

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

**AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES ANTIMICROBIANA,  
ANTIOXIDANTE E ANTINOCICEPTIVA DAS FOLHAS  
DA *Luehea divaricata* Martius.**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**JULIANE DE BORBA MÜLLER**

Santa Maria, RS, Brasil

2006

**AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES ANTIMICROBIANA,  
ANTIOXIDANTE E ANTINOCICEPTIVA DAS FOLHAS DA  
*Luehea divaricata* Martius.**

**por**

**Juliane de Borba Müller**

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

Orientadora: Prof<sup>fa</sup>. Dra. Melânia Palermo Manfron

Santa Maria, RS, Brasil

2006

**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

**AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES ANTIMICROBIANA,  
ANTIOXIDANTE E ANTINOCICEPTIVA DAS FOLHAS DA  
*Luehea divaricata* Martius.**

elaborada por  
**Juliane de Borba Müller**

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

COMISSÃO EXAMINADORA:

---

**Melânia Palermo Manfron, Dr<sup>a</sup>.**  
(Presidente/Orientadora)

---

**Celso Figueiredo Bittencourt, Dr. (UFSM)**

---

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

Santa Maria, 11 de outubro de 2006.

## AGRADECIMENTOS

A **Deus**, causa primeira de todas as coisas, pelas oportunidades que colocou em meu caminho e por ter povoado minha vida com tantas pessoas maravilhosas.

Aos **meus pais**, Léo Jorge e Tânia Maria, pelo exemplo de luta e dignidade, e por terem dado condições materiais e morais para que eu pudesse alcançar meus objetivos.

As **minhas irmãs** Luciane e Lisiane, pelas risadas e brincadeiras nas horas de descontração.

À **minha vó** Alzira, pelo exemplo de força e coragem, e por sempre me incentivar a prosseguir, mesmo quando tudo parecia dar errado.

À **minha orientadora** Melânia Palermo Manfron, por ter me aceito em seu grupo de pesquisa, pela sua orientação, amizade, dedicação e principalmente pela sua infinita paciência e contribuição em minha formação científica.

Aos **colegas de laboratório**, pois sem vocês esse trabalho não seria possível. Em especial, ao meu colega de mestrado Miguel, que acompanhou minha trajetória, estando presente nos momentos bons e ruins. Ao Rudinei, a Carla e a Vanessa pela disposição de trabalhar e aprender coisas novas, pela amizade e ajuda nos experimentos, por estarem presentes em todas as ocasiões, não medindo esforços para ajudar quando preciso ... não tenho palavras para agradecer.

Aos funcionários do **Departamento de Farmácia Industrial**, aos demais colegas de laboratório e **a todos** aqueles que de alguma maneira contribuíram para a realização desse trabalho, o meu **muito obrigada!**

*Nada do que foi será  
De novo do jeito que já foi  
um dia  
Tudo passa, tudo sempre  
Passará  
A vida vem em ondas,  
Como o mar  
Num indo e vindo  
Infinito.*

*(Lulu Santos / Nelson Motta)*

## RESUMO

Dissertação de Mestrado  
Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas  
Universidade Federal de Santa Maria

### **AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES ANTIMICROBIANA, ANTIOXIDANTE E ANTINOCICEPTIVA DAS FOLHAS DA *Luehea divaricata* Martius**

AUTORA: JULIANE DE BORBA MÜLLER  
ORIENTADORA: MELÂNIA PALERMO MANFRON  
**Data e Local da Defesa: Santa Maria, 11 de outubro de 2006**

A atividade antimicrobiana das folhas da *Luehea divaricata* Martius pelos métodos de difusão em ágar, bioautografia e microdiluição em caldo, foi significativa ( $p < 0,0001$ ) para os microorganismos *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538p), *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 12228), *Escherichia coli* (ATCC 11103), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 10031). Pelos métodos 2,2 – difenil, 1 – picrilhidrazila (DPPH) e  $\beta$  – caroteno – linolenato (BCB), tanto o extrato bruto (EB) como as frações demonstraram atividade antioxidante quando comparados com o padrão quercetina. O EB apresentou ação antinociceptiva com significância de 5% ( $p < 0,0001$ ) pelo método das contorções abdominais induzidas pelo ácido acético 0,8%. Pelo método da formalina não apresentou atividade na Fase Neurogênica, mas ação na Fase Inflamatória.

