup>, Roberta da Silva Jesus<sup>1</sup>, Camilla Filippi dos Santos Alves<sup>1</sup>, Tanise Vendruscolo Dalmolin<sup>1</sup>, Pauline Cordenonsi Bonez<sup>1</sup>, Carolina Dolwitsch<sup>1</sup>, Marli Matiko Anraku Campos<sup>1</sup>, Roberto Christ Vianna<sup>1</sup>, Marcelo Barcellos da Rosa<sup>1</sup>, Liliane de Freitas Bauermann<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Graduate Program in Pharmaceutical Sciences, Federal University of Santa Maria, Camobi Campus, Santa Maria, RS, 97105-900, Brazil.

\*Corresponding author:

Thiele Faccim de Brum, Graduate Program in Pharmaceutical Sciences, Federal University of Santa Maria, Avenida Roraima 1000, Cidade Universitária, Santa Maria, RS, 97105-900, Brazil. Tel.: +55 55 3220 9618; Fax: +55 55 3220 8248. E-mail: thichaim@gmail.com

**Abstract**

*Poikilacanthus glandulosus* is popularly known as “gaiana” and has been empirically used for therapeutic purposes, such as insect bites, cicatrization, inflammation, spider bite, contusion, phlebitis, nail fungus, spine, burn, and as a repellent and disinfectant. Phytochemical analysis, antimicrobial, antimycobacterial and antibiofilm forming activities of the crude extract and fractions of the branches and leaves of *P. glandulosus* were investigated. HPLC analysis revealed the presence of maslinic acid ( $2.024 \pm 0.10$  mg/g), uvaol ( $0.124 \pm 0.02$  mg/g) and sitosterol ( $0.502 \pm 0.05$  mg/g) in the CE of the leaves and  $\alpha$ -amyirin ( $0.60 \pm 0.05$  mg/g) and sitosterol ( $1.02 \pm 0.07$  mg/g) in the CE of the branches. In the CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> fraction leaves was identified maslinic acid ( $1.96 \pm 0.12$  mg/g) and sitosterol ( $1.79 \pm 0.10$  mg/g) and in the branches,  $\alpha$ -amyirin ( $0.55 \pm 0.01$  mg/g) and sitosterol ( $2.56 \pm 0.14$ mg/g). The best MIC were found against *S. mutans*, *S. aureus* and *S. saprophyticus* (6.48 mg/mL) for the leaves and *L. monocytogenes* and *S. mutans* (3.36 mg/mL) for the branches. The CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> fraction of the branches was highlight, being effective against *M. smegmatis* (MIC: 312.5  $\mu$ g/mL), *M. avium* (MIC: 625  $\mu$ g/mL) and *M. tuberculosis* (MIC 1250  $\mu$ g/mL). The CE and AcOEt fraction of leaves showed a reduction in biofilm formation by *S. aureus* in 23.79% and 24.66%, respectively. In relation to branches, CE inhibited of 44.1% against the biofilm formed by *S. mutans* and 26.76% front of *L. monocytogenes*.

**Keywords:** Gaiana, Antimicrobial, Biofilm



## 1 Introduction

*Poikilacanthus glandulosus* (Nees) Ariza (Acanthaceae) is a shrub and is popularly known as “gaiana” and has been empirically used for therapeutic purposes, such as insect bites, cicatrization, inflammation, spider bite, contusion, phlebitis, nail fungus, spine, burn, and as a repellent and disinfectant (Brum et al., 2016). Barneche et al., (2010) realized the antimicrobial screening through the acetone extract of *P. glandulosus* that showed no inhibition for the tested microorganisms. Recently, Brum et al., (2016) reported antiedematogenic and anti-inflammatory actions with the crude extract of *P. glandulosus* leaves and HPLC analysis revealed the presence of maslinic acid, uvaol and sitosterol (Brum et al., 2016). Furthermore, our group studies demonstrate the antioxidant capacity of the crude extract of the leaves and branches and its escolicida effect (unpublished results).

The shortage of new antimicrobial has been characterized as a public health emergency and pathogenic microorganisms resistant to antimicrobial used in therapy of infections have appeared both in the community and in hospitals (Gill et al., 2005; Olar et al., 2010; Glundlapalli et al., 2013).

Microbial biofilm formation of microorganisms is associated with persistent tissue and foreign body infections which are resistant to treatment with antimicrobial agents. The infections most frequently has been caused by *Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Escherichia coli* (Römling and Balsalobre, 2012). The treatment of these infections is conducted with high doses of antibiotics and by long-term therapy. In this context the toxicity and drug interactions in the treatment is often ineffective. Faced with this resistance to conventional antibiotics there is a great need to new antimicrobial drugs develop or new pharmaceutical forms and therefore new methods to reduce bacterial activity and combat associated infections (Pelgrift and Friedman, 2013).

In the present study we report the antimicrobial, antimycobacterial and antibiofilm activities of the crude extract and fractions of the branches and leaves from *P. glandulosus*. In addition, the phytochemical analysis of the non-polar compounds were verify by HPLC.

## 2 Material and Methods

### 2.1 Plant collection

Leaves and branches of *P. glandulosus* were collected in Santiago (Rio Grande do Sul State of Brazil) in May of 2012. A dried voucher specimen is preserved in the herbarium of the Department of Biology at Federal University of Santa Maria by registers numbers SMBD 12.442 and 13.178.

## 2.2 Extraction and partition of the leaves and branches

Plant material was dried at room temperature and powdered in a knife mill. The leaves (1.217 Kg) and branches (2.061 Kg) were macerated at room temperature with 70% ethanol for a week with daily shaking; the solvent was renewed several times. After filtration, the hydroalcoholic extract was evaporated under reduced pressure at a temperature below 40°C, in order to obtain the aqueous extract; part of this aqueous extract was evaporated to dryness to furnish the crude extract (CE). The remaining aqueous extract was partitioned with solvents of increasing polarity: dichloromethane, ethyl acetate and *n*-butanol. Finally, the fractions obtained were concentrated to dryness on a rotary evaporator.

## 2.3 Quantitative Analysis of non-polar Compounds by HPLC

For identification and quantification of the non-polar compounds was using the method of Schmidt (2016), which uses reverse phase chromatography with ultraviolet detection (UV-Vis). The chromatographic system Dionex used has pump P680 model, UVD- 170 detector and manual injection with handle of 100 µL. The chromatographic separation was carried out with a C18 Kinetex - 250 mm x 4,6 mm (Phenomenex), packed with 5 µm diameter particles, with precolumn of the same nature. The isocratic elution was conducted using mobile phase consists of Acetonitrile (ACN) and Tetrahydrofuran (THF) in the proportion of 90:10. Chromatographic operations were carried out at ambient temperature and in triplicate. The flow used was 0.5 mL.min<sup>-1</sup> and the peaks were detected at 210 nm.

## 2.4 Antimicrobial potential

### Microorganisms and preparation of inoculums

The following microorganisms used in the evaluation were obtained from American Type Culture Collection (ATCC): *Listeria monocytogenes* (ATCC 7644), *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923). Clinical and environmental isolates kindly provided by the Department of

Microbiology, Centro Universitário Franciscano (UNIFRA), were also used to test antimicrobial activity of *Poikilacanthus glandulosus* crude extracts and fractions: *E. coli* cepa A, *E. coli* cepa B, *Streptococcus mutans*, *Proteus mirabilis*, *Staphylococcus saprophyticus* and *Paenibacillus gluconolypticus*. All isolates were maintained on nutrient agar slants at 4°C. The inoculum of the tested microorganisms was prepared according to the Clinical Laboratory Standards Institute guidelines (CLSI, 2008) adjusted to 0.5 McFarland standard.

### 2.5 Disk diffusion test and determination of minimal inhibitory concentrations (MICs)

The disk diffusion test was chosen as screening test, following CLSI parameters, aiming the selection of sensitive microorganisms to the extract and fractions from the leaves and branches of *P. glandulosus*. The minimum inhibitory concentrations (MICs) were determined by microdilution technique, using Mueller–Hinton broth (Difco). The assay was carried out in 96-well microtitre plates. Each extract was mixed with an inoculum prepared in the same medium at a density adjusted per tube to 0.5 of the McFarland scale ( $1.5 \times 10^8$  CFU/mL) and the active extracts/fractions were diluted twofold serially ranging. Microtitre trays were incubated at 37°C and the MICs were recorded after 24 h of incubation. The MIC was defined as the lowest concentration of extract that inhibited bacterial growth. This test was performed in triplicate. The 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride was used as an indicator of microbial growth.

### 2.6 Antimicrobial assay on *Mycobacterium*

Antimycobacterial activity was tested against *Mycobacterium avium* LR541CDC, *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv (ATCC 25618) and *Mycobacterium smegmatis* mc<sup>2</sup> 155 (ATCC 700084). The suspensions were standardized through the range 0.5 Mac Farland scale and then diluted with Middlebrook 7H9 (MD7H9), supplemented with 10% OADC and 0.2% glycerol until the concentration of  $10^5$  UFC/mL. Plant extracts and fractions were dissolved in DMSO, at a concentration of 50.00 mg/mL and then diluted in MD7H9 until the desired concentrations and they were tested in triplicate. Sensitivity tests were performed by the method of broth microdilution second CLSI M7-A6. The plates *M. smegmatis* were incubated during 48 h, *M. avium* for 5 days and in *M. tuberculosis* for 7 days at 37°C. In order to verify

the existence or not of colony, growth was used dye MTT. Following it was considered as MIC (Minimum Inhibitory Concentration) the lowest concentration of the extract under test capable of producing inhibition of visible growth of the microorganisms used in microbiological assays.

### 2.7 Antibiofilm activity

Microtiter plate biofilm assay Biofilm study was performed by the method published by Merritt et al. (2005). Briefly, bacterial and fungal strains were individually inoculated in 5 ml of Trypticase soy broth (TSB) and grow up to stationary phase, respectively. Cultures diluted to 1:100 in TSB, and 100  $\mu$ l of each dilution pipetted to four wells in a sterile flat bottom microtiter plate. After incubation for 24 h in 37°C, planktonic bacteria removed from all of the wells and the extracts were added in the wells and serially diluted in TSB. After incubation for 24 h in 37 °C, planktonic bacteria removed from all of the wells and washed with distilled water for three times. 125  $\mu$ l of 0.1 % crystal violet solution (Sigma Chemical Co) added to each well, and then washed with distilled water. Microplates were inverted and vigorously tap on paper towels to remove any excess liquid and air dried. 200  $\mu$ l of 95 % ethanol poured in. Biofilm stains solubilized at room temperature. After shaking and pipetting of wells, 125  $\mu$ l of the solution from each well transferred to a new microtiter plate and relative biofilm formation was assayed by measuring the absorbance of the crystal violet solution at 600 nm (optical density—OD600). Negative control (only culture media), positive control for *S. aureus*, *S. mutans* or *L. monocytogenes* PA01 (without extracts).

## 3 Results and discussion

The analysis of non-polar compounds by HPLC was only performed with the CE and dichloromethane fraction ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ) of leaves and branches of gaimana, because it is expected to find in these extracts substances with these characteristics. HPLC analysis revealed the presence of maslinic acid ( $2.024 \pm 0.10$  mg/g), uvaol ( $0.124 \pm 0.02$  mg/g) and sitosterol ( $0.502 \pm 0.05$  mg/g) in the CE of the leaves from *P. glandulosus* (results published) by our research group and  $\alpha$ -amyrin ( $0.60 \pm 0.05$  mg/g) and sitosterol ( $1.02 \pm 0.07$  mg/g) in the CE of the branches. In the  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  fraction leaves was identified maslinic acid ( $1.96 \pm 0.12$  mg/g) and sitosterol ( $1.79 \pm 0.10$  mg/g) and in the branches,  $\alpha$ -amyrin ( $0.55 \pm 0.01$  mg/g) and sitosterol ( $2.56 \pm$

0.14mg/g). Among the various pharmacological activities of these compounds, the triterpenes have antimicrobial activity confirmed by other studies (Stavri et al., 2007; Copp and Pearce, 2007; Martins et al., 2011; Awolola et al., 2014).

The activities of the CE and fractions from the *P. glandulosus* leaves and branches against bacteria are shown in Table 1. The results show for leaves were effective for a larger number of microorganisms in relation to the branches. The CE and AcOEt of *P. glandulosus* leaves showed good activity for the same microorganisms *S. mutans*, *E. faecalis*, *S. aureus* and *S. saprophyticus*. The BuOH fraction of leaves was effective only for *P. mirabilis* and the CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> fraction showed no inhibition front the bacteria tested.

In relation to the branches, the crude extract was able to inhibit of the growth of *S. mutans* and *L. monocytogenes*. The AcOEt and BuOH fraction were effective only for *E. coli* cepa A and *P. gluconolypticus*, respectively.

Extracts of leaves and branches of *P. glandulosus* inhibit the growth of bacteria associated with clinically important diseases, for example, the *Listeria monocytogenes* is associated with serious human and animal infections, including abortion and septicemia. It is considered a pathogen of major concern due to high occurrence in foods and high mortality rate associated with listeriosis (Wang et al., 2013). *S. aureus* can cause a range of serious infections, with rates of morbidity and mortality of up to 64%, this pathogenicity reflects its ability to produce a variety of toxins, and to firmly adhere to prosthetic materials, apart from the capacity to develop resistance to antimicrobial agents (Casey et al., 2007).

Herbal medicines may be an alternative because they present secondary metabolites that are active against a wide range of microorganisms. Studies describe the action of naturally occurring molecules as antimicrobial agents such as terpenoids, glucocorticoids, flavonoids and polyphenols that are small molecules produced by plants and are able to inhibit many bacterial species, particularly Gram-positive microorganisms. In some cases these microorganisms are resistant to disinfection, particularly when they form biofilms (Schito et al., 2011). These secondary metabolites were found by our study group (unpublished results) and can be related to the antimicrobial activities found in this study.

The CE and fractions of *P. glandulosus* were also evaluated about their action front of *M. tuberculosis* mycobacteria, *M. avium* and *M. smegmatis*. *M. smegmatis* was employed as a model for the antimycobacterial activity. This microorganism has

been used as a surrogate for *Mycobacterium tuberculosis*, due to characteristics such as low infectivity, rapid growth and genetic similarity (McGaw et al., 2008).

It was observed that the CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> and EtOAc fractions of leaves were effective only against *M. smegmatis*, showing a MIC 312.5 and 625 µg/mL, respectively. The CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> fraction of the branches was the one that obtained the best results in relation to the other, being effective against *M. smegmatis* (MIC: 312.5 µg/mL), *M. avium* (MIC: 625 µg/mL) and *M. tuberculosis* (MIC 1250 µg/mL).

The *M. smegmatis* is a mycobacterium associate to infections as lung disease, despite not being the causative agent of tuberculosis; *M. smegmatis* has been used successfully in many studies due to the characteristic of rapid growth and ease of handling (Pauli et al., 2005). *Mycobacterium avium* is usually opportunistic pathogen, non-pathogenic in healthy individuals, infections caused by *M. avium* is prevalent in patients with AIDS, affecting as many as 40% of patients with advanced disease, which is resistant to most existing antimicrobials (Ramos et al., 2000). The additional prevalence of multidrug-resistant strains and extensively drug-resistant tuberculosis (De Rossi et al., 2006) stimulates an urgent need for the development of new drugs for the treatment of mycobacterial infections.

Natural sources provide numerous examples of interesting secondary metabolites with antimycobacterial activity, indicating that natural products could be rewarding field for the discovery of new antituberculosis leads (Copp, 2003; Pauli et al., 2005; Copp and Pearce, 2007; Boligon et al., 2012; Cruz et al., 2012). Phenolics and flavonoids were identified as responsible for this activity (Koysomboon et al., 2006; Suksamrarn et al., 2004). Triterpenes such as uvaol, oleanolic acid and β-amyrin have been shown to exhibit antimycobacterial activity against antibiotic-susceptible and -resistant strains of *M. tuberculosis* (Gu et al., 2004; Stavri et al., 2007; Jimenez-Arellanes et al., 2007).

The secondary metabolites reported for *P. glandulosus*, such as phenolic compounds, flavonoids, triterpenes and coumarins can be contributing to the antimycobacterial activity, because they have proven this activity, as already mentioned in this work. Furthermore, gallic acid was found in all fractions from leaves and branches of this species and also has antimicrobial activity (unpublished results).

Table 1. Antibacterial activity of the CE and factions of the leaves and branches of *P.glandulosus*.

Microorganismos	Leaves				Branches			
	CE	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	AcOEt	BuOH	CE	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	AcOEt	BuOH
<b>Bacteria</b>	<b>MIC (mg/mL)</b>							
<i>E. coli cepa A</i>	-	-	-	-	-	-	11.5	20.23
<i>E. coli cepa B</i>	-	-	-	-	-	-	-	20.23
<i>L. monocytogenes</i>	-	-	-	-	3.36	-	-	-
<i>S. mutans</i>	6.48	-	9.83	-	3.36	-	-	-
<i>E. faecalis</i>	12.97	-	19.66	-	-	-	-	-
<i>P. mirabilis</i>	-	-	-	15.38	-	-	-	-
<i>S. aureus</i>	6.48	-	9.83	-	-	-	-	-
<i>S. saprophyticus</i>	6.48	-	9.83	-	-	-	-	-
<i>P.gluconolypticus</i>	-	-	-	-	-	3.159	-	-

Table 2. Minimal inhibition concentration ( $\mu\text{g/mL}$ ) of CE and fractions of the leaves and branches of *P. glandulosus* against *M. smegmatis*, *M. tuberculosis* and *M. avium*.

