

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

**ESTUDO FARMACOGNÓSTICO DE
Pithecoctenium echinatum (Jacq.) Bail**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Rosana Casoti

**Santa Maria, RS, Brasil
2012**

**ESTUDO FARMACOGNÓSTICO DE
Pithecoctenium echinatum (Jacq.) Baill**

Rosana Casoti

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de Concentração em Produtos Naturais, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM,RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências Farmacêuticas.**

Orientadora: Prof^a Dr^a Melânia Palermo Manfron

Santa Maria, RS, Brasil
2012

Casoti, Rosana
Estudo Farmacognóstico de *Pithecoctenium echinatum*
(Jacq.) Baill / Rosana Casoti. 2012.
108 p.; 30cm

Orientadora: Melânia Palermo Manfron
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Maria, Centro
de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Ciências
Farmacêuticas, RS, 2012

1. *Pithecoctenium echinatum* (Bignoniaceae) 2. Morfo-anatomia
3. Controle de qualidade 4. Atividade biológica 5. Plantas medicinais
I. Manfron, Melânia Palermo II. Título.

© 2012

Todos os direitos autorais reservados a Rosana Casoti. A reprodução de partes ou do todo deste trabalho só poderá ser feita mediante a citação da fonte.

Endereço: Rua Luiz Zaganelli, 319, Acioli, João Neiva, ES, 29687-000

Fone (0xx) 27 3278 1153. End. Eletr: rocasoti@hotmail.com

**Universidade Federal de Santa Maria
Centro de Ciências da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas**

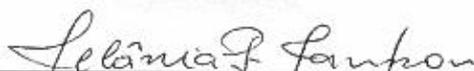
A Comissão Examinadora, abaixo assinada,
aprova a Dissertação de Mestrado

**ESTUDO FARMACOGNÓSTICO DE
Pithecoctenium echinatum (Jacq.) Baill**

por
Rosana Casoti

como requisito parcial para obtenção do grau de
Mestre em Ciências Farmacêuticas

COMISSÃO EXAMINADORA:



Prof^a. Dr^a. Melânia Palermo Manfron (UFSM)
(Presidente/Orientadora)



Prof. Dr. José Angelo Silveira Zuñazzi (UFRGS)



Prof. Dr. Sérgio Luiz Dalmora (UFSM)

Santa Maria, 28 de Março de 2012.

*“Desconfie do destino e acredite em você.
Gaste mais horas realizando que sonhando,
Fazendo que planejando, vivendo que esperando...
Porque, embora quem quase morre esteja vivo,
Quem quase vive, já morreu...”*

Luiz Fernando Veríssimo

O amor de Deus os uniu, o amor entre vocês me trouxe ao mundo, o amor de vocês me fez chegar até aqui. E hoje, adulta, enxergo que sem o único e verdadeiro amor, ninguém faria por mim tudo que vocês fizeram.

Papai e Mamãe

Esta dissertação é sem sombra de dúvida...nossa !

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus pelas maravilhas que tem proporcionado em minha vida.

À minha família Sirtulí, que comigo torce, chora, sorri e apóia em todos momentos, além de vibrarem com todas minhas vitórias. Agradeço aos meus pais Matilde e Edivaldo pelo grande amor dedicado a mim, acreditando e incentivando sempre. Em destaque, à minha mãe querida, ideal e exemplo de mulher, fonte inspiradora, porto seguro, que com sua força e coragem nunca me deixou desistir quando surgiram obstáculos.

Ao meu Amor, Jorge L. S. Sonogo, pelo carinho, conselhos e dedicação.

À querida professora orientadora Melânia P. Manfron por todo carinho de mãe; pelos ensinamentos, dedicação, disponibilidade, eficiência e incentivo que me deste, contribuindo de maneira decisiva na realização deste trabalho.

Ao professor Roberto Berlinck pela oportunidade de trabalhar em seu laboratório na USP - São Carlos e por todas as amizades conquistadas, em especial ao Mario Ferreira.

Ao professor João Marcelo S. de Oliveira pela orientação e ensinamentos botânicos prestados e aos colegas do laboratório de botânica, Mariane P. Dorneles, Cristieli Spat, Patrícia K. Costa, Merielem S. Martins, Cesar C. de Freitas, Marisa A. B. Abbad e Jaqueline Z. Sartoti pelo apoio e amizade.

Aos meus amigos de laboratório, Daiane F. Dala Lana, Camila B. Pereira, Tiago T. Makí, Raquel M. Necchi, Luísa M. Machado, Rachel de Lima, Lauri Júnior Royer, Aline Marin, Camila Z. Zanotto, Vilmar Banderó Filho, Alexandre Ribas e Cauriane M. Ercolani. Meu muito obrigado pelo apoio, palavras de incentivo e auxílio.

Aos meus amigos funcionários da UFSM, Vera Pagliarin, Gilberto D. Zanetti, Antônio Renato Sangoi, Paulo Ricardo J. Costa pelo carinho, atenção, conselhos e ensinamentos.

À todas minhas amigas da Igreja Batista, em especial a Giuliane B. Cardoso, Hanna S. Santos, Camila P. Diefenthaler, Catia Flores e Diéssica Vargas pelo carinho, apoio e orações.

À Eunice, Greice e Maria Fernanda pelo carinho de família.

À UFSM pela oportunidade de poder realizar este trabalho.

À CAPES pela concessão da bolsa de mestrado.

Aos professores que se disponibilizaram a avaliar este trabalho, agradeço as valiosas contribuições.

RESUMO

Dissertação de Mestrado
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas
Universidade Federal de Santa Maria, RS, Brasil

ESTUDO FARMACOGNÓSTICO DE *Pithecoctenium echinatum* (Jacq.) Baill

Autora: Rosana Casoti
Orientadora: Melânia Palermo Manfron
Local e Data de Defesa: Santa Maria, 28 de Março de 2012.

Pithecoctenium echinatum pertence à família Bignoniaceae, conhecida popularmente como pente-de-macaco e é utilizada na medicina popular para inflamações, reumatismo, infecções cutâneas, dor de cabeça, depurativo do sangue e calmante. O objetivo deste trabalho foi realizar a caracterização morfo-anatômica do fruto de *P. echinatum*; determinar parâmetros físico-químicos de qualidade da droga vegetal; isolar compostos químicos do metabolismo secundário, bem como investigar atividade antimicrobiana, antioxidante e anti-inflamatória, além de analisar parâmetros bioquímicos de toxicidade hepática e renal no extrato bruto das sementes de *P. echinatum*. Esta espécie possui ovário bicarpelar com presença de tricomas, emergências e cristais. Possui placentação parietal. O rudimento seminal é anátropo, unitegumentado e tenuinucelado. O anel nectarífero possui complexos estomáticos e tricomas. O epicarpo é cutinizado com presença de lenticelas, emergências e complexos estomatíferos. O mesocarpo externo possui células parenquimáticas, células pétreas, células esclerificadas e cristais. A semente é alada e exotestal. O endotélio e o endosperma constituem o envoltório membranáceo do embrião. O mesofilo cotiledonar possui compostos químicos como alcaloides, óleos fixos e voláteis, presença escassa de amido e é constituído de paredes pécticas. Na caracterização físico-química, por meio de testes farmacopeicos foi utilizado droga vegetal seca, constatando que não houve variação significativa das amostras coletadas em locais diferentes. O extrato hidroetanólico 70% (EB) das sementes de *P. echinatum* apresentou compostos do metabolismo secundário como esteróides e/ou triterpenos, flavonoides, alcaloides, antraquinonas, taninos catéquicos, oxidrila fenólica e heterosídeos cardiotônicos e óleos voláteis. Por doseamento espectroscópico foram determinados polifenóis, flavonoides e taninos no EB e frações. *P. echinatum* apresentou potencial antioxidante (CE₅₀ 131,84 µg/ml) na fração acetato pelo método do DPPH e atividade antimicrobiana à *P. aeruginosa*, *P. zophii* e *C. albicans* pelo método de microdiluição em caldo (CIM). A partir do EB das sementes de *P. echinatum* foi realizado o isolamento e a identificação de dois flavonoides diometina e hesperitina, agliconas flavona e flavanona, respectivamente. Estes flavonoides foram isolados de *P. echinatum* pela primeira vez. Os compostos foram determinados e analisados por CLAE/MS e RMN e seus espectros comparados com a literatura. A atividade anti-inflamatória do EB foi avaliada pelo método da indução da inflamação por cilindros de algodão, e realizadas dosagens séricas dos ratos submetidos ao bioensaio, nos quais foram administrados a três grupos de ratos, por via oral, 300mg/kg/dia do extrato bruto, 5mg/kg/dia de nimesulida e propilenoglicol 20% v/v, por 6 dias. Os resultados obtidos mostraram que o extrato bruto de *P. echinatum* apresentou inibição da inflamação significativa de 24,7%, semelhante à inibição obtida pelo grupo de animais tratados com nimesulida de 21,4%, em relação ao grupo controle. Os parâmetros hematológicos mostraram que houve aumento no número de leucócitos e diminuição no volume corpuscular médio (VCM), enquanto que AST, ALT e creatinina não apresentaram diferença significativa no uso do extrato de *P. echinatum*, quando comparados com o grupo controle propilenoglicol. Portanto, os parâmetros físico-químicos estabelecidos para *P. echinatum* possibilitam controle de qualidade da droga dessa espécie, e esta, apresentou atividades antimicrobiana, antioxidante e antiinflamatória. Além disso, não foram observados sinais de hepatotoxicidade e nefrotoxicidade nas condições experimentais testadas.

Palavras-chave: *Pithecoctenium echinatum*. Plantas medicinais. Análises físico-químicas. Morfo-anatomia. Atividade biológica.

ABSTRACT

Master Dissertation
Graduate Program in Pharmaceutical Sciences
Federal University of Santa Maria, RS, Brazil

STUDY OF PHARMACOGNOSY *Pithecoctenium echinatum* (Jacq.) Baill

Author: Rosana Casoti
Advisor: Melanie Palermo Manfron
Place and Date of Defense: Santa Maria, March 28, 2012.

Pithecoctenium echinatum belongs to the family Bignoniaceae, popularly known as comb monkey used in folk medicine for inflammations, rheumatism, skin infections, headaches, cleanses the blood and calming. The objective of this study was to characterize morphological and anatomical fruit of *P. echinatum*; to determine the physico-chemical quality of the plant drug, isolating chemical compounds of secondary metabolism, as well as to investigate antimicrobial, antioxidant and anti-inflammatory, and analyzing biochemical parameters of liver and kidney toxicity in the crude extract (CE) of seeds of *P. echinatum*. This species has bicarpelar ovary with the presence of trichomes, crystals and emergencies. It has parietal placentation. The rudiment seminal anatropous, unitegmic and tenuinucellate. The ring nectary has stomatal complexes and trichomes. The epicarp has cutin with the presence of lenticels, estomatíferos and complex emergencies. The outer mesocarp has parenchyma cells, stone cells, sclerified cells and crystals. The endocarp is represented by a single cell layer is not sclerified. The seed is winged and exotestal. The endothelium and the endosperm are the membranaceous embryo. The mesophyll has chemical compounds such as alkaloids, fixed oils, volatile oils, scarce presence of starch and consists of pectic walls. In physico-chemical characterization, using pharmacopoeia tests was used dried vegetable drug, noting that no significant variation of the samples collected in different locations. The hydroethanolic extract 70% seeds of *P. echinatum* presented secondary metabolic compounds such as steroids and/or triterpenes, flavonoids, alkaloids, anthraquinones, tannins, catechin, phenolic hydroxyl heterosides cardiotoxic and volatile oils. Assay polyphenols, flavonoids and tannins were determined by spectroscopic in the CE and fractions. *P. echinatum* showed antioxidant potential (IC_{50} 131.84 mg/ml) in acetate fraction by the DPPH method and antimicrobial activity to *P. aeruginosa*, *P. zophii* and *C. albicans* by the microdilution method (MIC). From the CE the seeds of *P. echinatum* we performed the isolation and identification of hesperetin and diosmetin. These flavonoids were isolated from *P. echinatum* first. The compounds were determined and analyzed by HPLC / MS and NMR and their spectra compared with the literature. The anti-inflammatory activity of the CE was assayed by the induction of inflammation for cotton rolls and serum taken from rats submitted to the bioassay, in which were administered orally by 300mg/kg/day of CE for 6 consecutive days and compared to nimesulide (5mg/kg/day) and negative control (propylene glycol 20% v/v). The results showed that the CE of *P. echinatum* showed significant inhibition of inflammation of 24.7%, similar to the inhibition obtained by the group of animals treated with nimesulide 21.4% compared to controls. The hematological parameters showed an increase in the number of leukocytes and decreased of corpuscular medium volume, while AST, ALT and creatinine showed no significant difference in the use of CE compared with the control group propylene glycol. Therefore, the physico-chemical parameters established for *P. echinatum* enable quality control of drugs of this kind, and this presented antimicrobial, antioxidant and anti-inflammatory activities. Furthermore, no evidence of a hepatotoxicidade and nephrotoxicity in the experimental conditions tested.

Keywords: *Pithecoctenium echinatum*. Medicinal plants. Physical and chemical analyzes. Morpho-anatomy. Biological activity.

LISTA DE FIGURAS

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 *PITHECOCTENIUM ECHINATUM* (JACQ.) BAILL

Figura 1 – *Pithecoctenium echinatum* (Jacq.) Baill..... 17

Figura 2 – Glicosídeos iridoides dos caules de *P. echinatum*..... 19

2.3 METABÓLITOS SECUNDÁRIOS

Figura 3 – Núcleo fundamental dos flavonoides..... 24

2.4 ATIVIDADE BIOLÓGICA

Figura 4 – Formação de espécies reativas de oxigênio e mecanismos antioxidantes nos sistemas biológicos. 28

Figura 5 – Síntese de prostaglandinas e leucotrienos..... 31

Figura 6 – Granuloma..... 33

3 MANUSCRITOS

3.1 MANUSCRITO 1 “Morfo-anatomia do fruto de *Pithecoctenium echinatum* (Jacq.) Baill (Bignoniaceae)”

Figura 1 – Flor de *P. echinatum*..... 45

Figura 2 – Fotos do ovário..... 45

Figura 3 – Corte transversal de *P. echinatum*..... 47

Figura 4 – Corte longitudinal de *P. echinatum*..... 48

Figura 5 – Vista geral do fruto de *P. echinatum*..... 49

Figura 6 – Corte transversal do pericarpo de *P. echinatum*..... 51

Figura 7 – Vista geral da semente de *P. echinatum*..... 52

Figura 8 – Aspecto geral do embrião..... 52

Figura 9 – Corte longitudinal da semente de *P. echinatum*..... 55

Figura 10 – Corte longitudinal da semente de *P. echinatum*..... 56

Figura 11 – Histoquímica da semente de *P. echinatum*..... 57

3.2 MANUSCRITO 2 “Caracterização físico-química e investigação de bioatividade em *Pithecoctenium echinatum* (Jacq.) Baill (Bignoniaceae)”

Figura 1 – Correlação entre polifenóis e atividade antioxidante..... 71

3.3 MANUSCRITO 3 “Avaliação da atividade anti-inflamatória e isolamento de diosmetina e hesperitina de *Pithecoctenium echinatum* (Jacq.) Baill (Bignoniaceae)”

Figura 1 - Fracionamento do extrato diclorometano..... 80

Figura 2 - Estrutura da diosmetina..... 82

Figura 3 - Estrutura da hesperitina..... 85

Figura 4 – Atividade anti-inflamatória do extrato bruto de *P. echinatum*..... 87

LISTA DE TABELAS

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.4.2 Atividade anti-inflamatória

Tabela 1 – Espécies vegetais com atividade anti-inflamatória aguda e crônica.....	38
---	----

3 MANUSCRITOS

3.2 MANUSCRITO 2 “Caracterização físico-química e investigação de bioatividade em *Pithecoctenium echinatum* (Jacq.) Baill (Bignoniaceae)”

Tabela 1 – Análises físico-químicas das sementes de <i>P. echinatum</i>	68
---	----

Tabela 2 – Rendimento dos metabólitos secundários de <i>P. echinatum</i>	69
--	----

Tabela 3 – Doseamentos de metabólitos secundários das sementes de <i>P. echinatum</i>	70
---	----

Tabela 4 – Potencial antioxidante do EB e frações das sementes <i>P. echinatum</i>	70
--	----

Tabela 5 – CIM expressos em µg/ml nos extratos das sementes de <i>P. echinatum</i>	72
--	----

3.3 MANUSCRITO 3 “Avaliação da atividade anti-inflamatória e isolamento de diosmetina e hesperitina de *Pithecoctenium echinatum* (Jacq.) Baill (Bignoniaceae)”

Tabela 1 - Dados de RMN (δ) ^1H (400MHz) e ^{13}C (100 MHz) correlacionados via $g\text{HSQC}$ ($^1J_{\text{CH}}$) do composto 1 em DMSO- d_6 e do isolado na literatura em DMSO- d_6	84
---	----

Tabela 2 - Dados de RMN (δ) ^1H (400MHz) e ^{13}C (126 MHz) correlacionados via $g\text{HSQC}$ ($^1J_{\text{CH}}$) do composto 2 em DMSO- d_6 e do isolado na literatura em DMSO- d_6	86
---	----

Tabela 3 - Parâmetros hematológicos e bioquímicos obtidos do soro de ratos Wistar, tratados com 300mg/kg/dia, via oral, após 6 dias.....	88
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

AINEs	anti-inflamatórios não esteroidais
AAS	ácido acetilsalicílico
ALT	alanina-aminotransferase
AMP	monofosfato adenosina
AST	aspartato aminotransferase
CCD	cromatografia camada delgada
CIM	concentração inibitória mínima
COX	ciclooxigenase
DCM	diclorometano
DPPH	2,2-difenil-1-picril-hidrazila
EB	extrato bruto
EE	Estolato de eritromicina
EROs	espécies reativas de oxigênio
FA	fosfatase ácida
GSH	glutationa-peroxidase
GSSG	glutationa oxidada
IBPM	Instituto Brasileiro de Plantas Mediciniais
IL	interleucina
NADPH	fosfato de dinucleotídio de adenina nicotiamida
NCCLS	National Commit-tee for Clinical and Laboratory Standards
NOS	óxido nítrico sintase
$O_2^{\cdot-}$	ânion superóxido
$\cdot OH$	radical hidroxil
PAS	Schiff-ácido periódico
RE	retículo endoplasmático
RPMI	Roswell Park Memorial Institute – meio de cultura de tecido animal desidratado
TBHP	Ferr-butyl-hidroperóxido
TNF	fator de necrose tumoral

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	14
2. REVISÃO DE LITERATURA	16
2.1 <i>Pithecoctenium echinatum</i> (JACQ.) BAILL.....	16
2.2 PLANTAS MEDICINAIS COMO FONTE DE MEDICAMENTOS.....	20
2.3 METABÓLITOS SECUNDÁRIOS.....	23
2.3.1 Flavonoides.....	23
2.4 ATIVIDADE BIOLÓGICA.....	27
2.4.1 Atividade Antioxidante.....	27
2.4.2 Atividade Anti-inflamatória.....	29
2.4.2.1 Inflamação.....	29
2.4.2.2 Inflamação granulomatosa.....	32
2.4.2.3 Drogas anti-inflamatórias não-esteroidais (AINEs).....	33
2.4.2.4 Drogas vegetais com ação anti-inflamatória.....	35
2.5 PARÂMETROS BIOQUÍMICOS HEPÁTICO E RENAL.....	39
3. MANUSCRITOS	41
3.1 MANUSCRITO 1 “Morfo-anatomia do fruto de <i>Pithecoctenium echinatum</i> (Jacq.) Baill (Bignoniaceae)”.....	42
3.2 MANUSCRITO 2 “Caracterização físico-química e investigação de bioatividade em <i>Pithecoctenium echinatum</i> (Jacq.) Baill (Bignoniaceae)”.....	62
3.3 MANUSCRITO 3 “Avaliação da atividade anti-inflamatória e isolamento de diosmetina e hesperitina de <i>Pithecoctenium echinatum</i> (Jacq.) Baill (Bignoniaceae)”.....	76
4. DISCUSSÃO GERAL	92
5. CONCLUSÕES	96
6. REFERÊNCIAS	97

APRESENTAÇÃO

Esta dissertação apresenta os resultados sob forma de manuscritos a serem publicados.

O item Discussão apresenta interpretação e comentários gerais dos resultados obtidos nos três manuscritos que compõem esse trabalho.

O item Conclusões apresenta as conclusões finais do trabalho, considerando os manuscritos.

Nas Referências menciona-se somente às citações que são apresentadas nos itens Introdução, Revisão de Literatura e Discussão Geral.

1. INTRODUÇÃO

Os recursos naturais, em especial as plantas têm sido um dos elos entre o homem e a natureza desde os tempos primórdios. A pesquisa nesta área tem demonstrado que os homens pré-históricos já utilizavam estas plantas para amenizar os sofrimentos de males físicos que os acometiam (CASTRO; CHENALLE, 1995). No Brasil o uso de plantas medicinais está relacionado à cultura popular, oriundo dos europeus, negros e principalmente povos indígenas, praticado até os dias atuais (MACEDO; FERREIRA, 2004).

Há uma grande variedade de espécies de plantas existentes na flora mundial, muitas com importantes propriedades terapêuticas. O Brasil é o país com maior diversidade genética vegetal do mundo, estimando a existência entre 350 a 550 mil espécies vegetais, mas apenas 10% (cerca de 55 mil) das espécies existentes foram catalogadas e menos de 1% (cerca de 4,4 mil) destas espécies vegetais estudadas do ponto de vista químico e farmacológico (GUERRA; NODARI, 2004).

Segundo OMS, de 252 fármacos essenciais para saúde humana 11% são exclusivamente de origem vegetal e em relação ao mercado mundial de medicamentos, aproximadamente 40% destes são oriundos direta ou indiretamente de fontes naturais, sendo a maioria (75%) de origem vegetal (ZUANAZZI; MAYORGA, 2010).

O reconhecimento internacional do fitoterápico e o fortalecimento do desenvolvimento tecnológico são fatores desencadeantes do aumento da utilização destes medicamentos. Contudo, grande parte da comercialização de plantas medicinais no Brasil advém de mercados, lojas de produtos naturais e feiras livres, não possuindo certificação de qualidade. Conseqüentemente, a utilização equivocada e inadequada de plantas medicinais pode trazer uma série de danos à saúde humana (VEIGA-JÚNIOR, 2005; SOUSA, 2007).

Os fitoterápicos são medicamentos obtidos a partir de plantas medicinais, que devem oferecer garantia de qualidade, efeitos terapêuticos comprovados, composição química padronizada e segurança de uso para a população. A eficácia e a segurança devem ser validadas através de levantamentos etnofarmacológicos, documentações técnico-científicas em bibliografia e/ou estudos farmacológicos e toxicológicos pré-clínicos e clínicos. A qualidade deve ser alcançada mediante o

controle das matérias-primas. O registro de fitoterápicos depende, obrigatoriamente, de estudos morfológicos, anatômicos e citoquímicos da planta medicinal (ANVISA, 2000).

Desse modo, a realização de estudos histoquímicos contribui para localização do composto produzido pela planta; identificação correta do vegetal e resolução de problemas taxonômicos e prospecção de compostos bioativos, otimizando principalmente todo processo de extração (METCALFE, CHALK, 1950; ASCENÇÃO, 2004).

As plantas contêm ampla variedade de metabólitos secundários, dentre eles, alcaloides, terpenos e compostos fenólicos. Estas substâncias recebem especial atenção, devido às funções biológicas como antioxidante, anti-inflamatória, antitumoral, antimicrobiana, dentre tantas outras ações farmacológicas. Existe a necessidade de estudos científicos que comprovem sua atividade para justificar as várias aplicações terapêuticas dos vegetais (SILVA, 1978; PIETTA, 2000).

Existem vários modelos, tanto *in vitro* como *in vivo*, para avaliar a atividade biológica de plantas medicinais como método do radical livre (DPPH) para avaliar o potencial antioxidante; concentração inibitória mínima para avaliar atividade antimicrobiana e modelo de indução do granuloma em ratos para determinar ação anti-inflamatória crônica (HAMMER *et al.*, 1999; CHOI *et al.*, 2002; ADEBAYO *et al.*, 2003).

Neste contexto, este trabalho tem por objetivo, a caracterização morfo-anatômica do fruto de *P. echinatum*, visando descrever características estruturais úteis para a melhor descrição e identificação da espécie; determinar parâmetros físico-químicos de qualidade da droga vegetal; isolar compostos químicos do metabolismo secundário, bem como investigar atividade antimicrobiana, antioxidante e anti-inflamatória, além de analisar parâmetros bioquímicos de toxicidade hepática e renal no extrato bruto das sementes de *P. echinatum*.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 *PITHECOCTENIUM ECHINATUM* (JACQ.) BAILL

P. echinatum pertence à família Bignoniaceae que é composta de árvores, arbustos e lianas com mais de 120 gêneros e 800 espécies com ampla distribuição nas regiões tropicais de todo mundo, especialmente nos trópicos americanos. É a mais importante de cipós florestais de região subtropical, dividi-se em 8 tribos, dos quais 3 ocorrem no Brasil: Tecomae, Bignoniae, Crescentieae, que são facilmente distinguidas pelo seu hábito e pelas estruturas dos seus frutos (BRANDÃO, 1979; GENTRY, 1980; VON POSER *et al.*, 2000). A tribo Bignonieae contém cerca de 400 espécies de liana, e é geralmente considerada a mais avançada (GENTRY, 1980).

Espécies de Bignoniaceae são utilizadas na horticultura, na medicina e também como madeira e corante. Apresentam uma diversidade de classes de constituintes químicos entre os quais se incluem lignanas, flavonoides, ácidos cinâmicos, ácidos benzóicos, alcaloides, triterpenos e monoterpenos (principalmente iridoides). As naftoquinonas são os mais frequentes, distinguindo-se um grupo estrutural mais simples constituído por prenilnaftoquinonas, piranonaftoquinonas e furanonaftoquinonas e um outro grupo, representado por estruturas mais complexas (CHOUDHURY *et al.*, 2011).

Nos últimos anos, houve um grande aumento nas pesquisas realizadas com espécies vegetais da família Bignoniaceae, as quais têm sido estudadas sob o ponto de vista farmacológico e toxicológico. A *Tabebuia avellanedae* e *Tabebuia cassinoides* são usadas como adjuvantes na terapia do câncer, devido ao lapachol uma naftoquinona (RAO, KINGSTON, 1982; STEINERT *et al.*, 1995). A atividade antimicrobiana em *Kigelia pinnata* é devido à presença de compostos iridoides (AKUNYILI *et al.*, 1991). A propriedade antiviral dos compostos verbascosideo e isoverbascosideo obtidos de *Markhamia lutea* (KERNAN *et al.*, 1998). De *Tecoma stans*, a tecomina e tecostanina compostos com atividade antidiabética (COSTANTINO *et al.*, 2003). *Arrabidaea brachypoda* com atividade antifúngica, anti-inflamatória e antinociceptiva atribuída à presença de compostos fenólicos (ALCERITO *et al.*, 2002).

Aproximadamente 360 espécies de Bignoniaceae, ocorrem na América Central, Amazônia, Mata Atlântica e florestas secas e savanas da Argentina, Bolívia,

Brasil e Paraguai (LOHMANN, 2006). No levantamento, realizado no estado do Rio Grande do Sul, das espécies de trepadeiras ocorrentes em bordas de fragmentos de floresta estacional foram registradas, no município de Santa Maria, cerca de sete espécies da família Bignoniaceae, como *Adenocalymma marginatum* DC., *Arrabidaea selloi* (Spreng.) Sandwith, *Clytostoma callistegioides* (Cham.) Bureau, *Cuspidaria pterocarpa* DC., *Macfadyena unguis-cati* (L.) A.H. Gentry, *Pyrostegia venusta* Miers e *P. crucigerum* (L.) A.H. Gentry (DURIGON *et al*, 2009).

Pithecoctenium crucigerum (L.) A.H. Gentry e *Amphilophilum crucigerum* (L.) L. G. Lohmann são sinonímias atribuídas a *Pithecoctenium echinatum* (Jacq.) Baill, o qual é chamado popularmente de pente-de-macaco, cipó-pente-de-macaco; escova-de-macaco; cipó-cruzeiro. *Pithecoctenium echinatum*, nomenclatura referente aos espinhos do fruto, origina-se do grego, pithex que significa macaco; ctenion, pente e echinatus, espinhoso (SCHNEIDER; LONDERO, 1965; LOHMANN, 2006).



Figura 1 – *Pithecoctenium echinatum* (Jacq.) Baill
Fonte: Rosana Casoti, janeiro de 2012.

P. echinatum é uma planta trepadeira lenhosa, que forma caules de 5 a 10 cm de diâmetro. Suas folhas são opostas, compostas, trifolioladas ou bifolioladas com o folíolo central transformado em gavinha robusta trífida. Os folíolos são ovalados, revestidos por tricomas ou glabecentes; a inflorescência é racemosa com cerca de 15 cm de comprimento, pubescente, com brácteas conspícuas, recurvadas; cálice denticulado; corola de cor branca ou branco-amarelada, densamente tomentosa e pentâmera (CERVI *et al*, 1989). Os frutos em formato de cápsula são secos e deiscentes, de cor castanha, achatado, espinhoso curto. As sementes são aladas de coloração branca-prateada (POOL, 2007).

É uma espécie heliófita, comum em clareiras e bordas de floresta, formando junto com outras lianas, redes de proteção à comunidade florestal retendo umidade e matéria orgânica em submatas semidevastadas, nos capoeirões, capoeiras e, sobretudo nas orlas das matas e das estradas. Floresce entre outubro e novembro e seus frutos amadurecem entre março e abril (SANDWICH; HUNT, 1974).

P. echinatum é utilizada popularmente nos tratamentos de inflamações, de reumatismo, de infecções cutâneas, dor de cabeça, como depurativo do sangue e calmante (FRANCO; FONTANA, 2005).

O extrato bruto metanólico e a fração diclorometano (DCM) de caules de *P. echinatum* apresentaram atividade antioxidante frente DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazila) e atividade anticolinesterásica pelo teste acetilcolinesterase por bioautografia (MARTIN *et al.*, 2007).