**Palavras-Chave:** *Luehea divaricata* Martius; Atividades Antimicrobiana, Antioxidante e Antinociceptiva.

## ABSTRACT

Mastership Dissertation  
Post-graduation Program in Pharmaceutical Sciences  
Federal University of Santa Maria

### EVALUATION OF ANTIMICROBIAL, ANTIOXIDANT AND ANTINOCICEPTIVE ACTIVITIES OF LEAVES OF *Luehea divaricata* Martius

AUTHOR: JULIANE DE BORBA MÜLLER  
ADVISER: MELÂNIA PALERMO MANFRON

**Date and local of defense: Santa Maria, October 11th 2006**

The antimicrobial of leaves of *Luehea divaricata* Martius by methods of diffusion in agar, bioautography and microdilution in broth, was significant ( $p < 0.0001$ ) for the microorganisms *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538p), *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 12228), *Escherichia coli* (ATCC 11103), *Klebsiella pneumoniae* (10031). By the methods 2,2 – diphenil, 1 – picrilhidrazil (DPPH) and  $\beta$ -carotene – linolenate (BCB), not only the gross extrate (GE) but also the fractions showed antioxidant activity when compared to the standard quercetin. The GE showed antinociceptive action, with significance of 5% ( $p < 0.0001$ ) by the method of abdominal contorsions induced by the acetic acid 0.8%. By the method of formaline it did not show activity in the neurogenic stage, but in the inflammatory stage.

**Key words:** *Luehea divaricata* Martius; antimicrobial, antioxidant and antinociceptive activities

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - <i>Luehea divaricata</i> Martius (Açoita-cavalo) .....	16
Figura 2 - Folhas da <i>Luehea divaricata</i> Martius .....	19
Figura 3 - Folhas desidratadas da <i>Luehea divaricata</i> Martius .....	20
Figura 4 – Histoquímica das folhas da <i>Luehea divaricata</i> Martius 4A – Monocristal; 4B – Drusas de oxalato de cálcio .....	20
Figura 5 - Núcleo fundamental dos flavonóides e sua numeração .....	22
Figura 6 - Constituintes Químicos Extraídos das Folhas da <i>Luehea divaricata</i> Martius .....	25
Figura 7 - Aferências medulares dos nociceptores: corte transversal da medula espinhal, mostrando as sinapses das fibras C e A $\delta$ nas lâminas I, II, III e V .....	43
Figura 8 - A via espinotalâmica – principal via pela qual a informação da dor é transmitida ao tálamo e ao córtex .....	45
Figura 9 - Protocolo Experimental de Partição Líquido-Líquido e Obtenção das Frações Orgânicas de <i>Luehea divaricata</i> Martius (açoita-cavalo) .....	57
Figura 10 - Fotografia do ensaio microbiológico por Difusão em Ágar .....	72
Figura 11 – Bioautografia das frações do extrato bruto das folhas da <i>Luehea divaricata</i> Martius. 11A – <i>E. coli</i> ; 11B – <i>S. aureus</i> .....	75
Figura 12 – Percentual da atividade antioxidante da substância controle, do extrato bruto e das frações da <i>Luehea divaricata</i> Martius frente ao oxidante DPPH .....	77
Figura 13 – Percentual da atividade antioxidante da substância controle, do extrato bruto e das frações das folhas da açoita-cavalo avaliados pelo método $\beta$ – caroteno – linolenato .....	78
Figura 14 – Efeito da administração do extrato metanólico da <i>Luehea divaricata</i> Martius sobre o comportamento de lambe a pata (em segundos), no teste da formalina. (A) Fase Neurogênica e (B) Fase Inflamatória .....	80



## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Microorganismos utilizados na determinação da Atividade Antimicrobiana da <i>Luehea divaricata</i> Martius .....	51
Tabela 2 – Protocolo do Ensaio Microbiológico por Difusão em Agar .....	62
Tabela 3 – Perfil de suscetibilidade de <i>S. aureus</i> ATCC 6538p ao extrato bruto (EB), as frações da <i>L. divaricata</i> Martius e a benzilpenicilina potássica ...	72
Tabela 4 - Perfil de suscetibilidade de <i>S.epidermidis</i> ATCC 12228 ao extrato bruto (EB), as frações da <i>L. divaricata</i> Martius e ao sulfato de gentamicina .....	73
Tabela 5 - Perfil de suscetibilidade de <i>E. coli</i> ATCC 11103 ao extrato bruto (EB), as frações da <i>L. divaricata</i> Martius e ao cloranfenicol .....	73
Tabela 6 - Perfil de suscetibilidade de <i>K. pneumoniae</i> ATCC 10031 ao extrato bruto (EB), as frações da <i>L. divaricata</i> Martius e ao sulfato de estreptomicina ..	74
Tabela 7 – Perfil de suscetibilidade de <i>S. aureus</i> , <i>E. coli</i> , <i>K.pneumoniae</i> , <i>C. albicans</i> , <i>S. cerevisiae</i> ao extrato bruto e as frações acetato de etila e butanólica da <i>L. divaricata</i> Martius .....	76
Tabela 8 – Atividade Antioxidante pelo método DPPH expresso em percentagem de inibição do extrato bruto e das frações da <i>L. divaricata</i> Martius .....	77
Tabela 9 - Atividade Antioxidante pelo método $\beta$ -caroteno-linolenato expresso em percentagem de inibição do extrato bruto e das frações de <i>L. divaricata</i> Martius .....	78
Tabela 10 – Efeitos da administração do extrato metanólico da <i>Luehea divaricata</i> Martius sobre o número de contorções abdominais induzidas por ácido acético 0,8%, em camundongos .....	79

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

$\delta$  – Deslocamento químico

$\mu\text{g}$  – micrograma

$\mu\text{l}$  – microlitro

AAS – Ácido Acetil Salicílico

ATCC – American Type Culture Collection

BCB -  $\beta$ -caroteno-linolenato

BHI – Brain Heart Infusion

BHT – Butil-hidroxitolueno

BST – Brine Shrimp Test

CBM – Concentração Bactericida Mínima

CCD – Cromatografia em Camada Delgada

CEB – Clone Epidêmico Brasileiro

CIM – Concentração Inibitória Mínima

DAINES – Drogas Antiinflamatórias não-esteroidais

DFI – Departamento de Farmácia Industrial

DMSO – Dimetilsulfóxido

DPPH – 2,2-difenil,1-picrilhidrazila

EA – Extrato Aquoso

EB – Extrato Bruto (extrato metanólico)

EHA – Extrato Hidroalcolico

F. Bras. IV – Farmacopéia Brasileira. 4. ed. 1988

FDA – Food and Drug Administration

Fr. AcOEt – Fração Acetato de Etila

Fr.  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  – Fração Clorofórmica

Fr. Hex – Fração Hexânica

Fr. ButOH – Fração Butanólica

GE – gross extrate

$G_{60} F_{245}$  – gel de sílica G com indicador de fluorescência para  $\lambda$  245

HDFI – Herbário do Departamento de Farmácia Industrial  
IASP – Internacional Association for the Study of Pain  
MeOH - metanol  
ml – mililitros  
NCCLS – National Comitee for Clinical Laboratory Standards  
nm – nanômetro  
OMS – Organização Mundial da Saúde  
q. s. p. – quantidade suficiente para  
Rf – fator de retenção  
SNC – Sistema Nervoso Central  
SNP – Sistema Nervoso Periférico  
UFC – Unidades Formadoras de Colônia  
UI - Unidades Internacionais  
USP – United States Pharmacopeia  
UV – Luz Ultravioleta  
v.i. – Via Intraperitoneal  
v.o. – Via Oral  
v/v – volume/volume  
YNB – Yeast Nitrogen Base