Microorganismos	Leaves				Branches			
	CE	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	AcOEt	BuOH	CE	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	AcOEt	BuOH
<b>Mycobacteria</b>	<b>MIC (<math>\mu\text{g/mL}</math>)</b>							
<i>M. tuberculosis</i>	2500	2500	>2500	-	-	1250	-	-
<i>M. avium</i>	2500	>2500	2500	-	-	625	-	-
<i>M. smegmatis</i>	2500	312.5	625	>2500	1250	312.5	2500	2500

Based on the results of antimicrobial activity against bacteria described above, we used the same values of CIM to perform the assay of the biofilm inhibiting capacity front formation of biofilms of *S. aureus* for CE and the AcOEt fraction of

leaves and *S. mutans* and *L. monocytogenes* for the CE of the branches. In this study, the CE and AcOEt fraction of *P. glandulosus* leaves showed a reduction in biofilm formation formed by *S. aureus* with a percentage of 23.79% and 24.66%, respectively (Figure 1). In relation to branches, CE presented a percentage of inhibition of 44.1% against the biofilm formed by *S. mutans* and 26.76% front of *L. monocytogenes* (Figure 2).

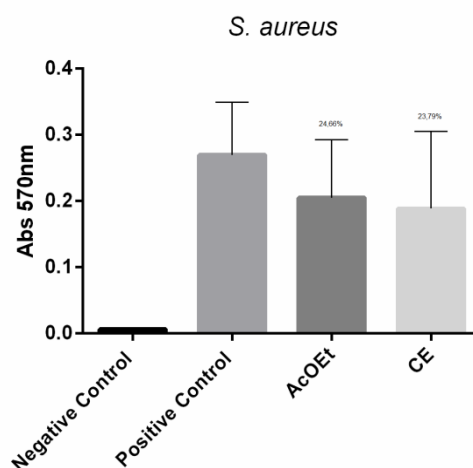


Figure 1 – Effect of CE and AcOEt fraction of *P. glandulosus* leaves against biofilm formation of *S. aureus*. Values are expressed as absorbance at 570 nm.

The bacteria have the ability to form biofilms. Biofilms are high degree organization communities where microorganisms form a structured, coordinated and functional thin layer (Tomihama et al., 2007). They are involved in major problems associated with the food industry, medicine, and everyday life. The risk becomes even more serious because bacteria within biofilms have been shown to have a decreased susceptibility to antimicrobial agents compared with those in the planktonic form (Gilbert et al., 2003).

In this study, for the first time, the antibiofilm activity of the extracts of leaves and branches of *P. glandulosus* against the biofilms formed by *P. aureus*, *S. mutans* and *L. monocytogenes* strains were investigated. The leaves of *P. glandulosus* presented significant activity against the strains tested, highlighting a greater potential for CE front of bacteria and the  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  fraction for mycobacteria, which were able to inhibit important pathogenic markers.



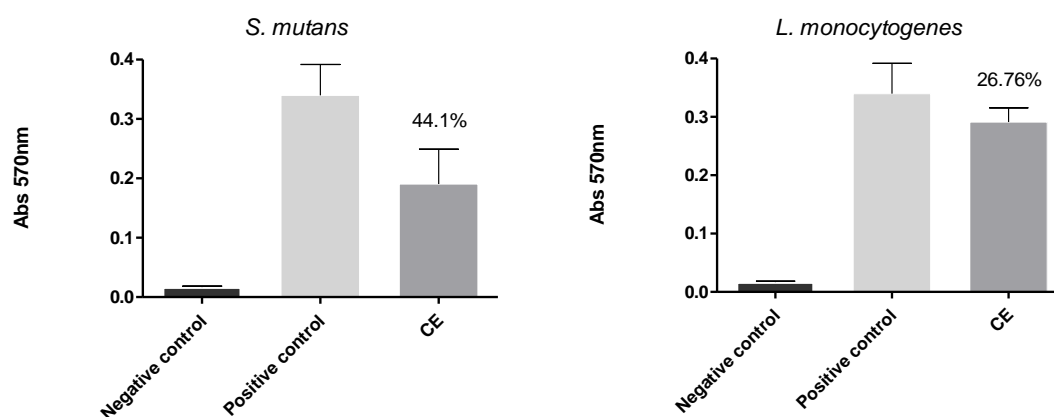


Figure 2 – Effect of CE of *P. glandulosus* branches against biofilm formation of *S. mutans* and *L. monocytogenes*. Values are expressed as absorbance at 570 nm.

### Acknowledgments

The authors would like to thank Prof. Dra. Margareth Linde Athayde for orientation and support for this work be performed, Prof. Dr. Renato Aquino Záchia for providing the identification of *P. glandulosus*. We also acknowledge fellowships from FAPERGS, Brazil.

### References

- Awolola, G. V.; Koorbanally, N. A.; Chenia, H.; Shode, F. O.; Baijnath, H. Antibacterial and anti-biofilm activity of flavonoids and triterpenes isolated From the extracts of *ficus sansibarica* warb. Subsp. *Sansibarica* (moraceae) extracts. *Afr J Tradit Complement Altern Med.*, v. 11, p. 124-131, 2014.
- Barneche, S., Bertucci, A., Haretche, F., Olivaro, C., Cerdeiras, M.P., Vázquez, A. Prospección química y microbiológica del bosque de galeria del río Uruguay. *Braz. J. Pharmcog.* 20, 878-885, 2010.
- Boligon A.A, Agertt V, Janovik V, Cruz R.C, Campos M.M.A, Guillaume D, Athayde M.L, Dos Santos A.R.S. Antimycobacterial activity of the fractions and compounds from *Scutia buxifolia*. *Brazilian J Pharmacog.* v 22, p 45–52, 2012.
- Brum, T.F., Camponogara, C., Jesus, R.S., Belke, B.V., Piana, M., Boligon, A.A., Pires, F.B., Oliveira, S.M., Rosa, M.B., Bauermann, L.F., 2016. Ethnopharmacological study and topical anti-inflammatory activity of crude extract from *Poikilacanthus glandulosus* (Nees) Ariza leaves. *J Ethnopharmacol.*, v. 193, p. 60–67, 2016.
- Casey AL, Lambert PA, Elliott TSJ. Staphylococci. In *J Antimicrob Agents.* 29:S23–32, 2007.

CLSI. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically, ninth ed. Approved standard M7–A6. Clinical and Laboratory Standards Institute, 2008.

Copp BR, Pearce AN. Natural product growth inhibitors of *Mycobacterium tuberculosis*. *Nat Prod Rep*, 24, 278–97, 2007.

Copp, B.R., Antimycobacterial natural products. *Natural Product Reports* 20, 535–557, 2003.

Cruz C.R, Agertt V, Boligon A.A, Janovik V, Campos A.M.M, Guillaume D, Athayde L. M. In vitro antimycobacterial activity and HPLC–DAD screening of phenolics from *Ficus benjamina* L. and *Ficus luschnathiana* (Miq.) Miq. Leaves. *Natural Product Research* V 26, N 23, p 2251–2254, 2012.

De Rossi E, Ainsa JA, Riccardi G. Role of mycobacterial efflux transporters in drug resistance: an unresolved question. *Microbiol Rev* 30: 36-52, 2006.

Gill SR, Fouts DE, Archer GL, Mongodim EF, DeBoy RT, Ravel J. Insights on Evolution of Virulence and Resistance from the Complete Genome Analysis of an Early Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Strain and a Biofilm-Producing Methicillin-Resistant *Staphylococcus epidermidis* Strain. *J Bacteriol.*,187:2426–38, 2005.

Gilbert P, McBain AJ, Rickard AH. Formation of microbial biofilm in hygienic situations: a problem of control. *Int Biodeter Biodegr*, 51:245-8, 2003.

Glundlapalli AV, Beekmann SE, Graham DR, Polgreen PM. Perspectives and concerns regarding antimicrobial agent shortages among infectious disease specialists. *Diagn Microbiol Infect Dis.*, 75:256–9, 2013.

Gu JQ, Wang Y, Franzblau SG, Montenegro G, Yang D, Timmermann BN. Antitubercular constituents of *Valeriana laxiflora*. *Planta Med*, 70:509–14, 2004.

Jimenez-Arellanes A, Meckes M, Torres J, Luna-Herrera J. Antimycobacterial triterpenoids from *Lantana hispida* (Verbenaceae). *J Ethnopharmacol* ,111:202–5, 2007.

Judith H. Merritt, Daniel E. Kadouri, George A. O’Toole. Growing and Analyzing Static Biofilms. HHS public access. *Curr. Protoc. Microbiol.* p. 29, 2005.

Koysomboon, S., Van Aaltena, I., Kato, S., Chantrapromma, K. Antimycobacterial flavonoids from *Derris indica*. *Phytochemistry*, 67, 1034– 040, 2006.

Martins, A., Vasas, A., Viveiros, M., Molnar, J., Hohmann, J., Amaral, L. Antibacterial properties of compounds isolated from *Carpobrotus edulis*. *Int. J. Antimicrob. Agents*, v. 37, p. 438–444, 2011.

McGaw, L.J., Lall, N., Hlokwe, T.M., Michel, A.N., Meyer, J.J.M., & Eloff, J.N. Purified compounds and extracts from *Euclea* species with antimycobacterial activity against *Mycobacterium bovis* and fast growing mycobacteria. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 31, 1429–1433, 2008.

Olar R, Badea M, Marinescu D, Chifiriuc CM, Bleotu C, Grecu MN, et al. Prospects for new antimicrobials based on N, N-dimethylbiguanide complexes as effective agents on both planktonic and adhered microbial strains. *Eur J Med Chem.*, 45:2868–75, 2010.

Pauli, G.F., Case, R.J., Inui, T., Wand, Y., Cho, S., Fischer, N.H., Franzblau, S.G. New perspectives on natural products in TB drug research. *Life Sciences* 78, 485–494, 2005.

Pelgrift RY, Friedman AJ. Nanotechnology as a therapeutic tool to combat microbial resistance. *Adv Drug Deliv Rev* 65, 1803-1815, 2013.

Ramos MC, Moraes MJ, Calisni AL, Roscani GN, Picolli EA. A retrospective bacteriological study of mycobacterial infections in patients with acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Br J Infect Dis* 4: 86-90, 2000.

Römling, U., Balsalobre, C. Biofilm infections, their resilience to therapy and innovative treatment strategies. *J. Intern. Med.* 272, 541–561, 2012.

Schito AM, Piatti G, Stauder M, Bisio A, Giacomelli E, Romussi G, et al. Effects of demethylfruticuline A and fruticuline A from *Salvia corrugata* Vahl. On biofilm production in vitro by multiresistant strains of *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* and *Enterococcus faecalis*. *J Antimicrob Agents.* 37:129–34, 2011.

Stavri M, Piddock LJV, Gibbons S. Bacterial efflux pump inhibitors from natural sources. *J Antimicrob Chemother*, 59:1247–60, 2007.

Suksamrarn, A., Chotipong, A., Suavansri, T., Boongird, S., Timsuksai, P., & Chuanynugul, A. Antimycobacterial activity and cytotoxicity of flavonoids from the flowers of *Chromolaena odorata*. *Archives of Pharmacal Research*, 27, 507–511, 2004.

Tomihama T, Nishi Y, Arai K. Biofilm formation and resistance to bactericides of *Pseudomonas syringae* pv. Theae. *Journal of General Plant Pathology* 73, 193-196, 2007.

## 6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A seleção de plantas com base em dados da medicina tradicional pode levar ao descobrimento de novas moléculas promissoras. Raras são as plantas nativas do Brasil que já foram submetidas a estudos de validação, o que confirma a existência de um enorme potencial medicamentoso nas nossas plantas, que precisa ser melhor aproveitado.

Tendo em vista o crescente processo de aculturação e perda de preciosas informações a respeito do uso de plantas pela população, desaparecimento das espécies ainda não estudadas e devido ao interesse do mercado por produtos de origem natural e das indústrias pela descoberta de novos fármacos, buscou-se neste trabalho resgatar e registrar o conhecimento do uso popular de *P. glandulosus*, já que é muito utilizada pela população de Santiago e região frente as mais diversas enfermidades. A referida planta pertence à flora brasileira e, no entanto, carece de estudos que comprovem seus efeitos. Neste sentido, servirá como guia para nortear outras pesquisas na busca de seus constituintes químicos e possíveis atividades farmacológicas, bem como avaliar os benefícios e a existência ou não de riscos proporcionados pelo uso da mesma.

O estudo etnofarmacológico permitiu coletar dados sobre a espécie junto aos usuários da planta para fim medicinal, obtendo informações de quarenta participantes voluntários. Dos informantes, 65% coleta a espécie *P. glandulosus* no quintal de casa e 53% cultiva a espécie em suas residências. A maior parte dos entrevistados não se preocupa com o período da época de coleta (93.0%).

A forma de transmissão do conhecimento sobre o uso de *P. glandulosus* predominante foi a informação por familiares, com porcentual de 83.0%. Segundo os usuários, a utilização da espécie com fins terapêuticos pode ser preparada apenas na forma de macerado, sendo que podem ser empregadas diferentes partes da planta para uso medicinal, destacando-se as mais utilizadas: as folhas e os galhos preparados juntos (65.0%), seguido pelo uso da folha sozinha e de todas as partes da planta, ambas com 13.0%. Em relação ao nome popular da espécie, todos os informantes relataram que conhecem apenas como “Gaiana”. Quanto à forma de administração, foram relatadas apenas duas formas de uso: externo (98.0%) e oral (2.0%).

Através das informações obtidas pelos entrevistados, foi possível verificar um número elevado de indicações terapêuticas, com destaque para picada de inseto (67.5%), cicatrização (50.0%) e inflamação (27.5%). Além disso, em menor porcentual, foram também informadas o uso da gaiana para febre, picada de aranha, contusão, flebite, fungos nas unhas, coluna

vertebral, queimadura, repelente e desinfetante e não foi relatado nenhum efeito adverso pelos usuários do macerado da planta.

Diante dos efeitos medicinais gerados pela *P. glandulosus*, evidenciou-se resultados satisfatórios para todos os usuários, sendo que o principal motivo do uso é devido ao bom resultado encontrado pela mesma, onde 5% considera o uso por ser barato e 8% relata que não faz mal a saúde. A maceração é a forma de conservação mais utilizada (95.0%), sendo que a cachaça é o solvente mais utilizado (40.0%), seguido do álcool (35.0%). Com relação a utilizar a planta *P. glandulosus* sozinha ou em associação com outra espécie medicinal ou outro medicamento, 95.0% relataram que a utilizam sozinha e 5% utilizaram intercalando o macerado de gaiana com outra medicação.

Quando se pretende trabalhar com plantas, o primeiro passo a ser realizado é a identificação da espécie e por seguinte, uma pesquisa fitoquímica preliminar, para conhecer os principais grupos de metabólitos secundários presentes nelas (MATOS, 2009). Deve-se levar em conta que a composição química de um vegetal varia de órgão para órgão, portanto é necessária a investigação da planta como um todo a fim de encontrar o maior número de substâncias com interesse farmacológico. No presente trabalho, este processo foi realizado com os extratos aquoso e hidroalcoólico das folhas e dos galhos de *P. glandulosus*, submetendo-os a uma série de reações de caracterização, verificando a presença e ausência dos principais metabólitos secundários.

Os resultados indicam a presença de metabólitos secundários que podem estar relacionados à sua ação no tratamento de diversas patologias. Tendo em vista o resgate da biodiversidade brasileira e identificação das potencialidades das plantas e sua possível ação medicinal, alguns metabólitos secundários são apontados neste estudo como ponto de partida para este enfoque. As classes de princípios ativos encontradas neste estudo acenam para várias possibilidades terapêuticas e os dados obtidos na literatura servem de apoio para direcionar os estudos a fim de aprofundar ainda mais o conhecimento sobre essa espécie.

Dentre os metabólitos secundários encontrados nesta análise fitoquímica, as cumarinas que estão presentes nas folhas e nos galhos de *P. glandulosus* possuem ação anticoagulante, imunossupressora, relaxante vascular, hipolipidêmica e hipotensora, sendo que aquelas que contêm grupos di-hidroxilados em posição orto, são poderosos inibidores da peroxidação lipídica, além de eliminarem o ânion radical superóxido e quelarem íons ferro, o que os conferem propriedades antioxidantes (MARTÍN-ARAGÓN et al., 1996). Esta classe de compostos, também foi descrita na espécie da mesma família, como a *Justicia pectoralis*

(LEAL et al., 2000), com a identificação do isolado de cumarina, umbeliferone (LINO et al., 1997).

Destaca-se ainda, a presença de fenóis em ambas as partes da planta, sendo relatados dentre tantas outras atividades, a antioxidante e anti-inflamatória, os heterosídeos cardioativos como hipotensores (SIMÕES et al., 2010), triterpenoides e esteroides apresentam uma variedade de propriedades medicinais, destacando-se os efeitos anti-inflamatórios, analgésicos, cardiovasculares e antitumorais (NIERO; MALHEIROS, 2009).

A determinação do perfil fitoquímico de *P. glandulosus* dos extratos aquoso e hidroalcolico das folhas mostrou-se diferente em relação aos galhos no que se refere a classe de metabólitos secundários e concentração dos mesmos. Dessa forma, os farmacógenos encontrados neste estudo acenam para várias possibilidades terapêuticas o que servirá de apoio para direcionar os estudos a fim de se especificar ainda mais o conhecimento sobre essa espécie, uma vez que os dados sobre a planta são escassos.

A inexistência de estudos relacionados com *P. glandulosus*, motivou a realização de análise cromatográfica por CLAE, com a finalidade de identificar e quantificar os possíveis compostos fenólicos presentes na espécie. Foram feitas duas análises, uma para pesquisa de compostos polares e outra para apolares. Diante dos padrões polares disponíveis em nosso laboratório de pesquisa, foi encontrado apenas o ácido gálico (AG) que está presente em todas as frações das folhas e dos galhos, variando de 0,78 a 10,37 mg/g nas folhas e de 0,68 a 6,72 mg/g nos galhos.

Segundo Ferguro e Harris (1999), os ácidos fenólicos caracterizam-se pela presença de um anel benzênico, um grupamento carboxílico e um ou mais grupamentos de hidroxila e/ou metoxila na molécula, que conferem propriedades antioxidantes. Embora outras características também contribuam para a atividade antioxidante dos ácidos fenólicos e seus ésteres, esta é, geralmente determinada pelo número de hidroxilas presentes na molécula. Além da atividade antioxidante comprovada destes compostos, estudos pré-clínicos têm mostrado que o AG possui uma variedade de ações farmacológicas, incluindo as atividades antioxidantes, anti-inflamatórias, antimicrobiana, antiviral e antitumoral (KIM, 2007; ÖZÇELIK; KARTAL; ORHAN, 2011).