No estudo fitoquímico realizado com o extrato metanólico dos caules foram isolados os glicosídeos iridoides teviridosídeo, ipolamiideo e strictolosídeo (VON POSER *et al.*, 2000). Martin e colaboradores (2007) isolaram 4 glicosídeos iridoides: teviridosídeo, ciclopropanoil teviridosídeo, hidroxibenzoil teviridosídeo, vaniloil teviridosídeo (figura 2), os quais apresentaram potencial antioxidante frente DPPH.

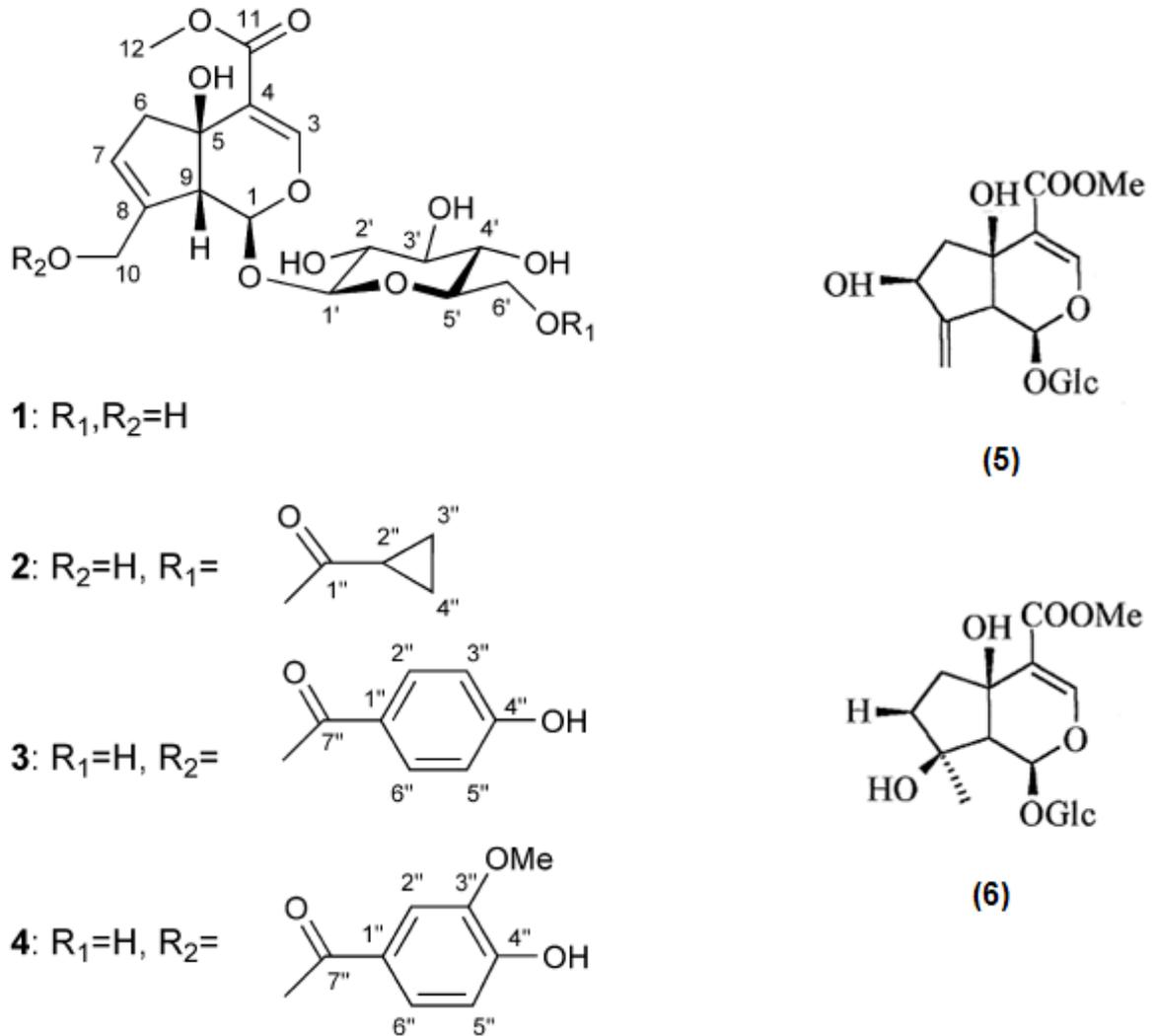


Figura 2 – Glicosídeos iridoides dos caules de *P. echinatum*.

(1) terividosídeo, (2) ciclopropanoil teviridosídeo, (3) hidroxibenzoil teviridosídeo, (4) vaniloil teviridosídeo, (5) estrictolósídeo e (6) ipolamiídeo.

Fonte: VON POSER *et al.* (2000); MARTIN *et al.* (2007)

2.2 PLANTAS MEDICINAIS COMO FONTE DE MEDICAMENTOS

A utilização das plantas medicinais ocorre desde a pré-história, onde homens primitivos praticavam saúde, alimentando-se de determinadas plantas pelo instinto de sobrevivência. Com isso, foram observando determinados efeitos que minimizavam suas enfermidades, acumulando assim, conhecimentos empíricos que foram passados de geração para geração (BRANDÃO, 2003).

Com o decorrer da evolução histórica, teorias e análises de certas plantas medicinais foram criadas com o objetivo de contribuir com a Ciência Médica Moderna. Surge então a Fitoterapia, que se caracteriza pela prática do uso de plantas ou de suas partes com a finalidade de prevenir, aliviar ou curar um processo patológico. Nessa transformação de uma planta em medicamento, prioriza-se a preservação da integridade química e farmacológica do vegetal, para garantir a constância de sua ação biológica e a segurança de utilização, além de valorizar o seu potencial terapêutico, obtendo-se então, um fitoterápico (BRASIL, 2004; VEIGA JÚNIOR *et al.*, 2005).

Segundo projeções do Instituto Brasileiro de Plantas Medicinais (IBPM), o mercado de medicamentos fitoterápicos movimenta anualmente cerca de 500 milhões de dólares no Brasil e cerca de 43 bilhões de dólares no mundo. Somente a Alemanha é responsável por 50% do mercado europeu e mais de 20% do mercado mundial de fitoterápicos, que representa mais de US\$ 3 bilhões. A taxa de crescimento de fitoterápicos da Espanha é da ordem de 35%; na Alemanha, 15%; na Itália, 11%; e no Reino Unido, 10%. Já na África, 80% da população depende do uso destes medicamentos, os quais representam alternativa frente ao alto custo dos fármacos sintéticos (TUROLA; NASCIMENTO, 2006; PINHEIRO, 2011).

A crescente busca por medicamentos a partir de plantas sem um rigor técnico e científico permitiu que inúmeros trabalhos com plantas medicinais estivessem disponíveis na literatura sem a correta identificação taxonômica das espécies utilizadas nas pesquisas. Para evitar esse problema, faz-se necessário uma abordagem interdisciplinar, ganhando valor e importância à execução de pesquisas com plantas medicinais, uma estratégia para a otimização dos estudos (DI STASI, 1996).

O fato da mesma espécie botânica em diferentes regiões, poder apresentar diferenças significativas em sua composição físico-química, é de extrema

importância para o estudo fitoquímico e a padronização de um fitoterápico levando em conta este tipo de variação, que vai desde a escolha do material até a etapa final do registro e divulgação dos resultados (CECHINEL FILHO, YUNES, 1998; GOTTLIEB, BORIN, 2000).

Padronizar um fitoterápico é uma tarefa complexa devido a sua composição heterogênea, que pode se apresentar na forma da planta inteira, partes de plantas ou extratos obtidos (ANVISA, 2000). Por isso é de essencial importância a observação do material vegetal de partida para o controle (ROSA, 2006).

Para garantir a qualidade reprodutível de um produto fitoterápico, faz-se necessária primeiramente autenticação da espécie, por meio da descrição macroscópica e microscópica; a determinação do grau de pureza, além de verificação de grupos ou de constituintes químicos, por meio de estudo fitoquímico, que é determinante na autenticidade da espécie vegetal, uma vez que este estudo identifica marcadores químicos (WHO, 1998; VEIGA JUNIOR *et al.*, 2005).

A possibilidade de isolar e identificar os princípios ativos dos produtos naturais usados na medicina popular só foi possível a partir do século XIX, com o desenvolvimento das técnicas de isolamento de substâncias puras a partir de produtos naturais e também dos métodos de elucidação das estruturas químicas. Entretanto, somente após a década de 1980, houve um aumento do interesse por compostos de origem vegetal, devido ao desenvolvimento de novos métodos de isolamento de substâncias ativas, tornando possível identificar substâncias em amostras complexas, como os extratos vegetais, a serem utilizadas como protótipos para o desenvolvimento de novos fármacos (TUROLA; NASCIMENTO, 2006).

A busca por moléculas bioativas pode se basear na posição filogenética da planta, selecionando um grupo de plantas em função da ocorrência de um determinado composto ou grupo de compostos característicos de uma determinada família; ou ainda, por estudos farmacológicos e toxicológicos, através de avaliações bioquímicas, em animais e/ou órgãos isolados, fornecendo parâmetros importantes na seleção de plantas para obtenção de biomoléculas ou de medicamentos fitoterápicos (MATOS, 1997; FELTROW; AVILA, 2000).

Entre os produtos naturais de origem vegetal, existe uma diversidade molecular de padrões estruturais que são encontradas nas distintas classes de metabólitos secundários como alcaloides, terpenos, flavonoides, taninos, entre outros, que representam uma fonte inesgotável de modelos originais de arquitetura

enantiopura. Devido essa grande variedade de moléculas, pesquisadores de vários campos da ciência têm se interessado pelos metabólitos vegetais, tendo em vista uma fonte promissora de novas substâncias potencialmente úteis ao homem (BARREIRO; FRAGA, 2001).

Um exemplo histórico da importância dos produtos naturais na gênese de fármacos foi a descoberta do ácido acetilsalicílico (AAS) a partir da salicina que é um glicosídeo natural proveniente das cascas dos caules de *Salix sp* (salgueiro). O AAS é um fármaco centenário empregado até hoje como protótipo de novos anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs), bem como no uso terapêutico como analgésico e antiinflamatório, atuando no controle da febre, na artrite reumatóide e na inibição da agregação plaquetária (BARREIRO; FRAGA, 2001; VIEGAS JUNIOR *et al.*, 2006).

Portanto, a utilização das plantas, seja como fitoterápico ou como fonte de substâncias protótipos, evidencia a importância da investigação científica para o desenvolvimento de um novo medicamento. Tais pesquisas deverão ser direcionadas à autenticidade botânica e química da espécie vegetal e à valorização da atividade farmacológica a ser explorada, garantindo conhecer os constituintes químicos de espécies vegetais, avaliar sua presença, além de selecionar as substâncias de interesse biológico e direcioná-las ao isolamento e elucidação estrutural (CECHINEL FILHO; YUNES; 1998; SIMÕES *et al.*, 2004).

2.3 METABÓLITOS SECUNDÁRIOS

São compostos orgânicos que não são considerados essenciais ao metabolismo basal da célula vegetal, mas que estão diretamente envolvidos nos processos de defesa contra herbívoros e microorganismos, proteção contra raios ultravioleta, atração de polinizadores e dispersores de sementes, bem como sua participação em alelopatias, que podem ser resultado da adaptação às condições ambientais na sobrevivência e perpetuação da espécie. Os metabólitos secundários variam de acordo com grupo filogenético e algumas substâncias são restritas a determinada família, gênero ou espécie, possibilitando o emprego como marcador taxonômico (BENNET; WALLSGROVE, 1994; SANTOS, 2004).

As plantas contêm uma ampla variedade de metabólitos secundários como, por exemplo, alcaloides, terpenos e compostos fenólicos, que recebem especial atenção, devido às funções anti-inflamatória, antioxidante, antitumoral, antimicrobiana, dentre tantas outras atividades farmacológicas (PIETTA, 2000).

2.3.1 Flavonoides

Os flavonoides representam um dos grupos fenólicos mais importantes e diversificados entre os produtos de origem natural. Essa classe de compostos é amplamente distribuída no reino vegetal, sendo biossintetizados a partir da via dos fenilpropanóides (ZUANAZZI; MONTANHA, 2004).

Os flavonoides são encontrados em diversas formas estruturais, sendo definidos quimicamente como substâncias compostas por um núcleo comum de fenilcromanona com substituição em uma ou mais hidroxilas, incluindo derivados ligados a açúcares (BIRT *et al.*, 2001). A maioria dos representantes desta classe possui 15 átomos de carbono em seu núcleo fundamental, constituído de duas fenilas ligadas por uma cadeia de três carbonos entre elas (figura 3). Estes podem apresentar-se como um anel pirano, ocorrendo formação de flavonas, flavonóis, flavanonas, dentre outros compostos (AHERNE; O'BRIEN, 2002).

As flavanonas diferem quimicamente das flavonas por apresentar uma ligação saturada entre carbonos dois e três. São encontradas em grandes quantidades em frutas cítricas, e possuem importância por serem substitutos em

potencial da sacarose, devido ao fato de dar origem às di-hidrochalconas, compostos de sabor doce bem acentuado (SILVA, 2001).

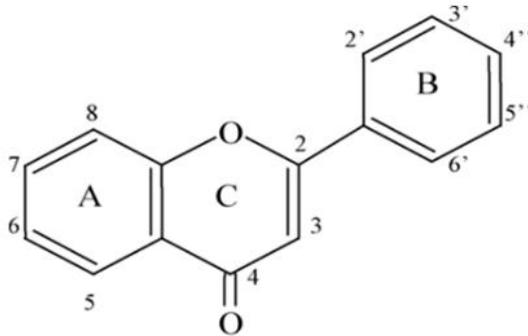


Figura 3 – Núcleo fundamental dos flavonoides

Flavonoides podem ser protetores contra doenças causadas por microorganismos em plantas, podem também reagir com enzimas, interferindo em processos biológicos, possuindo dessa forma, atividades farmacológicas em potencial como antioxidante, anti-inflamatória, antiviral, antifúngica, antiangiogênico, além de poderem influenciar nas células sinalizadoras e expressão gênica de relevância para o câncer e doenças do coração, entre outros (ZUANAZZI; MONTANHA, 2004; LOPEZ-POSADAS *et al.*, 2008).

A atividade antioxidante dos flavonoides é consequência de suas propriedades óxido-redução, as quais desempenham um importante papel na absorção e neutralização de radicais livres (DEGÁSPARI; WASZCZYNSKYJ, 2004). Dessa forma, demonstram grande eficiência no combate de vários tipos de moléculas oxidantes que estão envolvidos em danos no DNA e promoção de tumores (MARCHAND, 2002). Como as células fagocitárias produzem radicais livres como parte da defesa do corpo contra infecção, a ingestão adequada de antioxidantes é requerida para prevenir danos pelos oxidantes das próprias células imunes (CAO, 2001).

Na atividade anti-inflamatória, certos flavonoides podem bloquear os processos biosintéticos dos eicosanoides, como por exemplo quercetina e apigenina que possuem ação anti-inflamatória por causar inibição de COX-2 e de óxido nítrico sintase, como também inibir processos mitogênicos, interações célula-célula, incluindo possíveis efeitos na adesão molecular, como por exemplo a quercetina e a

luteolina, que podem reduzir a ativação do sistema complemento, diminuindo a adesão de células inflamatórias ao endotélio, resultando em uma redução da resposta inflamatória (FRIESENECKER *et al.*, 1995; MUTOH *et al.*, 2000; RASO *et al.*, 2001).

Pesquisas *in vitro* realizadas por Landolfi e colaboradores (1984) mostraram que flavonoides como a miricetina e quercetina foram capazes de modificar o metabolismo plaquetário do ácido araquidônico, bloqueando tanto o mecanismo da cicloxigenase como da lipoxigenase em concentrações relativamente elevadas, enquanto que em concentrações mais baixas o mecanismo da lipoxigenase foi o alvo principal da atividade inibitória. No entanto, a inibição da cicloxigenase e aumento de monofosfato adenosina (AMP) cíclico intracelular são os principais mecanismos envolvidos no efeito antiagregante de flavonoides como flavonas, apigenina, crisina e floretina.

Pelzer e colaboradores (1998) determinaram o efeito anti-inflamatório de 30 flavonoides das classes flavanonas, flavonas e flavonóis, mostrando que as flavanonas (eriodictiol e hesperitina); a flavona (7,4'-di-O-metilapigenina) e os flavonóis (quercetina, 3-O-metilquercetina e morina), inibiram significativamente o edema provocado pela carragenina em pata de rato por via intraperitoneal (ip).

A flavonona hesperidina, apresentou atividade anti-inflamatória aguda pelo método de edema de pata de rato e pleurisia induzida por carragenina na concentração de 50 mg/kg, via subcutânea, obtendo como resultado 47% e 48% de redução do edema e número de leucócitos, respectivamente, além verificar que esse flavonóide não causou danos à mucosa gástrica (EMIM *et al.*, 1994). Hesperidina é indicada no tratamento da insuficiência venosa crônica, vasculopatias, capilaropatias e hiperpermeabilidade capilar. É encontrada em abundância no mesocarpo (porção branca) dos limões e das laranjas verdes e parece ser mais ativa na presença da vitamina C. As doses usuais são de 20 a 200 mg/dia, por via oral (PRVADE MÉCUM, 2012).

O estudo realizado por Villa e colaboradores (1992) avaliou o efeito da diosmina e seu principal metabólito, diosmetina sobre os danos da membrana celular hepática de ratos frente a estolato de eritromicina (EE), ferr-butil-hidroperóxido (TBHP) e atividade antioxidante. O dano hepático foi monitorado pelas enzimas aspartato aminotransferase (AST) e fosfatase ácida (FA) constatando que apenas a diosmetina (50µM) protegeu contra lesão hepática frente a EE e que o

conteúdo total de AST e FA não foram afetados pelo tratamento prévio com flavonoides nas concentrações utilizadas. Quando as células foram tratadas com TBHP, diosmetina protegeu significativamente as células hepáticas. A atividade antioxidante da diosmetina foi consideravelmente maior do que a de diosmina. Após 40h de exposição aos flavonoides foi detectado na fração da membrana celular, apenas a diosmina, sugerindo maior efeito protetor à diosmetina.

A bioatividade da diosmetina também tem sido relatada como agente antimicrobiano, apresentando CIM de 25 µg/ml frente a bactéria *B. subtilis* e 50 µg/ml frente ao fungo *Trichophyton rubru* (MENG *et al.*, 2000); como agente anti-inflamatório, inibindo COX-2 (LOPEZ-POSADAS *et al.*, 2008); como composto quimioprotetor, inibindo a enzima citocromo P₄₅₀ (CIOLINO *et al.*, 1998); como agente anticancerígeno, exercendo efeitos citostáticos sobre progressão e proliferação do ciclo celular de células do câncer da mama (ANDROUTSOPOULOS *et al.*, 2009) e também como agente potencial para o tratamento de osteoporose, aumentando a diferenciação de osteoblastos (HSU; KUO, 2008).

O medicamento com associação de diosmina 450mg e hesperidina 50mg, via oral, possui propriedades venotônica e vasculoprotetora na microcirculação, normalizando a permeabilidade e reforçando a resistência capilar (RAMELET *et al.*, 2005, PRVADE MÉCUM, 2012). Este medicamento vem sendo comercializado há mais de dez anos, possuindo hoje vários produtos.

2.4 ATIVIDADE BIOLÓGICA

Nos últimos anos houve grande interesse em investigar os efeitos dos antioxidantes no tratamento de algumas doenças, devido sua capacidade de inibir ou reduzir lesões celulares causadas pelos radicais livres, os quais podem ser precursores de processos inflamatórios.

2.4.1 Atividade Antioxidante

A oxidação e produção de radicais livres são uma parte integrante do metabolismo normal de uma célula. Um desequilíbrio entre espécies reativas de oxigênio (EROs) e os mecanismos de defesa antioxidante (enzimática e não enzimática) de uma célula leva à produção excessiva de metabólitos do oxigênio, criando uma condição frequentemente denominado estresse oxidativo, que resulta na indução de danos celulares (SKAPER, 1997).

A produção de radicais livres (Figura 4) é controlada nos seres vivos por diversos compostos antioxidantes, os quais podem ter origem endógena (por ex., superóxido dismutase) ou serem provenientes da dieta alimentar e outras fontes como tocoferóis (vitamina E), ácido ascórbico (vitamina C), polifenóis, selênio e carotenóides (SOUSA *et al.*, 2007).

Os antioxidantes são capazes de estabilizar ou desativar os radicais livres antes que os mesmos ataquem os alvos biológicos nas células (ATOUI *et al.*, 2005). Os radicais livres também desempenham importante papel no sistema imunológico, agindo como uma barreira de defesa do organismo frente à presença de microrganismos, porém o efeito cumulativo desses radicais contribui para o aparecimento de diversas doenças como câncer, envelhecimento, cardiopatias e inflamações crônicas, entre outras (BABIOR, 2000).

As principais enzimas antioxidantes são a superóxido-dismutase, a glutathione peroxidase (GSH), glutathione reduzida; (GSSG) glutathione oxidada e forma reduzida de fosfato de dinucleotídeo de adenina nicotiamida (NADPH) (figura 4). Um dos radicais livres potencialmente lesivo é o O^2 que é convertido em superóxido ($O_2^{\cdot-}$) por enzimas oxidativas no retículo endoplasmático (RE), mitocôndrias, membrana plasmática, peroxissomas. A lesão celular pode ser causada também por radicais livres dos lipídios por meio da peroxidação (ROBBINS *et al.*, 2006).

Como os antioxidantes são importantes na manutenção da boa saúde, há um interesse crescente na investigação de atividade antioxidante de metabólitos secundários de plantas medicinais para compostos com maior potência e toxicidade inferior à sintéticos atualmente disponíveis (THABREW *et al.*, 1998). As plantas oferecem uma grande variedade de antioxidantes naturais, devido à diversidade estrutural de seus metabólitos. Muitas plantas medicinais já foram reconhecidas como fontes naturais de compostos antioxidantes, principalmente os compostos fenólicos (WANGENSTEEN *et al.*, 2004;. LANGLEY-EVANS, 2000; ARUOMA, 2003).

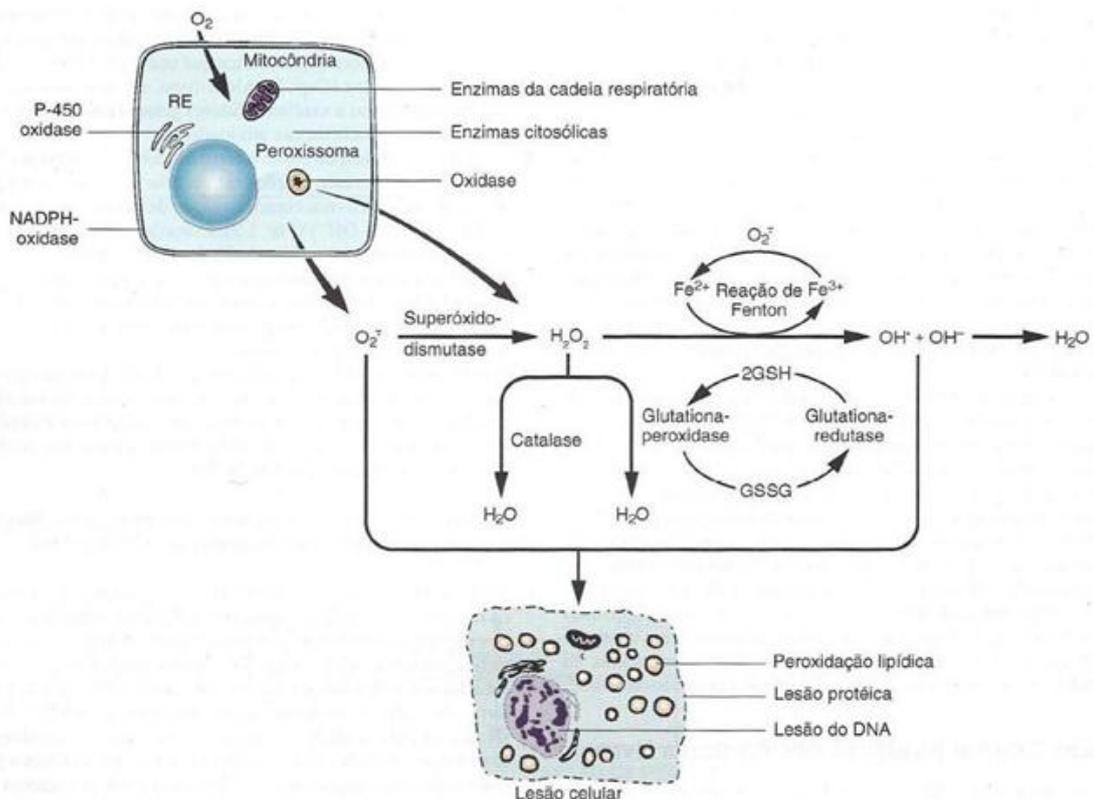


Figura 4 – Formação de espécies reativas de oxigênio e mecanismos antioxidantes nos sistemas biológicos.

Fonte: ROBBINS *et al.* (2006).

Os antioxidantes tocoferóis, ascorbato, carotenóides e polifenóis são compostos de baixo peso molecular capazes de sequestrar diretamente as espécies reativas de oxigênio (EROs) (SIES; STAHL; SEVANI, 2005). As substâncias fenólicas, principalmente os flavonoides, são potentes antioxidantes *in vitro* (GHISELLI *et al.*, 2000) e, como protegem os constituintes lipídicos da oxidação, julga-se que as mesmas tenham um papel importante na prevenção de muitas doenças crônicas degenerativas (KULISIC *et al.*, 2007; SEIFRIED *et al.*, 2007) como o câncer, a AIDS, além de outras doenças diretamente associadas ao processo de envelhecimento, como cataratas, Síndrome de Alzheimer e outras que atingem o sistema nervoso (BALDO *et al.*, 2008).

A atividade antioxidante pode ser medida diretamente pela capacidade de sequestrar radicais livres, ou indiretamente pelos efeitos do antioxidante no controle da oxidação. Dentre os diferentes métodos utilizados para determinar o potencial antioxidante *in vitro* temos o método do DPPH (CHOI *et al.*, 2002).

2.4.2 Atividade anti-inflamatória

2.4.2.1 Inflamação

A inflamação é uma resposta a estímulos químicos, físicos ou biológicos e tem por função erradicar os agentes microbianos ou irritantes e potencializar o reparo tecidual (BAUTISTA, 2003). Quando ocorre a lesão tecidual causada por bactéria, trauma, substâncias químicas, calor ou qualquer outro fenômeno, substâncias são liberadas pelo tecido lesado, como por exemplo, proteínas do plasma, neutrófilos, eosinófilos, linfócitos, basófilos, plaquetas, mastócitos, fibroblastos, linfócitos, proteínas fibrosas estruturais, glicoproteínas de adesão e proteoglicanos (GUYTON, HALL, 1997; KUMAR *et al.*, 2008).

Celsius enunciou quatro sinais cardeais que são observados macroscopicamente na inflamação aguda: o rubor, o tumor, o calor e a dor, seguido de um quinto fator, que corresponde à perda da função (CHEVILLE, 1994).

Há quatro critérios importantes para a classificação das inflamações que são evolução clínica, causa, patogenia e morfologia. Segundo o tempo de evolução, verificado em clínica, as inflamações dividem-se em superaguda, aguda, subaguda e

crônica. A inflamação pode ser designada como alterativa, exsudativa, proliferativa e reparativa, de acordo com a classificação morfológica, que é muito útil ao clínico, permitindo compreender os sinais e sintomas e a evolução das doenças inflamatórias (FARIA, 2003).

A inflamação superaguda é uma evolução muito rápida e geralmente mortal, usando às vezes o termo fulminante, como por exemplo, hepatite fulminante, infecção fulminante (FARIA, 2003).

A inflamação aguda tem início rápido, como sinais cardeais evidentes, duração curta (um a dois dias) e caráter exsudativo. É caracterizada por febre, produção de diversos hormônios, leucocitose e produção de proteínas de fase aguda pelo fígado. A resposta a reação local se inicia quando o dano tecidual e endotelial desencadeia vasodilatação e aumento da permeabilidade vascular resultando na exsudação de fluido e proteínas plasmáticas (edema) e na migração de leucócitos, predominantemente de neutrófilos (FLOWER, PERRETTI, 2005).

A inflamação subaguda possui sinais inflamatórios menos intensos e tempo de duração mais prolongado, cerca de 2 a 3 semanas, caracterizada por hiperemia e edema leve, poucos neutrófilos, eosinófilos, linfócitos e plasmócitos; e a proliferação de fibroblastos e de vasos sanguíneos (FARIA, 2003).

A inflamação crônica é caracterizada por sinais inflamatórios discretos e longa duração, podendo persistir durante meses e até anos. Esta inflamação é chamada de inespecífica e de caráter essencialmente proliferativo. Está associada com a presença e ativação de linfócitos e macrófagos, proliferação de vasos sanguíneos, necrose tissular e estímulo a proliferação de fibroblastos que culmina na fibrose tecidual. Os macrófagos não são numerosos nesta fase, a não ser em casos de inflamações granulomatosas ou específicas (GRUNDY, 2003; KUMAR *et al.*, 2008).

Os mediadores químicos inflamatórios mais estudados são os eicosanoides, que são liberados, por meio de frações de fosfolipídeos denominados ácidos araquidônicos, através da ação da fosfolipase A2, quando uma injúria qualquer danifica a membrana das diferentes células do organismo (TASAKA, 2002).

O ácido araquidônico, quando liberado, não tem ação inflamatória, mas os produtos de sua degradação, formados através da ação das enzimas lipoxigenase e cicloxigenases (COX), são mediadores químicos fundamentais para o desenvolvimento do processo inflamatório (figura 5). As lipoxigenases dão origem aos leucotrienos; durante esse processo, as diferentes vias enzimáticas podem

gerar radicais livres (BOOTHE, 1989). As cicloxigenases são enzimas que convertem o ácido araquidônico em prostaglandinas e tromboxanos, substâncias as quais, são conhecidas globalmente como eicosanoides. Estes são agentes participantes dos diversos graus dos mecanismos da inflamação, da dor e da febre (GUYTON, HALL, 1997; OLIVERA, 2004).

Há dois tipos de enzimas cicloxigenase, a COX-1 e COX-2. A COX-1 é uma enzima constitucional expressa em muitos tecidos (vasos sanguíneos, plaquetas, estômago, intestino e rins) estando envolvida na sinalização de uma célula para outra, por associação à produção de prostaglandinas, o que resulta em diversos efeitos fisiológicos como proteção gástrica, agregação plaquetária, homeostase vascular e manutenção do fluxo sanguíneo renal (RANG *et al.*, 1997).