## SUMÁRIO

<b>AGRADECIMENTOS</b> .....	<b>3</b>
<b>RESUMO</b> .....	<b>5</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>6</b>
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	<b>7</b>
<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	<b>8</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS</b> .....	<b>9</b>
<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>14</b>
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	<b>17</b>
<b>2.1 Aspectos gerais</b> .....	<b>17</b>
<b>2.2 Aspectos botânicos</b> .....	<b>18</b>
<b>2.3 Constituintes químicos dos vegetais</b> .....	<b>21</b>
<b>2.4 Sinergismo e antagonismo de princípios ativos</b> .....	<b>25</b>
<b>2.5 Etnofarmacologia e atividades farmacológicas</b> .....	<b>27</b>
2.5.1 Etnofarmacologia .....	27
2.5.2 Atividades farmacológicas .....	28
<b>3 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>49</b>
<b>3.1 Material vegetal</b> .....	<b>49</b>
<b>3.2 Equipamentos e acessórios</b> .....	<b>49</b>
<b>3.3 Solventes e reagentes</b> .....	<b>50</b>
<b>3.4 Substâncias de referência</b> .....	<b>51</b>
<b>3.5 Microorganismos</b> .....	<b>51</b>
<b>3.6 Animais</b> .....	<b>52</b>
<b>3.7 Meios de cultura</b> .....	<b>52</b>
3.7.1 Difusão em ágar .....	52
3.7.2 Bioautografia .....	54
3.7.3 Microdiluição em caldo .....	55
<b>3.8 Preparo do material vegetal, extratos e fracionamento</b> .....	<b>56</b>
<b>3.9 Atividade antimicrobiana</b> .....	<b>58</b>

3.9.1 Difusão em ágar .....	58
3.9.1.1 Preparação das suspensões .....	58
3.9.1.1.1 Suspensão bacteriana .....	58
3.9.1.1.2 Suspensão de fungos .....	58
3.9.1.2 Preparação das placas para o ensaio .....	59
3.9.1.2.1 Camada básica .....	59
3.9.1.2.2 Camada semeada .....	59
3.9.1.3 Preparação das amostras .....	60
3.9.1.3.1 Extrato metanólico e frações .....	60
3.9.1.4 Preparação das soluções padrões .....	60
3.9.1.4.1 Solução padrão de benzilpenicilina potássica .....	60
3.9.1.4.2 Solução padrão de sulfato de gentamicina .....	60
3.9.1.4.3 Solução padrão de cloranfenicol .....	61
3.9.1.4.4 Solução padrão de sulfato de estreptomicina .....	61
3.9.1.4.5 Solução padrão de nistatina .....	61
3.9.1.5 Esquema dos ensaios .....	62
3.9.1.6 Execução do ensaio .....	62
3.9.2 Bioautografia .....	63
3.9.2.1 Suspensões microbianas .....	63
3.9.2.2 Determinação da atividade antimicrobiana .....	63
3.9.3 Microdiluição em caldo .....	64
3.9.3.1 Técnica M-27A do NCCLS (1997) de microdiluição em caldo para avaliação da concentração inibitória mínima (CIM) frente a fungos leveduriformes .....	64
3.9.3.2 Preparação das placas de microdiluição para os testes .....	64
3.9.3.3 Preparação da amostra para a avaliação da atividade antimicrobiana .	65
3.9.3.4 Preparação do inóculo .....	65
3.9.3.5 Inoculação no meio da cultura .....	65
3.9.3.6 Incubação .....	66
3.9.3.7 Leitura do teste .....	66
<b>3.10 Atividade antioxidante .....</b>	<b>66</b>
3.10.1 Determinação da atividade antioxidante pelo método do DPPH .....	66
3.10.2 Determinação da atividade antioxidante pelo método do $\beta$ -Caroteno-Linolenato .....	67

<b>3.11 Atividade antinociceptiva .....</b>	<b>68</b>
3.11.1 Preparação dos reagentes .....	68
3.11.1.1 Solução de ácido acético 0,8% .....	68
3.11.1.2 Solução de indometacina .....	68
3.11.1.3 Solução de morfina .....	69
3.11.1.4 Solução de formalina 1,5% .....	69
<b>3.11.2 Testes comportamentais .....</b>	<b>69</b>
3.11.2.1 Teste das contorções abdominais .....	69
3.11.2.2 Teste da formalina .....	70
<b>3.12 Análise estatística .....</b>	<b>70</b>
<b>4 RESULTADOS .....</b>	<b>71</b>
<b>4.1 Extração e fracionamento .....</b>	<b>71</b>
<b>4.2 Atividade antimicrobiana .....</b>	<b>71</b>
4.2.1 Difusão em ágar .....	71
4.2.2 Bioautografia .....	74
4.2.3 Microdiluição em caldo .....	75
<b>4.3 Atividade antioxidante .....</b>	<b>76</b>
4.3.1 Método DPPH .....	76
4.3.2 Método $\beta$ -caroteno-linolenato .....	77
<b>4.3.3 Atividade antinociceptiva .....</b>	<b>79</b>
4.3.3.1 Teste das contorções abdominais .....	79
4.3.3.2 Teste da formalina .....	80
<b>5 DISCUSSÃO .....</b>	<b>81</b>
<b>6 CONCLUSÃO .....</b>	<b>85</b>
<b>7 REFERÊNCIAS .....</b>	<b>86</b>