O extrato bruto e as frações diclorometano das folhas e dos galhos foram submetidas a pesquisa de compostos apolares visto que é onde espera-se encontrar substâncias com estas características. Através da análise por HPLC, foi possível verificar a presença de ácido maslínico (2,02 mg/g), uvaol (0,12 mg/g) e sitosterol (0,50 mg/g) no EB das folhas e nos galhos,  $\alpha$ -amirina (0,60 mg/g) e sitosterol (1,02 mg/g). Na fração diclorometano, foram

identificados ácido maslínico (1,96 mg/g) e sitosterol (1,79 mg/g) nas folhas e  $\alpha$ -amirina (0,55 mg/g) e sitosterol (2,56 mg/g) nos galhos. Estes compostos comprovam o screening fitoquímico realizado neste trabalho, que revelou reação positiva para terpenos e esteroides nos extratos das folhas e dos galhos.

O ácido maslínico é um triterpeno pentacíclico e tem despertado interesse devido aos seus efeitos biológicos, que incluem as atividades antitumoral (ALLOUCHE et al., 2011), antidiabético (LIU et al., 2007), antioxidante (MONTILLA et al., 2003), anti-HIV (XU et al., 1996), antiparasitária (DE PABLOS et al., 2010), vaso-relaxante (RODRIGUEX et al., 2006), anti-inflamatório (HUANG et al., 2011) além de ser seguro por não ter apresentado toxicidade em testes realizados *in vivo* (SANCHEZ et al., 2013). O uvaol, um triterpeno diálcool, está presente em vários alimentos e plantas utilizadas na medicina popular como antioxidante (ALLOUCHE et al., 2011), como anti-bacteriano (MARTINS et al., 2011) e em um estudo recente, foi verificada sua ação como anti-inflamatório (AGRA et al., 2016). Sitosterol é um fitosterol e foi relatado como sendo útil no tratamento de hipercolesterolemia, câncer da próstata e da mama, doença da artéria coronária (MATSUOKA et al., 2008), diabetes e antioxidante (GUPTA et al., 2011). Medeiros et al. (2007) verificaram a atividade anti-inflamatória tópica de  $\alpha$ -amirina (triterpeno pentacíclico), além de possuir efeito antiplaquetário (ARAGÃO et al., 2007), hipnótico, sedativo e antidepressivo (ARAGÃO et al., 2006) e antitumoral (LIN et al., 2011).

Estes foram os primeiros compostos encontrados para *P. glandulosus* e outros podem ser investigados, visto que através deste trabalho, observou-se nos cromatogramas obtidos a presença significativa de outros picos que não foram identificados.

Os compostos fenólicos contribuem para o sabor, odor e coloração de diversos vegetais, desta forma muitos desses são economicamente importantes pela utilização como flavorizantes e corantes de alimentos e bebidas sendo de amplo emprego na indústria de alimentos. Além disso, em alguns derivados de ácidos fenólicos tem sido relatada atividade antioxidante, possuindo, portanto, importância também na indústria de medicamentos. Ainda, tem sido apontada a atividade antibacteriana, antiviral, hipocolesterolêmica, artrite reumatoide, dentre outras atividades (SIMÕES et al., 2010).

Os perfis e teores dos polifenóis em plantas e bebidas de origem vegetal são determinados, em grande parte, pelo tipo de espécie. Assim, algumas plantas ou alimentos podem ser particularmente ricos em um polifenol ou em uma classe específica de polifenóis, por exemplo, o café em ácidos fenólicos, o vinho tinto em estilbenos e antocianidinas, citros em flavanonas, o cacau e o chocolate em flavonoides, e produtos de soja em isoflavonoides.

Além disso, há influências do tipo de cultivo, condições de crescimento, estágio de maturidade, armazenamento, manuseio e processamento (MITJAVILA; MORENO, 2012).

Neste trabalho, a quantificação de polifenóis totais no extrato bruto (EB) e frações diclorometano (DCM), acetato de etila (AcOEt) e butanol (BuOH) obtido das folhas e dos galhos de *P. glandulosus*, utilizando como reagente o Folin-Ciocalteu e ácido gálico (AG) como padrão. Os teores de polifenóis variaram entre as frações e entre as duas partes da planta utilizada neste estudo (folhas e galhos). A fração AcOEt apresentou a maior concentração de polifenóis nas folhas, seguido pelo EB e frações BuOH e DCM. Nos galhos, o maior teor de polifenóis também foi encontrado na fração AcOEt, não havendo diferença significativa entre ambas as partes. A fração BuOH apresentou o segundo maior teor de polifenóis e a menor concentração nos galhos foi encontrada no EB, precedida pela fração DCM. Comparando as duas partes da planta, é possível perceber que a fração AcOEt foi a que possuiu o maior teor de polifenóis em ambas as partes estudadas não havendo diferença estatística entre elas.

A maior concentração de polifenóis da fração AcOEt encontrada neste trabalho era esperada, pois de acordo com o esquema proposto por Cechinel Filho e Yunes (1998) e estudos de composição qualitativa de extratos de plantas segundo Canadovic et al. (2008), revelam que os compostos fenólicos em geral, costumam se concentrar nesta fração quando se trabalha com frações de diferentes polaridades.

A produção de metabólitos secundários é o resultado de complexas interações entre biossíntese, transporte, estocagem e degradação (WINK, 1990). Embora qualquer célula vegetal ou tecido tenha a capacidade de biossintetizar metabólitos secundários, parece que isso ocorre somente em alguns tecidos ou mesmo em células especiais, em função do grau de diferenciação e desenvolvimento dos mesmos. Em alguns casos, a produção pode estar restrita a um estágio específico de desenvolvimento do vegetal ou a determinadas condições ecológicas ou ambientais (SIMÕES et al., 2010). Desta forma, o teor de polifenóis pode estar presente em maior ou menor concentração nas folhas ou nos galhos de *P. glandulosus* devido a diversos fatores mencionados acima como também, devido a fatores como a presença ou não de agentes invasores, já que os metabólitos são produzidos diante dessas condições como forma de proteção da espécie.

Os flavonoides constituem uma classe de compostos polifenólicos de ampla distribuição no reino vegetal. Encontrados em plantas principalmente na forma de glicosídeos, são os pigmentos amarelos, laranjas, azuis e vermelhos das flores, responsáveis também pela cor amarela das folhas no outono (MUSCHIETTI; MARTINO, 2009).



Além de estarem presentes em muitas plantas medicinais, os flavonoides também se encontram em medicamentos usados em todo o mundo. Existem estudos que demonstram que os flavonoides exibem uma série de ações bioquímicas e farmacológicas, tais como anticarcinogênico, antiviral, antimicrobiano, antitrombótico anti-inflamatória e atividade antimutagênica (TURKOGU et al., 2007). Por sua natureza fenólica, atuam como potentes agentes quelantes e captadores de radicais livres.

Neste estudo, a quantificação de flavonoides totais foi avaliada através do método colorimétrico baseado na formação de complexos estáveis do cátion alumínio com os flavonoides (WOLLENWEBER, 1988). A quantificação de flavonoides totais no EB e frações DCM, AcOEt e BuOH obtido das folhas e dos galhos de *P. glandulosus* foi realizada com reagente o  $AlCl_3$  e rutina como padrão.

A fração que se destacou, de forma bastante significativa com o maior teor de flavonoides nas folhas, foi a fração AcOEt com uma concentração bem superior em relação as demais e aos valores encontrados para as frações dos galhos. Através da análise estatística observou-se que as folhas possuem maior concentração de flavonoides em relação aos galhos em todas as frações testadas.

Estes resultados estão de acordo com trabalhos anteriores que relatam alta proporção de flavonoides nas folhas de outras espécies vegetais (GRUBESIC et al., 2005), confirmando assim uma das importantes funções da folha no vegetal, servindo como mecanismo de defesa contra os danos UV (HARBORNE; WILLIAMS, 2000). A exposição a níveis elevados de radiação UV faz com que as folhas a avermelhar, aumentando as concentrações de fenóis totais, principalmente os flavonoides (GARCIA-MACIAS et al., 2007).

Após a fração AcOEt, o segundo maior teor de flavonoides foi encontrado na fração DCM das folhas, de forma intermediária, o EB, e o menor valor para a fração BuOH. Já nos galhos, a fração DCM apresentou a maior concentração de flavonoides de forma bastante significativa em relação as demais frações, seguindo da fração AcOEt. As frações BuOH e EB revelaram os menores valores, não havendo diferença significativa entre elas. O maior teor de flavonoides para a fração DCM não foi o resultado esperado, levando em conta que os compostos fenólicos, em geral, costumam se concentrar nas frações mais polares, conforme já foi dito anteriormente através do trabalho de Cechinel Filho e Yunes (1998) e Canadovic et al. (2008).

Existe uma variedade de métodos para se determinar a capacidade antioxidante de ativos presentes em alimentos, fluidos biológicos, vegetais, entre outros. A maioria dos métodos de determinação da atividade antioxidante *in vitro*, tem como reagente um radical

livre, o qual é capturado ou neutralizado pelos compostos antioxidantes, inibindo a formação de produtos de oxidação (ROGINSKY; LISSI, 2005). Devido aos diferentes tipos de radicais livres e de suas diferentes formas de atuação em organismos vivos, dificilmente existirá um método simples e universal pelo qual a atividade antioxidante possa ser medida precisa e quantitativamente (ALVES et al., 2010).

Segundo Roginsky e Lissi, (2005) um dos métodos mais conhecidos para determinar a atividade antioxidante de extratos e substâncias isoladas é o método do DPPH (1,1-difenil-2-picril-hidrazil). A solução etanólica do DPPH apresenta coloração roxa e absorve fortemente em 518nm.

Por ação de um antioxidante, o DPPH é reduzido formando difenil-picril-hidrazina, apresentando coloração amarela, reação essa monitorada pelo decréscimo da absorbância. A partir dos resultados obtidos, determina-se a porcentagem de atividade antioxidante que corresponde à quantidade de DPPH consumida pelo antioxidante (BRAND-WILLIAMS et al., 1995). A capacidade antioxidante de *P. glandulosus* foi avaliada por esse método, empregando o ácido ascórbico como padrão.

As melhores capacidades sequestradoras do radical DPPH, neste estudo, foram observadas nos galhos de *P. glandulosus*, destacando este resultado para a fração AcOEt (IC<sub>50</sub>: 95,48 µg/mL), seguida da BuOH (IC<sub>50</sub>:118,92 µg/mL) e nas folhas, o menor valor de IC<sub>50</sub> foi encontrado no EB (132,57 µg/mL), seguida da fração AcOEt (150,27 µg/mL). As frações DCM das folhas e o EB dos galhos apresentaram capacidade antioxidante fraca (IC<sub>50</sub>: 207,39 e 409,5 µg/mL), respectivamente. Estes resultados podem ser explicados através da correlação positiva com os teores de polifenóis encontrado neste estudo, onde as frações AcOEt das folhas e dos galhos obtiveram os maiores teores desta classe de substâncias.

Vários autores relatam a existência de uma correlação positiva entre compostos fenólicos e o potencial antioxidante, usando ensaios similares (ALONSO et al., 2002; SHYAMALA et al., 2005; CHANDRA; MEJIA, 2004; TUNG et al., 2007; MUSTAFA et al., 2010).

Quando comparados com o padrão, percebe-se que todas as frações utilizadas neste estudo indicaram valores de IC<sub>50</sub> significativamente maiores, mostrando que obtiveram sua capacidade de inibir o radical DPPH de forma moderada a fraca. Este fato é comum ocorrer, visto que nas frações e no EB encontram-se diversas classes de substâncias, onde algumas podem reagir fortemente com o DPPH, e outras possuem um mecanismo de reação mais lento (TSIMOGIANNIS; OREOPOULOS, 2006). Além disso, segundo Cho et al. (2003), a estrutura dos grupos fenólicos e possíveis alterações nas hidroxilas, como por exemplo, por

glicosilação, provocam um decréscimo da atividade antioxidante, devido à redução no número de hidroxilas e ao impedimento estérico que o açúcar proporciona, dificultando a ligação a radicais livres. Geralmente, a atividade antioxidante dos flavonoides depende do padrão de estrutura e de substituição de grupos hidroxila.

No trabalho de Marathakam e colaboradores (2012) utilizando frações de *J. beddomei* frente ao radical DPPH, encontraram para as frações clorofórmio e acetato de etila, um IC<sub>50</sub> de 214,68 e 173,25 µg/mL, respectivamente. As frações metanol, éter de petróleo, clorofórmio e aquosa do caule de *J. gendarussa* mostraram valores de IC<sub>50</sub> de 262,9, 481,66, 482,5 e 366,66 µg/mL, respectivamente (KRISHMA et al., 2010). No caule de *J. spicigera* foi encontrado um IC<sub>50</sub> de 391,41 µg/mL para o extrato metanólico e 944,67 µg/mL no aquoso (SEPÚLVEDA-JIMÉNEZ et al., 2009). Nossos resultados mostram que *P. glandulosus* foi mais potente em sequestrar o radical DPPH.

Como forma de complementar o estudo *in vitro* do DPPH realizado para determinar a capacidade antioxidante de *P. glandulosus*, os extratos das folhas e dos galhos também foram avaliadas quanto à inibição da peroxidação lipídica pelo método do TBARS, uma vez que os compostos fenólicos têm recebido atenção especial nos últimos anos, sobretudo por inibirem a peroxidação lipídica.

O sistema nervoso central é praticamente vulnerável à peroxidação lipídica, devido ao seu alto conteúdo lipídico, incluindo ácidos graxos poli-insaturados, alvos principais das espécies reativas de oxigênio (GRUNDMAN, 2000). O Fe (II), um pró-oxidante conhecido, é o metal de transição mais abundante no corpo humano, é essencial para transporte de oxigênio e diversas reações redox (HYNES; O'COINCEANAINN, 2004). Este metal pode induzir a neurotoxicidade, via estimulação da reação de Fenton, que são importantes geradoras de radicais livres endógenos, e seus níveis podem estar aumentados em algumas doenças degenerativas (BOSTANCI; BAGIRICI, 2008).

Os compostos fenólicos são capazes de formar complexos com Fe (III) e estão associados com uma diminuição da absorção de ferro no organismo (LAYRISSE et al., 2000). O cérebro é particularmente suscetível a danos causados por radicais livres por causa do seu alto consumo de oxigênio e sua baixa concentração de enzimas antioxidantes e removedoras de radicais livres. Neste contexto, o potencial antioxidante do extrato bruto e das frações das folhas e dos galhos de *P. glandulosus* foram testados frente o Fe (II), utilizando o tecido encefálico de ratos para o ensaio do TBARS.

A fração AcOEt das folhas apresentou uma redução significativa na peroxidação lipídica no intervalo de concentração entre 62,5 e 250 µg/ml, apresentando os melhores

resultados comparado com as outras frações ( $IC_{50}$  de  $45,28 \pm 7,81 \mu\text{g/mL}$ ). A capacidade desta fração frente à peroxidação lipídica pode estar relacionada com o seu elevado teor de flavonoides e polifenóis.

O EB e a fração DCM das folhas apresentaram um efeito antioxidante significativo apenas na maior concentração testada ( $250 \mu\text{g/mL}$ ), apresentando um  $IC_{50}$  de  $162,42 \pm 4,20$  e  $242,80 \pm 5,64 \mu\text{g/ml}$ , respectivamente, o que pode ser explicado por estas frações possuírem os menores valores de flavonoides no EB e de polifenóis na fração DCM. A fração BuOH não foi capaz de reduzir significativamente a produção de ERO em relação ao nível basal nas concentrações testadas.

Já nos galhos, a fração DCM foi a única fração que apresentou redução significativa na peroxidação lipídica, apresentando uma diminuição significativa na produção de ERO em relação ao nível basal, a partir da concentração de  $125 \mu\text{g/mL}$  obtendo um  $IC_{50}$  de  $135,75 \mu\text{g/mL}$ . Este resultado pode estar relacionado com o maior teor de flavonoides encontrado para esta fração. No entanto, esta correlação não foi possível verificar com as demais frações que apresentaram valores de polifenóis e flavonoides relativamente elevados. Através da análise da regressão linear, foi possível perceber que as concentrações testadas para as outras frações não foram capazes de reduzir a peroxidação lipídica, sendo necessárias concentrações maiores, o que poderá produzir um efeito tóxico.

No entanto, existem diversos métodos para analisar a capacidade antioxidante, principalmente porque existem diversos mecanismos que extratos de plantas podem exercer esta ação. De acordo com Bianchi e Antunes (1999), os antioxidantes atuam em diferentes níveis na proteção dos organismos, como por exemplo, alguns compostos possuem forte capacidade em complexar com íons metálicos, impedindo a formação de radicais livres; outros atuam inibindo diretamente os radicais gerados pelo metabolismo celular ou por fontes exógenas, impedindo o ataque de lipídios, aminoácidos das proteínas, a dupla ligação dos ácidos graxos poli-insaturados e as bases do DNA, evitando a formação de lesões e a perda da integridade celular. Os resultados encontrados sugerem que *P. glandulosus* foi capaz de reduzir os níveis de malondialdeído e também a geração de ROS basal em ratos.

Os extratos das folhas e dos galhos de *P. glandulosus* também foram avaliados quanto oxidação da 2',7'-dichlorofluoresceína (DCFH), pois é também, um método muito utilizado para determinar o estresse oxidativo em células, devido a sua alta sensibilidade. Quando adicionada às células, a sua forma diacetato (DCFH-DA) é hidrolisada liberando DCFH que, ao reagir com ERs produzidas pelo metabolismo celular normal, forma o composto fluorescente 2'-7'-diclorofluoresceína (DCF), cuja intensidade é medida (ROTA; CHIGNELL;

MASON, 1999; BONINI et al., 2006). Assim, na presença de substâncias antioxidantes, estas reagem preferencialmente com as ERs neutralizando-as, resultando em menor formação de DCF e conseqüentemente uma menor intensidade da fluorescência é observada.