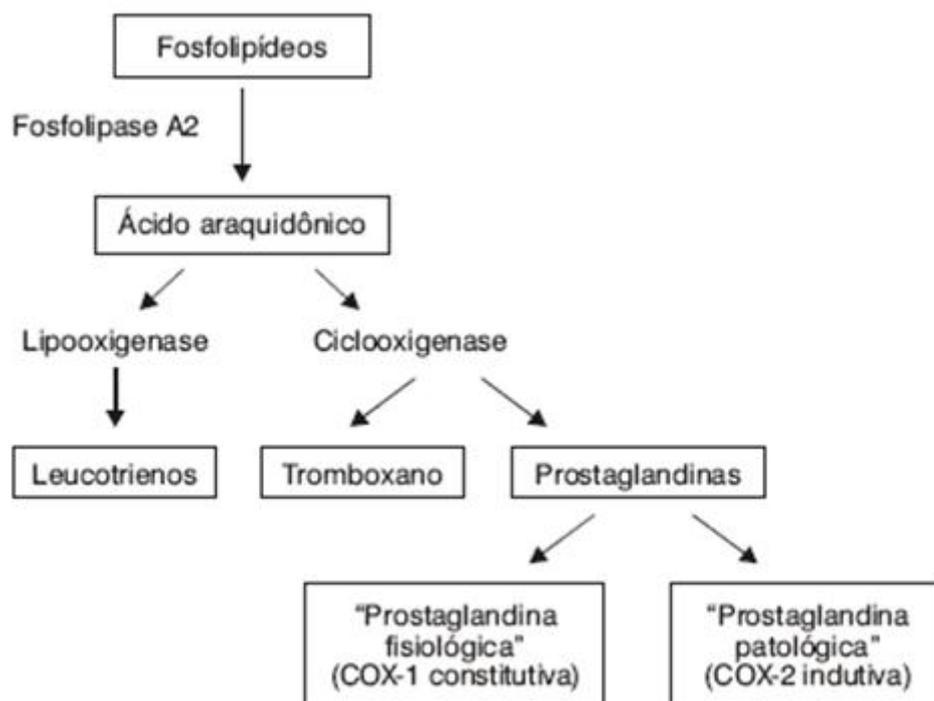


Figura 5 – Síntese de prostaglandinas e leucotrienos

Fonte: HILARIO *et al.* (2006).

Em contraste, a COX-2 está presente nos locais de inflamação, induzida assim por células inflamatórias quando elas são ativadas, e é considerada como sendo a enzima que produz os mediadores da inflamação da classe dos prostanóides denominada de enzima indutiva. Ela é expressa primariamente por

células envolvidas no processo inflamatório, como macrófagos, monócitos. Entretanto, sabe-se que ela também é encontrada em outros tecidos e órgãos como rins, cérebro, ovário, útero, cartilagem, ossos e endotélio vascular. A COX-2 é induzida pelas citocinas (IL-1, IL-2 e fator de necrose tumoral [TNF]) e outros mediadores nos sítios de inflamação como fatores de crescimento e endotoxinas (BRUNE *et al.*, 2004).

2.4.2.2 Inflamação granulomatosa

É uma inflamação crônica, chamada também de inflamação específica, que pode ser causada por agentes vivos (bacilos e fungos) ou por agentes inertes (corpos estranhos). O granuloma de corpo estranho pode ser endógeno como pelos, osso, cartilagens, dentre outros ou exógeno, como medicamentos de soluções oleosas, fios de sutura não-absorvíveis em algodão, corpos estranhos penetrados em ferimentos de pele, como grãos de areia e espinhos, entre outros (O'BRIEN, 1985).

Macroscopicamente, a área atingida mostra-se hiperemiada e tumefeita, fazendo suspeitar da existência de infecção ou recidiva cancerosa. Microscopicamente, o granuloma é constituído de aglomerados de células epitelióides, células gigantes, linfócitos e plasmácitos. Quando a inflamação é causada por corpos estranhos, células gigantes multinucleadas (originadas da fusão de macrófagos e células epiteliais) desenvolvem forma e tamanho irregulares para se adaptarem ao corpo a ser fagocitado (FARIA, 2003).

O granuloma é formado por numerosos macrófagos que se agrupam em torno do corpo estranho, possuindo tamanho variado, desde microscópico até cerca de 2mm de diâmetro ou mais (figura 6). O granuloma pode sofrer necrose ou evoluir para a cura. Na evolução para a cura, forma-se fibrose a partir da periferia do granuloma, sendo convertido em nódulo fibriótico através dos macrófagos que secretam substâncias produzindo fibronectina, interleucina 1 (IL-1) e linfócitos que secretam linfocinas (WILLIAMS; WILLIANS, 1983).

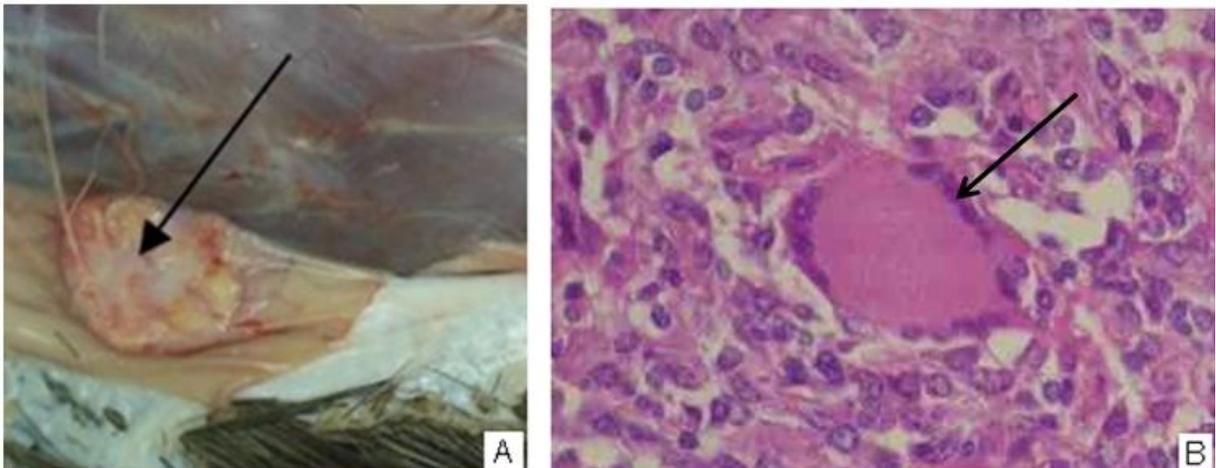


Figura 6 – Granuloma. (A) Aparência geral do granuloma subcutâneo, (B) Fotomicrografia de linfonodo granulomatoso subcutâneo.

Fonte: ADDO *et al.* (2007)

Dentre os métodos de avaliação da atividade anti-inflamatória crônica, pode-se citar o modelo de inflamação crônica por formação de granuloma induzido por cilindros de algodão, no qual um grupo de animais é submetido a droga teste, administrada por via oral ou subcutânea. Para avaliar a inibição da inflamação, calcula-se a diferença dos pesos dos granulomas do grupo de animais controle positivo (medicamento anti-inflamatório) e do grupo controle negativo tratados apenas com o veículo (GERMANO *et al.*, 1993).

2.4.2.3 Drogas anti-inflamatórias não-esteroidais (AINES)

São medicamentos para tratamentos sintomáticos inespecíficos, não interferindo na história natural das doenças inflamatórias e frequentemente prescritos para queixas musculoesqueléticas “reumáticas” e dores menores. Seu uso é muito difundido em todo o mundo e continua a crescer. Em 2000, sua comercialização alcançava cifras de cinco bilhões de dólares, com 100 bilhões de prescrições anuais nos Estados Unidos, sendo que 70% dos usuários faziam uso de AINES pelo menos uma vez na semana para reduzir inflamação e dor (SIMON, 1995; DUBOIS *et al.*, 2004).

Os AINES possuem um grupo variado de agentes e classes químicas que têm em comum a capacidade de controlar a inflamação, analgesia e hipertermia. Em geral, todos esses efeitos estão relacionados com a ação primária dos fármacos, ou seja, inibição da cicloxigenase araquidônica e, portanto, inibição da produção de

prostaglandinas mediante a inativação de enzimas cicloxigenases constitutiva (COX-1) e induzível (COX-2) e tromboxanos (RANG *et al.*, 1997).

Os AINEs são classificados como seletivos e não seletivos da COX-2. A inibição de COX-1 por AINEs convencionais (não seletivos) acarreta alguns dos efeitos adversos (gastropatia e nefropatia), efeitos comuns encontrados em AAS e diclofenacos. Os inibidores seletivos da COX-2 como meloxicam, celecoxibe, rofecoxibe, dentre outros, potencialmente representariam vantagens em relação aos AINEs não-seletivos, pois permaneceriam a eficácia anti-inflamatória, sem o aparecimento dos efeitos adversos consequentes à inibição enzimática não-seletiva (ROBERTS, MORROW, 2003).

À semelhança de outros AINEs, a nimesulida possui também ação analgésica e antipirética. O nimesulida inibe seletivamente a enzima COX-2, reduzindo a síntese de prostaglandinas relacionadas à inflamação e inibe a agregação plaquetária. A estrutura química do nimesulida indica um mecanismo do tipo "scavenger", através do qual o fármaco neutraliza a formação de radicais livres de oxigênio produzidos ao nível da cascata do ácido araquidônico e liberados em grande quantidade na origem do processo inflamatório por diversos tipos de células (granulócitos, neutrófilos, macrófagos), sem influenciar a quimiotaxia e a fagocitose.

Os AINEs estão entre as drogas mais comuns associadas com indução de lesões hepáticas, com uma incidência estimada entre 3 a 23 por 100 000 doentes ano. O diclofenaco e a nimesulida apresentam fator de risco consistentemente identificados, quando associados a outras drogas hepatotóxicas (RAINSFORD, 1998; AITHAL, DAY, 2007).

Nimesulida, comumente utilizado em processos inflamatórios agudos e/ou crônicos, tem sido bem tolerada pelos pacientes adultos, idosos e pediátricos em estudos clínicos e estudos de farmacovigilância. Este medicamento não possui efeitos colaterais graves de danos no estômago ou rins, sendo considerada a droga mais segura dos AINEs clássicos em humanos. Os efeitos adversos como gastrointestinais, dermatológicos, hepáticos, neurológicos e renais são observados quando associados à outros AINEs (DAVIS, BROGDEN, 1994; TRAVESSA *et al.*, 2004).

A maioria dos estudos com nimesulida foram de curto prazo, até 4 semanas, os quais mostraram que o nimesulida é eficaz na redução da dor associada à osteoartrite, ao câncer, à tromboflebite, à cirurgia oral, a dismenorrea em adultos, a

cirurgia geral em adultos e crianças, à febre, à inflamações acompanhadas de infecções do trato respiratório, a doenças otorrinolaringológicas e lesão traumática em adultos e crianças (VANE, 1995; WHO, 2002).

2.4.2.4 Drogas vegetais com ação anti-inflamatória

Plantas medicinais são amplamente utilizadas popularmente para o tratamento de diferentes condições inflamatórias. Vários profissionais da saúde também têm utilizado drogas vegetais por apresentarem propriedades químicas que ajudam no tratamento de doenças, principalmente inflamações cutâneas (MARTINS *et al.*, 2000).

Relatos científicos sugerem que os maiores responsáveis pela ação anti-inflamatória, de plantas, são os flavonoides. Estudos utilizando diferentes modelos animais em diferentes vias de administração, mostram que o tratamento farmacológico com certos flavonoides podem afetar, pelo menos em parte, algumas respostas inflamatórias em situações clínicas. Geralmente esta ação se dá pela inibição enzimática dos eicosanoides, gerando efeito sobre as moléculas pró-inflamatórias como a fosfolipase A2, cicloxigenases e lipoxigenases, reduzindo assim, as concentrações de prostaglandinas e leucotrienos (KIM *et al.*, 2004, FALCÃO *et al.*, 2005).

A atividade anti-inflamatória aguda avaliada pelo modelo inflamatório de edema de pata de rato induzido por carragenina e atividade anti-inflamatória crônica por formação de granuloma induzido por cilindros de algodão tratada com extratos de plantas medicinais tem mostrado resultados expressivos (tabela 1).

Extrato metanólico do caule de *Ventilago harmandiana* Pierre (Rhamnaceae) avaliado para efeito anti-inflamatório agudo pelo modelo de edema de pata de rato induzido por carragenina apresentou inibição significativa, quando comparado com a droga padrão aspirina. No modelo de inflamação crônica por formação de granuloma induzido por cilindros de algodão, a droga vegetal apresentou fraca inibição, quando comparada com prednisolona (PANTHONG *et al.*, 2004).

Boominathan e colaboradores (2004) demonstraram que o extrato metanólico de *Lonidium suffruticosam* (Violaceae) apresentou pouca atividade na fase aguda, pelo modelo de edema de pata de rato induzido por carragenina. Entretanto, na fase

crônica o extrato mostrou uma inibição significativa, comparado com o controle positivo, fenilbutasona.

Myracrodruon urundeuva (Anacardiaceae), conhecida popularmente como aroeira-do-sertão é utilizada em tratamentos de várias afecções, principalmente ginecológicas e ferimentos cutâneos por efeitos anti-inflamatório, cicatrizante, antiulcerogênico, anti-histamínico, antibradicinina e analgésico (GÓES *et al.*, 2005). Nos testes realizados por Viana e colaboradores (2003), o extrato de acetato de etila do caule de *M. urundeuva* apresentou inibição significativa, comparado com a droga padrão indometacina. Esse efeito foi atribuído à presença de chalconas no extrato.

Laggera alata (Compositae) é uma espécie vegetal empregada na medicina tradicional para o tratamento de doenças inflamatórias. A esta espécie foi dada grande atenção pela população nas últimas décadas devido ao seu efeito curativo notável, especialmente para a artrite reumática, bronquite, amigdalite e nefrite. Wu e colaboradores (2006) relataram estudos fitoquímicos e de atividade anti-inflamatória aguda e crônica na fração *n*-butanol das partes aéreas de *L. alata* mostrando a inibição da inflamação, quando comparada com o controle positivo dexametasona. Estes concluíram que o mecanismo de ação anti-inflamatório está associado à inibição da formação de prostaglandinas, à influência sobre os sistemas antioxidantes e à supressão da liberação lisoenzimas pelos compostos fenólicos, os quais foram determinados por HPLC.

Desde a antiguidade, cascas dos caules e folhas de *Mallotus peltatus* (Geist) Muell. Arg. var *acuminatus* (Euphorbiaceae) são utilizadas popularmente para curar dor de estômago, doenças intestinais relacionadas com inflamação e infecções da pele. O estudo realizado por Chattopadhyay e colaboradores (2002) revelou a presença de flavonoides, taninos, saponinas, terpenóides, esteróides e significativa atividade anti-inflamatória, para o extrato metanólico das folhas, tanto no modelo de inflamação aguda como no crônico, comparáveis a droga padrão indometacina.

Olajide e colaboradores (1999) realizaram um estudo de atividade anti-inflamatória para avaliar os efeitos do extrato aquoso da casca do caule de *Bridelia ferruginea* (Phyllanthaceae), o qual inibiu o edema de pata (58%) e a formação do tecido granulomatoso a um grau similar (43%), apresentando eficácia tanto na fase aguda como crônica do processo inflamatório. Fundamentando o uso desta planta em casos de artrite, contusões, furúnculos, luxações e queimaduras.

A fração diclorometano (DCM) extraída das folhas de *Trifolium pratense* apresentou atividade anti-inflamatória aguda *in vitro*, pelo método câmara de Boyden, onde inibiu a migração de leucócitos em todas concentrações testadas de 5 a 100 µg/mL; e *in vivo*, pelo método de edema de pata de rato induzido pela carragenina nas concentrações 50 e 100mg/kg de extrato de trevo-vermelho, por via oral, resultando em inibição de edema de pata igual a 63,37%. Esta atividade foi atribuída as isoflavonas agliconas, como formononetina, biochanina e seus metabólitos ou sinergismo destes compostos ou com outro composto presente em menor concentração. O mecanismo de ação sugerido a esta amostra foi a inibição da COX ou da enzima 5-lipoxigenase, comuns entre os flavonoides (SELLOUM *et al.*, 2003; RAMOS *et al.*, 2012)

Espécies	Drogas	Conc. (mg/kg)	Via Adm.	Edema de pata de rato induzida por carragenina	Conc. (mg/kg)	Granuloma induzido por <i>pellets</i> de algodão	Referências
<i>Ventilago harmandiana</i>	Extrato metanólico (caules)	300	i.p	59,0	150	29,0	Panthong <i>et al</i> , 2004
	Aspirina	150	i.p	74,0			
	Prednisonlona		i.p		2,5	46,0	
<i>Ionidium suffruticosam</i>	Extrato metanólico (planta inteira)	400	v.o	26,3	400	42,8	Boominathan <i>et al</i> , 2004.
	Fenilbutazona	100	v.o	32,5	100	53,2	
<i>Myracrodruon urundeuva</i>	extrato de acetato de etila (caules)	40	v.o	59,3			Viana <i>et al</i> , 2003
	Indometacina	10	v.o	29,6			
<i>Laggera alata</i>	fração <i>n</i> -butanol (partes aéreas)	100	v.o	54,4	200	54,8	Wu <i>et al</i> , 2006
	Dexametasona	2,5	v.o	75,2	2,5	69,6	
<i>Mallotus peltatus</i>	Extrato metanólico (folhas)	400	v.o	64,6	400	51,5	Chattopadhyay <i>et al</i> , 2002
	Indometacina	10	v.o	67,5	10	54,1	
<i>Bridelia ferruginea</i>	Extrato aquoso (casca do caule)	80	v.o	58,0	80	43,0	Olajide <i>et al</i> , 1999
	Indometacina	5	v.o	72,0	15	43,0	

Tabela 1 – Espécies vegetais com atividade anti-inflamatória aguda e crônica.

2.5 PARÂMETROS BIOQUÍMICOS HEPÁTICO E RENAL

O diagnóstico de várias enfermidades é auxiliado com variáveis bioquímicas como enzimas, proteínas, hormônios e minerais. As enzimas hepáticas aspartato aminotransferase (AST), alanina-aminotransferase (ALT), entre outras, costumeiramente estão incluídas no perfil de triagem bioquímica sérica como índice sensível, porém não específico, da lesão aguda dos hepatócitos, independentemente de sua etiologia (GAW *et al.*, 2001; BORSA *et al.*, 2006)

As transaminases são enzimas que estão amplamente distribuídas nos tecidos, predominando AST, no fígado, coração, músculo cardíaco, músculo estriado, rim e pâncreas, e ALT no fígado, rim e coração. A AST está presente no citosol e na mitocôndria dos hepatócitos (MILLER; GONÇALVES, 1999).

O aumento da atividade de AST e ALT no soro é geralmente considerado como um sensível indicador de dano hepático, que pode ser decorrente da ruptura dos hepatócitos, resultantes de lesões estruturais associadas à necrose; de indução de enzimas; das alterações na permeabilidade da membrana celular ou isquemia hepatocelular (FERREIRA NETO *et al.*, 1978; DUNCAN; PRASSE, 1982; MEYER *et al.*, 1995)

O doseamento de creatinina sérica é considerado rotina para maioria dos protocolos experimentais de toxicidade, devido ser um excelente avaliador da função renal. A creatinina é o produto final da degradação da creatina (fosfocreatina), ou seja, ela é sintetizada pelo fígado e rins e armazenada nos músculos, onde pode se manter na forma livre em 40% ou fosforilada em 60%. A fosfocreatina é catabolizada nos músculos e por reação não-enzimática irreversível é transformada em creatinina logo após exercícios físicos musculares. Uma vez produzida, a creatinina entra na circulação por meio de difusão simples e é filtrada pelos glomérulos num processo independente de energia, sendo excretada na urina (WILLIAMS *et al.*, 2000; DORETTO *et al.*, 2007).

Mensurações *in vivo* no músculo esquelético de ratos indicam que as células perdem diariamente em média de 1,7 a 2,5% do total de creatina. A similaridade para taxa de perda de creatina da célula como creatinina levou à proposta de que o efluxo de creatina da célula ocorre quase exclusivamente como creatinina. Em humanos saudáveis, aproximadamente 1,6% do *pool* diário de creatina é degradado em creatinina, sendo a quantidade de creatinina excretada diariamente proporcional

à massa muscular. A excreção de creatinina pode aumentar 10x mais em certas condições patológicas, como a doença renal (WILLIAMS *et al.*, 2000).

Os efeitos tóxicos de substâncias podem atingir todos os sistemas e órgãos, porém o fígado e o rim são os mais lesados. O fígado é atingido facilmente provavelmente devido a dois fatores importantes como a sua posição anatômica, que o torna mais vulnerável; e o seu próprio determinismo funcional, que condiciona maior concentração celular, não apenas dos compostos a serem transformados, como também dos metabólitos resultantes (MENDES, 1988). E o rim se deve pelo fato de estar rotineiramente exposto a altas concentrações de medicamentos ou de seus metabólitos a fim de metabolizar, concentrar e excretar compostos (MODARENSI, 2011).

3. MANUSCRITOS

3.1 MANUSCRITO 1

“Morfo-anatomia do fruto de *Pithecoctenium echinatum* (Jacq.) Baill (Bignoniaceae)”

3.2 MANUSCRITO 2

“Caracterização físico-química e investigação de bioatividade em *Pithecoctenium echinatum* (Jacq.) Baill (Bignoniaceae)”

3.3 MANUSCRITO 3

“Avaliação da atividade anti-inflamatória e isolamento de diosmetina e hesperitina de *Pithecoctenium echinatum* (Jacq.) Baill (Bignoniaceae)”

3.1 MANUSCRITO 1

Morfo-anatomia do fruto de *Pithecoctenium echinatum* (Jacq.) Baill (Bignoniaceae)

Rosana Casoti¹, João Marcelo Santos de Oliveira², Melânia P. Manfron¹

¹ Programa de Pós-Graduação Ciências Farmacêuticas. Laboratório de Farmacognosia. LABINFITO

² Programa de Pós-Graduação Agrobiologia. Laboratório de Botânica Estrutural. LABOTE

Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), caixa postal 5091, CEP 97105-900, Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brasil. e-mail: rocasoti@hotmail.com

RESUMO

Pithecoctenium echinatum (Jacq.) Baill conhecida popularmente como pente-de-macaco, pertence à família Bignoniaceae. As flores possuem corola branco-amareladas, ovário súpero e bicarpelar, cuja placentação é parietal; os óvulos são anátropos, unitegmentado e tenuinucelado. O carpelo é densamente piloso, cujos tricomas são multicelulares, tanto tectores quanto secretores, sendo comum, também, a ocorrência de emergências, ambos na epiderme externa. Um anel nectarífero com presença de complexos estomáticos e tricomas tectores, é observado. Os frutos desta espécie são síliquas, cujas valvas, quase planas possuem projeções epicárpicas equinadas. Internamente o pericarpo possui epicarpo, parede periclinal externa espessa e cutinizada; lenticelas; e presença de estômatos e emergências. As células pétreas juntamente com esclereídes são encontrados no mesocarpo. As sementes de *P. echinatum* são castanho-douradas com alas translúcidas, organizadas justapostas e sobrepostas no espaço locular. As sementes são constituídas por uma testa, endotélio, endosperma remanescente com uma única camada celular. O embrião é reto, contínuo, transverso-oblongo, cujos cotilédones são foliáceos e bilobados. As reservas da semente estão representadas por lipídeos, polissacarídeos e uma escassa quantidade de amido. Metabólitos secundários estão presentes como os alcaloides e compostos fenólicos.

Palavras-chave: *Pithecoctenium echinatum*, Bignoniaceae, histoquímica, morfo-anatomia, fruto.

1. INTRODUÇÃO

A família Bignoniaceae é composta de oito tribos, 104 gêneros e cerca de 800 espécies, predominantemente, neotropicais (FISCHER *et al.*, 2004). Segundo Gentry (1980), o Brasil é o maior centro de diversidade dessa família com 316 espécies agrupadas em 55 gêneros, correspondendo a aproximadamente 37% do total. No Rio Grande do Sul foram catalogadas 23 espécies da família, dentre elas, *Pithecoctenium echinatum* (Jacq.) Baill (SCHNEIDER; LONDERO, 1965).

A importância econômica desta família está associada tanto na atividade moveleira como também à fonte de pesquisa farmacológica, como por exemplo, atividade antidiabética por *Tecoma stans* (COSTANTINO *et al.*, 2003); como adjuvante na terapia do câncer pela *Tabebuia avellanedae* (STEINERT *et al.*, 1995); com propriedades anti-infecciosas do *Jacaranda decurrens* Cham (OLIVEIRA *et al.*, 2003; MINGARRO *et al.*, 2003), dentre tantas outras espécies com potente atividade biológica.

P. echinatum, conhecida popularmente como pente-de-macaco no estado do Rio Grande do Sul, possui sinonímia *Amphylophylum crucigerum* e *Pithecoctenium crucigerum* (LOHMANN, 2010). Floresce de outubro a dezembro e seus frutos são utilizados na medicina popular no tratamento de inflamações, reumatismo, infecções cutâneas, dor de cabeça, como depurativo do sangue e calmante (FRANCO; FONTANA, 2005). Para possibilitar o uso desta espécie como medicinal são necessários vários testes de controle de qualidade, dentre eles o controle botânico, nos quais parâmetros morfo-anatômicos auxiliarão na autenticidade da droga e seus adulterantes, permitindo a diferenciação inclusive, entre espécies botanicamente próximas (DI STASI, 1996).

Dentre os ensaios anatômicos destacam-se os referentes à histoquímica, pois auxiliam na caracterização de drogas e no monitoramento de análises fitoquímicas, bem como no aproveitamento racional da droga (ZANETTI *et al.*, 2004).

Este trabalho tem como objetivo realizar a caracterização morfo-anatômica da região ovariana, pericarpo e semente de *P. echinatum*, visando descrever características estruturais úteis para a melhor descrição da espécie e identificação da mesma, imprescindíveis no controle de qualidade da droga vegetal e análise farmacognóstica.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Pithecoctenium echinatum foi coletada no município de Santa Maria no Estado do Rio Grande do Sul a 29°41'02"S e 53°48'25" W. Flores e frutos maduros foram coletados nos meses de novembro 2010 e março de 2011, respectivamente. Material botânico testemunho foi depositado no Herbário do Departamento de Biologia da UFSM, com registro 12872 SMDB.

O material foi dessecado sob microscópio estereoscópio Olympus SZH10 e Leica EZ4 através do qual foi feito registro fotomicrográfico. O material dessecado foi seccionado transversal e longitudinalmente e fixado em glutaraldeído 3% (MCDOWELL; TRUMP, 1976). Após a fixação as amostras, ainda imersas no fixador, foram submetidas ao vácuo por 6 horas. Posteriormente, o material foi lavado em tampão fosfato de sódio 0,1M pH 7,2 (GABRIEL, 1982), seguido de lavagem em água destilada. Foi utilizado Tween 20 por 24h para extração de lipídios epicuticulares, sendo, a seguir, o material submetido à desidratação em série etílica.

Posteriormente, seguiu-se a desidratação em soluções de clorofórmio e etanol absoluto (1:3, 1:1, 3:1, 1:1, 1:3), finalizando a desidratação com uma etapa de etanol absoluto. O material foi pré-infiltrado em solução hidroxietilmetacrilato e etanol absoluto (1:1) durante o período de 12h, seguido de infiltração em hidroxietilmetacrilato e emblocamento, com esta resina, em suporte de Teflon até sua polimerização (GERRITS; SMID, 1983).

Secções de 5µm de espessura foram feitas em micrótomo rotativo Leica RM2245. O corante padrão utilizado foi Azul de Toluidina 0,05% pH 4,4 (FEDER; O'BRIEN, 1958). As lâminas permanentes foram depositadas no laminário do Laboratório de Botânica Estrutural do Departamento de Biologia, UFSM.

As observações e fotomicrografias foram realizadas em microscópio Leica® DM 2000 com sistema de captura de imagem DFC 295. A terminologia utilizada para descrição do embrião maduro foi baseada em Barroso e colaboradores (1999).

Para análise histoquímica das sementes, foram feitas lâminas semipermanentes com secções transversais à mão livre, das amostras dos exemplares mantidos a fresco, tratando tais secções com reagentes indicativos de compostos específicos como Sudan III para óleos voláteis e fixos; Dragendorff para alcaloides; reagente de Schiff e ácido periódico (PAS) para polissacarídeos e Azul de toluidina para lignina, pectinas e compostos fenólicos, conforme COSTA (1982).

3. RESULTADOS

3.1 MORFOLOGIA FLORAL

A flor de *P. echinatum* possui cálice tomentoso; corola campanulada e branco-amarelada, densamente tomentosa de 4 a 6 cm de comprimento; as anteras são glabras, ditecas e divaricadas; o estigma é bilobado; ovário é súpero cilíndrico, em seção transversal e densamente piloso, de cor amarelada, ocorrendo ainda um nectário anelar, relativamente desenvolvido, na base do ovário (fig. 1 e 2), com ocorrência de células similares a tricomas tectores (fig. 2B). Parte das características descritas acima confirmam o descrito por Sandwith; Hunt (1974).

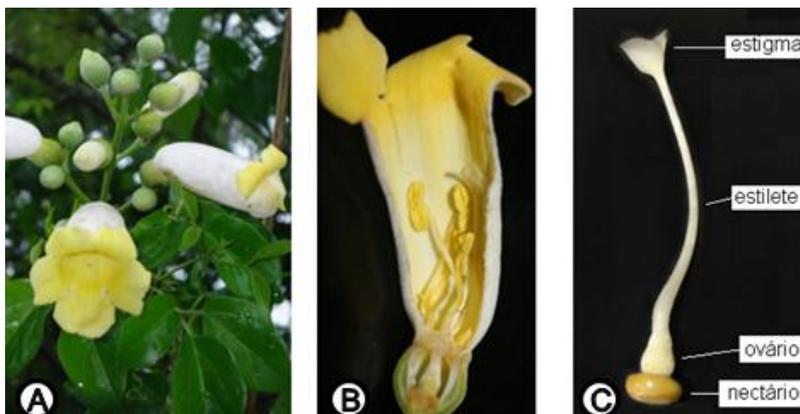


Figura 1 – Flor de *Pithecoctenium echinatum*.