## 1 INTRODUÇÃO

O trabalho da natureza e do homem vem definindo espécies com propriedades medicinais ao longo das Eras. No Reino Plantae observa-se uma grande variedade de espécies medicinais empregadas no combate às enfermidades diversas, que durante séculos foram a única fonte de agentes terapêuticos para o homem. Seus diversos usos são resultados do acúmulo secular de conhecimentos empíricos sobre a ação dos vegetais, por diferentes grupos étnicos (JÚNIOR, 1995; SIMÕES et al, 1995; DE MAGALHÃES, 2005; VIEIRA 2005).

No Brasil, além da assimilação dos conhecimentos indígenas, as contribuições trazidas pelos escravos e imigrantes representam papel importante para o surgimento de uma medicina popular rica e original, na qual a utilização de plantas medicinais ocupa lugar de destaque (SIMÕES et al, 1995).

O primeiro estudo sistemático de plantas medicinais foi realizado, cerca de 2.700 anos a.C., durante o Império Shen Nung. Entre as 365 drogas mencionadas no Inventário de Shen Nung, encontram-se espécies, tais como *Ephedra sp.*, *Ricinus communis* além do ópio de *Papaver somniferum*. Espécies estas que fornecem respectivamente efedrina, óleo de rícino e morfina, princípios ativos conhecidos e utilizados até hoje (BALICK e COX, 1997).

Segundo Bruschi e colaboradores (2000), as plantas atuam como fontes de agentes terapêuticos, modelos para novos medicamentos sintéticos ou ainda como material de partida, para a produção semi-sintética de moléculas de alta complexidade, o que justifica os 25 % dos fármacos utilizados na atualidade serem de origem vegetal.

Por outro lado, Di Stasi (1996) e Garcia e colaboradores (2002) estimam que apenas 8 % das espécies vegetais da flora brasileira tenham sido pesquisadas em busca de compostos bioativos; esse valor representa as 1100 espécies da flora nacional que foram avaliadas.

Entre os exemplos de fármacos obtidos a partir de fontes vegetais, destacam-se alguns utilizados, até o presente, e de usos relativamente dispersos pelos continentes, como, por exemplo a aspirina, a codeína, a digitoxina e o eugenol. Além destes, pode-se ainda destacar a podofilotoxina, isolada de *Podophylum peltatum*, que possui dois derivados semi-sintéticos, o etoposide, empregado no tratamento de câncer de testículos e certos tipos como o de pulmão, e o teniposide, que tem emprego no tratamento de leucemia linfoblástica aguda, linfoma não-Hodgkin e neuroblastoma. Também é digno de nota o psolarem, uma cumarina isolada de *Psorelea corylifolia*, que tem emprego no vitiligo (KINGHORN e BALADRIN, 1993).

Uma das descobertas mais significativas são os alcalóides da vinca, vincristina e vinblastina. Estes são utilizados em todo o mundo. A vincristina vem sendo utilizada no tratamento de câncer de pele e condições não cancerosas. Já a vinblastina nos casos de tumor de mama, testículos, pele e linfoma (DAVID e NASCIMENTO, 2004).

O ressurgimento de várias doenças, consideradas extintas, ou restritas a uma determinada área geográfica do planeta, assim como o surgimento de novas linhagens de agentes infecciosos, provocou um aumento nos investimentos feitos à pesquisa de produtos naturais, tornando o mercado de fitomedicamentos com comprovação científica de eficácia clínica, segurança e qualidade, promissor em todo o mundo (CALIXTO, 2005).

Entre as inúmeras espécies vegetais encontradas no território nacional, de interesse medicinal, temos a *Luehea divaricata* Martius (Tiliaceae) (figura 1), conhecida por açoita-cavalo. Essa apresenta diversos usos etnofarmacêuticos na infusão das folhas e no decocto das cascas, tais como antiinflamatório, antianêmico, diurético, asséptico bucal, entre outros (PIO CORRÊA, 1984, ALICE et al, 1995).