Neste trabalho, o EB e as frações das folhas e dos galhos de *P. glandulosus* foram testados em diferentes concentrações, utilizando o sobrenadante do homogeneizado de cérebro de ratos como meio e o BHT como padrão.

Nos resultados encontrados para as folhas de *P. glandulosus*, apenas a fração DCM foi capaz de reduzir a oxidação da DCFH de modo significativo na concentração de 31,2 µg/mL e as demais frações tiveram resultados significativos a partir da concentração de 62,5 µg/mL. Tal fato está de acordo com o resultado encontrado para a fração DCM das folhas na inibição da peroxidação lipídica que foi capaz de diminuir significativamente a produção de ERO na mesma concentração eficaz deste ensaio. O padrão BHT apresentou resultado significativo a partir da concentração de 15,6 µg/mL.

Os resultados encontrados para a fração DCM dos galhos foram os mesmos encontrados para as folhas, apresentou diminuição significativa da oxidação da DCFH na concentração de 31,2 µg/mL. Já para as demais frações, o comportamento foi um pouco diferente, pois apenas a fração AcOEt foi capaz de reduzir de forma significativa os níveis da oxidação da DCFH a partir da concentração de 62,5 µg/mL e a fração BuOH, apenas na maior concentração testada (250 µg/mL). O EB não foi capaz de reduzir a oxidação da DCFH de modo significativo. Nossos resultados sugerem que *P. glandulosus* foi capaz de reduzir a geração de ERO em sobrenadante de homogeneizado do cérebro de rato.

Diante do estudo etnofarmacológico, constatou-se que um dos principais usos populares da gaiana para inflamações, fato que motivou a realização da atividade anti-inflamatória do CE das folhas de *P. glandulosus*, uma vez que esta parte do vegetal apresentou maior teor de polifenóis e flavonoides e em geral, se destacou nos testes de atividade antioxidante, como também, é o extrato que mais se assemelha ao uso popular.

Dentre os diversos agentes irritantes existentes para avaliar o potencial antiinflamatório tópico, o óleo de Croton, extraído da planta *Croton tiglium*, tem como princípios irritantes ésteres de forbol, destacando-se como majoritário o 13-acetato de 12-otetracanoilforbol (TPA, do inglês *12-o-tetracanoilphorbol-13-acetate*), é um modelo bem estabelecido para a investigação dos efeitos de compostos antiinflamatórios esteroidais e não esteroidais (TOWBIN et al., 1995). É um modelo que permite avaliar a resposta inflamatória, uma vez que esse agente flogístico induz inflamação cutânea e

hiperproliferação celular em animais, semelhantes a diversas doenças de pele como, por exemplo, a psoríase (GÁBOR, 2000).

Estudos afirmam que a inflamação aguda induzida pela aplicação tópica de TPA ocorre devido ao aumento da permeabilidade vascular e vasodilatação, resultando em migração de leucócitos polimorfonucleares (principalmente neutrófilos), liberação de histamina e serotonina e moderada síntese de eicosanoides (6-ceto-PGF1 $\alpha$ , PGE2 e LTB4) (PUNGERÓ et al., 1998; BADILLA et al., 2007).

O mecanismo pelo qual o TPA exerce seu efeito é decorrente da ativação da proteína quinase C (PKC), bem como da ativação sequencial de outros grupos enzimáticos, como as proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPK) e a fosfolipase A2 (PLA2), que induz a liberação de Fator de Ativação Plaquetária (PAF) e Ácido Araquidônico (AA) que, conseqüentemente, desencadeia a produção de eicosanoides inflamatórios via enzimas ciclooxigenase (COX) e lipoxigenase (LOX) (FERRANDIZ et al., 1996; WANG et al., 2001; MURAKAWA et al., 2006). O TPA também parece induzir a expressão de citocinas pró-inflamatórias em queratinócitos da pele, desencadeando o processo inflamatório (WILMER et al., 1994; REDONDO et al., 1997).

A aplicação tópica do EB das folhas de *P. glandulosus* resultou na inibição dose dependente do edema de orelha induzido pelo óleo de Croton, apresentando inibição máxima de 87 $\pm$ 2% e a dexametasona, glicocorticóide utilizado como controle positivo, inibiu 89 $\pm$ 3%. Com a finalidade de verificar o efeito do CE sobre a infiltração de neutrófilos induzida pelo óleo de cróton, foi avaliada a atividade da mieloperoxidase (MPO). Como era esperado, o óleo de cróton causou um aumento da atividade da MPO e o EB de *P. glandulosus* inibiu a atividade desta enzima (64 $\pm$ 12%) enquanto que a dexametasona reduziu a atividade e 50 $\pm$ 3%. Para confirmar o aumento da infiltração de neutrófilos medido pela enzima MPO, foi realizada a análise histológica das orelhas dos ratos que revelou intenso aumento da espessura e migração celular expressiva quando submetidos à aplicação tópica única de óleo de cróton. Já o EB de *P. glandulosus* e a dexametasona reduziram a espessura da orelha e a infiltração de células inflamatórias.

Sugere-se, portanto, que a ação antiedematogênica do CE de *P. glandulosus* possa estar interferindo na expressão de citocinas pró-inflamatórias, como o TNF- $\alpha$ , inibindo a síntese ou atividade da COX-2 e conseqüentemente a inibição da síntese/liberação de prostaglandinas (PGs) ou ainda estar agindo diretamente na via da COX-2 e LOX (BOLLER, 2007). A presença dos metabólitos secundários encontrados neste trabalho para

*P. glandulosus*, tais como cumarina, compostos fenólicos e triterpenos podem estar colaborando para esta atividade.

O estresse oxidativo está relacionado à citotoxicidade. Ele é caracterizado pelo desequilíbrio entre as espécies reativas (ERs) e os agentes antioxidantes. As ERs podem causar danos nos componentes celulares, como material genético, membrana celular e proteínas celulares. Uma das suas principais consequências são as quebras na estrutura do DNA, resultando em instabilidade cromossômica, alterações genéticas e problemas relacionados à divisão celular (KLAUNING; KAMENDULI; HOCEVAR, 2010).

Compostos fenólicos, uma vez que impede a ação de radicais livres, acabam por proteger moléculas de DNA, podendo vir a abortar o desenvolvimento de alguns tipos de câncer. Neste sentido, devido ao fato dos extratos das folhas de *P. glandulosus* se destacarem pelo seu maior conteúdo de polifenóis e flavonoides verificado neste estudo, bem como foram evidenciadas pela sua capacidade antioxidante, realizou-se o ensaio de toxicidade somente com essa parte do vegetal.

As Células Mononucleadas de Sangue Periférico (CMSP) têm sido aplicadas por décadas como biomarcadores de efeitos cito e genotóxicos, entre outros. Por serem abundantes na circulação sanguínea, são expostas a qualquer agente mutagênico e são capazes de refletir danos recentes. As CMSP semeadas em cultura tornaram-se o modelo *in vitro* bastante promissor para diversos estudos, o que ressalta a utilidade desta linhagem celular em estudos de cito-genotoxicidade (MALUF et al., 2011).

Neste estudo foram utilizados CMSP para determinar parâmetros de toxicidade *in vitro*, onde foram avaliados a citotoxicidade MTT e genotoxicidade das suspensões, sendo definidas as mesmas concentrações do extrato bruto e frações utilizadas nos testes de capacidade antioxidante: 7,8; 15,6; 31,25; 62,5; 125 e 250 µg/mL. Os resultados de cito e genotoxicidade apontam que, em linfócitos humanos, o extrato bruto e as frações das folhas de *P. glandulosus* não provocaram alterações na estrutura normal do DNA, sem causar quebras de cadeia e não houve alterações cromossômicas e metanucleares nas concentrações testadas. O peróxido de hidrogênio utilizado como controle, apresentou essas alterações. No ensaio MTT observou-se que não houve redução da viabilidade das células nas concentrações testadas, sugerindo que os extratos não apresentaram atividade citotóxica. Além disso, verificou-se um estímulo à proliferação celular em algumas concentrações testadas das frações DCM (7,8, 31,25 e 62,5 µg/mL), AcOEt (7,8, 31,25 e 125 µg/mL) e BuOH (15,6 e 125 µg/mL). Tal fato pode estar associado com a sua ação anti-inflamatória verificada neste trabalho, visto que em um processo inflamatório ocorre aumento da proliferação celular como defesa do nosso organismo e consequente liberação de

citocinas pró-inflamatórias (GOTTLIEB, 2005) e neste sentido, os extratos de *P. glandulosus* estimularam a proliferação de linfócitos.

Segundo dados da literatura, os produtos naturais são ainda a maior fonte de agentes terapêuticos inovadores para diferentes condições, incluindo doenças infecciosas. Essas propriedades terapêuticas são atribuídas a produtos do metabolismo secundário, como terpenoides e compostos fenólicos (CLARDY; WALSH, 2004). As doenças infecciosas causadas por bactérias, fungos, vírus e parasitas são ainda a maior ameaça à saúde pública apesar do progresso da medicina humana. Seu impacto é particularmente grande em países em desenvolvimento devido à inviabilidade relativa de medicamentos e a emergente resistência dos micro-organismos às drogas em uso (OKEKE et al., 2005). O aparecimento de resistência é causado principalmente pelo uso crescente e inadequado de antimicrobianos, procedimentos invasivos, grande número de hospedeiros susceptíveis e falhas terapêuticas, ocasionando aumento da transmissão de organismos multirresistentes. Muitas cepas são resistentes a compostos antimicrobianos (CATÃO et al., 2005).

Neste trabalho, foi avaliado o potencial antimicrobiano de *P. glandulosus*, de modo a investigar a capacidade dos diferentes extratos de inibir o crescimento de bactérias e micobactérias causadores de infecções relevantes. Para isso, utilizou-se o método de microdiluição em caldo, que considera a relação entre a densidade da turbidez provocada pelo crescimento microbiano no meio de cultura e a concentração do extrato analisado, fornecendo resultados quantitativos (CIM) (OSTROSKY et al., 2008).

Os resultados encontrados para as folhas foram capazes de inibir um número maior de micro-organismos em relação aos galhos, que incluem as bactérias Gram-positivas (*E. faecalis*, *S. aureus*, *S. mutans*, *S. saprophyticus*) e Gram-negativa (*Proteus mirabilis*) com uma variação dos valores de CIM de 6,48 a 19,66 mg/mL. As melhores atividades encontradas para o EB das folhas foi contra as bactérias *S. mutans*, *S. aureus* e *S. saprophyticus* com CIM de 6,48 mg/mL e para os galhos, o EB foi efetivo apenas para *S. mutans* e *L. monocytogenes* com CIM de 3,36 mg/mL.

A fração AcOEt das folhas se destacou neste estudo, inibindo o crescimento de *E. faecalis* (19,66 mg/mL), *S. mutans* (9,83 mg/mL), *S. aureus* (9,83 mg/mL) e *S. saprophyticus* (9,83 mg/mL) sendo que para os galhos, esta fração foi efetiva apenas para *E. coli cepa A*. A fração BuOH das folhas foi eficaz contra *P. mirabilis* (15,38 mg/mL), já os galhos, apresentou inibição frente as duas cepas de *E. coli*. A fração DCM das folhas não apresentou inibição frente aos micro-organismos testados e os galhos, apenas contra *P. gluconolypticus*.



O melhor efeito encontrado para o EB, especialmente sobre bactérias Gram-positivas, pode ser atribuído, a uma interação entre os diferentes metabólitos presentes em sua composição, que é bastante complexa. Alguns estudos atribuem este resultado, considerando que as bactérias Gram-negativas são tipicamente mais resistentes aos agentes antimicrobianos, o que pode ser explicado pela presença de uma barreira de permeabilidade na membrana externa (camada de lipopolissacarídeos), que limita o acesso destes agentes aos seus alvos na célula bacteriana, conferindo assim, maior resistência à bactéria, fato não partilhado pelas bactérias Gram-positivas (OLIVEIRA et al., 2008; MALHEIRO et al., 2012; MARTINS, et al., 2013).

As bactérias utilizadas neste ensaio muitas vezes estão associadas a doenças de importância clínica, como por exemplo, *E. faecalis* está geralmente associada a infecções nosocomiais, e pode ocasionar infecções urinárias e endocardites (PARADELLA; KOGAITO; JORGE, 2007), a espécie *S. aureus* pode causar desde uma infecção cutânea simples, como foliculite e furúnculo ou, em casos mais graves, pneumonia, meningite, artrite e septicemia (SANTOS et al., 2007), *S. saprophyticus* é um importante patógeno em infecções do trato urinário, especialmente em mulheres jovens sexualmente ativas, mas também, acomete homens. Sua patogenicidade está relacionada com a capacidade de aderir à célula do epitélio do trato urinário. Ocasionalmente pode ser isolado em infecções de feridas e de casos de septicemia (SCHAECHTER et al., 2002).

O EB e as frações de *P. glandulosus* também foram avaliados quanto a sua ação frente às micobactérias *M. tuberculosis*, *M. avium* e *M. smegmatis*. Estas espécies de micobactérias são pouco virulentas e de crescimento rápido, que podem ser usadas com confiabilidade para testes de antimicobacterianos (TANEJA; TYAGI, 2007).

Foi possível observar que as frações DCM e AcOEt das folhas foram eficazes contra *M. smegmatis*, apresentando um MIC de 312,5 e 625 µg/mL, respectivamente. Já nos galhos, a fração DCM foi a que obteve os melhores resultados em relação às demais, sendo eficaz frente a *M. smegmatis* (MIC: 312,5 µg/mL), *M. avium* (MIC: 625 µg/mL) e *M. tuberculosis* (MIC: 1250 µg/mL). A fração DCM, se destaca mais uma vez, como visto na capacidade antioxidante pelo método da DCFH, o que pode ser atribuído à sua composição fitoquímica.

O micro-organismo *Mycobacterium tuberculosis* é o agente etiológico da tuberculose (COPP, 2003), uma doença infecciosa que vem aumentando sua incidência e que muitas vezes está associada a infecções virais (vírus da imunodeficiência humana). Neste sentido, tem havido um grande interesse na descoberta de novas alternativas para o tratamento desta doença, principalmente, devido ao surgimento de novos casos, ao surgimento de cepas de *M.*

*tuberculosis* resistentes e aos efeitos adversos do tratamento convencional, (NEWTON; LAU; WRIGHT, 2000; GARCÍA et al., 2012). Diversos estudos têm demonstrado atividade inibitória, frente à micobactérias, de extratos e substâncias isoladas de plantas com resultados promissores (ELDEEN; STADEN, 2007; RAMOS et al., 2008; CHEN et al., 2010; TEKWU et al., 2012). Essas informações são bastante importantes pelo fato de que poucas espécies deste gênero foram relatadas para o uso contra micro-organismos resistentes aos medicamentos utilizados normalmente.

No presente estudo, as folhas de *P. glandulosus* apresentaram atividade significativa frente às cepas testadas destacando um maior potencial para o EB frente a bactérias e para a fração DCM para micobactérias, que foram capazes de inibir importantes marcadores patogênicos.

Diante dos resultados obtidos na atividade antimicrobiana descrita acima, utilizou-se os mesmos valores das concentrações inibitórias mínimas para realizar-se o ensaio da capacidade de inibição do biofilme frente à formação de biofilmes de *S. aureus* para o EB e a fração AcOEt das folhas e *S. mutans* e *L. monocytogenes* para o EB dos galhos.

O EB e a fração AcOEt das folhas de *P. glandulosus* apresentaram redução na formação de biofilme formado por *S. aureus*, com percentual de 23,79% e 24,66%, respectivamente. Em relação aos galhos, o EB apresentou um percentual de inibição de 44,1% frente ao biofilme formado por *S. mutans* e 26,76% frente a *L. monocytogenes*.

Após o estabelecimento do biofilme, a difusão de antibióticos é dificultada, as camadas interiores das bactérias começam a ter uma baixa taxa metabólica, as alterações fisiológicas crescem de modo significativo, entre outros mecanismos de resistência (OLIVEIRA et al., 2006).

A resistência à metilina é um adicional importante fator no estabelecimento de infecções causadas por *S. aureus* e está se tornando cada vez mais prevalente. Este perfil de resistência, juntamente com a capacidade de formar biofilme complica o tratamento de infecções causadas por este agente patogênico (CHAMBERS; DELEO, 2009; KOKSAL et al., 2009; MARTINS et al., 2013; SHORE; COLEMAN, 2013).

Neste sentido, devido a difícil difusão dos antibióticos e aos mecanismos de resistência, torna-se importante o estudo de terapias alternativas, como as plantas medicinais que vem se mostrando eficientes em inibir a formação do biofilme. Albuquerque e colaboradores (2013) demonstraram o efeito antibiofilme dental *in vitro* do extrato das folhas de *Lippia sidoides Cham*, sendo o *S. aureus*, uma das bactérias responsáveis pela aderência deste biofilme.

Em um estudo realizado com *Rosmarinus officinalis* Linn, foi demonstrada sua ação efetiva na inibição de aderência de bactérias, dentre elas, encontraram-se a *S. mutans* ATCC 25175 (SILVA et al, 2008). Nyila e colaboradores (2012) relataram o efeito inibidor de  $\beta$ -sitosterol frente ao biofilme formado por *L. monocytogenes* e evidenciaram que este composto pode desempenhar um importante papel como agente desinfetante contra a biofilmes desta bactéria e poderia ser utilizado para a limpeza de superfícies de processamento e utensílios.

Alguns autores sugerem que alguns compostos oriundos de produtos naturais podem agir danificando a membrana das células bacterianas, diminuindo os flagelos, impedindo a adesão das bactérias e reduzindo a estabilidade dos biofilmes (SILVA et al., 2008; REN et al., 2015).

A equinococose é uma zoonose de ampla distribuição geográfica, podendo ser encontrada em diversas partes do mundo (BART et al., 2006), inclusive no sul do Brasil (DE LA RUE et al., 2011). Em humanos o tratamento depende basicamente do órgão comprometido pela parasitose, do estágio biológico larvário, bem como da quantidade de cistos hidáticos presentes no órgão afetado. O cisto hidático desenvolve-se principalmente em órgãos como fígado (50%) e pulmões (20%), podendo, em menor probabilidade, alojar-se nos rins, baço, cérebro, útero, ossos, órbita ocular e bexiga (ECKERT et al., 2001).