A – vista geral, B – flor com ovário, C - gineceu

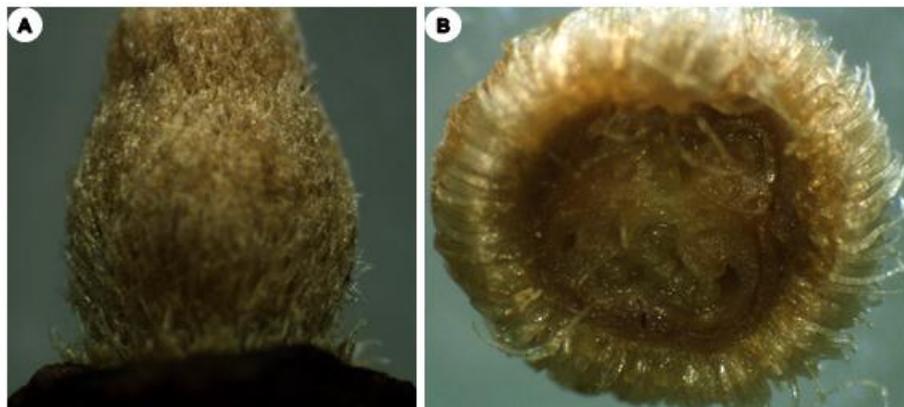


Figura 2 – Fotos do ovário.

A – vista geral (25x), B – corte transversal (35x).

3.2 ANATOMIA DO OVÁRIO

O ovário é bicarpelar (fig. 3A). A epiderme dorsal ou externa é unisseriada com presença de grande quantidade de tricomas tectotes multicelulares e emergências, além de um número relativamente menor de tricomas glandulares (fig. 3A, C e D, 4A, e B). Os tricomas glandulares são observados em diferentes estágios de desenvolvimento.

A placentação do rudimento seminal é parietal com presença de tecido parenquimático, ligando as regiões placentares e se estruturando a semelhança de um septo que acaba dividindo o ovário em dois lóculos simétricos (fig. 3A e B). O mesofilo carpelar é parenquimático com células isodiamétricas. A epiderme ventral ou interna é glabra, uniestratificada e não estomatífera (fig. 3B e E).

O rudimento seminal é anátropo, unitegumentado e tenuinucelado (fig. 3E). Circundando a base do ovário ocorre um anel nectarífero secretor bem desenvolvido com presença de células do tipo guarda de complexos estomáticos e coberto por tricomas (fig. 3C, 4A, 4C).

Há presença de estrutura amareladas composta por feixes de cristais em forma de agulha dispostos de maneira concêntrica em todo mesofilo carpelar (fig. 3B, D).

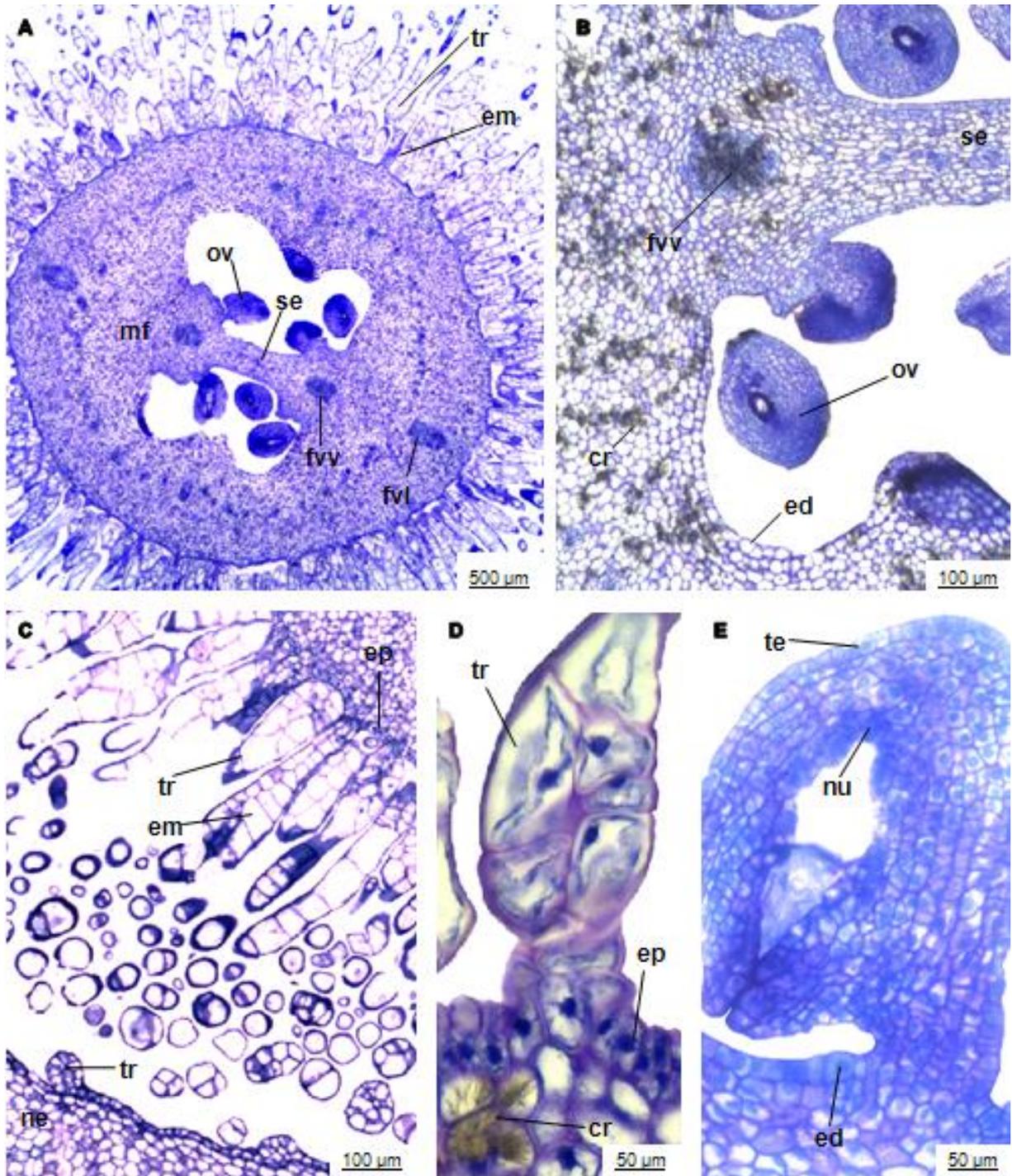


Figura 3 – Corte transversal do ovário de *Pithecoctenium echinatum*.

A – vista geral, B – mesofilo, C – epiderme externa, D – tricoma, E – óvulo. Legenda: (cr) cristais, (ed) epiderme interna, (em) emergência, (ep) epiderme externa, (fvl) feixe vascular lateral, (fvv) feixe vascular ventral, (mf) mesofilo, (ne) nectário, (nu) nucelo, (se) septo, (te) tegumento, (tr) tricoma.

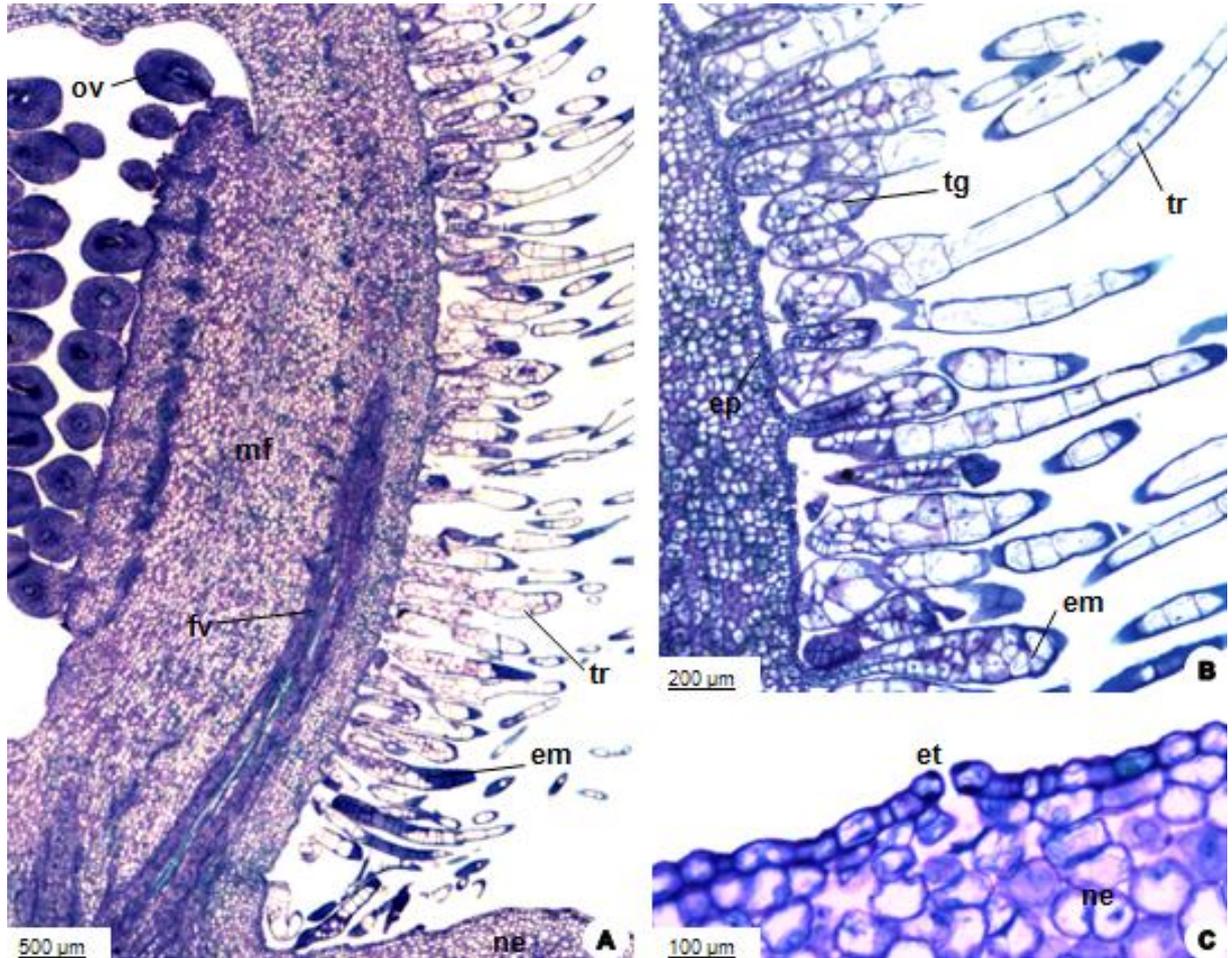


Figura 4 - Corte longitudinal de *P. echinatum*.

A – vista geral, B – epiderme externa e C – nectário. Legenda: (em) emergência (ep) epiderme, (et) estômato, (fv) feixe vascular, (mf) mesofilo, (ne) nectário, (ov) óvulo, (tr) tricoma, (tg) tricoma glandular.

3.3 MORFOLOGIA DO PERICARPO

Os frutos medem cerca de 12 cm de comprimento, 6 cm de largura e 2 cm de espessura em sua região mediana, sendo comprimidos lateralmente, resultando em valvas quase planas ou convexas. Uma coluna seminífera plana fica livre entre as valvas e presa apenas pela base. Os frutos possuem projeções equinadas, com coloração esverdeada a marrom-ferruginosa quando seco (fig 5).



Figura 5 – Vista geral do fruto de *P. echinatum*.

A – parte externa, B – coluna seminífera e C – parte interna com sementes

3.4 HISTOLOGIA DO PERICARPO

O pericarpo é dividido em epicarpo, mesocarpo e endocarpo (fig. 6A).

O epicarpo é composto por tecido parenquimático com variação no número de camadas celulares, podendo ocorrer de uma a três células (fig. 6F, G). A parede periclinal externa das células mais externas é espessa e lignificada. Lenticelas e emergências também são observadas. Ocorre presença de complexos estomatíferos com as células-guarda levemente acima do nível do epicarpo (fig. 6B, F, G)

O mesocarpo divide-se em três camadas distintas. O mesocarpo externo é formado por células parenquimáticas isodiamétricas e células pétreas em grupos (fig. 6 B). O maior acúmulo de células parenquimáticas é observado nas projeções espinescentes (fig. 6A). As células pétreas se agrupam em uma camada abaixo do

epicarpo, porém não formam um estrato contínuo, embora o relativo grande número de células auxilie na estruturação das projeções espinescentes. Há presença de estrutura amareladas compostas por feixes de cristais em forma de agulha dispostos de maneira concêntrica em todo mesocarpo externo (fig. 6 D).

No limite desta porção do mesocarpo são observadas células pétreas isoladas ou em grupamentos de poucas células (fig. 6C). No limite entre o mesocarpo externo e médio é observado sistema vascular representado por feixes vasculares colaterais e parênquima com células volumosas e paredes delgadas e lignificadas. Mais internamente, se observa uma região representativa do pericarpo composto por parênquima cujas células são volumosas e suas paredes são lignificadas, sendo típica a ocorrência de espaços intercelulares pequenos (fig. 6A, C). O mesocarpo interno possui uma ou duas camadas de células esclerificadas, relativamente pequenas, que formam um estrato contínuo (fig. 6A, E).

O endocarpo é representado por uma única camada celular, cujas células possuem paredes delgadas e não são esclerificadas. No pericarpo maduro é comum o rompimento do endocarpo, aparentemente em função de sua estrutura relativamente menos rígida e resistente (fig. 6A, 6E).

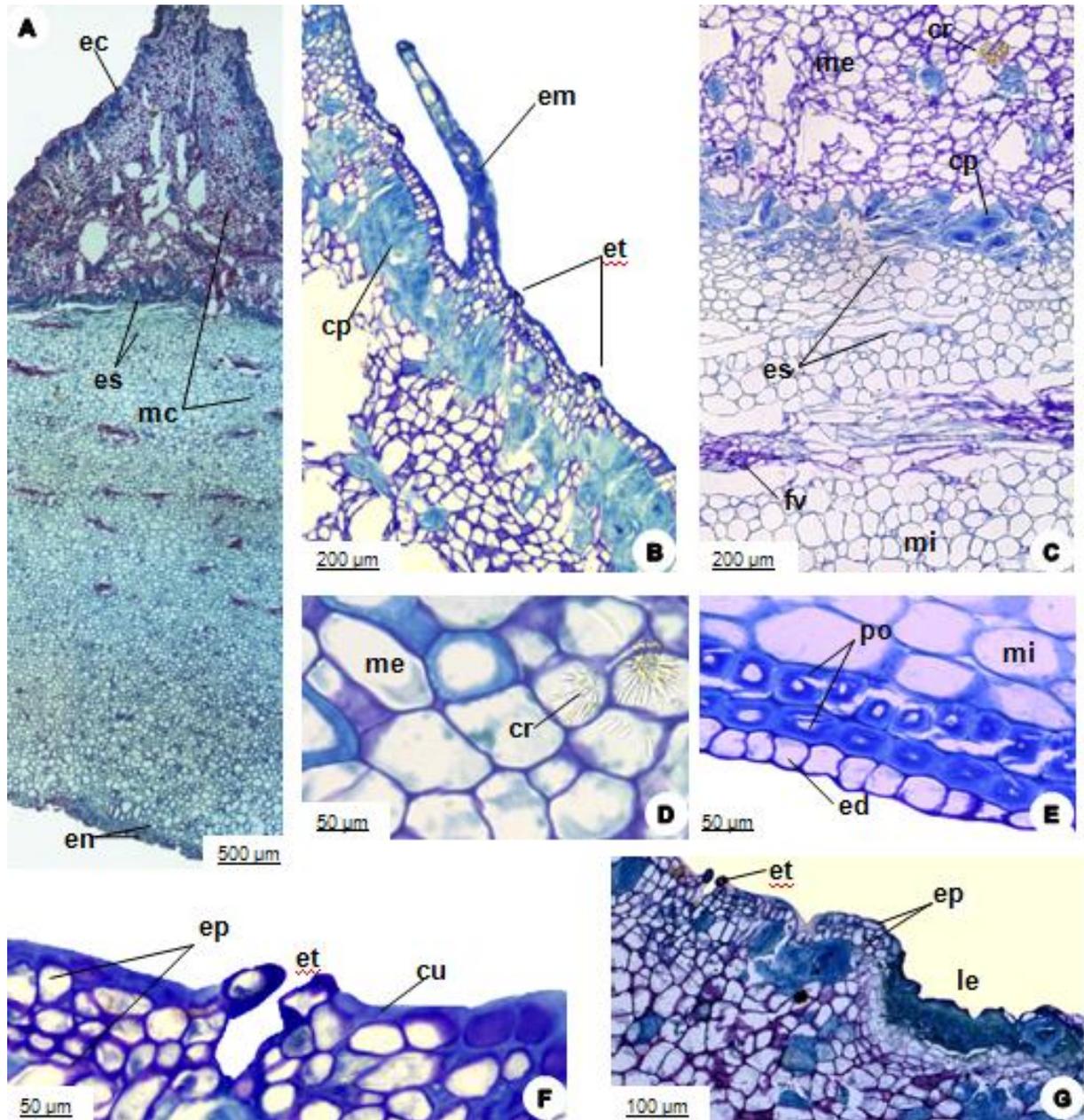


Figura 6 – Corte transversal do pericarpo de *P. echinatum*.

A – vista geral, B – emergência, C – mesocarpo, D – cristais, E – endocarpo, F – epicarpo, G – lenticela. Legenda: (cp) células pétreas, (cr) cristais, (cu) cutina, (ec) epicarpo, (ed) epiderme interna, (em) emergência, (en) endocarpo, (ep) epiderme, (es) esclerênquima, (et) estômato, (fv) feixes vasculares, (le) lenticela, (mc) mesocarpo, (me) mesocarpo externo, (mi) mesocarpo interno, (po) pontoações

3.5 MORFOLOGIA DA SEMENTE

Pithecoctenium echinatum apresenta sementes aladas, organizadas no espaço locular de forma justaposta e sobreposta ao longo do comprimento do fruto, ocupando todo lóculo delimitado pelo septo desenvolvido (fig. 5C). Possuem coloração castanho-dourada, de superfície brilhante, com núcleo seminal evidente (fig. 7). As sementes apresentam alas translúcidas, de consistência membranácea, alongadas lateralmente, com comprimento médio de 5 cm de largura e 2,5 cm de altura (fig. 7). As sementes são exalbuminadas com dois cotilédones foliáceos, bilobados, justapostos, de coloração branca, com comprimento médio de 0,8 cm de largura, 0,6 cm de altura (fig. 8) e 0,1 cm de espessura (fig. 9E).

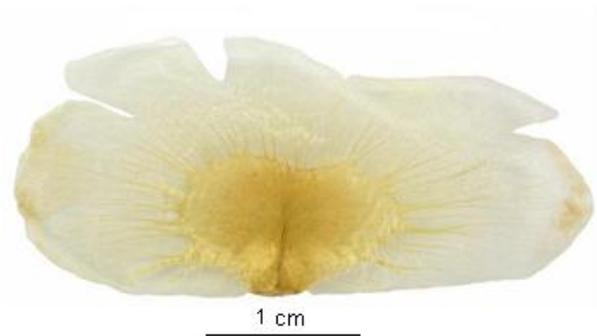


Figura 7 – Vista geral da semente de *P. echinatum*. Face dorsal.



Figura 8 – Aspecto geral do embrião.

Observação a estrutura lobada dos cotilédones. A – rafe, B –anti-rafe.

3.6 ANATOMIA DA SEMENTE

A semente é exotestal. As células da exotesta apresentam-se espessadas e lignificadas. O espessamento parietal é particular na região do núcleo seminal, pois é predominante apenas nas paredes radiais e, no conjunto do tecido, se organiza a semelhança de estrias de Caspary (fig. 9A, 9C, 10A, 10B). Nessa região também, as células se projetam acima da superfície semelhança de papilas, dando à superfície seminal contorno irregular quando analisado em seção (fig. 9A, 9C).

O tecido mesotestal é composto por parênquima esclerenquimatoso, onde as células na maturidade acabam sendo comprimidas pela expansão do embrião (fig. 9A, C, D). A endotesta é destruída durante o desenvolvimento, não sendo organizada como um tecido na maturidade, onde apenas restos celulares podem ser observados (fig.9E).

O endotélio contendo substâncias fenólicas e as células do endosperma constituem o envoltório membranáceo do embrião. O endosperma remanescente é formado de uma camada delgada de células parenquimáticas e não apresentam nenhum tipo de reserva. Entretanto, a camada de endosperma próxima a rafe apenas apresenta três a quatro camadas celulares, as quais diminuem gradativamente até apresentar uma única camada de células (fig. 9D, E, 10D).

A análise da estrutura embrionária mostra que o eixo hipocótilo-radícula e cotilédones podem ser distinguidos. O eixo hipocótilo-radícula é relativamente curto e reto. Os cotilédones apresentam, em seus ápices uma constrição profunda que quase atinge o nó cotiledonar (figs. 8A,B, 10A), gerando um aspecto bilobado aos mesmos, embora o meristema apical seja mantido coberto. A base dos cotilédones se desenvolve mais que o eixo hipocótilo-radícula, a semelhança de aurículas. Tais características morfológicas, associadas à ligação dos cotilédones ao eixo embrionário conferem, quando em vista através do plano antero-posterior, aspecto reniforme aos lobos de cada um dos cotilédones (fig. 8). Em seção pode ser mais bem observados que os cotilédones são paralelos entre si, crassos e plano-convexos (fig. 9E), além de possuir uma superfície lisa. Porém, cabe salientar que a face da anti-rafe possui uma convexidade mais acentuada (figs. 8A, B).

Em secção longitudinal, são observadas células da epiderme do cotilédone, as quais são levemente alongadas tangencialmente tanto na região ventral quanto na dorsal (fig. 9B). O mesofilo cotiledonar é parenquimático, onde em suas células

se observa acúmulo de alcaloides (fig. 11A), óleos fixos e voláteis (fig. 11C) e presença escassa de amido (fig. 11B, D). O tecido cotiledonar apresenta espaços intercelulares que são mais desenvolvidos no terço proximal. A aplicação da reação do ácido periódico e reagente de Schiff (PAS) mostrou que as paredes das células embrionárias são predominantemente pécticas (fig. 11B). Abaixo do nó cotiledonar as células epidérmicas se apresentam isodiamétricas (fig. 10C, 10D).

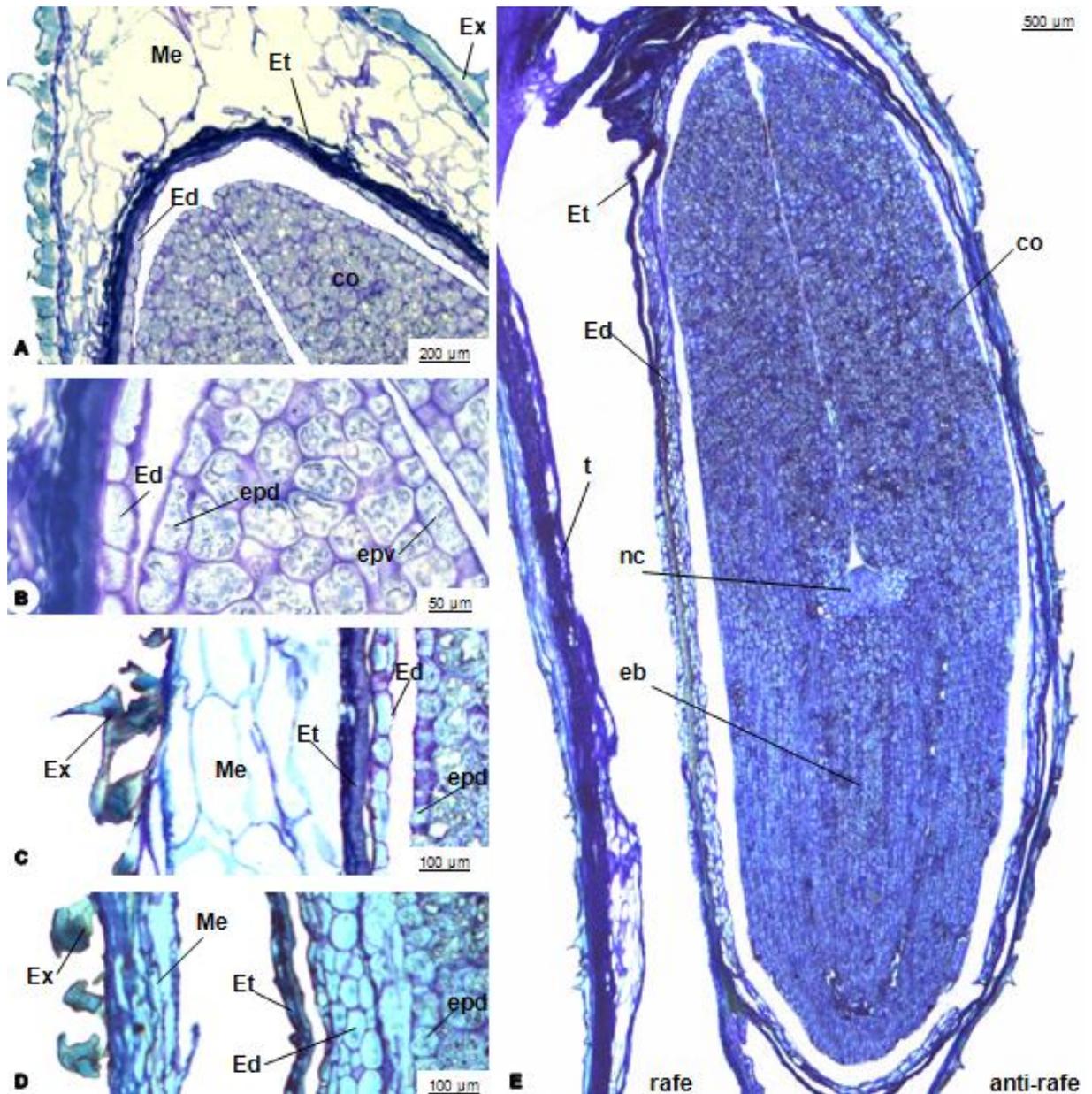


Figura 9 – Corte longitudinal da semente de *P. echinatum*.

A – região distal (ala), B – cotilédone, C – testa, D – detalhe da região da anti-rafe (testa), E – vista geral. Legenda: (co) cotilédone, (eb) embrião, (Ed) endosperma, (epd) epiderme cotiledonar dorsal, (epv) epiderme cotiledonar ventral, (Et) endotélio, (Ex) exotesta, (Me) mesotesta, (nc) nó cotiledonar, (t) testa.

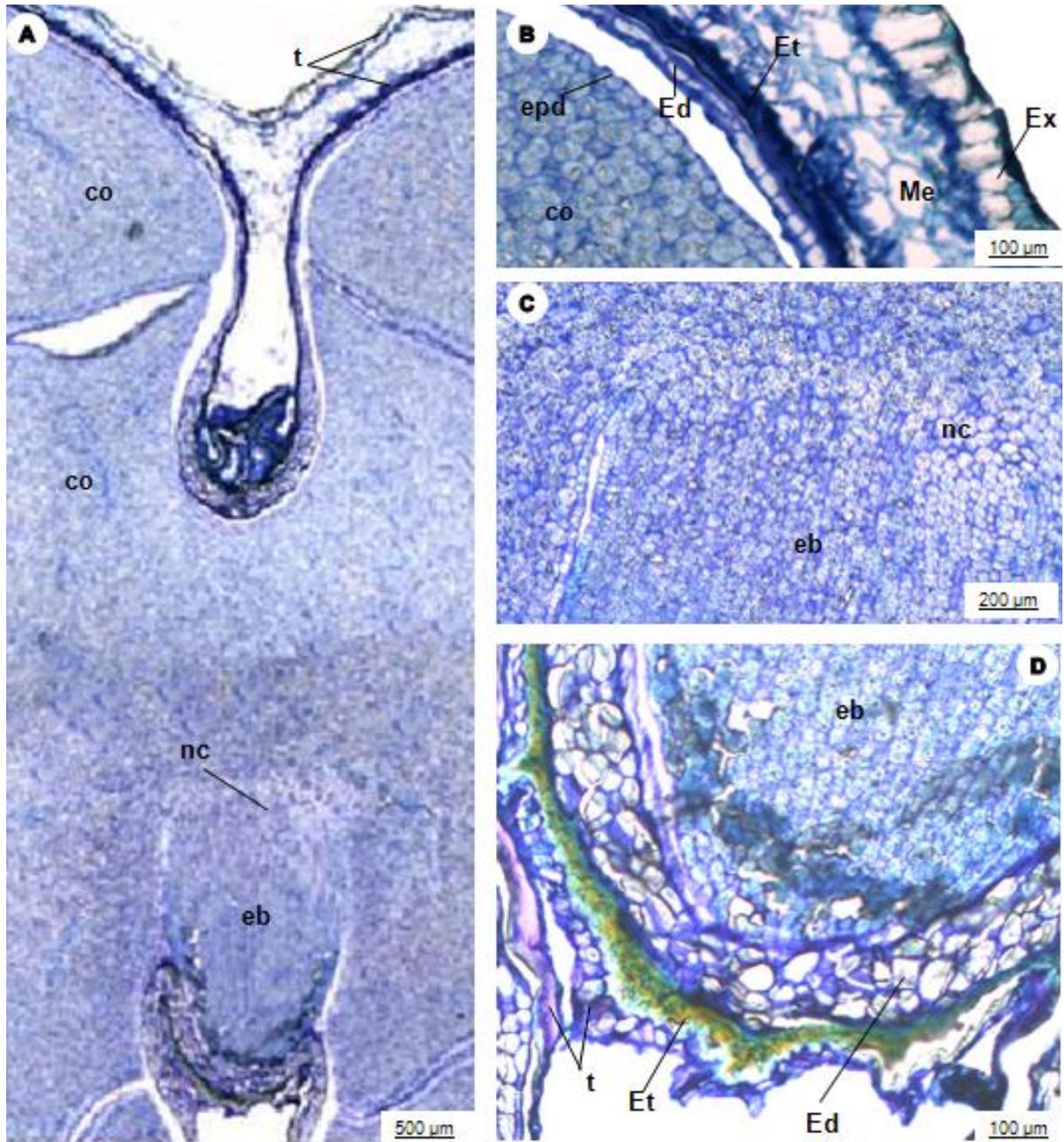


Figura 10 – Corte longitudinal da semente de *P. echinatum*. Observação paradérmica

A – vista geral; B – testa; C – nó cotiledonar, D – coifa. Legenda: (co) cotilédone, (eb) embrião, (Ed) endosperma, (epd) epiderme coticoledonar dorsal, (Et) endotélio, (Ex) exotesta, (Me) mesotesta, (nc) nó cotiledonar, (t) testa

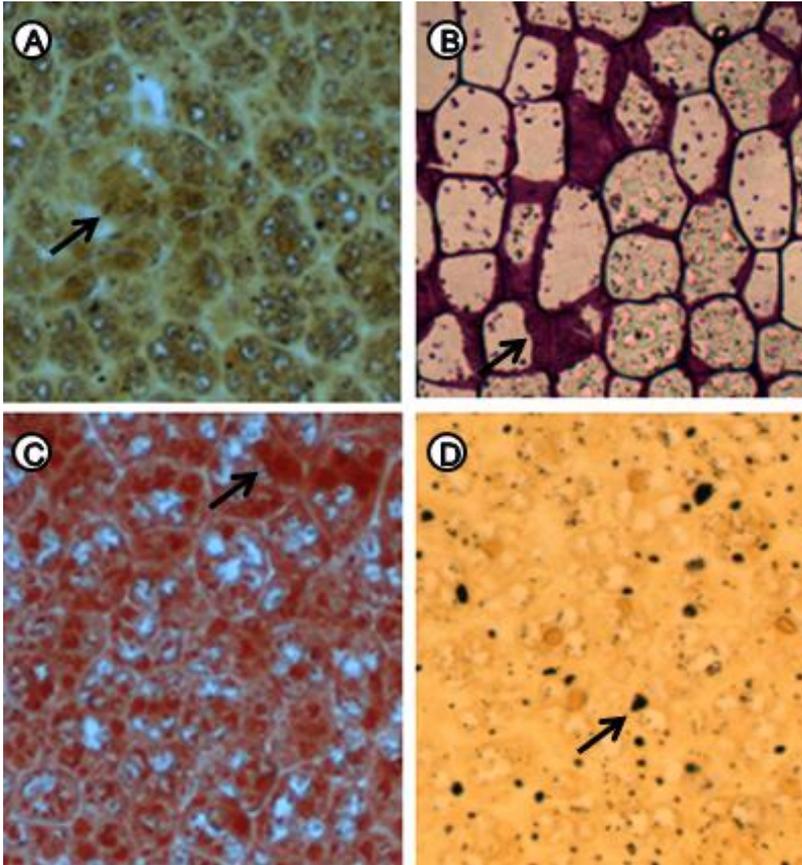


Figura 11 – Histoquímica da semente de *P. echinatum*.