Conforme Brasil (1995), o uso popular e mesmo o tradicional não são suficientes para validar eticamente as plantas medicinais como medicamentos eficazes e seguros, e nesse sentido não se diferenciam de qualquer outro medicamento sintético, onde a preconização é fundamentada em evidências experimentais comprobatórias cujo risco a que se expõem aqueles que a utilizam é suplantado pelos benefícios que possam advir.



Segundo Elizabetsky (2006), a seleção de uma espécie vegetal para pesquisa baseada nas alegações de um dado efeito terapêutico em humanos, pode se constituir em um valioso atalho para a descoberta de fármacos. O seu uso tradicional pode ser encarado como uma pré-triagem quanto à utilidade terapêutica.

O conhecimento popular nos mostra que os empregos terapêuticos, às diferentes partes da planta estudada, são muitos e variam de acordo com os grupos étnicos. Segundo Calixto (2000) a tendência observada para a fitoterapia, assim como no passado, é desempenhar um papel cada vez mais importante na assistência à saúde da população. Desta forma, não se pode negar a importância da avaliação dos efeitos terapêuticos dos fitoterápicos. Para avaliar os usos populares da açoita-cavalo e colaborar na geração de novos fitomedicamentos, tivemos como objetivos, neste trabalho, testar as atividades antimicrobiana, antioxidante e antinociceptiva do extrato metanólico e frações desse obtidas das folhas da *Luehea divaricata* Martius.



Figura 1 - *Luehea divaricata* Martius (Açoita-cavalo)

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Aspectos gerais

A *Luehea divaricata* Martius (Tiliaceae), está inserida na ordem Malvales, pertencente à subclasse Rosidae da classe Magnoliaceae de Magnoliophyta. O sul da África, Brasil, Argentina, Uruguai e Paraguai, constituem os principais centros de dispersão da família Tiliaceae, a qual conta com 35 gêneros e 370 espécies das quais cerca de 55 a 60 espécies, distribuídas em 13 gêneros, ocorrem no Brasil (LORENZI, 1988).

Essa espécie é conhecida popularmente como açoita-cavalo, açoita-cavalo miúdo, ibatingui, ivatingui, pau-de-canga, caiboati, esteiveira. É nativa nos estados brasileiros da Bahia, Rio de Janeiro, São Paulo, Minas Gerais, Goiás, Mato Grosso do Sul, Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul (ALICE et al, 1995; LORENZI, 1988).

A açoita-cavalo é uma árvore pioneira em várias formações florestais. Trata-se de uma espécie heliófita, isto é, vegeta preferencialmente em locais de bastante luz e seletiva higrófila, ou seja em solos bastante úmidos. É, sem dúvida, uma espécie característica das florestas aluviais onde pode ser bastante freqüente ou mesmo abundante. Interessante é constatar que é pouco freqüente, rara ou pode faltar completamente nas matas altas e densas, sobretudo em terrenos de inclinação suave e solos profundos, onde a mata é bem desenvolvida. Nos solos rochosos e íngremes no alto das encostas, reaparece a açoita-cavalo com elevada freqüência; demonstrando assim que possui dois ambientes ecológicos distintos para o seu desenvolvimento na floresta primária. Igualmente é muito comum nas matas semidevastadas, nas capoeiras e capoeirões (REITZ et al, 1988).

No Estado do Rio Grande do Sul ocorre em todas as bacias hidrográficas. Apresenta uma dispersão irregular e descontínua, sendo particularmente freqüente ao longo dos rios, terrenos rochosos e íngremes, onde a floresta é mais aberta e nas

capoeiras mais desenvolvidas. Foi observada em todas as regiões fitogeográficas; inclusive no Escudo Rio-Grandense e na Campanha Gaúcha, onde se torna uma das árvores características e emergentes das matas de galeria. Encontrada praticamente desde o nível do mar até 950 metros de altitude no planalto (REITZ et al, 1988, LORENZI, 1992).

Durante o inverno, a *L. divaricata* perde totalmente as folhas, floresce nos meses de dezembro, janeiro e fevereiro, e seus frutos encontram-se maduros de maio à junho (LORENZI, 1988).