O procedimento cirúrgico torna possível a retirada total do cisto hidático presente nos seres humanos, sendo que este é o método de escolha dos médicos no intuito da obtenção de cura da doença (NELL et al., 2011; SCARLATA et al., 2011). No entanto, nem sempre isto ocorre, pois além das dificuldades relacionadas com o procedimento, o risco de o cisto romper-se é muito grande, podendo causar choque anafilático devido ao extravasamento do líquido hidático, além de acarretar recidivas da doença anos após a cirurgia (ECKERT et al., 2001).

Outro método de tratamento também utilizado é o PAIR (punção/aspiração/introdução/reaspiração), onde se faz uso de um agente escolicida, geralmente salina hipertônica e/ou álcool 95%, para inativar os protoescoléces no interior do cisto. Após, retira-se todo líquido presente no cisto, a fim de inativá-lo (SILVA et al., 2001).

Devido ao lento desenvolvimento do cisto hidático no organismo humano, há uma nítida dificuldade de diagnóstico e conseqüentemente, de tratamento da doença. Novas terapias que visam um tratamento seguro e menos invasivo no combate desta parasitose são de extrema importância, bem como a descoberta de novos protoescolicidas que aumentem a ação diminuindo os efeitos indesejados aos pacientes acometidos (MAGGIORE et al., 2012; KAVOOSI; PURFARD, 2013).

Na busca por protoescolicidas eficientes no tratamento da equinococose cística, alguns autores têm analisado o efeito dos óleos e extratos de plantas frente aos protoescoléces de *Echinococcus* spp., evidenciando sucesso terapêutico em diversas concentrações testadas, buscando alternativas de tratamento eficientes para esta importante parasitose (MOAZENI; NAZER, 2010; HAILONG et al., 2013; MOAZENI et al., 2012; NOAL, 2014).

Diante deste contexto, este trabalho demonstrou a eficácia do CE das folhas e dos galhos de *P. glandulosus* quanto a sua atividade frente à protoscoleces de *E. ortoleppi*. Este ensaio foi realizado com o CE visto que o tratamento PAIR é uma forma de introdução do agente escolicida no interior do órgão afetado onde se localiza o agente escolicida. Além disso, foi verificada a ação do AG frente a este parasita visto que esta substância foi verificada nesses extratos. No entanto, o AG foi encontrado em todas as frações das folhas e dos galhos de *P. glandulosus*, mas em maior concentração na fração BuOH de ambas as partes do vegetal, motivo pelo qual nos levou a realizar este estudo com esses extratos em uma tentativa de justificar esta atividade.

Para a realização deste trabalho, as protoscoleces foram identificadas molecularmente como *E. ortleppi*. O CE e a fração BuOH das folhas e dos galhos foram preparadas na concentração de 350 mg/mL e o AG em 7 mg/mL. O CE e a fração BuOH das folhas foram capazes de causar a morte de todos os protoescoléces em 5 minutos de exposição. Já o CE e a fração BuOH dos galhos obtiveram um efeito protoescolicida (100%) em um tempo um pouco maior, 10 e 15 minutos após aplicação dos extratos, respectivamente. O padrão AG foi capaz de matar todos os protoescoléces em 15 minutos de exposição.

Este efeito significativo dos extratos de *P. glandulosus* pode ser explicado por uma boa atividade do AG que foi identificado por análise de HPLC-DAD nesta espécie. O AG apresenta uma variedade de ações farmacológicas, mas, este é o primeiro relato sobre a atividade escolicida deste composto. A relação entre as atividades antiparasitária e antioxidante de compostos naturais têm sido objeto de investigação e discutidas, especialmente na geração de ROS, mas ainda não está bem esclarecido (Ribeiro et al., 1997; Moazeni et al, 2012). Outros compostos presentes na espécie podem estar contribuindo para esta atividade, visto que apresentou elevado teor de polifenóis e flavonóides, além do ácido maslínico, uvaol e sitosterol e outros ainda não identificados.

Yones e colaboradores (2011) relataram a utilização de extratos alcoolicos de *Thymus vulgaris*, *Salvia officinalis* e compostos puros de timol e mentol frente a protoescoléces de *Echinococcus* spp., onde descrevem uma ação protoescolicida em 7 dias após contato com os extratos e 2 a 5 dias com os compostos puros. Neste sentido, os extratos de *P. glandulosus*

podem vir a ser uma alternativa como agente escolicida frente a *E. ortleppi*, visto que apresentou efeito eficaz em um curto período de tempo. No entanto, testes *in vivo* podem ser realizados para confirmar esta ação, bem como identificar possíveis compostos presentes na espécie que possam estar colaborando para esta atividade.

## 7 CONCLUSÃO

- O estudo etnofarmacológico permitiu coletar dados sobre a espécie junto aos usuários de *P. glandulosus* para fim medicinal, verificando seu nome popular, uso medicinal, tipo de extrato, entre outros.
- Os resultados da análise fitoquímica preliminar indicaram a presença de triterpenoides e esteroides, cumarinas, catequinas, fenóis, ácidos orgânicos, amino-grupos, antocianinas, antocianidinas e flavonoides, heterosídeos antociânicos, heterosídeos cardioativos.
- Através da análise por CLAE foi revelado a presença de AG em todas as frações testadas (folhas e galhos) de *P. glandulosus*. Também foi revelada a presença de ácido maslínico, uvaol, sitosterol e  $\alpha$ -amirina no extrato bruto e fração diclorometano da espécie.
- A fração acetato de etila apresentou o maior teor de polifenóis nas folhas e nos galhos de *P. glandulosus*. Em relação ao teor de flavonoides, a fração diclorometano apresentou o maior valor no galhos e a fração acetato de etila nas folhas da espécie vegetal.
- Na avaliação da capacidade antioxidante, a fração AcOEt dos galhos e o EB das folhas, se destacaram em relação a inibição pelo radical DPPH. As frações AcOEt das folhas e a  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  dos galhos reduziram significativamente a peroxidação lipídica comparado com as demais. Em relação ao teste da DCFH, a fração  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  das folhas e dos galhos se destacou na redução da oxidação de ERO.
- A aplicação tópica do EB das folhas de *P. glandulosus* resultou na inibição dose dependente do edema de orelha induzido pelo óleo de Croton.
- Os extratos obtidos das folhas de *P. glandulosus* não apresentaram citotoxicidade e genotoxicidade nas concentrações testadas.
- Na avaliação da atividade antimicrobiana através de microdiluição em caldo, o EB e frações demonstraram boas atividades contra bactérias Gram-positivas, sendo promissora a atividade da fração DCM frente à micobactéria *M. smegmatis*.
- O EB e a fração AcOEt das folhas de *P. glandulosus* apresentaram redução na formação de biofilme formado por *S. aureus* e o EB dos galhos foi eficaz frente a *S. mutans* e a *L. monocytogenes*.
- O EB das folhas e dos galhos apresentou efeito escolicida frente a *Echinococcus ortleppi* em um curto período de tempo.

- Diante das constatações obtidas neste estudo foi possível validar as informações sobre o uso da espécie para fim medicinal, conhecer as principais classes de metabólitos secundários presentes nas folhas e nos galhos de *P. glandulosus*, identificando pela primeira vez a composição química, a avaliação da capacidade antioxidante, atividade anti-inflamatória, toxicidade, antimicrobiana, antibiofilme e escolicida desta espécie.

## 8 PERSPECTIVAS FUTURAS

- Identificar e isolar e metabólitos secundários presentes na espécie e posteriormente, um estudo biodirecionado com as atividades biológicas estudadas neste trabalho entre outras.
- Avaliar a toxicidade *in vivo* dos extratos de *P. glandulosus*.
- Realizar o efeito de extratos de *P. glandulosus* através de ensaios em linhagens celulares tumorais.
- Verificar uma formulação tópica contendo extrato bruto da gaiana e avaliar sua possível atividade anti-inflamatória.
- Determinar a atividade *in vivo* de *P. glandulosus* frente à protoscoleces de *E. ortoleppi*.



## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBOT, P. J. Comfrey: assessing the low-cost health risk. **Med. J. Aust.**, v. 149, p. 678-682, 1988.

ADESEGUN, S. A.; FAJANA, A.; ORABUEZE, C. I.; COKER, H. A. B. Evaluation of Antioxidant Properties of *Phaulopsis fascisejala* C.B.Cl. (Acanthaceae). **Evidence Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 6, n. 2, p. 227–231, 2009.

ANVISA. **Guia para a condução de estudos não clínicos de toxicologia e segurança farmacológica necessários ao desenvolvimento de medicamentos**. Brasília, 31 de janeiro de 2013 – Versão 2. Disponível em: <www.anvisa.gov.br> Acesso em: 15 set. 2016.

AGRA, L. C.; LINS, M. P.; MARQUES, P. S.; SMANIOTTO, S.; DE MELO, C. B.; LAGENTE, V.; BARRETO, E. Uvaol attenuates pleuritis and eosinophilic inflammation in ovalbumin-induced allergy in mice. **European Journal of Pharmacology**, v.780, p. 232–242, 2016.

ALBUQUERQUE A. C. L.; PEREIRA M.S.V.; SILVA D.F.; PEREIRA L.F.; VIANA F.A.C.; HIGINO J.S.; BARBOSA M.R.V. The anti-adherence effect of *Lippia sidoides* Cham. Extract against microorganisms of dental biofilm. **Revista brasileira de plantas medicinais**. v.15, p.41-46, 2013.

ALEXIADES, M. N. (ed). **Selected Guidelines for Ethnobotanical Research: A Field Manual**. New York: The New York Botanical Garden; 1996.

AL-FATIMI, M. et al. Antioxidant, antimicrobial and cytotoxic activities of selected medicinal plants from Yemen. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 111, p. 657-666, 2007.

ALLOUCHE, Y.; WARLETA, F.; CAMPOS, M.; SANCHEZ-QUESADA, C. et al., Antioxidant, antiproliferative, and pro-apoptotic capacities of pentacyclic triterpenes found in the skin of olives on MCF-7 human breast cancer cells and their effects on DNA damage. **J. Agric. Food Chem.**, v. 59, p. 121–130, 2011.

AL-MAMARY, M.; AL-MEERI, A.; AL-HABORI, M. Antioxidant activities and total phenolics of different types of Honey. **Nutrition Research**, v. 22, p. 1041-1047, 2002.

ALONSO, A. M. et al. Determination of antioxidant power of red and white wines by a new electrochemical method and its correlation with polyphenolic content. **Journal Agriculture Food Chemistry**, v. 50, p. 3112-3115, 2002.

ALVES, C.Q. et al. Métodos para determinação da atividade antioxidante *in vitro* em substratos orgânicos. **Química Nova**, v. 33, n. 10, p. 2202-2210, 2010.

AMID, A.; JOHAN, N. N.; JAMAL, P.; ZAIN, W. N. W. M. Observation of antioxidant activity of leaves, callus and suspension culture of *Justicia gendarusa*. **African Journal of Biotechnology**, v. 10, n. 81, p. 18653-18656, 2011.

- AMOROZO, M. C. M. A. abordagem etnobotânica na pesquisa de plantas medicinais. In: DI STASI, L. C. (org.) **Plantas Mediciniais**: arte e ciência. Um guia de estudo interdisciplinar. São Paulo: Editora UNESP, p. 47-68, 1996.
- ANDRADE, F. M. C.; CASALI, V. W. Z. Etnobotânica e estudos de plantas medicinais. In: RODRIGUES, A. G. et al. **Plantas medicinais e aromáticas**: etnoecologia e etnofarmacologia. Viçosa, MG: UFV, DFT, p. 3-22, 2002.
- ARAGÃO, G. F. et al. A possible mechanism for anxiolytic and antidepressant effects of alpha- and beta-amyrin from *Protium heptaphyllum* (Aubl.) March. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, Phoenix, v. 85, p. 827-834, 2006.
- ARAGÃO, G. F. et al. Antiplatelet activity of  $\alpha$  and  $\beta$  amyrin, isomeric mixture from *Protium heptaphyllum*. *Pharmaceutical Biology*. Lisse, v. 45, n. 5, p. 343-349, 2007.
- ARIZA, L. E. Notas sobre Acanthaceae. El Genero *Poikilacanthus*. II. **Kurtziana**, v. 17, p. 157-161, 1984.
- ATOUI, A. K. et al. Tea and herbal infusions: Their antioxidant activity and phenolic profile. **Food Chemistry**, v. 89, p. 27, 2005.
- AYRES M. C. C; et al. Atividade antibacteriana de plantas úteis e constituintes químicos da raiz de *Copernicia prunifera*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, São Paulo, v. 18 n. 1, p. 90-97, 2008.
- BABICH, H.; ROSENBERG, D.W.; BORENFREUD, E. In vitro cytotoxicity studies with the fish hepatoma cell line, PLHC-1 (*Poeciliopsis lucida*). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.21, p.327-336, 1991.
- BADILLA, B.; CAMBRONERO, J.; CICCIO, J. F.; et al. Determination of topical anti-inflammatory activity of the essential oil and extracts of *Lippia alba* (Mill.) Brown (Verbenaceae), using the model of mouse ear edema induced by TPA and AA. **Pharmacognosy Magazine**, v. 3, n. 11, 2007.
- BALBINOTTI, H. et al. *Echinococcus ortleppi* (G5) and *Echinococcus granulosus sensu stricto* (G1) loads in cattle from Southern Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 188, n. 4, p. 255-260, 2012.
- BALICK, M. J. Ethnobotany and the identification of therapeutic agents from the rainforest. In: **CIBA Foundation Symposium on Bioactive Compounds from Plants**. Bangkok: CIBA, p. 22-39, 1990.
- BARBOSA, K.B.F. et al. Oxidative stress: assessment of biomarkers. **Journal of the Brazilian Society of Food and Nutrition**, v. 33, n. 2, p. 111-128, 2008.
- BARBOSA, K.B.F. et al. Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. **Revista de Nutrição**, v. 23, n. 4, p. 629-643, 2010.
- BARNECHE, S.; BERTUCCI, A.; HARETCHE, F.; OLIVARO, C.; CERDEIRAS, M. P.; VÁZQUEZ, A. Prospección química y microbiológica del bosque de galería del río Uruguay.

**Revista Brasileira de Farmacognosia. Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 20, n. 6, p. 878-885, 2010.

BARREIROS, A. L. B. S.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P. Estresse Oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Química Nova**, v. 29, n. 1, 2006.

BART, J. M. et al. Genetic typing of *Echinococcus granulosus* in Romania. **Parasitology Research**, v. 98, n. 2, p. 130-137, 2006.

BATISTA, C.V.F.; SCHRIPEMA, J.; VERPOORTE, R.; RECH, S.B.; HENRIQUES A.T. Indole alkaloids from *Rauwolfia sellowii*. **Phytochemistry**, v.41, n.3, p.969-973, 1996.

BENETT, R. N.; WALSGROVE, R. M. Secondary metabolites in plant defense mechanisms. **New Phytologist**, v.127, p. 617-633, 1994.

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

BLAZSÓ, G.; GÁBOR, M. Effects of prostaglandin antagonist phloretin derivatives on mouse ear edema induced with different skin irritants. **Prostaglandins**, v. 50, p. 161-168, 1995.

BOLLER, S. Atividade Antiinflamatória Tópica do Extrato e Compostos Isolados da *Baccharis illinita* DC, (*Asteraceae*) em Camundongos. Dissertação de mestrado em Farmacologia, UFP, Curitiba, 2007.

BOLIGON, A. A.; ARGETT, V.; JANOVIK, V.; CRUZ, R. C.; CAMPOS, M. M. A.; GUILLAUME, D.; ATHAYDE, M. L.; SANTOS, A. R. S. Antimycobacterial activity of the fractions and compounds from *Scutia buxifolia*. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 22, n. 1, p. 45-52, jan/fev, 2012.

BONINI, M.G. et al. The oxidation of 2',7'-dichlorofluorescein to reactive oxygen species: A self-fulfilling prophesy? **Free Radical Biology & Medicine**, v. 40, p. 968-975, 2006.

BOSTANCI, M. O.; BAGIRICI, F. Neuroprotective effect of aminoguanidine on iron induced neurotoxicity. **Brain Research Bulletin**, v. 76, p. 57-62, 2008.

BRANDÃO, M. das G. L. **Plantas medicinais e fitoterápicos (aspectos gerais e métodos de validação)/Maria das Graças Lins Brandão**. Belo Horizonte: Editora O Lutador, p. 5- 44, 2009.

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

BRASIL, Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância Sanitária. Portaria nº 19 de 30.1.92 **Diário Oficial da União**, v. 197, seção I, 3.2.1992.

BRASIL, Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância Sanitária. Portaria nº 6 de 31.1.95 **Diário Oficial da União**, v. 200, seção I, p. 1523- 1524, 6.2.1995.

BRIGANTI, S.; PICARDO, M. Antioxidant activity, lipid peroxidation and skin diseases. **European Academy of Dermatology**. V. 17, p. 663-669, 2003.

BRUNETTI, E. et al. Expert consensus for the diagnosis and treatment of cystic and alveolar echinococcosis in humans. **Acta Tropica**, v. 114, n. 1, p. 1-16, 2010.

BURKART, A. Acantáceas indígenas como forrajeiras de emergencia. **Darwiniana** 6: 192-202, 1943.

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

CANADANOVIC, B.J.; CETKOVIC, G.; DILAS, S., et al. Radical scavenging, antibacterial, and antiproliferative activities of *Melissa officinalis* L. extracts. **Journal of Medicinal Food**, v. 11, p. 133-143, 2008.

CATÃO, R. M. R.; BARBOSA-FILHO, J. M.; GUTIERREZ, S. J. C.; LIMA, E. O. L.; PEREIRA, M. S. V.; ARRUDA, T. A.; ANTUNES, R. M. P. Avaliação da Atividade Antimicrobiana de Riparinas sobre Cepas de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* Multirresistentes. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, v. 37, p. 247-249, 2005.