A – Dragendorff (alcaloides), B – PAS (polissacarídeos), C – Sudan III (óleos fixos e voláteis), D – Lugol (amido)

4. DISCUSSÃO

O rudimento seminal (óvulo) é anátropo, unitegmentado e tenuinucelado de acordo com o que é previsto para Bignoniaceae (CORNER, 1976). O anel nectarífero com presença de tricomas é uma das características que diferencia esta espécie das demais do gênero *Pithecoctenium* (RIVERA, 2000).

Entre as principais características do fruto de *P. echinatum* estão projeções equinadas, que possivelmente são adaptações adquiridas para desencorajar a predação de frutos jovens por macacos (GENTRY, 1975). Esta espécie possui deiscência loculicida, o que também pode ser observado em *Tecoma stans* (RENÒ et al., 2007), ou seja, o tecido de abscisão está localizado dorsiventralmente desde a base até o ápice do pericarpo. A deiscência se dá pela queda das valvas e o deslocamento do réplum (BARROSO et al., 1999). A presença de células pétreas no mesocarpo externo, esclerificação do parênquima do mesocarpo, associado a

desidratação do pericarpo, são responsáveis pelo enrijecimento do pericarpo, tendo como consequência a deiscência do pericarpo maduro.

Na linha de deiscência, o tecido de abscisão do pericarpo é constituído por células parenquimáticas que atravessam o pericarpo interrompendo a camada de esclerênquima, onde se dá principalmente pela ruptura neste tecido, devido às células serem fracamente agrupadas por causa da alteração na tensão ocorrida durante a desidratação (EAMES; MACDANIELS, 1947).

As sementes de *P. echinatum* são exalbuminosas, corroborando o descrito por Esau (1985), o qual refere-se às sementes sem endosperma ou com apenas uma pequena quantidade. Características semelhantes foram encontradas em *Tabebuia ochracea* sendo tal característica típica para Bignoniaceae (SAMPAIO *et al.*, 2007).

A formação de uma estrutura membranácea que envolve os embriões é comum dentre as espécies de Bignoniaceae (COSTA, 1995). Em *P. echinatum*, o envoltório membranáceo está localizado entre o embrião e a testa da semente, que também é verificada estrutura semelhante em *Tabebuia chrysotricha* e *T. ochraceae*, *Pyrostegia venusta*, *T. stans*, espécies das quais pertencem à mesma família (GABRIELLI, CASTRO, 1995; COSTA, 2003; SOUZA *et al.*, 2005; RENÒ *et al.*, 2007). Essa estrutura, provavelmente tem funções como impedir o deslocamento de nutrientes; criar um espaço de ar que auxilie na flutuabilidade da semente através do rompimento com a mesotesta; controlar o desenvolvimento dos embriões; e ter alguma utilidade durante a germinação das sementes (SOUZA *et al.*, 2005; SAMPAIO *et al.*, 2007).

O endotélio, cujas células contêm compostos fenólicos, parece estar relacionado à proteção contra predadores e microrganismos, ao aumento de dureza do tegumento e à atribuição de cor à semente (BELTRATI; PAOLI, 2006). A presença de endotélio é principalmente registrada em famílias que mostram óvulos unitegmentados e tenuinucelados, desenvolvidos tardiamente *ab initio* no endosperma celular (KAPIL; TIWARI, 1978 apud SOUZA *et al.*, 2005). Há presença de endosperma remanescente com tecido relativamente escasso, entretanto, *P. venusta*, que pertence à mesma tribo (Bignonieae), possui endosperma bem evidente (GABRIELLI; CASTRO, 1995).

O embrião de *P. echinatum* possui características, descritas por Barroso e colaboradores (1999), semelhantes para *Tabebuia caraiba* e *T. stans*. No entanto, *T. caraiba* possui embrião axial e endosperma ausente (FERREIRA; CUNHA, 2000).

A presença de estruturas de coloração amarelada, compostas por feixes de cristais em forma de agulha dispostos de maneira concêntrica, ocorrem na região ovariana e pericarpo de *P. echinatum*. Estruturas semelhantes foram encontradas em *Anthurium gracile* e *Anthurium minarum*, inferindo-as como cristais de natureza flavonoídica, diosmina (MANTOVANI *et al.*, 2010). Oliveira-Pires e colaboradores (2003) e Mantovani e colaboradores (2010), em seus estudos apresentaram diosmina como potencial taxonômico por não ser característica comum entre as espécies estudadas.

6. REFERÊNCIAS

- BARROSO, G.M.; MORIM, M.P.; PEIXOTO, A.L.; ICHASO, C.L.F. **Frutos e sementes: morfologia aplicada à sistemática de dicotiledôneas**. Viçosa: UFV, 441p. 1999.
- BELTRATI, C.M; PAOLI, A.A. **Semente**. In: APPEZZATO-DA-GLORIA, B.; CARMELLO-GUERREIRO, S.M. Anatomia vegetal. 2.ed. Viçosa: Ed. UFV, 2006.
- CORNER, E.J.H. **The seed of dicotyledons**. Cambridge University Press, London. 1976.
- COSTA, A. F. **Farmacognosia**. 2ª edição, Lisboa; Fundação Calouste Gulbenkian, v. III, 1032 p, 1982.
- COSTA, M.E. **Morfo-anatomia da semente e da plântula de *Tabebuia serratifolia* (Vahl) Nicholson (Bignoniaceae)**. Dissertação de mestrado, Universidade Federal do Paraná, Curitiba. 1995.
- COSTA, M.E. **Morfoanatomia e desenvolvimento do fruto, semente e plântula de *Tabebuia ochracea* (Chamisso) Standley (Bignoniaceae)**. Rio Claro, 2003. 109p. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2003.
- COSTANTINO L. et al. Isolation and pharmacological activities of the *Tecoma stans* alkaloids. **IL Farmaco**.n.58. p.781-785, 2003.
- DI STASI, L.C. **Plantas medicinais: Arte e ciência**. Unesp: São Paulo, 1996.
- EAMES, A.J.; MacDANIELS, L.H. **Introduction to plant anatomy**. New York: McGraw-Hill Book, 427p., 1947.

ESAU, K.. **Anatomía vegetal**. 3d. Omega: Barcelona, 1985.

FEDER, N.; O'BRIEN, T.P. Plant microtechnique. Some principles and new methods. **American Journal of Botany** v.55, p.123-142,1958.

FERREIRA, R.A.; CUNHA, M.C.L. Aspectos morfológicos de sementes, plântulas e desenvolvimento da muda de craibeira (*Tabebuia caraiba* (Mart.) Bur.) – Bignoniaceae e pereiro (*Aspidosperma pyriforme* Mart.) – Apocynaceae. **Revista Brasileira de Sementes** . v.22, p.134-143, 2000.

FISCHER, E., I. THEISEN; L. G. LOHMANN. Bignoniaceae. In: J. W. Kadereit (ed.) **The families and genera of vascular plants**. Springer-Verlag, Heidelberg: Germany. v. VII, p.9-38, 2004.

FRANCO, I.J.; FONTANA, V. L. **Ervas e plantas: A medicina do simples**. 10 ed. rev. 208p, 2005.

GABRIEL, B.L. **Biological Electron Microscopy**. Van Nostrand Reinhold Company: New York, 1982.

GABRIELLI, A.C.; CASTRO, M.M. Anatomia da semente madura de *Pyrostegia venusta* (Ker.) Miers – Bignoniaceae. **Revista Brasileira de Botânica**. v.18, p.227-234, 1995.

GENTRY, A.H. **Bignonia crucigera: A case of mistaken identity**. Taxon 24, p.121-123. The New York Botanical Garden: New York. 1975.

GENTRY, A.H., **Bignoniaceae. Part I (Crescentieae and Tourretieae). Flora neotropica**. Monogr.25. The New York Botanical Garden: New York. 1980.

GERRITS, P. O.; SMID, L. A new less toxic polymerization system for the embedding of soft tissues in glycol methacrylate and subsequent preparing of serial sections. **Journal of Microscopy**. v .132, p.81-85, 1983.

LOHMANN, L.G. Bignoniaceae. In: Lista de espécies da Flora do Brasil. **Jardim Botânico Rio de Janeiro**. Rio de Janeiro. 2010. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov/2010/FB112461>>. Acesso em: 4 out. 2011.

MANTOVANI, A., FILARTIGA, A.L.D.P.; COELHO, M.A.N. Anatomia comparada da folha e espata de espécies de *Anthurium* (Araceae) ocorrentes na Mata Atlântica. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 33, n.1, p.185-200, 2010.

MCDOWELL, E.M.; TRUMP, B.R. Histological fixatives for diagnostic light and electron microscopy. **Archives of Pathology & Laboratory Medicine**. v.1000, p.405-414, 1976.

MINGARRO, M.D; ACER, N.; LLINARES,F.; POZUELO, J.M.; MERA, A.G.; VICENTEN, J.A.; MORALES, L;ALGUACIL, L.F.; PÉREZ, C. Biological activity of

extracts from *Catalpa bignonioides* Walt. (Bignoniaceae). **Journal Of Ethnopharmacology**. n.87, p.163-167, 2003.

OLIVEIRA, T.B.; NETO, B H.J.C.; XAVEIER, M.A.; GARROTE, C.F.D.; ASQUIERI, E.R.; REZENDE, M.H.; FERREIRA, H.D.; PAULA, J.R. Estudo Farmacognóstico das raízes de *Jacaranda decurrens* Cham (carobinha). **Revista Brasileira Farmacognosia**.v.13, supl.1, p.54-55, 2003.

OLIVEIRA-PIRES, M.F.; MELO-DE-PINNA, G.F.; FELIX, L.P. Taxonomic separation of the genera Prosthechea and Encyclia (Laeliinae Orchidaceae) using leaf and root anatomical features. **Botanical Journal of Linnean Society**, v.143, p. 293-303, 2004.

RENÒ, L.R.; MOSQUETA, I.S.; BRACCINI, A.L. Morfo-anatomia do fruto e sementes de amarelinho (*Tecoma stans* (L.) Kunth – Bignoniaceae). **Revista Brasileira de Sementes**. v.29, p.18-30, 2007.

RIVERA GL. Nuptial nectary structure of Bignoniaceae of Argentina. **Darwiniana**. v.38, p.227–23, 2000.

SAMPAIO, D.S.; COSTA, M.E.; PAOLI, A.A.S. Ontogenia da semente de *Tabebuia ochracea* (Cham.) Standl. (Bignoniaceae). **Revista Brasileira de Botânica**. v.30, p.289-302, 2007.

SANDWITH, N.Y; HUNT. D.R. **Flora Catarinense**. I parte: As plantas. Fascículo: Bign. Itajaí, 1974.

SCHNEIDER, E.P.M; LONDERO, I.W.B. Flora Ilustrada do Rio Grande do Sul – Fascículo VI: Bignoniaceae. **Boletim do Instituto de Ciências Naturais**. v.25, p. 7-37, 1965.

SOUZA, L.A, IWAZAKI, M.C.; MOSCHETA, I. Morphology of the pericarp and seed of *Tabebuia chrysotricha* (Mart. ex DC.) Standl. (Bignoniaceae). **Brazilian Archives of Biology and Technology**. v.48, p.407-418, 2005.

STEINERT, J.; KHALAF, H.; RIMPLER, M.; HPLC separation and determination of naphthol [2,3-b]furan-4,9-diones and related compounds in extracts of *Tabebuia avellanedae* (Bignoniaceae). **Journal of Chromatography A**. n.693, p. 281–287, 1995.

ZANETTI; G. D.; MANFRON, M.P.;S HOELZEL,C.S. Análise morfo-anatômica de *Tropaeolum majus* L. (Tropaeolaceae). **IHERINGIA, Série Botânica**, Porto Alegre, v. 59, n.2, p.173-178, 2004.

3.2 MANUSCRITO 2

Caracterização físico-química e investigação de bioatividade em *Pithecoctenium echinatum* (Jacq.) Baill (Bignoniaceae)

Rosana Casoti¹, Daiane F. Dalla Lana¹, Tiago D. Maki¹, Luana Rossato², Sydney H. Alves², Melânia P. Manfron¹

¹ Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. LABINFITO

² Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. LAPEME

Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), caixa postal 5091, CEP 97105-900, Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brasil. e-mail: rocasoti@hotmail.com

RESUMO

Pithecoctenium echinatum é uma espécie pertencente à Bignoniaceae, conhecida popularmente como pente-de-macaco é utilizada na medicina popular para inflamações, reumatismo, infecções cutâneas, dor de cabeça, depurativo do sangue e calmante. O objetivo deste trabalho foi realizar a caracterização físico-química e investigar as atividades antioxidante e antimicrobiana nas sementes desta espécie. Na caracterização físico-química, por meio de testes farmacopeicos foi utilizado droga vegetal seca, constatando que não houve variação significativa das amostras coletadas em locais diferentes. Na extração hidroetanólica 70%, o rendimento do extrato bruto (EB) foi de 22,94%, sendo que na partição do EB, o maior rendimento foi a fração butanólica (16,55%). O EB das sementes de *P. echinatum* apresentou compostos do metabolismo secundário como esteróides e/ou triterpenos, flavonoides, alcaloides, antraquinonas, taninos catéquicos, oxidrila fenólica e heterosídeos cardiotônicos e óleos voláteis. Por doseamento espectroscópico foram determinados polifenóis, flavonoides e taninos no EB e frações. *P. echinatum* apresentou potencial antioxidante (CE₅₀ 131,84 µg/ml) na fração acetato pelo método do DPPH e atividade antimicrobiana à *P. aeruginosa*, *P. zophii* e *C. albicans* pelo método de microdiluição em caldo (MIC). Portanto, os parâmetros físico-químicos estabelecidos para *P. echinatum* possibilitam controle de qualidade da droga dessa espécie, e esta, apresentou atividades antimicrobiana e antioxidante.

Palavras-chave: *Pithecoctenium echinatum*. Bignoniaceae. Controle físico-químico. DPPH. CIM.

1. INTRODUÇÃO

Há uma grande variedade de espécies de plantas existentes na flora mundial, muitas com importantes propriedades terapêuticas. O Brasil detém a maior biodiversidade do mundo, mas 10% das espécies existentes foram catalogadas e menos de 1% destas espécies vegetais estudadas do ponto de vista químico e farmacológico. A busca de desenvolvimento de novos fármacos, produção semi-sintética de compostos e subsídio para o controle de qualidade de fitoterápicos são essenciais (GUERRA; NODARI, 2001).

O reconhecimento internacional do fitoterápico e o fortalecimento do desenvolvimento tecnológico são fatores desencadeantes no aumento da utilização destes medicamentos. Contudo, grande parte da comercialização de plantas medicinais no Brasil advém de mercados, lojas de produtos naturais e feiras livres, não possuindo certificação de qualidade. Conseqüentemente, a utilização inadequada dos fitoterápicos, decorrentes principalmente da automedicação, pode trazer uma série de danos à saúde humana (VEIGA-JÚNIOR *et al.*, 2005; SOUSA *et al.*, 2007).

A utilização de plantas medicinais com identificação equivocada, devido a mesma espécie botânica apresentar diferenças significativas na sua composição físico-química, quando oriundos muitas vezes de diferentes regiões, torna a pesquisa farmacognóstica de extrema importância (GOTTLIEB, BORIN, 1997).

P. echinatum é uma espécie pertencente à família Bignoniaceae, conhecida como pente-de-macaco, utilizada popularmente nas inflamações, reumatismo, infecções cutâneas, dor de cabeça, depurativo do sangue e calmante. O objetivo deste trabalho é realizar a caracterização físico-química e investigar as atividades antioxidante e antimicrobiana nas sementes desta espécie.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Material vegetal

As sementes de *P. echinatum* foram coletadas em março de 2010 nas cidades de Santa Maria (amostra 1), Santana do Livramento (amostra 2) e São Martinho da Serra (amostra 3), Rio Grande do Sul, Brasil. Uma amostra do material vegetal foi identificada pelo biólogo Gilberto Dolejal Zanetti, e depositada no Herbário do Departamento de Biologia da UFSM, conforme exsicata SMDB 12872. As sementes coletadas foram submetidas à secagem em estufa com ar circulante, à temperatura de 40°C e logo após, moídas e armazenadas em local seco e fresco.

2.2 Análises físico-químicas

A determinação de água, teor de cinzas totais, cinzas insolúveis em ácido clorídrico, cinzas sulfatadas, índice de amargor, índice de intumescência foram realizadas com cerca de 200g do material vegetal seco (droga) de acordo com os métodos preconizados pela Farmacopeia Brasileira 4ª edição (1988) e WHO (1998)

2.3 Preparo do extrato bruto (EB)

Parte do material vegetal da amostra 1 (404g) foi macerado em solução hidroetanólica a 70%. O extrato obtido (EB) foi liofilizado e calculado o rendimento.

2.4 Partição do extrato bruto

O extrato bruto (20g) foi diluído em 100 mL de água, particionado por meio de funil de separação em frações de polaridades crescentes com os solventes hexano, diclorometano (DCM), acetato de etila e *n*-butanol. A partição com cada solvente foi monitorada por CCD até o esgotamento. As frações obtidas foram concentradas em evaporador rotativo, secos em estufa a 35°C e calculados seus rendimentos.

2.5 Análise fitoquímica

A avaliação fitoquímica preliminar foi realizada conforme a metodologia proposta por Moreira (1979) e Costa (1982), com modificações. Além de reações de caracterização de metabólitos secundários, por meio de reagentes específicos, as amostras foram cromatografadas em sílica gel GF254 e eluídas em diferentes

eluentes, de acordo com as substâncias a serem identificadas (WAGNER; BLADT, 1984).

2.6 Doseamento de metabólitos secundários

2.6.1 Determinação do rendimento de óleos voláteis

O teor de óleos voláteis foi realizado a partir de 25g da droga seca e moída (amostra 1) por hidrodestilação em aparelho de Clevenger de acordo com Akisue (1986) modificado. A purificação foi realizada com éter etílico e sulfato de sódio anidro. O rendimento do óleo volátil foi calculado em relação ao peso inicial da droga.

2.6.2 Determinação da concentração de polifenóis

Os polifenóis foram determinados pelo método de Folin-Ciocalteu, utilizando como padrão ácido gálico conforme Chandra e Meija (2004) modificado. As leituras das amostras foram feitas em espectrofotômetro Shimadzu UV1021, a 730 nm e em triplicata. A concentração de polifenóis foi determinada por interpolação da absorvância das amostras com a curva de calibração obtida com o padrão e expressos em miligramas de equivalentes de ácido gálico por grama de extrato vegetal.

2.6.3 Determinação da concentração de flavonoides

Os flavonoides foram determinados de acordo com Rio (1996) modificado, utilizando como padrão rutina. As leituras das amostras foram realizadas em espectrofotômetro Shimadzu UV102, a 425 nm e em triplicata. A concentração de flavonoides foi determinada por interpolação da absorvância das amostras com a curva de calibração obtida com o padrão e expressos em miligramas de equivalentes de rutina por grama de extrato vegetal.

2.6.4 Determinação da concentração de taninos condensados

Os taninos condensados ou catéquicos foram determinados pelo método da vanilina 4% em solução metanólica de ácido clorídrico, utilizando como padrão catequina conforme Agostini-Costa e colaboradores (1999). As leituras das amostras, em triplicatas, foram realizadas em espectrofotômetro Shimadzu

UV1021, a 490 nm. A concentração de taninos foi determinada por interpolação da absorvância das amostras com a curva de calibração obtida com o padrão e expressos em miligramas de equivalentes de catequina por grama de extrato vegetal.

2.7 Determinação do potencial antioxidante pelo método DPPH

A avaliação da capacidade antioxidante foi determinada pelo método fotolorimétrico do DPPH (1,1-difenil 2-picrilhidrazila), de acordo com Choi e colaboradores (2002). Preparou-se soluções do extrato, do DPPH e do padrão ácido ascórbico em etanol. As leituras das soluções foram feitas em triplicata em espectrofotômetro Shimadzu UV1021 (518nm). A porcentagem de inibição do radical DPPH pelas amostras foi calculada de acordo com a fórmula:

$$\% \text{ inibição} = 100 - [(Abs. Amostra - Abs. Branco) \times 100 / Abs. Controle negativo]$$

2.8 Avaliação da atividade antimicrobiana

Para a avaliação da atividade antimicrobiana do extrato hidroetanólico e frações, utilizou-se o método de microdiluição em caldo de acordo com o Clinical and Laboratory Standards CLSI M27 A3 (2008) para leveduras, CLSI M7A6 (2003) para bactérias e CLSI M38A (2002) para fungos filamentosos.

Os inóculos em solução salina 0,85% foram preparados pelo método espectrofotométrico, resultando em suspensão $1,5 \times 10^3$ UFC/ml para leveduras e 5×10^5 UFC/ml para bactérias. Foram realizadas diluições seriadas de 1.000 µg/ml até 2 µg/ml em dimetilsulfóxido do EB e frações.

Os testes foram realizados em microplacas estéreis de poliestireno em meio ao caldo Muller-Hinton para bactérias, RPMI 1640 para fungos e alga. As cavidades das placas de microdiluição contendo 100 µL das amostras vegetais foram inoculadas com 100µl de suspensão de fungos e 10 µL de suspensão bacteriana. A cavidade do controle positivo continha 0,1ml do inóculo e 0,1ml do meio, sem extrato e frações. Os ensaios foram realizados em duplicata.

As placas foram incubadas por um período de 24 horas a 35-37 °C para bactérias e, por 48 horas a 25-27 °C para fungos. Após o período de incubação, observou-se o crescimento microbiano indicado pelo aparecimento de turvação.

Através deste método, determinou-se a menor concentração da amostra vegetal capaz de inibir o crescimento microbiano, chamada de Concentração

Inibitória Mínima (CIM).

2.8.1 Microrganismos

Na determinação da atividade antimicrobiana foram utilizadas cepas de *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Candida albicans* ATCC 44373, *Aspergillus fumigatus* isolado clínico e *Prototheca zopfii* isolado clínico, disponíveis no Laboratório de Pesquisas Micológicas da UFSM.

2.9 Análise estatística

Os resultados dos experimentos foram analisados em *software GraphPrism 5.0* com significância ($p < 0,05$).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O extrato bruto das sementes de *P. echinatum* apresentou compostos do metabolismo secundário como esteróides e/ou triterpenos, flavonoides, alcaloides, antraquinonas, taninos catéquicos, oxidrila fenólica e heterosídeos cardiotônicos. Através da mesma metodologia, Sandabe e colaboradores (2006), no extrato aquoso do caule de *Ficus sycomorus*, constataram a presença de alcaloides, flavonoides, saponinas e taninos gálicos. Já para a raiz de *Urera baccifera* foram observados heterosídeos flavonoídicos, heterosídeos saponínicos, taninos e purinas mostrando que estes metabólitos podem ser caracterizados em diferentes espécies e servem para distingui-los com marcadores químicos (GINDRI *et al*, 2010)

Pela análise físico-química das sementes de *P. echinatum* não houve variação significativa dos parâmetros de qualidade analisados com as amostras (tabela 1).

Tabela 1 - Análises físico-químicas das sementes de *P. echinatum*

Parâmetros de qualidade	Amostra 1	Amostra 2	Amostra 3	Média das amostras
	X± DP	X± DP	X± DP	
Teor de água (%)	5,38±0,06 ^a	4,98±0,09 ^a	5,56±0,57 ^a	5,31±0,24
Cinzas totais (%)	10,41±0,83 ^a	10,85±0,78 ^a	11,52±0,76 ^a	10,92±0,79
Cinzas insol. HCl (%)	0,65±0,07 ^b	0,89±0,04 ^a	0,79±0,05 ^{ab}	0,77±0,05
Cinzas sulfatadas (%)	7,15±0,17 ^a	7,10±0,22 ^a	7,57±0,27 ^a	7,27±0,22
Índice de intumescência	39,04±1,34 ^a	41,79±1,75 ^a	39,58±1,90 ^a	40,13±1,66
Índice de amargor (u/g)	220,00±0,50 ^a	218,00±0,28 ^a	220,00±0,35 ^a	219,33±0,37

As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si.

Foi aplicado o Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Média e desvio padrão (X± DP)

A média de cinzas totais determinada nas sementes de pente-de-macaco foi de 10,92%. Para *Caesalpinia férrea* a qual apresentou 5,31% de cinzas foi atribuído aos sais inorgânicos presentes no material vegetal (FRASSON et al., 2003; Farmacopeia Brasileira, 1996).

As cinzas insolúveis em HCl de *P. echinatum* (0,78%) está dentro dos teores aceitos pela Farmacopeia Brasileira, aceito até 1%. As cinzas insolúveis podem indicar contaminação ambiental ou presença de substâncias silicosas da própria espécie. O teor de cinzas insolúveis em HCl entre a amostra 1 e 2 são diferentes, mas estatisticamente iguais a amostra 3. Essa variação pode ser decorrente da diversidade climática e geográfica, como temperatura, pluviosidade, tipo de solo, pois as mesmas foram coletadas em diferentes locais. Estabelecer teores de cinzas é um importante parâmetro para o controle de qualidade de farmacógeno.

É preconizado pela Farmacopeia Brasileira (1988) que se estabeleça água residual as drogas vegetais, o que permite manter a qualidade nas condições de armazenamento. Para *P. echinatum* foi de 5,31%.

O índice de intumescência fornece os teores de mucilagem de *P. echinatum* que foi de 40%. A mucilagem é constituída de pectina, monossacarídeos como glicose, além de compostos fenólicos como flavonoides e taninos (GRAZIOSI; RATHINAVELU, 2005).

Segundo Obradovic e colaboradores (2005), os taninos com menos de quatro monômeros são predominantemente amargos e contribuem, portanto para o

amargor de algumas plantas, principalmente os taninos gálicos, o qual não foi caracterizado em *P. echinatum*, a que se atribui o baixo índice de amargor (219 u/g).

Aos óleos voláteis são atribuídos, entre outras atividades, ação sobre sistema nervoso central, anti-inflamatória e antioxidante. Pente-de-macaco é utilizado popularmente no controle de infecções cutâneas, reumatismo e dores de cabeça, e esta, apresentou óleos voláteis (1,9%), os quais podem ser responsáveis por algumas das propriedades atribuídas a essa planta (tabela 2).

Tabela 2 – Rendimento dos metabólitos secundários de *P. echinatum*

Amostras	Peso Inicial (g)	Peso obtido (g)	Rendimento (%)
Óleos essenciais	25*	0,474	1,90
Extrato bruto	404*	92,800	22,94
Fração hexânica		0,521	2,61
Fração DCM		0,926	4,63
Fração acetato	20**	0,338	1,69
Fração butanólica		3,310	16,55

* droga seca ** extrato bruto

A partir do rendimento do EB (22,94%) para *P. echinatum* obteve-se, por partição com solventes de polaridade crescente, um maior rendimento na fração butanólica (16,55%) e através dos doseamentos pode ser verificado que a maior parte dos polifenóis e flavonoides se concentrou na fração acetato de etila (tabela 3).

Tabela 3 – Doseamentos de metabólitos secundários das sementes de *P. echinatum*.

Amostras (0,004%)	Polifenóis (mg/g)	Flavonoides (mg/g)	Taninos (mg/g)
Extrato bruto	196,00	11,00	37,70
Fração hexânica	*	*	*
Fração DCM	68,00	0,82	50,00
Fração acetato de etila	674,00	9,13	49,92
Fração butanólica	222,00	0,53	21,49

* Não detectado.

P. echinatum apresentou na fração acetato de etila 674,00 mg/g de polifenóis. Estas substâncias são conhecidas por apresentarem benefícios, devido ao seu poder antioxidante (anti-cancerígeno, anti-inflamatório, anti-aterogênico, anti-trombótico, antimicrobiano, vasodilatador e analgésica) (WOLLGAST; ANKLAN, 2000).