A madeira da açoita-cavalo é moderadamente pesada (0,640 g/cm<sup>3</sup>); de cor uniforme, clara, às vezes com tonalidade rósea; superfície sem brilho, lisa ao tato; textura média; sem cheiro, nem gosto distintos. Por ser moderadamente pesada, de boa aparência, com retratibilidade média a baixa e resistência mecânica variando entre a média e baixa, é indicada para confecções de estrutura de móveis. Na construção civil, é recomendada para ripas, molduras, cordões, guarnições, rodapés, etc. Devido a sua boa trabalhabilidade, a madeira desta espécie tem sido aplicada na fabricação de coronhas de armas, formas de sapatos e de outras peças torneadas. Boa para trabalhar, sendo usada para cadeiras, carrocerias, lanças para cavalaria, caixas de piano, cangas e esculturas (REITZ et al, 1988; LORENZI, 1992).

Devido à utilidade, à beleza da madeira e ao valor ornamental, também das flores bem como da árvore inteira, conta-se entre as espécies cujo cultivo merece ser intensificado entre nós (REITZ et al, 1988).

Segundo Reitz e colaboradores (1988) e Lorenzi (1992), a açoita-cavalo é uma das 55 árvores consideradas como mais importantes para o reflorestamento de áreas degradadas, assim como a cabreúva, cedro, coronilha, ipê-roxo, maria-preta, murta, peroba, salseiro, tiambaúva, entre outras.

## **2.2 Aspectos botânicos**

De acordo com Pontiroli (1965), Dimitri (1980), Cunha (1981), Inque e colaboradores (1984), Reitz e colaboradores (1988) e Bortoluzzi e colaboradores (2002), a espécie é uma árvore caducifólia, de até 30m de altura e 80 a 100 cm de diâmetro; com o tronco geralmente tortuoso e nodoso, com base alargada; fuste

comumente curto de 4 a 6m de comprimento. No interior da floresta densa, forma troncos quase retos e bastante altos; casca parda-acinzentada, fibrosa, com gosto adstringente um pouco amargo; ramificação irregular, grossa e tortuosa, formando copa larga, densa e bastante singular, possuindo as seguintes características:

- Folhas (Figura 2): simples, alternas dísticas, oval-elípticas, elípticas ou oblongo-lanceoladas, às vezes rômbricas, de até 15 cm de comprimento e 6,5 cm de largura, com ápice agudo ou acuminado, base assimétrica e margem serrada com dentes regulares a ligeiramente irregulares; nervação palminérvia, com três nervuras principais, face ventral verde-oliva, com raros pêlos estrelados, áspera ao tato, face dorsal densamente pubescente, de cor esbranquiçada ou ferrugínea; folhas distintamente discolores;



Figura 2 - Folhas da *Luehea divaricata* Martius

- Flores: vistosas, rosadas, diclamídeas, pentâmeras, hermafroditas, actinomorfas com 3 a 4 cm de diâmetro, reunidas em inflorescência cimosas axilares ou paniculadas terminais. Cálice com sépalas lanceoladas e tormentosas no dorso. Corola com pétalas livres, de até 2,5 cm de comprimento e 1,5 cm de largura, suborbiculares, barbadas na face interna. Androceu polistêmone, monadelfo, com anteras ditecas de deiscência longitudinal, alternadas com estaminódios reflexos, côncavos, fimbriados no ápice. Gineceu com ovário pentacarpelar, gamocarpelar, pentalocular, densamente pubescente, lóculos polispérmicos, estilete único, pubescente até a porção mediana; estigma subcapitado, levemente pentalobado, glabro;

- Fruto: seco capsular, deiscente na porção apical, oval-oblonga, pentacarpelar, densamente coberto de pêlos dourados; mede cerca de 3 cm de

comprimento; lenhoso, liso e escuro quando maduro;

- Sementes: pequenas, escuras, achatadas, aladas, com ala unilateral;

Segundo Alice e colaboradores (1995) e Bortoluzzi e colaboradores (2002), as folhas da *Luehea divaricata* Martius quando desidratadas apresentam os bordos enrolados sobre a nervura central (Figura 3).



Figura 3 - Folhas desidratadas da *Luehea divaricata* Martius

Ao realizarem a histoquímica da folha, observaram a presença e a disposição de monocristais, drusas de oxalato de cálcio (Figura 4 A - B) e mucilagens.