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

CHAMBERS, H. F.; DELEO, F. R. Waves of Resistance: *Staphylococcus aureus* in the Antibiotic Era. **Nat Rev Microbiol**, v. 7, p. 629-41, 2009.

CHANDRA, S.; DE MEJIA, E.G. Polyphenolic compounds, antioxidant capacity and quinone reductase activity of an aqueous extract of *Ardisia compressa* in comparison to Mate (*Ilex paraguaiensis*) and Green (*Camellia sinensis*) Teas. **J. Agric. Food Chem.** v.52, p. 3583-3589, 2004.

CHAUHAN, N. S.; DIXIT, V. K. *Asteracantha longifolia* (L.) Nees, Acanthaceae: chemistry, traditional, medicinal uses and its pharmacological activities - a review. **Revista Brasileira de Farmacognosia. Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 20, n. 5, p. 812-817, 2010.

CHEN, Y. F. et al. Anti-inflammatory and analgesic activities from roots of *Angelica pubescens*. **Planta Med**, v. 61, p. 2-8, 1995.

CHEN, L.W. et al. Secondary metabolites and antimycobacterial activities from the roots of *Ficus nervosa*. **Chemistry & Biodiversity**, v. 7, p. 1814-1821, 2010.

CHO, E. J. et al. Study on the inhibitory effects of Korean medicinal plants and their main compounds on the DPPH radical. **Phytomedicine**, v. 10, p. 544-551, 2003.

CLARDY, J.; WALSH, C. Lessons from natural molecules. **Nature**, v. 432, p. 829-837, 2004.

COPP, B.R. Antimycobacterial natural products. **Natural Product Reports**, v. 20, n. 6, p. 535-557, 2003.

COSTA, J. G. M.; *et al.* Estudo químico-biológico dos óleos essenciais de *Hyptismartiusii*, *Lippia sidoides* e *Syzigium aromaticum* frente a larvas do *Aedes aegypti*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, São Paulo, v. 15, n. 4, p. 304-309, 2005.

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

CUNHA, A. P. da. (coord.) **Farmacognosia e fitoquímica**. 3 Ed. Lisboa: Editora da Fundação Calouste Gulbenkian, p. 38-58, 2010.

DAGLIA, M. Polyphenols as antimicrobial agents. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 23, n. 2, p. 174-181, 2012.

DANIEL, T. F. A synopsis of *Poikilacanthus* (Acanthaceae) in Mexico. **Bulletin of the Torrey Botanical Club**, v. 118, p. 451-458, 1991.

DANIEL, T. F. Pollen Morphology of Mexican Acanthaceae: diversity and systematic significance. **Proceedings of the California Academy of Sciences**, v. 50, n. 8, p. 217-256, 1998.

DANIEL, T. F. Additional chromosome numbers of American Acanthaceae. **Systematic Botany**. v. 25, p. 15-25, 2000.

DAVIES, D.G.; PARSEK, M.R.; PEARSON, J.P.; *et al.* The involvement of cell-to-cell signals in the development of a bacterial biofilm. **Science**. v. 280 p. 295-257, 1998.

DE LA RUE, M. L. *et al.* New data on *Echinococcus* spp. in Southern Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical**, v. 48, n. 2, p. 103-104, 2006.

DE LA RUE, M.L. *et al.* Infection of humans and animals with *Echinococcus granulosus* (G1 and G3 strains) and *E. ortleppi* in Southern Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 177, n.2, p. 97-103, 2011.

DE PABLOS, L. M., DOS SANTOS, M. F., MONTERO, E., GARCÍAGRANADOS, A. *et al.*, Anticoccidial activity of maslinic acid against infection with *Eimeria tenella* in chickens. **Parasitol Res.**, v.107, p. 601–604, 2010.

DIAS, B.F.S. A implementação da convenção sobre diversidade biológica no Brasil: desafios e oportunidades. Campinas, p. 10, 1996.

DI STATI, L. C.; SANTOS, E. M. G.; SANTOS, C. M. dos; HIRUMA, C. A. **Plantas medicinais na Amazônia**. São Paulo: Editora Unesp, p. 194, 1989.

DOAK, S.H.; MANSHEAN, B.; JENKINS, G.J.S.; SINGH, N. In vitro genotoxicity testing strategy for nanomaterials and the adaptation of current OECD guidelines. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, p.1 – 8, 2011.

DOMÍNGUEZ, X. A.; ACHENBACH, H.; GONZÁLEZ, C. C.; FERRÉ-D'AMORE, A. R. Estudio químico del muítle (*Justicia spicigera*). **Revista Latinoamericana de Quím**, v. 21, p. 142-143, 1990.

DONLAN, R.M. Biofilm Formation: A Clinically Relevant Microbiological Process. **Health care Epidemiology**. v. 33 p.1387-1392, 2001.

ECKERT, J. et al. WHO/OIE Manual on Echinococcosis in Humans and Animals: a Public Health Problem of Global Concern. **World Organisation for Animal Health**, Paris, v. 1, n. 1, p. 1-264, 2001.

ELDEEN, I.M.S.; STADEN, J.V. Antimycobacterial activity of some trees used in south African traditional medicine. **South African Journal of Botany**, v. 73, p. 248-254, 2007.

EMA – The Europea Agency for the evaluation of Medicinal Products. **Position paper on the risks associated with the use of herbal products containing Aristolochia species**. 2000. EMA/HMPWP/23/00.

ETKIN, N. Anthropological methods in ethnopharmacology. **Journal Ethnopharmacoly**, v. 38, p. 93-104, 1993.

EZCURRA, C. **Acanthaceae**. In Flora de la Provincia de Jujuy, parte IX (A. Cabrera, ed.). INTA, Buenos Aires, p.278-359, 1993.

FARIAS, M. R. Avaliação da qualidade de matérias-primas vegetais. In: SIMÕES, C. M. O. et al, (Org.). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6. ed. Porto Alegre/ Florianópolis: Ed. UFRGS, 2010, p. 263-288.

FERGURO, L. R.; HARRIS, P. J. Protection against cancer by wheat bran: role of dietary fibre and phytochemicals. **European Cancer Prevention Organisation**, v. 8, n.1, p. 17-25, 1999.

FERRANDIZ, M. L.; GIL, B.; SANZ, M. J.; et al. Effect of Bakuchiol on Leucoyte Functions and Some Inflammatory Responses in Mice. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 48, n. 9, p. 975-980, 1996.

FILHO, D. W.; SILVA, E. L. da; BOVERIS, A.; YUNES, R. A.; CALIXTO, J. B. Flavonoides antioxidantes de plantas medicinais e alimentos: importância e perspectivas terapêuticas. In: YUNES, R. A.; CALIXTO, J. B. (eds). **Plantas Medicinais sob a Ótica da Química Medicinal Moderna**, Chapecó: Argos, 317, 2001.

FRESHNEY, R. I. Culture of animal cells: a manual of basic technique. 5. ed. New Jersey: Wiley-Liss, 2005.

FUCHS, F. D.; WANNMACHER, L.; FERREIRA, M. B. C. **Farmacologia clínica: fundamentos da terapêutica racional**. 3. ed. Rio de Janeiro, Guanabara koogan. p. 294, 2006.

FYLAKTAKIDOU, K.C.; HADJIPAVLOU-LITINA, D.J.; LITINAS, K.E.; GABOR, M. Mouse ear inflammation models and their pharmacological applications. Budapest: Akadémiai Kiadó, 2000.

GAO, Z.; HUANG, K.; YANG, X.; XU, H. Free radical scavenging and antioxidant activities of flavonoids extracted from the radix of *Scutellaria baicalensis* Georgi. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1472, p. 643-650, 1999.

GARCIA-MACIAS, P.; ORDIDGE, M.; VYSINI, E.; WAROONPHAN, S.; BATTEY, N. H.; GORDON, M. H. Changes in the flavonoid and phenolic acid contents and antioxidant activity of red leaf lettuce (Lollo Rosso) due to cultivation under plastic films varying in ultraviolet transparency. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, p. 10168–10172, 2007.

GARCÍA, D, RAMOS.J.A, SANCHIS.V, MARÍN.S. Effect of *Equisetum arvense* and *Stevia rebaudiana* extracts on growth and mycotoxin production by *Aspergillus flavus* and *Fusarium verticillioides* in maize seeds as affected by water activity. V.153, p 21–27, 2012.

GILANI, A. H.; ATTA-UR-RAHMAN. Trends in Ethnopharmacology. **Journal Ethnopharmacology**, v. 100, p. 43-49, 2005.

GOETZ, M. E., LUCH, A. Reactive species: a cell damaging route assisting to chemical carcinogens. **Cancer Letters**, v. 266, p. 73-83, 2008.

GOTTLIEB, O. R.; KAPLAN, M. A. C.; KUBITZKI, K.; TOLEDO, J.R.B. Chemical dichotomies in the magnolialean complex. **Nordic Journal of Botany**, v. 8, p. 437-444, 1989.

GOTTLIEB, A. B. Psoriasis: emerging therapeutic strategies. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 4, n. 1, p. 19-34, ISSN 1474-1776, 2005.

GRESSLER, L. T. **Atividade da Curcumina livre e nanoencapsulada *in vitro* e *in vivo* sobre ratos infectados experimentalmente por *Trypanosoma evansi***. 2014. 63f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária)-Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2014.

GROSSO, G. et al. Worldwide epidemiology of liver hydatidosis including the Mediterranean area. **World Journal of Gastroenterology**, v. 18, n. 13, p. 1425-1437, 2012.

GROTTO, D. et al. Importance of the lipid peroxidation biomarkers and methodological aspects for malondialdehyde quantification. **Química Nova**, v. 32, n. 3, p. 169-174, 2009.

GRUBESIC, R. J.; VUKOVIC, J.; KREMER, D.; VLADIMIR-KNEZEVIC, S. Spectrophotometric method for polyphenols analysis: Prevalidation and application on *Plantago* L. species. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 39, p. 837–842, 2005.

GRUNDMAN, M. Vitamin E and Alzheimer disease: the basics additional clinical trials. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 71, n. 2, p. 630S-636S, 2000.

GUPTA, R.; SHARMA, A. K.; DOBHAL, M. P.; SHARMA, M. C.; GUPTA, R. S. Antidiabetic and antioxidant potential of  $\beta$ -sitosterol in streptozotocin-induced experimental hyperglycemia. **Journal of diabetes**, v. 3, p. 29–37, 2011.

GÜLÇİN, I. Antioxidant activity of food constituents: an overview. **Archives of Toxicology**, v. 86, p. 345-391, 2012.

GYAMFI, M. A.; YONAMINE, M.; ANIYA, Y. Free-radical scavenging action of medicinal herbs from Ghana *Thonningia sanguinea* on experimentally-induced liver injuries. **General Pharmacology: The Vascular System**, v. 32, p. 661-667, 1999.

HAAG, K. L. et al. Livestock Trade History, Geography, and Parasite Strains: The Mitochondrial Genetic Structure of *Echinococcus granulosus* in Argentina. **Journal of Parasitology**, v. 90, n.2, p. 234-239, 2004.

HAILONG, L. V. et al. *In vitro* and *in vivo* treatments of *Echinococcus granulosus* with *Huaier aqueous* extract and albendazole liposome. **Parasitology Research**, v.111, n. 1, p. 961-966, 2013.

HAJHASHEMI, V.; GHANNADI, A.; SHARIF, B. Anti-inflammatory and analgesic properties of the leaf extracts and essential oil of *Lavandula angustifolia* Mill. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 89, n. 1, p. 67-71, 2003.

HALLIWELL, B. Reactive oxygen species and the central nervous system. **Journal of Neurochemistry**, v. 59, p. 1609-1623, 1992.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. **Free radicals in biology and medicine**. 3. ed. Oxford: Clarendon Press, 1999.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. **Free Radicals in Biology and Medicine**. 4ed.; Oxford University Press: Oxford, 2007.

HARBORNE, J. B.; WILLIAMS, C. A. Advances in flavonoid research since 1992. **Phytochemistry**, v. 55, p. 481–504, 2000.

HASLAM, E. Natural polyphenols (vegetable tannins) as drugs: Possible modes of action. **Journal Natural Product**, v. 59, p. 205-215, 1996.

HOSTETTMANN, K.; GUPTA, M. P.; MARSTON, A.; QUEIROZ, E. F. **Handbook of strategies for the isolation of bioactive natural products**. Ed. Bogota: Iberoamerican program of science and technology, CYTED; Convenio Andrés Bello, p. 13-114, 2008.

HUANG, L.; GUAN, T.; QIAN, Y.; HUANG, M.; TANG, X.; LI, Y.; SUN, H. Anti-inflammatory effects of maslinic acid, a natural triterpene, in cultured cortical astrocytes via suppression of nuclear factor-kappa B. **European Journal of Pharmacology**, v. 15, p. 169–174, 2011.

HYNES, M.J.; O'COINCEANAINN, M. The kinetics and mechanisms of reactions of iron (II) with caffeic acid, chlorogenic acid, sinapic acid, ferulic acid and naringin. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 98, p. 1457-1464, 2004.



- JAMIESON, D. Oxygen toxicity and reactive oxygen metabolites in mammals. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 7, n. 1, p. 87-108, 1989.
- JOHN, B.; REDDY, V. R. K.; SULAIMAN, C. T. Total Phenolics and Flavonoids in Selected *Justicia* Species. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, v. 2, n. 4, p. 72-73, 2013.
- JOLY, A. B. **Botânica**: introdução a taxonomia vegetal. 12 Ed. São Paulo: Companhia Editorial nacional, p. 598-600, 1998.
- KALIA, V. C. Quorum sensing inhibitors: An overview. **Biotechnology Advances**. v. 31, p. 224-245, 2013.
- KANTER, M. Free radicals, exercise and antioxidant supplementation. **Proceedings of the Nutrition Society**, v. 57, p. 9-13, 1998.
- KASNOWSKI, M. C. et al. Formação de biofilme na indústria de alimentos e métodos de validação de superfícies. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**. n. 15, 2010.
- KAVOOSI, G.; PURFARD, A. M. Scolicidal effectiveness of essential oil from *Zataria multiflora* and *Ferula assafoetida*: disparity between phenolic monoterpenes and disulphide compounds. **Comparative Clinical Pathology**, v. 22, n. 5, p. 999–1005, 2013.
- KIM, Y. J. Antimelanogenic and antioxidant properties of gallic acid. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**. v. 30, n. 6, p.1052-5, 2007.
- KOH, P. O. Ferulic acid prevents the cerebral ischemic injury-induced decrease of Akt and Bad phosphorylation. **Neuroscience Letters**, v. 507, p.156– 160, 2012.
- KOKSAL, F.; YASAR, H.; SAMASTI, M. Antibiotic resistance patterns of coagulase-negative *Staphylococcus* strains isolated from blood cultures of septicemic patients in Turkey. **Microbiol Res**. v. 164, p. 404–10, 2009.
- KRISHMA, K. L.; MRUTHUNJAYA, K.; PATEL, J. A. Antioxidant and hepatoprotective potential of stem methanolic extract of *Justicia gendarussa* Burn. **International Journal of Pharmacology**, v. 6, n. 2, p. 72-80, 2010.
- LACY, A.; O’KENNEDY, R. Studies on coumarins and coumarin-related compounds to determine their therapeutic role in the treatment of cancer. **Curr. Pharm. Des.** v.10, n.30, p. 3797-3811, 2004.
- LAYRISSE, M. et al. Iron Bioavailability in Humans from Breakfasts Enriched with Iron Bis-Glycine Chelate, Phylates and Polyphenols. **Journal of Nutrition**, n. 130, p. 2195-2199, 2000.
- LEAL, L. K. A. M; FERREIRA, A. A. G.; BEZERRA, G. A.; MATOS, F. J. A.; VIANA, G. S. B. Antinociceptive, anti-inflammatory and bronchodilator activities of Brazilian medicinal plants containing coumarin: a comparative study. **Journal Ethnopharmacology**, v. 70, p. 151-159, 2000.

- LI, W.; LI, N.; TANG, Y.; LI, B.; LIU, L.; ZHANG, X.; FU, H.; DUAN, J.A. Biological activity evaluation and structure-activity relationships analysis of ferulic acid and caffeic acid derivatives for anticancer. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 22, p.6085–6088, 2012.
- LIN, K. et al. Xanthine Oxidase Inhibitory Triterpenoid and Phloroglucinol from Guttiferaceous Plants Inhibit Growth and Induced Apoptosis in Human NTUB1 Cells through a ROS-Dependent Mechanism. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. Washington, v. 59, p. 407-414, 2011.
- LINO, C. S.; VIANA, G. S. B.; MATOS, F. J. A. Analgesic and antiinflammatory activities of *Justicia pectoralis* Jacq and its main constituents: coumarin and umbelliferone. **Phytotherapy Research**. v. 11, p. 211-215, 1997.
- LIU, J.; SUN, H.; DUAN, W.; MU, D. et al. Maslinic acid reduces blood glucose in KK-Ay mice. **Biol. Pharm. Bull.** n. 30, p. 2075–2078, 2007.
- LIZCANO, L. J.; BAKKALI, M. F.; RUIZ-LARREA, B.; RUIZ-SANZ, J. I. Antioxidant activity and polyphenol content of aqueous extracts from Colombian Amazonian plants with medicinal use. **Food Chemistry**, v. 119, p. 1566–1570, 2010.
- MACHADO, M. et al. Os óleos essenciais como agentes anti-parasitários. **Revista de Fitoterapia**, v. 10, n. 1, p. 35-44, 2010.
- MAGGIORE, M. A. et al. Anthelmintic effect of *Mentha* spp. essential oils on *Echinococcus granulosus* protoscoleces and metacestodes. **Parasitology Research**, v. 110, n. 3, p.1103-1112, 2012.
- MALHEIRO, R.; SÁ, O.; PEREIRA, E.; AGUIAR, C.; BAPTISTA, P.; PEREIRA, J. A. *Arbutus unedo* L. leaves as source of phytochemicals with bioactive properties. **Industrial Crops and Products**, v. 37, p. 473– 478, 2012.
- MALUF, S. W.; RIEGEL, M. **Citogenética Humana**, grupo A, 2011.
- MARATHAKAM, A.; KANNAPPAN, N.; JASEMINE, S.; SANTHIAGU, A.; SREEJITH, M.; AJITH, M. P. Studies on phytochemical and In-Vitro antioxidant potential of *Justicia beddomei* (Clarke) Bennett. **Free Radicals and Antioxidants**, v. 2, n. 4, 2012.
- MARAVILLA, P. P. et al. *Echinococcus granulosus* cattle strain identification in an autochthonous case of cystic echinococcosis in central Mexico. **Acta tropica**, v. 92, n. 3, p.231-6, 2004.
- MARCINKIEWICZ, J.; STRUS, M.; PASICH, E. Antibiotic resistance: a —dark side of biofilm-associated chronic infections. **Pol Arch Med Wewn**, v. 6, p 309-313, 2013.
- MARTINEZ, P. H. Medicinal plants and regional traders in Mexico: physiographic differences and conservational challenge. **Economyc botany**, v. 51, n. 2, p. 107-120, 1997.
- MARTINS, S. et al. Antibacterial activity of crude methanolic extract and fractions obtained from *Larrea tridentata* leaves. **Industrial Crops and Products**, v. 41, p. 306-311, 2013.