O potencial antioxidante de *P. echinatum* (tabela 4) no EB foi de 18,11%, que quando comparada com *Arctium lappa* foi menos eficiente, a qual apresentou 90,79% (LIMA *et al.*, 2006a).

Tabela 4 – Potencial antioxidante do EB e frações das sementes *P. echinatum*

Amostras	% inibição	CE₅₀ (µg/ml)
Ácido ascórbico	96,87	12,12
Extrato bruto	18,11	545,93
Fração hexânica	1,28	13775,77
Fração DCM	4,38	2723,26
Fração acetato de etila	90,57	131,84
Fração butanólica	30,43	381,12

Na concentração de 200 µg/ml a fração acetato de etila de *P. echinatum* apresentou atividade antioxidante semelhante ao ácido ascórbico, possivelmente devido à presença de polifenóis e flavonoides como foram observados na tabela 3.

Fazendo correlação estatística com os dados de teor de polifenóis e a concentração eficiente (CE_{50}) obtidos com o extrato e frações de *P. echinatum* é possível inferir uma correlação positiva (figura 1). Esta correlação foi observada também para os extratos de *Terminalia brasiliensis*, *Cenostigma macrophyllum* e *Copernicia prunifera*. Já os extratos das folhas de *Terminalia fagifolia* e *Qualea grandifolia* não foi observado correlação (SOUSA *et al.*, 2007).

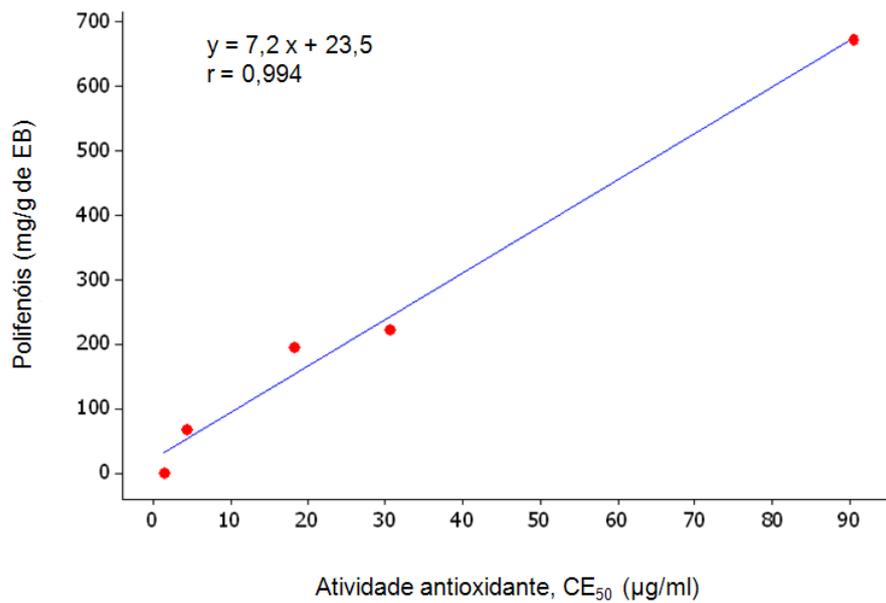


Figura 1 – Correlação entre polifenóis e atividade antioxidante. Foi aplicado Correlação de Pearson com 95% de confiança.

P. aeruginosa apresentou sensibilidade ao EB e frações com exceção da fração butánolica (tabela 5). Embora essa sensibilidade tenha sido baixa para EB e fração DCM, para as frações hexânica e acetato foi moderada. As demais bactérias não apresentam sensibilidade a *P. echinatum*.

P. aeruginosa, gram negativa, está presente em infecções do trato urinário, cujo sistema pode ser protegido por substâncias como flavonoides e proantocianidinas (VIEIRA *et al.*, 2005; FIGUEIREDO *et al.*, 2007).

Tabela 5 – CIM expressos em µg/ml nos extratos das sementes de *P. echinatum*

Microorganismos	EB	FH	FD	FA	FB
<i>Escherichia coli</i>	*	*	*	*	*
<i>Proteus mirabilis</i>	*	*	*	*	*
<i>Staphylococcus aureus</i>	*	*	*	*	*
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	512	256	512	256	*
<i>Aspergillus fumigatus</i>	*	*	*	*	*
<i>Prothoteca zophii</i>	512	512	512	256	512
<i>Candida albicans</i>	256	256	128	*	512

Segundo a classificação de Holetz e colaboradores (2002), bom < 100 µg/ml, moderada 100-500 µg/ml, fraca 500-1000 µg/ml e concentração acima de 1000 µg/ml considerada inativa(*). (EB) extrato bruto, (FH) fração hexânica, (FD) fração diclorometano, (FA) fração acetato e (FB) fração butanólica.

Djipa e colaboradores (2000), sugerem que a atividade antimicrobiana de *Syzygium jambus* esteja relacionada com a alta quantidade de taninos, pois com a eliminação destes, esta propriedade foi suprimida. Quanto a atividade antifúngica, observamos que *A. fumigatus* não foi sensível e *C. albicans* foi a que apresentou uma melhor sensibilidade, sendo mais sensível (128 µg/ml) na fração DCM. Já a alga *P. zopfii* responsável por afecções em animais e no homem (BEXIGA *et al.*, 2003) apresentou baixa sensibilidade com exceção para fração acetato que foi moderada (256 µg/ml).

A atividade antimicrobiana observada pode ser atribuída também aos óleos voláteis presentes em *P. echinatum*, uma vez que esta substância, segundo Lima e colaboradores (2006b), estão relacionadas a diversas funções necessárias à sobrevivência vegetal, exercendo papel fundamental na defesa contra microrganismos. Cientificamente é atribuído a cerca de 60% dos óleos essenciais a propriedades antifúngicas e 35% exibem propriedades antibacterianas (BHAVANANI; BALLOW, 1992).

4. CONCLUSÃO

Os parâmetros físico-químicos estabelecidos para *P. echinatum* possibilitam controle de qualidade da droga dessa espécie.

P. echinatum apresenta atividade antioxidante na fração acetato e atividade antimicrobiana à *P. aeruginosa*, *P. zophii* e *C. albicans*.

5. REFERÊNCIAS

AKISUE, Gokithi. Aparelho extrator de óleo essencial: modificação do aparelho de Clevenger. **Rev. bras. farmacogn.**, São Paulo, v. 1, n. 2, 1986 .

AGOSTINI COSTA, T. S.; GARRUTI, D. S.; LIMA, L.; FREIRE, S.; ABREU, F. A. P.; FEITOSA, T. Avaliação de metodologias para determinação de taninos no suco de caju. **Boletim CEPPA**, Curitiba, v. 12, n. 2, p. 167-176, 1999.

BEXIGA, R.; CAVACO, L.; VILELA, C.L. Isolamento de *Prothotheca zophii* a partir de leite bovino. *Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias*, v.545, n.98, p.33-37, 2003.

BHAVANANI SM, BALLOW CH. New agents for Gram-positive bacteria. **Current Opinion in Microbiology**. v.13, p. 528-534,1992.

CHANDRA, S.; MEIJA, E.G. Polyphenolic Compounds, Antioxidant Capacity, and Quinone Reductase Activity of an Aqueous Extract of *Ardisia compressa* in comparison to Mate (*Ilex paraguariensis*) and Green (*Camellia sinensis*) Teas. **Journal Agriculture and Food Chemistry**, v. 52, p. 3583-3589, 2004.

CHOI, C.W.; KIM, S.C.; HWANG, S.S.; CHOI, B.K.; AHN, H.J.; LEE, M.Y.; PARK, S.H.; KIM, S.K. Antioxidant activity and free radical scavenging capacity between Korean medicinal plants and flavonoids by assay-guided comparison. **Plant Science**, v. 163, p. 1161-1168, 2002.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARTS INSTITUTE. CLSI. **Method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts: proposed standard**. 3. ed. Wayne, PA: CLSI, M27-A3, 2008.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARTS INSTITUTE. CLSI. **Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; approved standard M7-A6**. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, PA. 2003.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. CLSI. **Method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi**; approved standard M38-A. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, PA. 2002.

COSTA, A. F. **Farmacognosia**. 2ª edição, Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, v. III, 1032 p., 1982.

DJIPA, C.D.; DELMEE, M.; QUENTIN-LECLERCQ, J. Antimicrobial Activity of bark extracts of *Syzygium jambos* (Myrtaceae). **Journal of Ethnopharmacology**, v.71, p.307-313, 2000.

FARMACOPEIA BRASILEIRA. 4. ed. **Parte I**. São Paulo : Atheneu, 1988.

FARMACOPEIA BRASILEIRA. 4. ed. São Paulo: Atheneu, 1996.

FIGUEIREDO, E.A.P.; RAMOS, H.; MACIEL, M.A.V.; VILAR, M.C.M.; LOUREIRO, N.G.; PEREIRA, R.G. *Pseudomonas Aeruginosa*: Freqüência de Resistência a Múltiplos Fármacos e Resistência Cruzada entre Antimicrobianos no Recife/PE. **Revista Brasileira de Terapia Intensiva**. v.19, n.4, 2007.

FRASSON, A.P.Z.; BITTENCOURT, C.F.; HEINZMANN, B.M. Caracterização físico-química e biológica do caule de *Caesalpinia férrea* Mart. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.13, n.1, p.35-39, 2003.

GINDRI, A.L.; SILVA, M.; MARCHI, M.B.; BRUM, L.S.; ATHAYDE, M.L.; HOELZEL, S.C.S.M. Análise fitoquímica qualitativa das cascas e do miolo da raiz de *Urera baccifera* (L.) Gaudich(Urticaceae). **Saúde (Santa Maria)**, v.36, n.2, p.6370, 2010.

GOTTLIEB, O.R.; BORIN, M.R.M. Natural products research in Brasil. *Ciência e Cultura*, v.49, p.315-320, 1997.

GRAZIOSI, G.; RATHINAVELU, R. Uso alternativo potencial de detritos e subprodutos do café. **Organização Internacional do Café**, ago. 2005.

GUERRA, P.M.; NODARI, O.R. **Biodiversidade**: aspectos biológicos, geográficos, legais e éticos. In: Simões, C.M.O. [org.] et al. *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. 6.ed. Porto Alegre: UFRGS; Florianópolis:UFCS, p.13-25, 2001.

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

LIMA, A.R.; BARBOSA, V.C.; SANTOS FILHO, P.R.; GOUVÊA, C.M.C.P. Avaliação in vitro da atividade antioxidante do extrato hidroalcoólico de folhas de bardana. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v.16, n.4, p.531-536, 2006a.

LIMA, I.O.; OLIVEIRA, R.A.G.; LIMA E.O.; FARIAS, N.M.P.; SOUZA, E. L. Atividade antifúngica de óleos essenciais sobre espécies de *Candida*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v.16, n.2, p.197-201, 2006b.

MOREIRA, E.AT., Contribuição para o estudo fitoquímico de *Lobelia hassleri* A. ZAHLB e *Lobelia stellfeldii* R. BRAGA. Comanulaceae. **Tribuna Farmacêutica**, V.47, n° 1, p. 13-39, 1979.

OBRADOVIC D.; SCHULZ, M.; OATEY, M. Addition of natural tannins to enhance the quality of red wine. **Australian & New Zealand Grapegrower & Winemaker**. n.493, p. 52-54, 2005.

RIO, R.G.W. **Métodos de controle químico de amostras de própolis**. 1996. Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 1996.

SANDABE, U.K.; ONYEYILI, P.A.; CHIBUZO, G.A. Phytochemical screening and effect of aqueous extract of *Ficus sycomorus* L. (Moraceae) stem bark on muscular activity in laboratory animals. **Journal of Ethnopharmacology**. v.103 p.481–483, 2006.

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

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

VIEIRA, OM.C.; SANTOS, M.H; SILVA, G.A.; SIQUEIRA, A.M. Atividade antimicrobiana de *Struthanthus vulgaris* (erva-de-passarinho). **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v.15, n.2, p. 149-154, 2005.

WAGNER, H.; BLADT, S. **Plant drug analysis - A thin layer chromatography atlas**. 1.ed. Berlim: Springer, 384p., 1984.

WHO, World Health Organization. **Quality control methods for medicinal plant materials**. WHO Library: Geneva. p.1-115, 1998.

WOLLGAST, J.; ANKLAN, E. Polyphenols in chocolate: is there a contribution to human health? **Food Research International**, n.33, p.449-459, 2000.

3.3 MANUSCRITO 3

Avaliação da atividade anti-inflamatória e isolamento de diosmetina e hesperitina de *Pithecoctenium echinatum* (Jacq.) Baill (Bignoniaceae)

Rosana Casoti¹, Mario Ferreira², Rafael Noal Moresco¹, Sergio Luiz Dalmora¹, Roberto G.S. Berlinck², Melânia Palermo Manfron¹

¹ Universidade Federal de Santa Maria (UFSM) – PPGCF. Santa Maria. Rio Grande do Sul.

² Universidade de São Paulo (USP) – Instituto de Química de São Carlos. São Paulo.

Universidade Federal de Santa Maria, Laboratório de Farmacognosia (LABINFITO), caixa postal 5091, CEP 97105-900, Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brasil e-mail: rocasoti@hotmail.com

RESUMO

A partir do extrato hidroetanólico 70% (EB) das sementes de *P. echinatum* foi realizado o isolamento e a identificação de dois flavonoides diosmetina e hesperitina, agliconas flavona e flavanona, respectivamente. Estes flavonoides foram isolados de *P. echinatum* pela primeira vez. Os compostos foram determinados e analisados por CLAE/MS e RMN e seus espectros comparados com a literatura. A atividade anti-inflamatória do (EB) foi avaliada pelo método da indução da inflamação por cilindros de algodão, e realizadas dosagens séricas dos ratos submetidos ao bioensaio, nos quais foram administrados, por via oral, 300mg/kg/dia do extrato bruto por 6 dias consecutivos e em comparação com nimesulida (5mg/kg/dia) e controle negativo (propilenoglicol 20% v/v). Os resultados obtidos mostraram que o extrato bruto de *P. echinatum* apresentou inibição da inflamação significativa de $24,7 \pm 3,5\%$, semelhante à inibição obtida pelo grupo de animais tratados com nimesulida de $21,4 \pm 6,5\%$, em relação ao grupo controle. Os parâmetros hematológicos mostraram que houve aumento no número de leucócitos e diminuição no volume corpuscular médio (VCM), enquanto que AST, ALT e creatinina não apresentaram diferença significativa no uso do extrato de *P. echinatum*, quando comparados com o grupo controle propilenoglicol. Portanto, os resultados demonstraram que *Pithecoctenium echinatum* possui atividade anti-inflamatória, possivelmente devido a presença de hesperitina e diosmetina. Além disso, não foram observados sinais de hepatotoxicidade e nefrotoxicidade nas condições experimentais testadas.

Palavras-chave: *P. echinatum*. Bignoniaceae. Granuloma. AST. ALT. Creatinina. Hesperitina. Diosmetina.

1. INTRODUÇÃO

P. echinatum pertence à família Bignoniaceae, espécie nativa do Brasil, largamente dispersa na América tropical, desde o México até Argentina (SANDWICH; HUNT, 1974). Possui sinonímia *Pithecoctenium crucigerum* (L.) A.H. Gentry e *Amphilophilum crucigerum* (L.) L. G. Lohmann (LOHMANN, 2006). É uma trepadeira lenhosa, com frutos secos deiscentes, de cor castanha, possuindo sementes aladas de coloração branca-prateada (SANDWICH; HUNT, 1974; POOL, 2007). É denominada popularmente de pente-de-macaco e utilizada nos tratamentos de inflamações, reumatismo, infecções cutâneas, dor de cabeça, como depurativo do sangue e calmante (FRANCO; FONTANA, 2005).

No estudo químico realizado com o extrato metanólico dos caules *P. echinatum*, foram isolados os glicosídeos iridoides teviridosídeo, ipolamiídeo e estrictolosídeo (VON POSER et al., 2000). Já Martin e colaboradores (2007) isolaram quatro glicosídeos iridoides: teviridosídeo, ciclopropanoil teviridosídeo, hidroxibenzoil teviridosídeo e vaniloil teviridosídeo, os quais apresentaram potencial antioxidante frente a DPPH por bioautografia.

Desta forma, considerando que a *P. echinatum* apresenta atividades biológicas *in vitro*, como antioxidante, e por ser utilizada popularmente para o tratamento de diferentes doenças, faz-se necessário o desenvolvimento de estudos adicionais relacionados à investigação de outras atividades biológicas bem como análises complementares. Neste contexto, este estudo teve por objetivo realizar o isolamento de compostos químicos oriundos do extrato bruto das sementes de *P. echinatum*, bem como verificar, no extrato bruto, a atividade anti-inflamatória e efeitos toxicológicos através de parâmetros farmacológicos e bioquímicos.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Equipamentos

Cromatografia em camada delgada comparativa (CCDC) e Cromatografia em coluna (CC)

As análises foram feitas em placas de sílica gel 60 com indicador de fluorescência UV254 da Fluka. As revelações foram efetuadas com irradiações UV de 254nm e 360nm, e exposição ao reagente fofosmolíbldico. A cromatografia em coluna foi feita usando 10g de sílica C₁₈, modo reverso.

Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada com PDA-MS

As análises das frações obtidas após o fracionamento em CC foram analisadas por cromatografia líquida acoplada a detectores de arranjos de diodos e espectrômetro de massas (LC – PDA – MS). O sistema é composto por um cromatógrafo líquido de alta eficiência (Separation module - Waters® 2695), acoplados aos detectores Photodiode Array Detector (Waters® 2996), Micromass ZQ (Waters®).

Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

As separadas preparativas foram feitas em cromatografia de alta eficiência acoplada a um detector de ultravioleta, composto por uma bomba gradiente quaternário (Pump controller, Waters® 600) e um detector UV (Dual λ Absorbance Detector, Waters® 2487).

Coluna e método utilizados na Cromatografia líquida de alta eficiência

No LC – PDA – MS, foi utilizada coluna de fase reversa ODS-SP 5 μ m, 4,6x250 mm (Science INC), utilizando um gradiente de H₂O/MeOH/MeCN/CH₃OOH-90/5/5/0,1 a H₂O/MeOH/MeCN/CH₃OOH-0/50/50/0,1 em 40 minutos. Nas separações preparativas foi utilizada coluna de fase reversa ODS-SP 5 μ m, Utilizando um gradiente de H₂O/MeOH/MeCN/CH₃OOH-44/28/28/0,1 a H₂O/MeOH/MeCN/CH₃OOH-20/40/40/0,1 em 15 minutos.

Concentração das amostras (frações)

Foram feitas sob pressão reduzida, usando evaporadores Yamato BM42 e sistema de centrifuga à vácuo ThermoSavant, SpeedVac®Plus SC210A.

Ressonância Magnética Nuclear de 1H e 13C (RMN de 1H e 13C)

Os espectros de RMN foram obtidos em equipamento Bruker DRX (9,4 T), operado a 400,35MHz na frequência do hidrogênio e a 100,10 MHz na frequência do carbono.

2.2 Animais

Ratos machos Wistar pesando entre 170-200g foram mantidos em temperatura (23 ± 2 °C) e umidade (55 ± 10 %) no Biotério do Departamento de Farmácia Industrial da UFSM, onde receberam alimento e água *ad libitum*, com ciclo de claro e escuro de 12 horas. Todos os procedimentos foram realizados de acordo com recomendações do Comitê Internacional de cuidados dos animais e de acordo com os regulamentos nacionais para a experimentação animal.

2.3 Material vegetal

Pithecoctenium echinatum foi coletada no município de Santa Maria no Estado do Rio Grande do Sul a 29°41'02"S e 53°48'25" W. O material foi identificado pelo biólogo Gilberto Dolejal Zanetti, e uma exsicata está depositada sob registro 12872 SMDB, no herbário no Departamento de Biologia da UFSM

2.4 Extração e isolamento

As sementes de *P. echinatum* foram colhidas, no mês de março de 2010 e submetidas à secagem em estufa com ar circulante, à temperatura de 40°C e após, moídas em moinho de facas, maceradas em solução hidroetanólica 70%. O extrato bruto foi liofilizado e 20g deste extrato foi diluído em 100 mL de água, particionado por meio de funil de separação em frações de duas polaridades crescentes com os solventes hexano e diclorometano (DCM) como mostra a figura 1 a seguir.

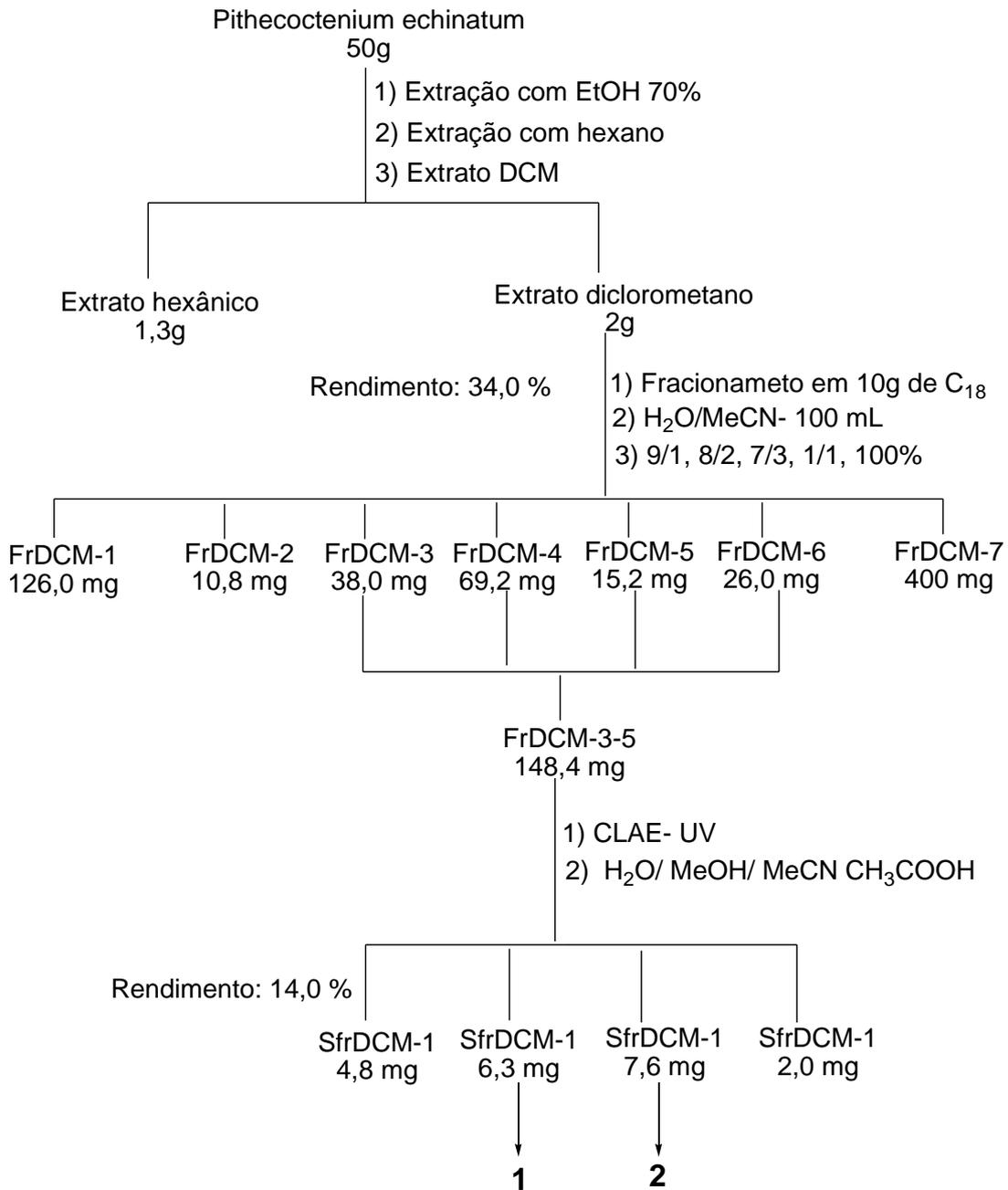


Figura 1 - Fracionamento do extrato diclorometano.

2.5 Teste de indução de tecido granulomatoso

A avaliação da atividade anti-inflamatória do extrato *P. echinatum* foi realizado pelo método da indução da inflamação por cilindros de algodão, proposto por Germano e colaboradores (1993). Três grupos de 6 animais foram distribuídos aleatoriamente e colocados em gaiolas individuais: grupo referência (nimesulida - 5mg/kg/dia), controle negativo (propilenoglicol 20% - v/v) e grupo teste (extrato de *P. echinatum* - 300mg/kg/dia em propilenoglicol 20%). O tratamento foi realizado por

via oral, por gavagem, durante seis dias, com administração de 1,5 ml dividido em 3 doses diárias de 0,5 ml em intervalos de 4 horas.

Para implantação dos cilindros de algodão em condições assépticas, os animais foram anestesiados e por incisão longitudinal dorsal foi implantado, por via subcutânea, um cilindro de algodão branco estéril (40 mg) na região central dorsal de cada animal. Os cilindros de algodão foram previamente cortados, envoltos em alumínio e esterilizados em autoclave a 121°C por 15 minutos. Imediatamente antes da implantação, foram imersos em ampicilina 30%.

No sétimo dia, os animais foram sacrificados e os granulomas removidos por dissecação e secos em estufa a 60°C por 24 horas, determinando seus pesos brutos por meio de uma balança analítica. O peso do granuloma foi calculado pela diferença entre os pesos inicial e final e expresso em gramas.

2.6 Parâmetros bioquímicos de toxicidade

No 7º dia do teste do granuloma, foram coletados 3 mL de sangue através de punção cardíaca dos animais dos grupos teste, controle positivo e controle negativo, para avaliação de parâmetros bioquímicos.

Foram realizados estudos de série vermelha (eritograma) e contagem de plaquetas e leucócitos. Estas determinações foram realizadas no analisador celular COBAS ARGOS 50® - ROCHE. Os esfregaços sanguíneos foram analisados em microscópio Olympus.

Uma parte do sangue foi centrifugada à 2800 rpm por 15 minutos para a obtenção do soro, o qual foi utilizado para a análise bioquímica de aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT) e creatinina. Essas dosagens foram realizadas através dos métodos comercialmente disponíveis no sistema automatizado Cobas MIRA® (Roche Diagnostics, Basel, Suíça).

2.7 Análise estatística

Os resultados dos experimentos biológicos foram analisados por meio *software GraphPrism5.0* utilizando análise de variância ANOVA, comparando as médias pelo teste t *Student* ($p < 0,05$).

3. RESULTADOS E DISCUSSÕES

3.1 Identificação das substâncias isoladas a partir da fração DCM

O extrato diclorometano foi fracionado de acordo com o fluxograma da figura 1 resultando no isolamento dos composto 1 e 2, com rendimento a partir da obtenção fração DCM de 0,32% e 0,38%, respectivamente.

3.2.1 Identificação da substância 1 (diosmetina)

O composto 1 (figura 2) foi isolado como sólido amorfo e o espectro de RMN de ^1H (tabela 1) registrou sinais de dois anéis aromáticos, um trissubstituído apresentando sinais em δ_{H} 7,55 (*dd*; 1H; 8,6 e 2,2 Hz), δ_{H} 7,43 (*d*; 1H; 2,2 Hz) e δ_{H} 7,09 (*d*; 1H; 8,6 Hz), e outro tetrasubstituído apresentando sinais em δ_{H} 6,47 (*d*; 1H; 2,0 Hz) e δ_{H} 6,20 (*d*; 1H; 2,0 Hz). Foi possível observar também a presença de um hidrogênio ligado a carbono sp^2 em δ_{H} 6,76 (*s*), de uma metoxila em δ_{H} 3,80 (*s*; 3H) e de hidrogênios de hidroxila em δ_{H} 12,94 e 9,50 (*s*).

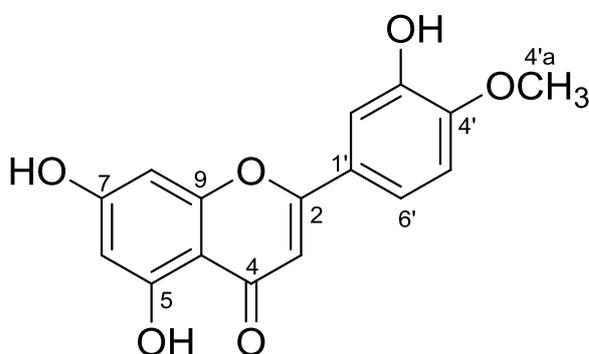


Figura 2 - Estrutura da diosmetina.

O espectro de RMN de ^{13}C (Tabela 1) confirmou a presença do anel aromático tetrasubstituído δ_{C} (164,6; 161,9; 157,7; 104,0; 99,3, 94,3) e do anel aromático trissubstituído δ_{C} (151,6; 147,2; 123,4; 119,1; 113,4; 112,6). Foi verificado também a presença de dois carbonos sp^2 em δ_{C} (164,0; δ_{C} 104,0), da metoxila em δ_{C} 56,2 e uma carbonila de cetona em δ_{C} 182,1.

O padrão de substituição para os anéis aromáticos e o hidrogênio ligado ao carbono sp^2 em δ_{H} 6,76 (*s*) observados no espectro de RMN de ^1H , juntos com os sinais dos carbonos sp^2 δ_{C} (164,0; 104,0) e da carbonila δ_{C} 182,1 observados no

espectro de RMN de ^{13}C , sugerem um anel de pirona condensado com o anel aromático tetrasubstituído com o anel aromático trissubstituído ligado ao anel da pirona na posição 2, indicando que a molécula seja uma flavona. Os hidrogênios foram correlacionados aos seus átomos de carbono via $g\text{HSQC}$ ($^1J_{\text{CH}}$) (Tabela 1).

Com o espectro de massas obtido pelo LC-MS no modo positivo foi possível observar a presença do íon em m/z 301 ($[\text{M}+\text{H}]$), sendo possível determinar a fórmula molecular como $\text{C}_{16}\text{H}_{12}\text{O}_5$. Análises desses dados e comparações com os da literatura (PINSON *et al.*, 2011) permitiram a identificação do composto 1 como sendo a diosmetina.