- MARTINS, A., VASAS, A., VIVEIROS, M., MOLNAR, J., HOHMANN, J., AMARAL, L. Antibacterial properties of compounds isolated from *Carpobrotus edulis*. **Int. J. Antimicrob. Agents**, v. 37, p. 438–444, 2011.
- MARTINS, A.; RIBOLI, D. F. M.; CAMARGO, C. H.; PEREIRA, V. C.; SAMPAIO, R. A.; CUNHA, M. R. L. Antimicrobial resistance and persistence of *Staphylococcus epidermidis* clones in a Brazilian university hospital. **Diagn Microbiol Infect Dis**. v. 77, p. 1644–168, 2013.
- MARTÍN-ARAGÓN, S.; BENEDÍ, J.; VILLAR, A. Oxygen active species-scavenger properties of coumarins. **Phytotherapy Research**, v. 10, p. S75-S78, 1996.
- MATOS, F. J. A. **Introdução a fitoquímica experimental**. 3 Ed. Fortaleza: Editora da Universidade Federal do Ceará - UFC, p. 20, 2009.
- MATSUOKA, K.; NAKAZAWA, T.; NAKAMURA, A.; HONDA, C.; ENDO, K.; TSUKADA, M. Study of thermodynamic parameters for solubilization of plant sterol and stanol in bile salt micelles. **Chem Phys Lipids**, v. 154, p. 87–93, 2008.
- MAURICIO, A. Q. Estudo da atividade antioxidante do ácido caféico e da PIH: um polifenol natural e um quelante sintético. Dissertação (Mestrado em Química) – Programa de Pós-Graduação em Química, Instituto de Química, UNB, Brasília, 2006.
- MAYNE, S.T. Antioxidant nutrients and chronic disease: use of biomarkers of exposure and oxidative stress status in epidemiologic research. **Journal of Nutrition**, v. 133, n. 3, p. 933-940, 2003.
- MEDEIROS, R.; OTUKI, M.F.; AVELLAR, M. C.; CALIXTO, J.B. Mechanisms underlying the inhibitory actions of the pentacyclic triterpene alpha-amyrin in the mouse skin inflammation induced by phorbol ester 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate. **Eur. J. Pharmacol.** v. 559, p. 227-235, 2007.
- MENSOR, L. L.; MENEZES, F. S.; LEITÃO, G. G.; REIS, A. S.; SANTOS, T. C.; COUBE, C. S.; LEITÃO, S. G. Screening of Brazilian plant extracts for antioxidant activity by the use of DPPH free radical method. **Phytotherapy Research**, v. 15, p. 127-130, 2001.
- MERRITT, J. H.; KADOURI, D. E.; O'TOOLE, G. A. **Growing and analyzing static biofilms**. Curr Protoc Microbiol Chapter 1: Unit 1B.1, 2005.
- MINCIS, M. Doença hepática induzida por drogas: aspectos de interesse clínico. **Gastroenterol Endosc Dig**. v. 4, p 102-108, 1985.
- MING, L. C. Coleta de plantas medicinais. In: DI STASI, L. C. (org.) **Plantas Medicinais: arte e ciência**. Um guia de estudo interdisciplinar. São Paulo: Editora UNESP, p. 69-85, 1996.
- MITJAVILA, M.T.; MORENO, J.J. The effects of polyphenols on oxidative stress and the arachidonic acid cascade. Implications for the prevention/treatment of high prevalence diseases. **Biochemical Pharmacology**, v. 84, p. 1113–1122, 2012.

- MOAZENI, M.; NAZER, A. *In vitro* effectiveness of garlic (*Allium sativum*) extract on scolices of hydatid cyst. **World Journal of Emergency Surgery**, v.34, n. 11, p. 2677–2681, 2010.
- MOAZENI, M. et al. *In vitro* lethal effect of ajowan (*Trachyspermum ammi L.*) essential oil on hydatid cyst protoscoleces. **Veterinary Parasitology**, v.187, n. 1/2, p. 203-208, 2012.
- MONTEIRO, D. U. et al. *Echinococcus canadensis* (G7) and *Echinococcus granulosus sensu stricto* (G1) in swine of southern Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 202, n. 3, p. 335-338, 2014.
- MONTILLA, M. P., AGIL, A., NAVARRO, M. C., JIMENEZ, M. I. et al. Antioxidant activity of maslinic acid, a triterpene derivative obtained from *Olea europaea*. **Planta Med.** n. 69, p. 472– 474, 2003.
- MOREIRA, E. A. Contribuição para o estudo fitoquímico de *Lobelia hassleri* A. ZAHLB e *Lobelia stellfeldii* R. BRAGA. *Companulaceae*. **Tribuna Farmacêutica**, v. 47, n. 1, p. 13-39, 1979.
- MORO, L. P.; SCHANTZ, P. M. Molecular identification of *Echinococcus* isolates from Peru. **Parasitology International**, v. 58, n. 2, p. 184–186, 2009.
- MUSCHIETTI, L. V.; MARTINO, V. S. Atividades biológicas dos flavonoides naturais. In: YUNES, R. A.; FILHO CECHINELL, V (Orgs.). **Química de produtos naturais, novos fármacos e a moderna farmacognosia**, 2Ed. Itajaí: Universidade do Vale do Itajaí, p. 259-278, 2009.
- MURAKAWA, M.; YAMAOKA, K.; TANAKA, Y.; et al. Involvement of necrosis factor (TNF)- $\alpha$  in phorbol ester 12-o-tetradecaoylphorbol-13-acetate (TPA)- induced skin edema in mice. **Biochemical Pharmacology**, v. 71, p.1331-1336, 2006.
- MUSTAFA R.A.; HAMID A.A.; MOHAMED S.; BAKAR F.A. Total Phenolic Compounds, Flavonoids, and Radical Scavenging Activity of 21 Selected Tropical Plants. **Journal of food science**, n.1, v. 75, p. 28-30, 2010.
- NELL, M. et al. Primary extrahepatic alveolar echinococcosis of the lumbar spine and the psoas muscle. **Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials**, v. 1, n. 1, p. 10:13, 2011.
- NEWTON, A.M.; LAU, C.; WRIGHT, C; W. A review of antimycobacterial natural products. **Phytotherapy Research**, v. 14, p. 303-322, 2000.
- NICOLAIDES, D. N. Natural and synthetic coumarin derivatives with antiinflammatory/antioxidant activities. **Curr. Pharm. Des.** v.10, p.3813-3833, 2004.
- NIERO, R.; MALHEIROS, A. Principais aspectos químicos e biológicos de terpenos. In: YUNES, R. A.; FILHO CECHINELL, V (Orgs.). **Química de produtos naturais, novos fármacos e a moderna farmacognosia**, 2Ed. Itajaí: Universidade do Vale do Itajaí, p. 259-278, 2009.

NOAL, C. B. **Efeitos *in vitro* de *Blepharocalyx salicifolius* (h.b.k.) O. Berg na viabilidade de protoescoléces de *Echinococcus* spp.** 2014. 62f. Dissertação (Mestrado em Farmacologia)- Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2014.

NYILA, M. A.; LEONARD, C. M.; HUSSEIN, A. A.; LALL, N. Activity of South African medicinal plants against *Listeria monocytogenes* biofilms, and isolation of active compounds from Acacia karroo. **South African Journal of Botany**, v. 78, p. 220–227, 2012.

OIE - World Organization for Animal Health. Institute for International Cooperation in Animal Biologics, [on line] OIE, 2011, Echinococcosis. Acesso em: 01 de setembro de 2011. Disponível em: <http://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/pdfs/echinococcosis.pdf>.

OKEKE, I. N.; LAXMANINARAYAN, R.; BHUTTA, Z. A.; DUSE, A. G.; JNKINS, P.; O'BRIEN, T. F.; PABLOS-MENDEZ, A.; KLUGMAN, K. P. **Antimicrobial resistance in developing countries**. Part 1: recent trends and current status. *Lancet Infectious Disease*, v. 5, p. 481-493, 2005.

OLIVEIRA, I.; SOUSA, A.; MORAIS, J. S.; FERREIRA, I. C. F. R.; BENTO, A.; ESTEVINHO, L.; PEREIRA, J. A. Chemical composition, and antioxidant and antimicrobial activities of three hazelnut (*Corylus avellana* L.) cultivars. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, p. 1801–1807, 2008.

OLIVEIRA, M.; BEXIGA, R.; NUNES, S. F.; CARNEIRO, C.; CAVACO, L. M.; BERNARDO, F. Biofilm-forming ability profiling of *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* mastitis isolates. **Vet. Microbiol**, v. 118, p. 133–40, 2006.

OSTROSKY, E.A. et al. Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração mínima inibitória (CMI) de plantas medicinais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n. 2, p. 301-307, 2008.

OZAKI, Y.; SEKITA, S.; SOEDIGDO S.; HARADA, M. Antiinflammatory effect of *Graptophyllum pictum* (L.) Griff. **Chem Pharm Bull (Tokyo)**. Oct, v.37, n. 10, p. 2799-802, 1989.

ÖZÇELİK, B.; KARTAL, M.; ORHAN, I. Cytotoxicity, antiviral and antimicrobial activities of alkaloids, flavonoids, and phenolic acids. **Pharmaceutical Biology**, v. 49, n. 4, p. 396-402, 2011.

PA, R.; MATHEW, L. Antimicrobial activity of leaf extracts of *Justicia adhatoda* L. in comparison with vasicine. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, p. 1556-1560, 2012.

PARADELLA, T.C.; KOGA-ITO, C.Y.; JORGE, A.O.C. *Enterococcus faecalis*: considerações clínicas e microbiológicas. **Revista de Odontologia da UNESP**, v. 36, n. 2, p. 163-168, 2007.

PIO-CORRÊA, M. **Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas**. Ministério da Agricultura, Instituto Brasileiro de Desenvolvimento Florestal, Rio de Janeiro, v. 4, 1969.

PROFICE, S. R.; KAMEYAMA, C.; CORTÊS, A. L. A.; BRAZ, D. M.; INDRIUNAS, A.; VILAR, T.; PESSOA, C.; EZCURRA, C.; WASSHAUSEN, D. Acanthaceae In: **Catálogo de plantas e fungos do Brasil**. Ed. Rio de Janeiro: Andrea Jakobsson Estúdio: Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro, v.1, p. 570-584, 2010.

PUNGERÓ, V.; TURULL, A.; QUERALT, J. Arachidonic acid (AA) and tetradecanoylphorbol acetate (TPA) exert systemic effects when applied topically in the mouse. **Inflammation**, v. 22, n. 3, 1998.

RAJ, B. Pollen morphological studies in the Acanthaceae. **Grana Palynologica**, v. 3, p. 3–108, 1961.

RAMOS, D.F. et al. Investigation of the antimycobacterial activity of 36 plant extracts from the brazilian Atlantic Forest. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 44, n. 4, p. 669-674, 2008.

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

REDONDO, P.; GARCIA-FONCILLAS, J.; ESPANA, A.; et al. Differential modulation of IL-8 and TNF-alpha expresión in human keratinocytes by buflomedil chlorhydrate and pentoxifylline. **Experimental Dermatology**, v. 6, p. 186-194, 1997.

REN, S.; WU, M.; GUO, J.; ZHANG, W., LIU, X.; SUN, L.; HOLYST, R.; HOU, S.; FANG, Y.; FENG, X. Sterilization of polydimethylsiloxane surface with Chinese herb extract: a new antibiotic mechanism of chlorogenic acid. **Scientific Reports**, v. 5, n. 10464, 2015.

REPETTO, M. G.; LIESUY, S. F. Antioxidant properties of natural compounds used in popular medicine for gastric ulcers. **Brazilian Journal of Med Biological Research**, n. 35, v. 5, p. 523-534, 2002.

RHODES, M. J. C. Physiological roles for secondary metabolites in plants: from progress, many outstanding problems. **Plant Molecular Biology**, v. 24, n. 1, p. 1-20, 1994.

RICE-EVANS, C. A.; PACKER, L. **Flavonoids in Health and Diseases**. New York: Marcel Dekker Inc., New York., v. 1, p. 179-197, 1998.

RILEY, T.; SONTAG, E.; CHEN, P.; P. LEVINE, A. 2008 Transcriptional control of human p53-regulated genes. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v.9, p.402–412, 2008.

ROBBINS; COTRAN. **Patologia**: Bases patológicas das doenças. Tradução de Kumar; Abbas; Fausto. 7ª ed. Rio de Janeiro: Elsevier. p. 50, 2005.

RODRIGUES, A. G.; AMARAL, A. C. F. **Plantas Mediciniais e Fitoterapia na Saúde da Família**. Ed. Brasília, 2012.

RODRIGUES, A. G.; DE SIMONI, C. Plantas medicinais no contexto de políticas públicas. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 31, n. 255, p. 7-12, 2010.

RODRÍGUEZ-RODRÍGUEZ, R.; PERONA, J. S.; HERRERA, M. D.; RUIZGUTIERREZ, V. Triterpenic compounds from “orujo” olive oil elicit vasorelaxation in aorta from spontaneously hypertensive rats. **J. Agric. Food Chem.** n. 54, p. 2096–2102, 2006.

ROGERO, S.O.; LUGÃO, A.B.; IKEDA, T.I.; CRUZ, A.S. Teste in vitro de Citotoxicidade: Estudo Comparativo entre Duas Metodologias. **Materials Research**, v.6, p.3 – 31, 2003.

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

ROTA, C.; CHIGNELL, C.F.; MASON, R.P. Evidence for free radical formation during the oxidation of 2'-7'-dichlorofluorescein to the fluorescent dye 2'-7'- dichlorofluorescein by horseradish peroxidase: possible implications for oxidative stress measurements. **Free Radical Biology e Medicine**, v. 27, n. 7/8, p. 873-881, 1999.

SAGAVE, L. **Atividade de diferentes formulações de *Melaleuca alternifolia* e terpinen-4-ol em isolados de *Rhodococcus equi* de diferentes origens**. 2014. 39f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária)-Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria. 2014.

SANCHEZ-GONZÁLEZ, M.; LOZANO-MENA, G.; JUAN, M. E.; GARCÍA-GRANADOS, A.; PLANAS, J. M. Assessment of the safety of maslinic acid, a bioactive compound from *Olea europaea* L. **Mol. Nutr. Food Res.** n. 57, p. 339–346, 2013.

SANTOS, A. B. dos. **Atividade antioxidante de extratos vegetais da flora brasileira: estudo com ressonância paramagnética eletrônica (RPE) e teoria do funcionamento da densidade**. 2006. Tese (Doutorado em Física Aplicada a Medicina e Biologia)-Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, São Paulo, 2006.

SANTOS, A. L. et al. *Staphylococcus aureus*: visitando uma cepa de importância hospitalar. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 43, n. 6, p. 413-423, 2007.

SANTOS, R. I. Metabolismo básico e origem dos metabólitos secundários. In: SIMÕES, C. M. O. et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6. Ed. Porto Alegre/ Florianópolis: Ed. UFRGS/Ed. UFSC, p. 403-434, 2010.

SCARLATA, F. et al. Cystic hydatidosis: a rare case of spine localization. **Le Infezioni in Medicina**, v. 19, n. 1, p. 39-41, 2011.

SEPÚLVEDA-JIMÉNEZ, G.; REYNA-AQUINO, C.; CHAIRES-MARTÍNEZ, L.; BERMÚDEZ-TORRES, K.; RODRÍGUEZ-MONROY, M. Antioxidant activity and content of phenolic compounds and flavonoids from *Justicia spicigera*. **Journal of Biological Sciences**, v. 9, n. 6, p. 629-632, 2009.

SCHAECHTER, M. E.; ENGLBERG, N. C.; EISENSTEIN, B. I.; MEDOFF, G. **Microbiologia: mecanismos das doenças infecciosas**. 3ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002.

SCHROETER, H.; BOYD, C.; SPENCER, J. P. E.; WILLIAMS, R. J.; CADENAS, E.; RICE-EVANS, C. MAPK signaling in neurodegeneration: influences of flavonoids and of nitric oxide. **Neurobiology of Aging**, v. 23, n. 5, p. 861-880, September, 2002.

SHIBAMOTO, T. Analytical methods for trace levels of reactive carbonyl compounds formed in lipid peroxidation systems. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 41, n. 1, p. 12-25, 2006.

SHINWARI, Z. K.; KHAN, I.; NAZ, S.; HUSSAIN, A. Assessment of antibacterial activity of three plants used in Pakistan to cure respiratory diseases. **Afr. J. Biotechnol**, v. 8, n. 24, p. 7082-7086, 2009.

SHORE, A. C.; COLEMAN, D. C. Staphylococcal cassette chromosome mec: Recent advances and new insights. **Int. J. Med. Microbiol**, v. 303, p. 350-9, 2013.