Tabela 1 - Dados de RMN (δ) ^1H (400MHz) e ^{13}C (100 MHz) correlacionados via gHSQC ($^1J_{\text{CH}}$) do composto 1 em DMSO- d_6 e do isolado na literatura em DMSO- d_6

Nº	δ_{C} de 1 (Isolado)	δ_{C} de 1 (Literatura)	δ_{H} de 1 (Isolado)	δ_{H} 1 (Literatura)
1	-	-	-	-
2	164,6	164,3	-	-
3	104,0	103,5	6,76 s	6,76 s
4	182,1	181,7	-	-
5	161,9	161,5	-	-
6	99,3	98,9	6,47 d (2,0 Hz)	6,49 s
7	164,6	163,6	-	-
8	94,3	94,0	6,20 d (2,0 Hz)	6,22 s
9	157,7	157,4	-	-
10	104,1	103,8	-	-
1'	123,4	123,0	-	-
2'	113,4	112,9	7,42 d (2,2 Hz)	7,44 br s
3'	147,2	146,8	-	-
4'	151,6	151,2	-	-
4'a	56,2	55,8	3,80 s	3,88 s
5'	112,6	112,2	7,09 d (8,6 Hz)	7,11 d (8,5 Hz)
6'	119,1	118,8	7,55 dd (8,6 e 2,2 Hz)	7,56 d (8,5 Hz)
OH	-	-	12,94 s	12,94 s
OH	-	-	9,50 s	9,56 s

3.2.2 Identificação da substância 2 (hesperitina)

O composto 2 (Figura 3) apresentou espectros de RMN de ^1H e ^{13}C (Tabela 2) com o mesmo perfil do composto 1, sendo que a principal diferença observada foi a ausência do sinal de hidrogênio em δ_{H} 6,20 (s) e de dois carbonos sp^2 δ_{C} (164,0; 104,0), referentes a dupla ligação e a presença de três sinais de hidrogênios em δ_{H} 5,43 (dd; 1H; 3,0 e 12,4 Hz), δ_{H} 3,21 (dd; 1H; 12,4 e 17,7 Hz), δ_{H} 2,70 (dd; 1H; 3,0 e 7,7 Hz) e de dois carbonos em δ_{C} (46,0; 78,0), o que sugere não haver uma dupla ligação nos carbonos 2 e 3.

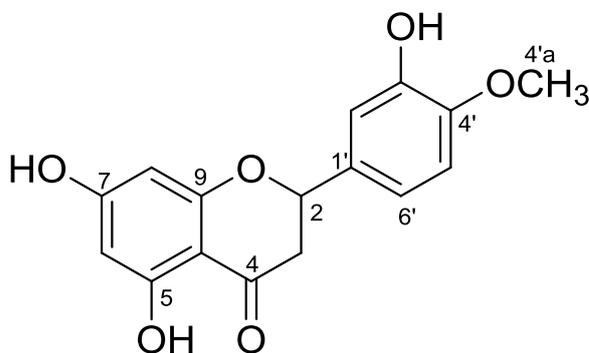


Figura 3 - Estrutura da hesperitina

Com o espectro de massas obtido pelo LC-MS no modo positivo foi possível observar a presença do íon em m/z 303 ($[\text{M}+\text{H}]$), sendo possível determinar a fórmula molecular como $\text{C}_{16}\text{H}_{14}\text{O}_5$. Comparação (SHEN *et al.*, 1993; WAWER *et al.*, 2001) com dados da literatura confirmou a estrutura do composto 2 como sendo a flavanona hesperitina.

Tabela 2 - Dados de RMN (δ) ^1H (400MHz) e ^{13}C (126 MHz) correlacionados via gHSQC ($^1J_{\text{CH}}$) do composto 2 em DMSO- d_6 e do isolado na literatura em DMSO- d_6

Nº	δ_{C} de 2 (Isolado)	δ_{C} de 2 (Literatura)	δ_{H} de 2 (Isolado)	δ_{H} 2 (Literatura)
1	-	-	-	-
2	78,6	78,6	5,43 <i>dd</i> (3,0 e 12,4Hz)	5,41 <i>dd</i> (3,0 e 12,5Hz)
3	42,5	42,8	3,21 <i>dd</i> (12,4 e 17,7Hz)	3,16 <i>dd</i> (12,2 e 17,1Hz)
3	42,5	42,8	2,70 <i>dd</i> (3,0 e 17,7Hz)	2,72 <i>dd</i> (3,0 e 17,1 Hz)
4	196,6	195,5	-	-
5	163,9	164,0	-	-
6	96,2	96,4	5,87 <i>d</i> (2,0 Hz)	5,89 <i>d</i> (2,1Hz)
7	167,1	166,9	-	-
8	95,4	95,4	5,88 <i>d</i> (2,0 Hz)	5,90 <i>d</i> (2,1Hz)
9	163,2	162,9	-	-
10	102,2	102,2	-	-
1'	131,6	131,3	-	-
2'	114,5	113,6	6,93 <i>d</i> (8,3 Hz)	6,93 <i>d</i> (8,5 Hz)
3'	146,9	146,6	-	-
4'	148,3	147,9	-	-
4'a	56,1	54,0	3,77 <i>s</i>	3,77 <i>s</i>
5'	112,1	111,5	6,91 <i>d</i> (2,1 Hz)	6,92 <i>d</i> (1,9 Hz)
6'	118,1	117,7	6, 87 <i>dd</i> (8,3 e 2,1 Hz)	6,86 <i>dd</i> (8,3 e 1,9 Hz)
OH	-	-	12,94 <i>s</i>	12,10 <i>s</i>
OH	-	-	9,50 <i>s</i>	-

3.2 Atividade anti-inflamatória e parâmetros bioquímicos de toxicidade

O modelo de granuloma em ratos tem sido usado para avaliar a atividade anti-inflamatória na reação inflamatória crônica (SPECTOR, 1969). Este modelo avalia a fase transudativa e proliferativa da inflamação crônica. Substâncias anti-inflamatórias, tais como AINEs interferem no processo de formação de granuloma, suprimindo a infiltração inicial de neutrófilos no granuloma (BAILEY, 1982).

Após seis dias consecutivos de administração oral de *P. echinatum*, os resultados obtidos, a partir dos cálculos do peso do granuloma seco, mostraram uma inibição significativa de $(24,7 \pm 3,5)\%$, que é similar estatisticamente com a inibição obtida pelo grupo de animais tratados com nimesulida de $(21,4 \pm 6,5)\%$ (referência), quando comparados ao grupo tratados com propilenoglicol 20% (controle negativo), como mostrado na Figura 4.

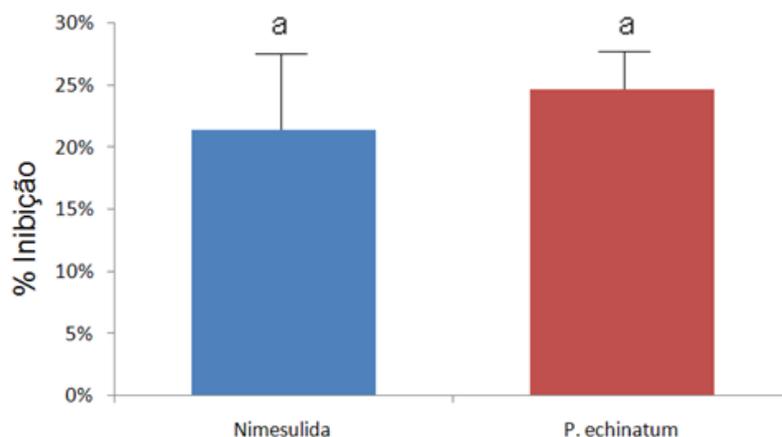


Figura 4 – Atividade anti-inflamatória do extrato bruto de *P. echinatum*

Efeitos da administração oral de *P. echinatum* 300 mg/kg em ratos (n=6) comparados com nimesulida 5mg/kg durante 6 dias, na formação do tecido granulomatoso em relação ao grupo controle. Os valores foram submetidos a análise estatística teste *t Student* ($p < 0,05$).

A atividade anti-inflamatória observada pode estar associada às substâncias isoladas diosmetina e hesperitina.

López-Posadas e colaboradores (2008) realizaram estudo (*in vitro*) do efeito da diosmetina e hesperitina (50 μ M) sobre a inibição de citocinas (TNF- α e IL-2) e a expressão COX-2 induzida pela citocina concanavalina A (50 μ g/ml) por meio de cultura de esplenócitos. Os resultados mostraram que diosmetina inibiu totalmente a COX-2 e as citocinas, mas hesperitina inibiu apenas as citocinas em torno de 50%.

Já em estudos de modelo inflamatório de pata de rato induzido por carragenina, a hesperitina mostrou significativa inibição da inflamação, quando administrada por via intraperitoneal, mas mostrou-se inativa ou pouco eficiente quando administrada por via oral (RIBEIRO *et al*, 2008). O que corrobora o estudo realizado por Freedman e Merrit (1963), no qual foi utilizando 45 mg/kg/dia hesperitina em ratos para modelo de graduloma, mostrando-se ativa contra resposta inflamatória, quando administrada intraperitonealmente, mas inativa por via oral.

Labrid (1994) constatou que a associação de 90% diosmina mais 10% hesperidina possuía ação anti-inflamatória por inibir a formação de edema perivascular em ratos. Como a ação anti-inflamatória da diosmina é associada ao seu metabólito diosmetina (VILLA *et al*, 1992), podemos inferir que o mesmo ocorre com hesperidina e hesperitina.

Os estudos de série vermelha (eritrograma), contagem de plaquetas e leucócitos, além de dosagens bioquímicas foram indicadas na Tabela 3.

Tabela 3 - Parâmetros hematológicos e bioquímicos obtidos do soro de ratos Wistar, tratados com 300mg/kg/dia, via oral, após 6 dias.

Parâmetros	Grupos tratados (n=6)		
	Propilenoglicol	Nimesulida	<i>P. echinatum</i>
	$\bar{X} \pm DP$	$\bar{X} \pm DP$	$\bar{X} \pm DP$
Eritrócitos ($10^3/\mu\text{L}$)	6,73 \pm 0,57 ^a	7,02 \pm 0,21 ^a	7,14 \pm 0,57 ^a
Hemoglobina (g/dL)	12,33 \pm 0,48 ^a	12,78 \pm 0,29 ^a	12,48 \pm 0,84 ^a
Hematócrito (%)	38,50 \pm 3,13 ^a	40,45 \pm 1,19 ^a	39,63 \pm 3,58 ^a
H.C.M (pg)	18,45 \pm 1,69 ^a	18,23 \pm 0,50 ^a	17,70 \pm 0,64 ^a
C.H.C.M (%)	32,20 \pm 2,73 ^a	31,62 \pm 0,41 ^a	31,68 \pm 0,96 ^a
V.C.M (fl)	57,14 \pm 0,29 ^a	57,68 \pm 1,28 ^a	55,60 \pm 1,93 ^b
R.D.W (%)	13,37 \pm 1,28 ^{ab}	13,97 \pm 0,67 ^a	12,33 \pm 0,86 ^b
Leucócitos ($10^3/\mu\text{L}$)	12,77 \pm 1,62 ^b	15,15 \pm 2,70 ^b	18,72 \pm 1,34 ^a
Plaquetas ($10^3/\mu\text{L}$)	1,21 \pm 0,13 ^b	1,38 \pm 0,14 ^a	1,09 \pm 0,06 ^b
AST (U/L)	149,33 \pm 49,38 ^a	130,17 \pm 14,26 ^a	160,80 \pm 37,80 ^a
ALT (U/L)	53,00 \pm 14,59 ^a	55,50 \pm 8,76 ^a	57,60 \pm 13,79 ^a
Creatinina (mg/dL)	0,22 \pm 0,06 ^a	0,19 \pm 0,09 ^a	0,19 \pm 0,04 ^a

Letras comparam as médias entre os grupos em cada variável (na horizontal)

Médias seguidas de letra minúscula diferente diferem significativamente ($p < 0,05$) pelo Teste *t Student* Média e desvio padrão ($\bar{X} \pm DP$)

Os parâmetros hematológicos, dos ratos submetidos ao ensaio de indução do granuloma, mostraram que o extrato aquoso de *P. echinatum* interfere tanto na série vermelha quanto na branca, quando comparado com o controle (propilenoglicol).

Os efeitos observados da droga sobre diferentes elementos do sangue sugerem uma influência no sistema hematopoiético, haja vista que houve leucocitose e redução do VCM. O estudo imunomodulador realizado por Raphael e Kuttan (2003) em compostos triterpenóides, mostrou que esse metabólito pode influenciar no aumento da celularidade da medula óssea e contagem total de leucócitos, sugerindo efeito sobre o sistema hematopoiético como imunomodulador.

Já na análise dos parâmetros de função hepática e renal, AST/ALT e creatinina, não foi detectada alteração significativa, quando comparado ao controle (propilenoglicol), o que permite afirmar que o uso do extrato bruto das sementes de *P. echinatum* não causa danos hepáticos ou lesão tecidual, nem comprometimento da função renal nos animais, na dose testada durante 6 dias.

As transaminases são enzimas que estão amplamente distribuídas nos tecidos, predominando AST, no fígado, coração, músculo cardíaco, músculo estriado, rim e pâncreas, e ALT no fígado, rim e coração. A AST está presente no citosol e na mitocôndria dos hepatócitos (MILLER; GONÇALVES, 1999). O aumento da atividade de AST e ALT no soro é geralmente considerado como um sensível indicador de dano hepático, que podem ser decorrentes da ruptura dos hepatócitos, resultantes de lesões estruturais associadas à necrose; de indução de enzimas; das alterações na permeabilidade da membrana celular ou isquemia hepatocelular (FERREIRA NETO *et al.*, 1978; DUNCAN; PRASSE, 1982; MEYER *et al.*, 1995).

A creatinina é utilizada especialmente como um indicador de função renal. O aumento das concentrações plasmáticas de creatinina fornece evidência de sobrecarga renal, insuficiência renal aguda ou catabolismo protéico aumentado (ADEBAYO *et al.*, 2003).

4. CONCLUSÃO

Os resultados demonstraram que *Pithecoctenium echinatum* possui atividade anti-inflamatória, possivelmente devido a presença de hesperitina e diometina, os quais foram isolados a partir do extrato bruto, o que vem corroborar sua utilização etnomedicinal. Além disso, não foram observados sinais de hepatotoxicidade e nefrotoxicidade nas condições experimentais testadas.

5. AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Antonio Gilberto Ferreira, pela supervisão de RMN ^1H e ^{13}C realizados no Departamento de Química da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar) – São Paulo.

6. REFERÊNCIAS

ADEBAYO, J. O.; YAKUBU, M. T.; EGWIM, E. C.; OWOYELE, V. B.; ENAIBE, B. U. Effect of ethanolic extract of *Khaya senegalensis* on some biochemical parameters of rat kidney. **Journal of Ethnopharmacology**, v.88, p. 69-72, 2003.

BAILEY, P. J. Biochemical study of the cotton pellets granuloma in rats. **Biochemical Pharmacology**. v.31, p. 1213-1218, 1982.

DUNCAN, J.R.; PRASSE, K.W. **Patologia clínica veterinária**. São Paulo: Guanabara Koogan, 217p. 1982.

FRANCO, Ivacir João; FONTANA, Vilson Luiz. **Ervas e plantas: A medicina do simples**. 10 ed. rev. 208p. 2005.

FERREIRA-NETO, J.M.; VIANA, E.S. **Patologia clínica veterinária**. Belo Horizonte: Rabelo Brasil, 279p. 1978.

GERMANO, P. M. L.; MIGUEL, M.; MIGUEL, O.; GERMANO, M. I. S. Prevenção e controle das toxinfecções de origem alimentar. **Revista Higiene Alimentar**, v.7, n.27, p.6-11, 1993.

LOHMANN, L. G. Untangling the phylogeny of neotropical lianas (Bignoniaceae, Bignoniaceae). **American Journal of Botany**, v.93, n.2, p.304–318, 2006.

LOPEZ-POSADAS, R.; BALLESTER, I.; ABADIA-MOLINA, A. C.; SUAREZ, M. D.; ZARZUELO, A.; MARTINEZ-AUGUSTIN, O.; MEDINA, F. S. Effect of flavonoids on rat splenocytes, a structure–activity relationship study. **Biochemical Pharmacology**, v.76, p. 495– 506, 2008.

MARTIN, F.; HAY, A.E.; CORNO, L.; GUPTA, M.P.; HOSTETTMANN, K. Iridoid glycosides from the stems of *Pithecoctenium crucigerum* (Bignoniaceae). **Phytochemistry**. n.68 p.1307-1311, 2007.

MEYER, D.J.; COLES, E.H.; RICH, L. J. **Medicina de laboratório veterinário: interpretação e diagnóstico**. São Paulo: Roca, 308 p. 1995.

MILLER, O.; GONÇALVES, R.R. **Laboratório para o clínico**. 8 ed. São Paulo: Editora Atheneu, p.607. 1999.

POOL, Amy. **A revision of the genus Pithecoctenium (Bignoniaceae)**. *Annals of the Missouri Botanical Garden*. Article, v. 94, l.3, p.622-642, 2007.

RAPHAEL, T. J.; KUTTAN, G. Effect of naturally occurring triterpenoids glycyrrhizic acid, ursolic acid, oleanolic acid and nomilin on the immune system. **Phytomedicine**. v.10, p.483–489, 2003.

RIBEIRO, I. A.; ROCHA, J.; SEPODES, B.; MOTA-FILIPPE, H.; RIBEIRO, M.H. Effect of naringin enzymatic hydrolysis towards naringenin on the anti-inflammatory activity of both compounds. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**. p.52–53, 2008.

SANDWITH, N.Y; HUNT. D.R. **Flora Catarinense**. I parte: As plantas. Fascículo: Bign. Itajaí, 1974.

SPECTOR , W.G. The granulomatous inflammation exudates. **International Review of Experimental Pathology**. v. 8, p.1-55, 1969.

VILLA, P.; COVAA, D.; FRANCESCOB L.; GUAITANIB, A.; PALLADINI, G.; PEREGO, R. Protective effect of diosmetin on in vitro cell membrane damage and oxidative stress in cultured rat hepatocytes. **Toxicology**, v.13 p.179-189, 1992.

VON POSER, G.L.; SCHRIPEMA, J.; HENRIQUES, A.T.; JENSEN, S.R.; The distribution of Iridoids in Bignoniaceae. **Biochemical Systematics and Ecology**. v.28, p.351-356, 2000.

WAWER, I.; ZIELINSKA, A. ¹³C CP/MAS NMR studies of flavonoids. **Magnetic Resonance in Chemistry**. v.39, p. 374–380. 2001.

4. DISCUSSÃO GERAL

A placentação parietal apresentada em *Pithecoctenium echinatum* é uma característica anatômica relevante da espécie, uma vez que na família Bignoniaceae algumas espécies possuem placentação intermediária entre axial e parietal, como por exemplo, *Tecoma stans* e *Tabebuia ochraceae* (BITTENCOURT JR., 1995; COSTA, 2003; RENÒ *et al.*, 2007).

O rudimento seminal (óvulo) anátropo, unitegumentado e tenuinucelado observado nesta espécie foi o mesmo previsto por Corner (1976) para Bignoniaceae. O anel nectarífero com presença de tricomas é uma das características que diferencia esta espécie das demais do gênero *Pithecoctenium* (RIVERA, 2000).

A presença de células pétreas no mesocarpo externo, esclerificação do parênquima mesocárpico, associado à desidratação do pericarpo, são responsáveis pelo seu enrijecimento, tendo como consequência a deiscência do pericarpo maduro.

A deiscência loculicida de *P. echinatum* também pode ser observada em *Tecoma stans* (RENÒ *et al.*, 2007), ou seja, o tecido de abscisão está localizado dorsiventralmente desde a base até o ápice do pericarpo (BARROSO *et al.*, 1999).

Segundo Barroso e colaboradores (1999), para classificar um táxon como Bignoniaceae e tribo Bignonieae, o fruto deve apresentar características como pericarpo mais longo que largo e com réplum, sementes com ala contornando o núcleo seminífero, bilobadas no ápice e com eixo hipocótilo-radícula curto, características estas observadas em *P. echinatum*, como também a importante presença do endosperma remanescente, sobre o qual há uma discussão na literatura de estar ou não presente em Bignoniaceae (CRONQUIST, 1981; SAMPAIO *et al.*, 2007).

As células contendo compostos fenólicos do endotélio, juntamente com as células sem reserva nutritiva do endosperma remanescente constituem o envoltório membranáceo do embrião de *P. echinatum*. De acordo com Costa (1995) a presença dessa estrutura membranácea nas sementes é comum entre as espécies desta família, cuja função sugerida é impedimento do deslocamento de nutrientes; criação de espaço de ar, auxílio à flutuabilidade; controle do desenvolvimento dos embriões e germinação de sementes (SOUZA *et al.*, 2005; SAMPAIO *et al.*, 2007). A

presença de compostos fenólicos no endotélio parece estar relacionada à proteção contra predadores e microorganismos, aumento de dureza do tegumento e atribuição de cor à semente (BELTRATI; PAOLI, 2006).

O embrião de *P. echinatum* é reto, contínuo, transverso-oblongo, características as quais são descritas para Bignoniaceae (BARROSO *et al.*, 1999).

A presença de estruturas de coloração amarelada, compostas por feixes de cristais em forma de agulha dispostos de maneira concêntrica, ocorrem na região ovariana e pericarpo de *P. echinatum*. Estruturas semelhantes foram encontradas em *Anthurium gracile* e *Anthurium minarum*, inferindo-as como cristais de natureza flavonoídica, diosmina (MANTOVANI *et al.*, 2010).

O potencial antioxidante do extrato bruto foi de 18,11%, mostrando-se menos eficiente quando comparada com *Arctium lappa*, 90,79% (LIMA *et al.*, 2006). A fração acetato apresenta atividade antioxidante semelhante ao ácido ascórbico na concentração de 200 µg/ml. Esta maior atividade possivelmente é devido aos polifenóis e flavonoides.

P. aeruginosa apresentou sensibilidade ao EB e frações com exceção da fração butánolica. Embora essa sensibilidade tenha sido baixa para EB e fração DCM, para as frações hexânica e acetato foi moderada. As demais bactérias não apresentam sensibilidade a *P. echinatum*.

Djipa e colaboradores (2000), sugerem que a atividade antimicrobiana de *Syzygium jambus* esteja relacionada com a alta quantidade de taninos, pois com a eliminação destes, esta propriedade foi suprimida. Quanto a atividade antifúngica, observamos que *A. fumigatus* não foi sensível e *C. albicans* foi a que apresentou uma melhor sensibilidade, sendo mais sensível (128 µg/ml) na fração DCM. Já a alga *P. zopfii* responsável por afecções em animais e no homem (BEXIGA *et al.*, 2003) apresentou baixa sensibilidade com exceção para fração acetato que foi moderada (256 µg/ml).

A atividade antimicrobiana observada pode ser atribuída também aos óleos voláteis presentes em *P. echinatum*, uma vez que esta substância, segundo Lima e colaboradores (2006b), estão relacionadas a diversas funções necessárias à sobrevivência vegetal, exercendo papel fundamental na defesa contra microorganismos. Cientificamente é atribuído a cerca de 60% dos óleos essenciais a propriedades antifúngicas e 35% exibem propriedades antibacterianas (BHAVANANI; BALLOW, 1992).

P. echinatum inibuiu o processo inflamatório (24,7%), sendo similar a nimesulida (21,4%). Substâncias anti-inflamatórias, tais como AINEs interferem no processo de formação de granuloma, suprimindo a infiltração inicial de neutrófilos (BAILEY, 1982). Esta atividade pode estar associada às substâncias isoladas diosmetina e hesperitina, pois López-Posadas e colaboradores (2008) avaliando o efeito das mesmas sobre inibição de citocinas (TNF- α e IL-2) e a expressão COX-2, observaram que diosmetina inibiu totalmente a COX-2 e as citocinas, enquanto que hesperitina inibiu citocinas em torno de 50%.

Em modelo inflamatório de pata de rato induzido por carragenina, a hesperitina mostrou significativa inibição da inflamação, via intraperitoneal e inativa por via oral (RIBEIRO *et al.*, 2008), corroborando Freedman e Merrit (1963), que utilizou 45 mg/kg/dia hesperitina em modelo de granuloma, obtendo o mesmo resultado.

A associação de diosmina (90%) e hesperidina (10%) inibe a formação de edema perivascular em ratos (LABRID, 1994). Como a ação anti-inflamatória da diosmina é associada ao seu metabólito diosmetina (VILLA *et al.*, 1992), inferimos que o mesmo ocorre com hesperidina e hesperitina. Diosmetina por não ser uma substância difundida na natureza, comercialmente disponível e apresentar além de atividade anti-inflamatória, atividade antioxidante e anticancerígenas (LABRID, 1994; PINZON *et al.*, 2011), torna *P. echinatum* uma planta muito valiosa como medicinal.

Outra importância da presença de diosmetina e hesperitina nas sementes desta espécie é pelo fato de já haver uma associação medicamentosa de diosmina 450mg e hesperidina 50mg com nome comercial de Diosmin[®] e Daflon[®] utilizados para microcirculação devido suas propriedades venotônica e vasculoprotetora (RAMELET *et al.*, 2005; PRMECUM, 2012). Desta forma, pente-de-macaco vem a ser uma fonte medicamentosa alternativa.

Os parâmetros hematológicos mostram que o EB de *P. echinatum* interfere tanto na série vermelha quanto na branca, porque houve leucocitose e redução do VCM. Estes efeitos sobre diferentes elementos do sangue sugerem uma influência dos metabólitos secundários no sistema hematopoiético, que segundo Raphael e Kuttan (2003) podem ter ação imunomoduladora por influenciar no aumento da celularidade da medula óssea e na contagem total de leucócitos.

Já na análise dos parâmetros de função hepática e renal, AST/ALT e creatinina, não foi detectada alteração significativa sugerindo que o uso do extrato

bruto das sementes de *P. echinatum* não causa danos hepáticos ou lesão tecidual, nem comprometimento da função renal.

As transaminases são enzimas que estão amplamente distribuídas nos tecidos, predominando AST, no fígado, coração, músculo cardíaco, músculo estriado, rim e pâncreas, e ALT no fígado, rim e coração. A AST está presente no citosol e na mitocôndria dos hepatócitos (MILLER; GONÇALVES, 1999). O aumento da atividade de AST e ALT no soro é geralmente considerado como um sensível indicador de dano hepático, que podem ser decorrentes da ruptura dos hepatócitos, resultantes de lesões estruturais associadas à necrose; de indução de enzimas; das alterações na permeabilidade da membrana celular ou isquemia hepatocelular (FERREIRA NETO *et al.*, 1978; DUNCAN; PRASSE, 1982; MEYER *et al.*, 1995).

A creatinina é utilizada especialmente como um indicador de função renal. O aumento das concentrações plasmáticas de creatinina fornece evidência de sobrecarga renal, insuficiência renal aguda ou catabolismo protéico aumentado (ADEBAYO *et al.*, 2003).

5. CONCLUSÕES

- A presença de tricomas no anel nectarífero diferencia *P. echinatum* das demais espécies do gênero.
- A placentação parietal de *P. echinatum* é uma característica relevante, pois em Bignoniaceae há presença de placentação intermediária entre axial e parietal.
- As sementes de *P. echinatum* são exalbuminosas com presença de endosperma remanescente.
- Os parâmetros físico-químicos estabelecidos para *P. echinatum* possibilita controle de qualidade da droga dessa espécie.
- *P. echinatum* possui atividade antioxidante, antimicrobiana e anti-inflamatória.
- Os flavonoides hesperitina e diosmetina foram isolados da semente de *P. echinatum*.
- *P. echinatum* é promissora como fitoterápico sendo necessário o desenvolvimento de mais pesquisas, uma vez que na credibilidade popular estas sementes tem valor medicinal.

6. REFERENCIAS

- ADEBAYO, J. O.; YAKUBU, M. T.; EGWIM, E. C.; OWOYELE, V. B.; ENAIBE, B. U. Effect of ethanolic extract of *Khaya senegalensis* on some biochemical parameters of rat kidney. **Journal of Ethnopharmacology**, v.88, p. 69-72, 2003.
- AHERNE, S. A.; O'BRIEN, N. M. Dietary flavonols: chemistry, food content, and metabolism. **Nutrition**. New York, v. 18, n. 1, p. 75-81, 2002.
- AITHAL, G. P.; DAY, C.P. Nonsteroidal Anti-inflammatory Drug-induced Hepatotoxicity. **Clinics in Liver Disease**. v.11, l. 3, p. 563-575, 2007.
- AKUNYILI, D.N.; HOUGHTON, P.J.; RAMAN, A. Antimicrobial activities of the stem bark of *Kigelia pinnata*. **Journal of Ethnopharmacology**. v.35, n.2, p.173-177, 1991.
- ALCERITO, T.; BARBO, F.E.; NEGRI, G.; SANTOS, D.Y.A.C.; MEDA, C.I.; YOUNG, M. C. M.; CHAVEZ, D.; BLATT, C.T.T. Foliar epicuticular wax of *Arrabidaea brachypoda*: flavonoids and antifungal activity. **Biochemical Systematics and Ecology** v.30. p.677–683, 2002.
- ANDROUTSOPOULOS, V.P.; WILSHER, N.; ARROO, R.R.; POTTER, G. Bioactivation of the phytoestrogen diosmetin by CYP1 cytochromes P450. **Cancer Letters**, v. 274, n.1, p.54-60, 2009.
- ANVISA 2000. **Resolução RDC 17, de 24 de fevereiro de 2000**. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/2000/17_00rdc.htm. Acesso em 30/04/2010
- ARUOMA, O.I.,. Methodological considerations for characterizing potential antioxidant actions of bioactive components in plant foods. **Mutation Research** 523–524, 9–20, 2003.
- ASCENÇÃO, L. **Métodos histoquímicos em vegetais**. Viçosa: UFV. 22p. 2004.
- ATOUI, A. K.; MANSOURI, A.; BOSKOU, G.; KEFALAS, P. **Food Chemistry**., 89, 27; 2005.
- BABIOR, B.M. Phagocytes and oxidative stress. **American Journal of Medicine**, v. 109, p. 33–44, 2000.
- BAILEY, P. J. Biochemical study of the cotton pellets granuloma in rats. **Biochemical Pharmacology**. v.31, p. 1213-1218, 1982.
- BALDO, D. C.; NEHME, C.J.; VILEGAS, W. **Avaliação da atividade antioxidante do extrato etanólico do caule e das folhas *Serjania* sp. (Sapindaceae)**. USP-Araraquara, 2008.
- BARREIRO, E. J.; FRAGA, C. B. M. **Química Medicinal: As bases moleculares da ação dos fármacos**. Porto Alegre: Artmed, p. 53-81, 2001.

BARROSO, G.M.; MORIM, M.P.; PEIXOTO, A.L.; ICHASO, C.L.F. **Frutos e sementes: morfologia aplicada à sistemática de dicotiledôneas**. Viçosa: UFV, 441p. 1999.

BAUTISTA, L.E. Inflammation, endothelial dysfunction, and the risk of high blood pressure: epidemiologic and biological evidence. **Journal Human Hypertension**, v.17, n.4, p. 223-230, 2003.

BELTRATI, C.M; PAOLI, A.A. **Semente**. In: APPEZZATO-DA-GLORIA, B.; CARMELLO-GUERREIRO, S.M. Anatomia vegetal. 2.ed. Viçosa: Ed. UFV, 2006.

BENNET, RN; WALLSGROVE, RM. Secondary metabolites in plant defence mechanisms. **New Phytology**, v.127, p.617-633. 1994.

BHAVANANI SM, BALLOW CH. New agents for Gram-positive bacteria. **Current Opinion in Microbiology**. v.13, p. 528-534,1992.

BIRT, D. F.; HENDRICH, S.; WANG, W. Dietary agents in cancer prevention: flavonoides and isoflavonoids. **Pharmacology Therapeutics**. v. 90, p. 157-177, 2001

BITTENCOURT Jr., N.S. Vascularização floral de *Tabebuia ochracea* (Cham.) Standley (Bignoniaceae). **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v.18, n.2, p.143-155, 1995.

BOOMINATHAN, R.; PARIMALADEVI, B.; MANDAL, S.C.; GHOSHAL, S.K. Anti-inflammatory evaluation of *Ionidium suffruticosam* Ging. in rats. **Journal of Ethnopharmacology**. v.91, p. 367–370, 2004.

BOOTHE, D.M. The patogenesis and pharmacologic control of inflammation. **Veterinary Medicine**, v.84, n.7, p.856-866, 1989.

BORSA, A.; KOHAYAGAWA, A.; BORETTI, L.P.;SAITO, M.E.; KUIBIDA K. Níveis séricos de enzimas de função hepática em frangos de corte de criação industrial clinicamente saudáveis. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. v.58, n.4, p.675-677, 2006.

BRANDÃO, A. **Botânica: Introdução à taxonomia vegetal**. 5 ed. São Paulo: Ed. Nacional. 1979.

BRANDÃO, M. G. **Plantas medicinais e fitoterapia**. Belo Horizonte: Universidade Federal de Minas Gerais, 2003

BRASIL. Resolução n. 48, de 16 de março de 2004. Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos. **Lex: Coletânea de Legislação e Jurisprudência**, São Paulo, 1. Trim. de 2004. Legislação Federal e Marginalia.

BRUNE K, HINZ B. Selective cyclooxygenase-2 inhibitors: similarities and differences. **Scandinavian Journal of Rheumatology**. v.33, p.1-6, 2004.

CAO, Y. Endogenous angiogenesis inhibitors and their therapeutic implications. **International Journal of Biochemistry & Cell Biology**. v. 33, p. 357-369, 2001.

CASTRO, L.O.; CHENALLE, V.M. **Plantas Medicinais, condimentares e Aromáticas: descrição e cultivo**. Guaíba: Agropecuária. 196p. 1995.

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, pp.99-105, 1998.

CERVI, A.C.; PACIORNIK, E.F.; VIEIRA, R.F.; MARQUES, L.C. Espécies vegetais de um remanescente de floresta de araucária (Curitiba, Brasil): Estudo preliminar I. **Acta Biológica Paranaense**, Curitiba, v.18, p.73-114, 1989.

CHATTOPADHYAY, D.; ARUNACHALAM, G.; MANDAL, A.B.; SUR, T.K.; MANDAL, S.C.; BHATTACHARYA, S.K. Antimicrobial and anti-inflammatory activity of folklore: *Mallotus peltatus* leaf extract. **Journal de Ethnopharmacology**.v.82, p. 229-237, 2002.

CHEVILLE, N.F. **Introdução à patologia veterinária**. São Paulo: Manole, Cap.5. p.301-342,1994.

CHOI, C.W.; KIM, S.C.; HWANG, S.S.; CHOI, B.K.; AHN, H.J.; LEE, M.Y.; PARK, S.H.; KIM, S.K. Antioxidant activity and free radical scavenging capacity between Korean medicinal plants and flavonoids by assay-guided comparison. **Plant Science**, v. 163, p. 1161-1168, 2002.

CHOUDHURY, S.; DATTA, S.; TALUKDAR, A.D.; CHOUDHURY, M.D. Phytochemistry of the Family Bignoniaceae - A Review. **Assam University Journal of Science & Technology: Ciências Biológicas e Ambientais**.v.7, n.1, p.145-150, 2011.

CIOLINO, H.P.; WANG, T.T.Y.; YEH, G.C. Diosmin and diosmetin are agonists of the aryl hydrocarbon receptor that differentially affect cytochrome P450 1A1 activity. **Cancer Research**, v.58, p.2754-2760, 1998

CORNER, E.J.H. **The seed of dicotyledons**. Cambridge University Press, London. 1976.

COSTA, M.E. **Morfo-anatomia da semente e da plântula de *Tabebuia serratifolia* (Vahl) Nicholson (Bignoniaceae)**. Dissertação de mestrado, Universidade Federal do Paraná, Curitiba. 1995

COSTA, M.E. **Morfoanatomia e desenvolvimento do fruto, semente e plântula de *Tabebuia ochracea* (Chamisso) Standley (Bignoniaceae)**. Rio Claro, 2003.

109p. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) - Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2003.

COSTANTINO L.; RAIMONDI, L.; PIRISINO, R.; BRUNETTI, T.; PESSOTTO, P.; GIANNESI, F.; LINS, A.P.; BARLOCCO, D.; ANTOLINI, L.; EL-ABADY, S. Isolation and pharmacological activities of the *Tecoma stans* alkaloids. **IL Farmaco**. n.58. p.781-785, 2003.

CRONQUIST, A. **An integrated system of classification of flowering plants**. Columbia University Press, New York. 1981.

DAVIS, R.; BROGDEN, R.N; Nimesulide. An update of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties, and therapeutic efficacy.Review. **Journal of Drugs**. v.48,n.3, p.431-454, 1994.

DJIPA, C.D.; DELMEE, M.; QUENTIN-LECLERCQ, J. Antimicrobial Activity of bark extracts of *Syzygium jambos* (Myrtaceae). **Journal of Ethnopharmacology**, v.71, p.307-313, 2000

DI STASI, L. C. **Plantas medicinais**. Arte e ciência - um guia de estudo interdisciplinar. São Paulo: Editora UNESP, 1996.

DORETTO, J.S.; SILVA, M.A.M.L.; LAGOS, M.S. Determinação dos valores de referência para uréia e creatinina séricas em eqüinos. **Boletim de Medicina Veterinária**, v.3, n.3, p.67-71, 2007.

DUNCAN, J.R.; PRASSE, K.W. **Patologia clínica veterinária**. São Paulo: Guanabara Koogan,.217p. 1982.

DURIGON, J.; CANTO-DOROW, T.S; EISINGER, S.M. Composição florística de trepadeiras ocorrentes em bordas de fragmentos de floresta estacional, Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brasil. Rodriguésia **Revista do Jardim Botânico do Rio de Janeiro**. v.60, n.2, p.415-422, 2009.

DUBOIS, R.W.; MELMED, G.Y.; HENNING, J.M.; LAINE, L. Guidelines for the appropriate use of non-steroidal anti-inflammatory drugs, cyclo-oxygenase-2-specific inhibitors and proton pump inhibitors in patients requiring chronic anti-inflammatory therapy. **Alimentary Pharmacology & Therapeutics**. v.19, p.197–208, 2004.

EMIM, J.A.S.; OLIVEIRA, A.B.;LAPA, A.J. Pharmacological Evaluation of the Anti-inflammatory Activity of a Citrus Bioflavonoid, Hesperidin, and the Isoflavonoids, Durtin and Claussequinone, in Rats and Mice. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v.46, p.118–122, 1994.

ESAU, K.. **Anatomía vegetal**. 3d. Omega: Barcelona, 1985.

FALCÃO, H. S.; LIMA, I.O.; SANTOS, V.L.; DANTAS, H.F.; DINIZ, M. F.F.M.; BARBOSA-FILHO, J. M., BATISTA, L.M. Review of the plants with anti-inflammatory activity studied in Brazil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v.15, n.4, p. 381-391, 2005.

FARIA, J.L. **Patologia Geral: Fundamentos das doenças com aplicações clínicas**. Guanabara: Rio de Janeiro, 298p. 2003

FREEDMAN, L. MERRITT, A.J. **Science**. 25 139 (3552) 344–345. 1963.

FELTROW, C.; AVILA, J. **Manual de Medicina Alternativa para o Profissional**. Tradução de Patrícia Josephini Voeux. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan,. 743p. 2000.

FERREIRA-NETO, J.M.; VIANA, E.S. **Patologia clínica veterinária**. Belo Horizonte: Rabelo Brasil, 279p. 1978.

FLOWER, R.J.; PERRETTI, M. Controlling inflammation: a fat chance?. **Journal of Experimental Medicine**. v. 201, n.5, p.671-674, 2005.

FRANCO, Ivacir João; FONTANA, Vilson Luiz. **Ervas e plantas: A medicina do simples**. 10 ed. rev. 208p. 2005.

FRIESENECKER, B.; TSAI, A. G.; INTAGLIETTA, M. Cellular basis of inflammation, edema and the activity of Daflon 500 mg. **International journal of microcirculation: clinical and experimental**, v. 15, p. 17-21, 1995.

GAW, A.; COWAN, R.A.; O'REILLY, D.S.J. **Bioquímica Clínica**. 2 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p.50-51, 2001.

GENTRY, A.H., **Bignoniaceae. Part I (Crescentieae and Tourretieae). Flora neotropica**. Monogr.25. The New York Botanical Garden: New York. 1980.

GERMANO, P. M. L.; MIGUEL, M.; MIGUEL, O.; GERMANO, M. I. S. Prevenção e controle das toxinfecções de origem alimentar. **Revista Higiene Alimentar**, v.7, n.27, p.6-11,1993.

GHISELLI, A.; SERAFINI, M.; NATELLA, F.; SCACCINI, C. Total antioxidant capacity as a tool to assess redox status: critical view and experimental data. **Free Radical. Biology and Medicine**. v.29, n.11, p.1106-1114, 2000.

GÓES, A. C. A. M. et al. Análise histológica da cicatrização da anastomose colônica, em ratos, sob ação de enema de Aroeira-do-sertão (*Myracrodruon urundeuva* fr. all.) a 10%. **Acta Cirúrgica Brasileira**. São Paulo, v. 20, n. 2, 2005.

GOTTLIEB, O.R.; BORIN, M.R.M.B. Biodiversity: modelling angiosperms as networks. **Phytochemistry**, v.55, pp.559-565, 2000.

GRUNDY, S.M. Inflammation, hypertension, and the metabolic syndrome. **Journal of the American Medical Association**, v.290, n.22, p.3000-2, 2003.

GUERRA, M.P.; NODARI, R.O. **Biodiversidade: aspectos biológicos, geográfico, legais e éticos**. in SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO,

J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. Farmacognosia: da planta ao medicamento. 5 ed. Porto Alegre/Florianópolis: UFRGS/UFSC, 2004.

GUYTON, A.C.; HALL, J.E. **Resistência do organismo a infecção**. In: GUYTON, A.C.; HALL, J.E. Tratado de Fisiologia Médica. 9 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, cap.33. p.397-404, 1997.

HAMMER, K. A.; CARSSON, C.F.; RILEY, T. V. Antimicrobial activity of essential oils and plant extracts. *Journal of Applied Microbiology*, v.89, p.985-990, 1999.

HILARIO, M. O. E.; TERRERI, M. T.; LEN, C. A. Antiinflamatórios não-hormonais: inibidores da ciclooxigenase 2. **Jornal de Pediatria (Rio de Janeiro)**, Porto Alegre, v. 82, n. 5, 2006 .

HSU, Y.L.; KUO, P.L. Diosmetin induces human osteoblastic differentiation through the protein kinase C/p38 and extracellular signal-regulated kinase ½ pathway. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 23, n.6, p.949-960, 2008.

HUERRE, M. R.; GOUNON, P. Inflammation: patterns and new concepts. **Immunological Reviews**. v. 147, n. 7, p. 417-34, 1996.

KERNAN, M.R.; AMARQUAYE, A.; CHEN, J.; CHAN, L.D.F.J.; SESIN, N.; PARKINSON, Z.J.; BARRETT, C.; BALES, YE, M.; STODDART, C.A.; SLOAN, B.; BLANC, P.; LIMBACH, C.; MRISHO S; ROZHON, E.J. Antiviral phenylpropanoid glycosides from the medicinal plant *Markhamia lutea*. **Journal of Natural Products**. v.61, p.564–570, 1998.

KIM, H.P.;SON, K.H.;CHANG, H.W.;KANG, S.S. Anti-inflammatory Plant Flavonoids and Cellular Action Mechanisms. Critical Review. **Journal Pharmacological Sciences**. v.96, p.229-245 , 2004.

KULISIC, T.; KRISKO, A.; DRAGOVIÆ-UZELAC, V.; MILOS, M.; PIFAT, G. The effects of essential oils and aqueous tea infusions of oregano (*Origanum vulgare* L. spp hirtum), thyme (*Thymus vulgaris* L.) and wild thyme (*Thymus serpyllum* L.) on the copper-induced oxidation of human low-density lipoproteins. **International Journal of Food Science and Nutrition**. v. 58, n.2, p. 87-93, 2007.

KUMAR, V.; ABBAS, A.K.; FAUSTO, N.; MITCHELL, R.N. Robbins Patologia Básica. 8ed. Rio de Janeiro: Editora Elsevier, 2008.

LABRID, C. Pharmacologic properties of Daflon 500 mg. **Angiology** v.45, p.524-530,1994.

LANGLEY-EVANS, S.C. Antioxidant potential of green and black tea determined using the ferric reducing power (FRAP) assay. **International Journal of Food Science and Nutrition**. v.51, p.181-188, 2000.

LANDOLFI, R.; MOWER, R.L.; STEINER, M. Modification of platelet function and arachidonic acid metabolism by bioflavonoids. **Biochemical Pharmacology**. v.32, p.1525-1530, 1984.

LIMA, A.R.; BARBOSA, V.C.; SANTOS FILHO, P.R.; GOUVÊA, C.M.C.P. Avaliação in vitro da atividade antioxidante do extrato hidroalcoólico de folhas de bardana. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v.16, n.4, p.531-536, 2006

LOHMANN, L.G. Untangling, the phylogeny of neotropical lianas (Bignoniaceae, Bignoniaceae). **American Journal of Botany**. v.93, n.2, p.304-318, 2006.

LOPEZ-POSADAS, R.; BALLESTER, I.; ABADIA-MOLINA, A. C.; SUAREZ, M. D.; ZARZUELO, A.; MARTINEZ-AUGUSTIN, O.; MEDINA, F. S. Effect of flavonoids on rat splenocytes, a structure–activity relationship study. **Biochemical Pharmacology**, v.76, p. 495– 506, 2008.

MACEDO, M.; FERREIRA, A.R. Plantas hipoglicemiantes utilizadas por comunidades tradicionais na Bacia do Alto Paraguai e Vale do Guaporé, Mato Grosso-Brasil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 14, p. 45-47, 2004.

MANTOVANI, A., FILARTIGA, A.L.D.P.; COELHO, M.A.N. Anatomia comparada da folha e espata de espécies de *Anthurium* (Araceae) ocorrentes na Mata Atlântica. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 33, n.1, p.185-200, 2010.

MARCHAND, L. L. Cancer preventive effects of flavonoides – a review. **Biomedicine & Pharmacotherapy**. v. 56, p.296-301, 2002.

MARTIN, F.; HAY, A.E.; CORNO, L.; GUPTA, M. P.; HOSTETTMANN, K. Iridoid glycosides from the stems of *Pithecoctenium crucigerum* (Bignoniaceae). **Phytochemistry**. v.68 p.1307-1311, 2007

MARTINS, E.R.; CASTRO, D.M.; CASTELLANI, D.C.; DIAS, J.E. **Plantas medicinais**. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 2000.

MATOS, F.J.A. **Introdução à Fitoquímica Experimental**. 2ª ed. Fortaleza: Edições UFC, 141p., 1997.

MENG, J.C.; ZHU, Q.X.; TAN, R.X. New antimicrobial mono and sesquiterpenes from *Soro-seris hookeriana* subsp *erysimoides*. **Planta Medica**, v.66, n.6, p.541-544, 2000.

METCALFE, C. F.; CHALK, L. **Anatomy of the Dicotyledons: Leaves, stem and wood in relation to taxonomy with notes on economic uses**. Oxford: Clarendon Press, v.1, 724p., 1950.

MEYER, D.J.; COLES, E.H.; RICH, L.J. **Medicina de Laboratório Veterinária: interpretação e diagnóstico**. São Paulo: Roca, p.47-61, 1995.

MIGUEL, D. M.; MIGUEL, O. G. **Desenvolvimento de fitoterapia**. São Paulo: Robre, 1999.

MILLER, O.; GONÇALVES, R.R. **Laboratório para o clínico**. 8 ed. São Paulo: Editora Atheneu, p.607. 1999.

MUTOH, M.; TAKAHASHI, M.; FUKUDA, K.; KOMATSU, H.; ENYA, T.; MATSUSHIMA-HIBIYA, Y.; MUTOH, H.; SUGIMURA, T.; WAKABAYASHI, K. Suppression by Flavonoids of Cyclooxygenase-2 Promoter-dependent Transcriptional Activity in Colon Cancer Cells: Structure-Activity Relationship. **Japanese Journal of Cancer Research**, v.91, p.686–691, 2000.

NOURSHARGH, S, HORDIJK, PL, SIXT, M. Breaching multiple barriers: leukocyte motility through venular walls and the interstitium. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**. v. 11, p. 366-378, 2010.

O'BRIEN, J.P. Actinic granuloma: the expanding significance. **International Journal of Dermatology**, v.24, p.473, 1985.

OLAJIDE, O.A. ; MAKINDE, J. M.; AWE, S.O. Effects of the aqueous extract of *Bridelia ferruginea* stem bark on carrageenan-induced oedema and granuloma tissue formation in rats and mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v.66, p.113-117, 1999.

OLIVERA, W. AINEs seguridad y eficacia, calmar o no calmar es el dilema. Novedades em Analgesia. **El Diário Medico**, p.4, 2004.

PANTHONG, A.; KANJANAPOTHI, D.; TAESOTIKUL, T.; PHANKUMMOON, A.; PANTHONG, K.; REUTRAKUL, V. Anti-inflammatory activity of methanolic extracts from *Ventilago harmadiana* Pierre. **Journal of Ethnopharmacology**.v. 91, p.237–242, 2004.

PELZER, L.E.; GUARDIA, T.; JUAREZ, O.A.; GUERREIRO, E. Acute and chronic anti-inflammatory effects of plant flavonoids. **IL Farmaco**. v.53, p. 421-424, 1998.

PIETTA, P.G. Flavonoids as antioxidants. **Journal of Natural Products**, v. 63, p. 1035-1042, 2000.

PINHEIRO, K. Interesse por plantas medicinais é crescente no mundo. **FCIÊNCIA**, Ceará, 21 jan. 2011. Disponível em: < <http://fciencia.funcap.ce.gov.br>>. Acesso em: 01 mar 2012.

PINZON, L.C.; UY, M.M.; SZE, K.H.; WANG, M.; CHU I.K. Isolation and characterization of antimicrobial, anti-inflammatory and chemopreventive flavones from *Premna odorata* Blanco. **Journal of Medicinal Plants Research**, v.5, n.13, p. 2729-2735, 2011.

POOL, Amy. **A revision of the genus Pithecoctenium (Bignoniaceae)**. Annals of the Missouri Botanical Garden. Article. v.94, n.3, p.622-642, 2007.

P.R. VADE MÉCUM. Disponível em < www.prvademecum.com>. Acesso em 02 mar. 2012.

RAMELET, A.A.; BOISSEAU, M.R.; ALLEGRA, C.; NICOLAIDES, A.; JAEGER, K.; CARPENTIER, P.; CAPPELLI, R.; FORCONI, S. Veno-active drugs in the management of chronic venous disease. An international consensus statement: Current medical position, prospective views and final resolution. **Clinical Hemorheology and Microcirculation**, v.33, n.4, p. 309-319, 2005.

RANG, H.P.; DALLE, M.M.; RITTER, J.M. **Farmacologia**. Tradução de Amaury José da Cruz Júnior. 3.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1997.

RAO, M. M.; KINGSTON, D. G. I. Plant Anticancer Agents. XII. Isolation and Structure Elucidation of New Cytotoxic. **Journal of Natural Products**. v.45, n.5, p. 600–604, 1982.

RASO, G. M. Et al. Inhibition of inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 expression by flavonoids in macrophage J774A.1. **Life Sciences**. v.68, p.921-931, 2001.

RAINSFORD, K.D. An analysis from clinico-epidemiological data of the principal adverse events from the cox-2 selective nsaid, nimesulide, with particular reference to hepatic injury. **Inflammopharmacology**.v.6, p. 203-221, 1998.

RAMOS G.P.;APEL, M.,A.;MORAIS, C.B.;CEOLATO, P.C.;SCHAPOVAL E.E.S.;DALL'AGNOL M.; ZUANAZZI J.A.S. *In vivo* and *in vitro* anti-inflammatory activity of red clover *Trifolium pratense* dry extract **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.22, n.1, 2012.

RAPHAEL, T. J.; KUTTAN, G.Effect of naturally occurring triterpenoids glycyrrhizic acid, ursolic acid, oleanolic acid and nomilin on the immune system. **Phytomedicine**. v.10, p.483–489, 2003.

RENÒ, L.R.; MOSQUETA, I.S.; BRACCINI, A.L. Morfo-anatomia do fruto e sementes de amarelinho (*Tecoma stans* (L.) Kunth – Bignoniaceae). **Revista Brasileira de Sementes**. v.29, p.18-30, 2007.

RIBEIRO, I.A.; SEPODES, J.B.; MOTA-FILIFE, H.; RIBEIRO M. H.Effect of naringin enzymatic hydrolysis towards naringenin on the anti-inflammatory activity of both compounds. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic.**, p.13-18, 2008.

RIVERA GL. Nuptial nectary structure of Bignoniaceae of Argentina. **Darwiniana**. v.38, p.227–23, 2000.

ROBBINS, S. A., KUMAR, V.; ABBAS, A. K. **Patologia - Bases Patológicas das Doenças**. 7ed. Ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2006.

ROBERTS II, L. J.; MORROW, J. D. **Analgésico, antipiréticos, agentes anti-inflamatórios e fármacos utilizados no tratamento da gota.** In: HARDMAN, J. G.; LIMBIRD, L. E. (Ed.). Goodman & Gilman: as bases farmacológicas da terapêutica. Rio de Janeiro: McGraw-Hill, 2003

SAMPAIO, D.S.; COSTA, M.E.; PAOLI, A.A.S. Ontogenia da semente de *Tabebuia ochracea* (Cham.) Standl. (Bignoniaceae). **Revista Brasileira de Botânica.** v.30, p.289-302, 2007.

SANDWITH, N.Y; HUNT. D.R. **Flora Catarinense.** I parte: As plantas. Fascículo: Bign. Itajaí, 1974.

SANTOS, R.I. **Metabolismo Básico e origem dos metabólitos secundários** in SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. Farmacognosia: da planta ao medicamento. 5 ed. Porto Alegre/Florianópolis: UFRGS/UFSC, 2004.

SCHNEIDER, E.P.M; LONDERO, I.W.B. Flora Ilustrada do Rio Grande do Sul – Fascículo VI: Bignoniaceae. **Boletim do Instituto de Ciências Naturais.** v.25, p. 7-37,1965.

SEIFRIED, H.E.; ANDERSON, D.E.; FISHER, E.I.; MILNER, J.A. A review of the interaction among dietary antioxidants and reactive oxygen species. **Journal of Nutritional Biochemistry.** v. 18, n. 9, p.567-579, 2007.

SELLOUM L, BOURICHE H, TIGRINE C, BOUDOUKHA C Anti-inflammatory effect of rutin on rat paw oedema, and on neutrophils chemotaxis and degranulation. **Experimental and Toxicologic Pathology,** v.54, p.313-318, 2003.

SIES, H.; STAHL, W.; SEVANIAN, A. Nutritional, dietary and postprandial oxidative stress. **Journal of Nutrition.** v.135, n.5, p.969-972, 2005.

SIMON, L.S. Actions and toxicity of nonsteroidal anti-inflammatory drugs. **Current Opinion Rheumatology.** v.7, n.3, p.159-166, 1995.

SILVA, M..R. A brief history of inflammation. In: VANE, J. R.; FERREIRA, S.H. **Handbook of Experimental Pharmacology.** New York: Springer-Verlang, v.50, n.1, p.6-25, 1978.

SILVA, R.R. **Modelos de indução de hiperlipidemia e avaliação do efeito hipolipidêmico de flavonoides e corantes naturais em frangos de corte.** Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, 139p., 2001.

SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento.** 5 ed. Porto Alegre/Florianópolis: UFRGS/UFSC, 2004.

SKAPER, S.D.; FABRIS, M.; FERRARI, V. Quercetin protects cutaneous tissue-associated cell types including sensory neurons from oxidative stress induced by

glutathione depletion: cooperative effects of ascorbic acid. **Free Radical Biology & Medicine**. v 22, p. 669-678, 1997.

SOUSA, C.M.M.; SILVA, H.R.; VIEIRA-JR., G.M.; AYRES, M.C.C.; COSTA, C.L.S.; ARAÚJO, D.S.; CAVALCANTE, L.C.D.; BARROS, E.D.S.; ARAÚJO, P.B.M.; BRANDÃO, M.S.; CHAVES M.H. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. **Química Nova**, vol.30, n.2, pp. 351-355, 2007.

SOUZA, L.A, IWAZAKI, M.C.; MOSCHETA, I. Morphology of the pericarp and seed of *Tabebuia chrysotricha* (Mart. ex DC.) Standl. (Bignoniaceae). **Brazilian Archives of Biology and Technology**. v.48, p.407-418, 2005.

STEINERT, J.; KHALAF, H.; RIMPLER, M. HPLC separation and determination of nafta [2,3-b] furan-4,9-diones and related compounds in extracts of *Tabebuia avellanedae* (Bignoniaceae). **Journal of Chromatography**. n.693, p.281-287, 1995.

TASAKA, A.C. **Antiflamatórios não esteroideais**. In: SPINOSA, H.S.; GÓRNIK, S.L., BERNARDI, M.M. Farmacologia aplicada a Medicina Veterinária, 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, Cap. 21, p.225-250, 2002.

THABREW, M.I., HUGHES, R.D., MCFARLANE, I.G. Antioxidant activity of *Osbeckia aspera*. **Phytotherapy Research**. v.12, p. 288–290, 1998.

TRAVESSA, G.; BIANCHI, C.; DA CAS, R.; ABRAHA, I.; MENNITI-IPPOLITO, F.; VENEGONI, M. Cohort study of hepatotoxicity associated with nimesulide and other non-steroidal anti-inflammatory drugs. **British Medicinal Journal**, v.327, p.901-909, 2004.

TUROLLA, M.S.R., NASCIMENTO, E.S. Informações toxicológicas de alguns fitoterápicos utilizados no Brasil. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**. v. 42, n. 2, abr./jun., 2006.

VANE, J.R., BOTTING, R.M. **A better understanding of anti-inflammatory drugs based on isoforms of cyclooxygenase COX-1 and COX-2**. In: Advances in prostaglandin, thromboxane and leukotriene research. v.23, edited by B. Samuelsson et al Raven Press Ltd. New York. p.340-347, 1995.

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

VIANA, G.S.B. ; BANDEIRA, M.A.M.; MATOS, F.J.A. Analgesic and antiinflammatory effects of chalcones isolated from *Myracrodruon urundeuva* Allemão. **Phytomedicine**. v.10, p.189–195, 2003.

VILLA, P.; COVAA, D.; FRANCESCOB L.; GUAITANIB, A.; PALLADINI, G.; PEREGO, R. Protective effect of diosmetin on in vitro cell membrane damage and oxidative stress in cultured rat hepatocytes. **Toxicology**, v.13 p.179-189, 1992.

VON POSER, G.L.; SCHRIPSEMA, J.; HENRIQUES, A.T.; JENSEN, S.R.; The distribution of Iridoids in Bignoniaceae. **Biochemical Systematics and Ecology**. v.28, p.351-356, 2000.

WANGENSTEEN, H., SAMUELSEN, A.B., MALTERUD, K.E. Antioxidant activity from Coriander. **Food Chemistry** . v.88, p.293–297, 2004.

WHO, World Health Organization. Pharmaceuticals Newsletter – **Nimesulide**. Medicines Documentation. Amsterdam, Holland, n.4, 19 p., 2002.

WHO, World Health Organization. **Quality control methods for medicinal plant materials**. WHO Library: Geneva. p.1-115, 1998.

WILLIAMS, G.T.; WILLIAMS, W.J. Granulomatous inflammation a review. **Journal of Clinical Pathology**, v.36, p.323, 1983.

WILLIAMS, M.H.; KREIDER, R.B.; BRANCH, J. D. **Creatina**. 1ed. São Paulo: Manole, 2000.

WU, Y.; ZHOU, C.; SONG, L.; LI, X.; SHI, S.; MO, J.; CHEN, H.; BAI, H.; WU, X.; ZHAO, J.; ZHANG, R.; HAO, X.; SUN, H.; ZHAO, Y. Effect of total phenolics from *Laggera alata* on acute and chronic inflammation models. **Journal of Ethnopharmacology**. v.108, p.243–250, 2006.

ZUANAZZI, J.A.S.; MONTANHA, J.A. **Flavonoides in** SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C.P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. Farmacognosia: da planta ao medicamento. 5ed. Porto Alegre/Florianópolis: UFRGS/UFSC, 2004.

ZUANAZZI, J.A.S.; MAYORGA, P. Fitoprodutos e desenvolvimento econômico. **Química Nova**, v. 33, p. 1421-1428, 2010.