SHYAMALA, B. N. et al. Leafy vegetable extracts-antioxidant activity and effect on storage stability of heated Oils. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 6, p. 239-245, 2005.

SILVA, A. M.; CALDEIRA, J.; NUNES, J. N. P.A.I.R. – alternativa terapêutica do quisto hidático do fígado. **Journal Port Gastreterol**, v.8, n.1, p. 113-120, 2001.

SILVA, M. S. A.; SILVA, M. A. R.; HIGINO, J. S.; PEREIRA, M. S. V.; CARVALHO, A. A. T. Atividade antimicrobiana e antiaderente *in vitro* do extrato de *Rosmarinus offi cinalis* Linn. sobre bactérias orais planctônicas. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 18, p. 236-240, Abr./Jun. 2008.

SILVA, A. M.; CALDEIRA, J.; NUNES, J. N. P.A.I.R. – alternativa terapêutica do quisto hidático do fígado. **Journal Port Gastreterol**, v.8, n.1, p. 113-120, 2001.

SILVA, J. et al. Analgesic and anti-inflammatory effects of essential oils of Eucalyptus. **Journal Ethnopharmacology**, v.89, n. 2/3, p. 277-283, 2003.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G. et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6. ed. Porto Alegre/ Florianópolis: Ed. UFRGS/Ed. UFSC, p. 229-615, 2010.

SOARES, S. E. Ácidos fenólicos como antioxidantes. **Revista de Nutrição**, p. 15, 71, 2002.

SOENEN, S.J.; DE CUYPER, M. Assessing cytotoxicity of (iron oxide-based) nanoparticles: an overview of different methods exemplified with cationic magnetoliposomes. **Contrast Media e Molecular Imaging**, v.4, p.207 - 219, 2009.

SOUZA, M. E. **Atividade antimicrobiana e antibiofilme de nanopartículas de óleo de *Melaleuca alternifolia***. 2014. 76f. Dissertação (Mestrado em Nanociências)- Centro Universitário Franciscano de Santa Maria, Santa Maria, 2014.

SPJUT, R. W.; PERDUE JUNIOR, R. E. Plant folklore: a tool for predicting sources of antitumor activity?. **Cancer Treatment Reports**, v. 60, p. 979-985, 1976.



SSEGAWA, P.; KASENENE, J.M. Medicinal plant diversity and uses in the Sango bay area, Southern Uganda. **Journal of Ethnopharmacology**, 113, 521-540, 2007.

STEWART, P.S.; COSTERTON J.W. Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. **The Lancet**. v. 358 n. 14, 2001.

TANEJA, N. K.; TYAGI, J. S. Resazurin reduction assays for screening of anti-tubercular compounds against dormant and actively growing *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium bovis* BCG and *Mycobacterium smegmatis*. **J. Antimicrob Chemother.** 60: 288–293, 2007.

TEKWU, E.M. et al. Antibacterial activity of selected Cameroonian dietary spices ethnomedically used against strains of *Mycobacterium tuberculosis*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 142, p. 374-382, 2012.

THOMPSON, R. C. A. et al. Molecular and morphological characterization of *Echinococcus* in cervids from North America. **Parasitology**, v. 132, n.3, p. 439-447, 2006.

TOWBIN, H.; PIGNAT, W.; WIESENBERG, I. Time dependent cytokine production in the croton oil-induced mouse ear oedema. **Inflammation Research**, v. 44, p. S160-S1, 1995.

TSIMOGLIANNIS, D. I.; OREOPOULOU, V. The contribution of flavonoids C-ring on the DPPH free radical scavenger efficiency. A kinetic approach for the 30,40-hydroxy substituted members. **Food Science Emerging Technology**, v. 7, p. 140–146, 2006.

TUNG, Y. T. et al. Antioxidant activities of natural phenolic compounds from *Acacia confuse* bark. **Bioresource Technology**, v. 98, p. 1120-1123, 2007.

TURKOGLU, A; DURU, M. E.; MERCAN, N.; KIVRAK, I.; GEZER, K. Antioxidant and antimicrobial activities of *Laetiporus sulphureous* (Bull.) Murrill. **Food Chemistry**, n. 1, v 101, p. 267–73, 2007.

UEKI, S.Y.M.; MARTINS, M.C.; TELLES, M.A.S.; VIRGILIO, M.C.; GIAMPAGLIA, C.M.S.; CHIMARA, E.; FERRAZOLI, L. Micobactérias não-tuberculosas: diversidade das espécies no estado de São Paulo. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**. Rio de Janeiro, v.41, n.1, p.1-8, 2005.

VAN INGEN, J.; TOTTEN, S.E.; HEIFETS, L.B.; BOEREE, M.J.; DALEY, C.L. Drug susceptibility testing and pharmacokinetics question current treatment regimens in *Mycobacterium simiae* complex disease. **International Journal of Antimicrobial Agents**. v.39, p.173-176, 2012.

VAGIMIGLI, M. et al. Endothelial dysfunction in acute and chronic coronary syndromes: evidence for a pathogenetic role of oxidative stress. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 40, p. 255-261, 2003.

VANE, J. R.; BAKHLE, Y. S.; BOTTING, R. M. Cyclooxygenases 1 and 2. **Annual Reviews of Pharmacology and Toxicology**, vol. 38, p. 97-120, 1998.

VANHAELEN, M.; LEJOLY, J.; HANOCQ, M. et al. **The Medicinal Plant Industry, USA**, p. 59, 1991.

VASCONCELOS, S. M. L.; GOULART, M. O. F.; MOURA, J. B. F.; MANFREDINI, V.; BENFATO, M. S.; KUBOTA, L. T. Espécies Reativas de Oxigênio e de Nitrogênio, Antioxidantes e Marcadores de Dano. **Química Nova**, v. 30, p.1323-1338, 2007.

VASCONCELLOS, M. F. Padrão de adesão agregativa e formação de biofilme em *Escherichia coli* enteroagregativa típica e atípica: papel da proteína Shf Dissertação (Mestrado em Ciências). Universidade de São Paulo, 2009.

VEIGA JUNIOR, V.F.; PINTO, A.C.; MACIEL, M. A. M. Plantas Medicinais: cura segura? **Química Nova**, v. 28, n. 3, São Paulo, 2005.

VENDRAMINI, P. F. **O uso de plantas medicinais entre idosos: uma parceria de saberes em educação ambiental**. 83f. Trabalho de conclusão (licenciatura – Ciências Biológicas). Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2005.

WANG, H.Q.; KIM, M.P.; TIANO, H.F.; et al. Protein kinase C-alpha coordinately regulates cytosolic phospholipase A2 activity and the expression of cyclooxygenase-2 through different mechanism in mouse keratinocytes. **Molecular Pharmacology**, v. 59, p. 860-866, 2001.

WASSHAUSEN, D. C.; SMITH, L. B. Acantáceas. Itajaí, SC: Ed. Herbário Barbosa Rodrigues, Flora Ilustrada Catarinense, p. 100-117, 1969.

WASSHAUSEN, D. C.; WOOD, J. R. I. Acanthaceae of Bolivia. **Contributions from the US National Herbarium**, v. 49, p.1-152, 2004.

WILMER, J.L.; BURLESON, F.G.; KAYAMA, F.; et al. Cytokine induction in human epidermal keratinocytes exposed to contact irritants and its relation to chemical – induced inflammation in mouse skin. *Journal of Investigative Dermatology*, v. 102, n. 6, p. 915-922, 1994.

WINK, M. Physiology of secondary product formation in plantas. In: CHARLWOOD, B. V.; RHODES, M. J. C. **Secondary products from plant tissue culture**. Oxford: Clarendon, p. 403-434, 1990.

WINTER, C. A.; RISLEY, E. A.; NUSS, G. W. Carrageenan induced edema in hind paw of rats as an assay for anti-inflammatory drugs. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, v. 111, p. 544-7, 1962.

WOLLENWEBER, E.; JAY, M. Flavones and flavonols. In: HARBORNE, J. B. **The flavonoids: advances in research since 1980**. 1st ed., London. Chapman and Hall, p. 233-302, 1988.

WHO, World Health Organization. **The world medicines situation 2011: traditional medicines: global situation, issues and challenges**. Geneva: WHO, p. 12, 2011.

XU, H. X.; ZENG, F. Q.; WAN, M., SIM, K. Y. Anti-HIV triterpene acids from *Geum japonicum*. **J. Nat. Prod.** n. 59, p. 643–645, 1996.

YANG, C. S. et al. Inhibition of carcinogenesis by dietary polyphenolic compounds. **Annu Review Nutrition**, v. 21, p. 381-406, July, 2001.

YONES, D.; TAHER, G. A.; IBRAHEIM, Z. Z. *In vitro* effects of some herbs used in egyptian traditional medicine on viability of protoscolices of hydatid cysts. **Korean Journal of Parasitology**, v. 49, n. 3, p. 255-263, 2011.

YOU DIM, K. A.; SHUKITT-HALE, B.; JOSEPH, A. J. Flavonoids and the brain: interactions at the blood-brain barrier and their physiological effects on the central nervous system. **Free Radical Biology e Medicine**, v. 37, p. 1683-1693, 2004.

YUNES, R. A.; CALIXTO, J. B. **Plantas medicinais sob a ótica da química medicinal moderna**. Chapecó: Argos, p. 481- 502, 2001.

ZIECH, D. et al. The role of reactive oxygen species and oxidative stress in environmental carcinogenesis and biomarker development. **Chemico-Biological Interactions**, v. 188, n. 2, p. 334-339, 2010.

## APÊNDICE A – Questionário

### ESTUDO ETNOFARMACOLOGICO DE *Poikilacanthus glandulosus* Ariza (Nees) NA REGIÃO DE SANTIAGO/RS

Apresentação: Este questionário destina-se exclusivamente ao levantamento para o trabalho de Doutorado do curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), no qual pretende-se verificar através deste questionário, o uso na medicina popular na região de Santiago/RS e informações adicionais a respeito da espécie *Poikilacanthus glandulosus* (gaiana). Neste sentido, contamos com a sua colaboração.

**POR FAVOR, NÃO SE IDENTIFIQUE, OBRIGADA.**

DATA: \_\_\_\_\_

Dados do informante	
<b>Faixa etária</b>	<input type="checkbox"/> até 20 <input type="checkbox"/> 21-30 <input type="checkbox"/> 31-40 <input type="checkbox"/> 41-50 <input type="checkbox"/> 51-60 Maior de 60 anos
<b>Escolaridade</b>	<input type="checkbox"/> alfabetizado <input type="checkbox"/> não alfabetizado <input type="checkbox"/> ensino fundamental completo <input type="checkbox"/> ensino fundamental incompleto <input type="checkbox"/> ensino médio completo <input type="checkbox"/> ensino médio incompleto <input type="checkbox"/> ensino superior <input type="checkbox"/> pós-graduado
<b>Sexo</b>	<input type="checkbox"/> feminino <input type="checkbox"/> masculino
<b>Nacionalidade</b>	
<b>Cidade atual</b>	

Dados sobre a planta medicinal	
<b>Conhece a planta “gaiana”</b>	<input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> não
<b>Local de coleta</b>	<input type="checkbox"/> no quintal de casa <input type="checkbox"/> mato <input type="checkbox"/> outro: _____
<b>Época de coleta</b>	<input type="checkbox"/> verão <input type="checkbox"/> outono <input type="checkbox"/> inverno <input type="checkbox"/> primavera
<b>Cultiva em casa</b>	<input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> não
<b>Indicação terapêutica</b>	_____ _____
<b>Fonte de conhecimento do uso</b>	<input type="checkbox"/> familiares e vizinhos <input type="checkbox"/> profissional da saúde <input type="checkbox"/>
<b>Modo de preparo</b>	<input type="checkbox"/> fresca <input type="checkbox"/> depois de seca <input type="checkbox"/> infusão <input type="checkbox"/> maceração <input type="checkbox"/> outro: _____
<b>Qual parte da planta utiliza</b>	<input type="checkbox"/> folha <input type="checkbox"/> galhos <input type="checkbox"/> raiz <input type="checkbox"/> flores <input type="checkbox"/> todas as partes
<b>Conhece outro nome popular além de gaiana?</b>	<input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> não, se sim, qual o(s) nome(s): _____

<b>Forma de administração</b>	<input type="checkbox"/> uso externo <input type="checkbox"/> via oral <input type="checkbox"/> chá <input type="checkbox"/> outra via, qual (is): _____
<b>Tempo de tratamento</b>	_____
<b>Resultados obtidos</b>	<input type="checkbox"/> satisfatórios <input type="checkbox"/> regular <input type="checkbox"/> nenhum efeito
<b>Motivo do uso da planta</b>	<input type="checkbox"/> mais barato <input type="checkbox"/> não faz mal a saúde <input type="checkbox"/> bom resultado <input type="checkbox"/> outro: _____
<b>Conservação</b>	<input type="checkbox"/> planta seca <input type="checkbox"/> planta fresca <input type="checkbox"/> macerado Se macerado em qual solvente: _____
<b>Efeitos colaterais</b>	<input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> não, Qual (is): _____
<b>Utiliza a planta sozinha ou em associação com outra planta</b>	<input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> não, se sim, para qual finalidade: _____
<b>Observações adicionais:</b>	

## ANEXO A – APROVAÇÃO DO PROJETO DE PESQUISA INTITULADO PELA PLATAFORMA BRASIL

The screenshot displays the 'Plataforma Brasil' web interface. At the top, there is a green header with the 'Saúde' logo and 'Ministério da Saúde' text. Below this, the 'Plataforma Brasil' logo is visible on the left, and navigation links for 'principal' and 'sair' are on the right. A dark blue navigation bar contains buttons for 'Público', 'Pesquisador', and 'Alterar Meus Dados'. The user's name 'Margareth Linde Athayde - Pesquisador | V3.0' and session expiration 'Sua sessão expira em: 39min 27' are shown on the right side of this bar.

The main content area is titled 'DETALHAR PROJETO DE PESQUISA'. It features a section for 'DADOS DA VERSÃO DO PROJETO DE PESQUISA' with the following information:

- Título da Pesquisa:** Estudo etnofarmacológico de *Poikilacanthus glandulosus* Ariza (Nees) na região de Santiago/RS
- Pesquisador Responsável:** Margareth Linde Athayde
- Área Temática:**
- Versão:** 1
- CAAE:** 43223615.1.0000.5346
- Submetido em:** 24/03/2015
- Instituição Proponente:** Universidade Federal de Santa Maria/ Pró-Retoria de Pós-Graduação e Pesquisa
- Situação da Versão do Projeto:** Aprovado
- Localização atual da Versão do Projeto:** Pesquisador Responsável
- Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

At the bottom right of the details section, there is a circular stamp that reads 'COORDENADOR ORIGINAL' and a 'Comprovante de Recepção' with the ID 'PB\_COMPROVANTE\_RECEPCAO\_486900'.

## ANEXO B – APROVAÇÃO DO PROJETO DE PESQUISA PELO COMITÊ DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA



Comissão de Ética no Uso de Animais  
da  
Universidade Federal de Santa Maria

Santa Maria, 07 de abril de 2016  
CEUA N 5786050215

Ilmo(a). Sr(a).  
Responsável: Sara Marchesan De Oliveira  
Área: Bioquímica E Biologia Molecular  
Sara Marchesan De Oliveira (orientador)

Título da proposta: "Atividade anti-inflamatória tópica do extrato bruto de *Solanum corymbiflorum* e *Poikilacanthus glandulosus* sobre o edema de orelha induzido por óleo de crôton."

### Parecer Consubstanciado da Comissão de Ética no Uso de Animais UFSM

A Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Santa Maria, no cumprimento das suas atribuições, analisou e **APROVOU** o Relatório Final (versão de 28/março/2016) da proposta acima referenciada.

Resumo apresentado pelo pesquisador: "1. Os objetivos propostos foram todos cumpridos? Resp: Sim Os resultados obtidos propiciaram a criação de novos projetos? Resp: Sim 2. O N amostral proposto inicialmente foi suficiente? Qual o N amostral total alocado? Resp: Sim. 192 animais 3. Houve perdas? se sim, quantas? Resp: Não 4. Ocorreu algum evento adverso durante a condução do estudo? Resp: Não 5. Resultados já apresentados em congresso? Resp: Não 6. Resultados já publicados? Resp: Sim".

Comentário da CEUA: "".

Profa. Dra. Daniela Bitencourt Rosa Leal  
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais  
Universidade Federal de Santa Maria

Prof. Dr. Denis Broock Rosemberg  
Vice-Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais  
Universidade Federal de Santa Maria

## ANEXO C – APROVAÇÃO DO MANUSCRITO NO PERIÓDICO JOURNAL OF APPLIED PHARMACEUTICAL SCIENCE

**Journal of Applied Pharmaceutical Science** <japs@ejmanager.com> 14 de mai ☆ ↶ ↷  
para mim ▾

2 pessoas

inglês ▾ > português ▾ Traduzir mensagem Desativar para: inglês x

Dear Dr. Thiele Faccim de Brum,

I am pleased to inform you that your manuscript titled as "Effect of Poikilacanthus glandulosus (Nees) Ariza branches and gallic acid against viability of Echinococcus ortleppi protoscoleces" (Manuscript Number: JAPS-2016-04-267) was accepted for publication in the Journal of Applied Pharmaceutical Science. You are required to submit article processing charges USD 75 within next three days of receiving this mail through Banking/Paypal. Payment details are as follows;

For SWIFT/wire transfer:  
[Please add US \$ 10 extra for bank transaction charges]  
A/C Name: OPEN SCIENCE PUBLISHERS LLP  
A/C No. 50200005570011  
Bank Name: HDFC bank Pvt. Ltd.  
IFSC: HDFC000192  
SWIFT Code: HDFCINBBXXX  
MICR code: 474240002

Paypal email: [opensciencepublishersllp@gmail.com](mailto:opensciencepublishersllp@gmail.com)

Please send a scanned copy of the deposition receipt of amount transferred to [editor@japsonline.com](mailto:editor@japsonline.com)

---

You could check your possible publication date at your author page.

Editor JAPS  
Adic. a circ.  
Mostrar detalhes