O padrão da venação, bem como as fibras esclerenquimáticas envolvendo os feixes vasculares nas folhas, a presença de tricomas, drusas e cristais prismáticos servem de auxílio na identificação e diferenciação de outras espécies, sendo estes úteis na sua padronização e controle de qualidade botânico (BORTOLUZZI et al, 2002).

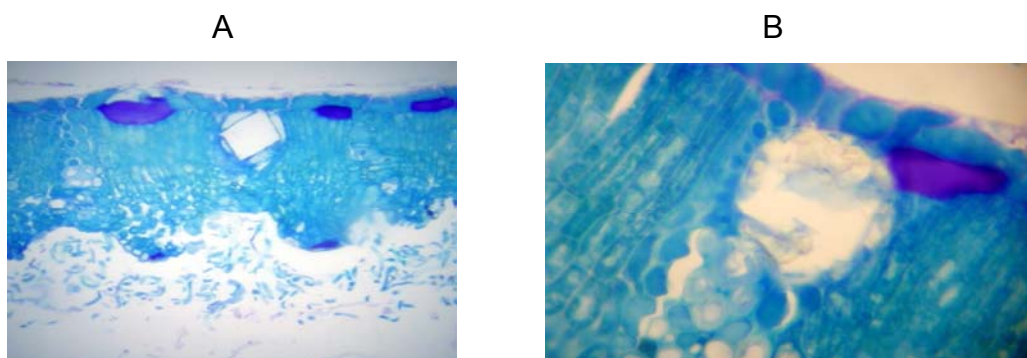


Figura 4 – Histoquímica das folhas da *Luehea divaricata* M. 4A – Monocristal; 4B – Drusas de oxalato de cálcio.

### 2.3 Constituintes químicos dos vegetais

O metabolismo vegetal está condicionado aos processos fotossintéticos e pode ser dividido em metabolismo primário e secundário. Desses processos resultam os metabólitos primários, como os lipídios, as proteínas, os carboidratos e os ácidos nucleicos (OLIVEIRA, 2003).

A maioria dos metabólitos secundários é formada no metabolismo da glicose. A glicose é convertida em moléculas de ácido pirúvico, que podem seguir duas vias diferentes. Na primeira, moléculas de piruvato entram na via do ácido chiquímico para formar todos os metabólitos secundários aromáticos (alcalóides indólicos, quinolínicos, isoquinolínicos; ligninas e lignanas; cumarinas e taninos hidrossolúveis). Na segunda, o piruvato continua sendo oxidado até a formação de moléculas de acetil-coenzima A (acetil-coA). Essas podem seguir três vias diferentes: via do ciclo do ácido cítrico, via do mevalonato e via da condensação do acetato, formando os chamados derivados do acetato. Na via do ciclo do ácido cítrico, serão formados os alcalóides pirrolidínicos, tropânicos, pirrolizidínicos, piperidínicos e quinolizidínicos. A via do mevalonato origina os terpenóides e os esteróis. A combinação de uma unidade do ácido chiquímico, e uma ou mais unidades do acetato ou derivados deste, poderá resultar na produção de antraquinonas, flavonóides e dos taninos condensados (SANTOS, 2001; OLIVEIRA, 2003).

Simões e colaboradores (2004) afirmam que o fracionamento do extrato bruto com solventes de polaridade crescente possibilita inferir as possíveis classes de substâncias extraídas nas diferentes frações de acordo com suas polaridades e solubilidades. O fracionamento começa preferencialmente com o hexano onde são extraídos os lipídios, ceras, pigmentos e furanocumarinas; com o clorofórmio obtém-se antraquinonas livres, bases livres de alcalóides e glicosídeos cardiotônicos; o acetato de etila e butanol extraem flavonóides, cumarinas simples, triterpenos de polaridade elevada, taninos e diversas classes de heterosídeos.

Os constituintes químicos presentes na *Luehea divaricata*, originam-se do mecanismo geral de todos os metabólitos secundários dos vegetais. Segundo Bortoluzzi e colaboradores (2002), ficou fortemente caracterizada, na análise fitoquímica das folhas da *L. divaricata*, a presença de flavonóides, saponinas,

taninos catéquicos e mucilagem. Em menor quantidade estão presentes os alcalóides, óleos fixos, antocianinas, carotenóides, e polissacarídeos. Segundo Alice (1995), antraquinonas livres, antracenosídeos, taninos gálicos, cumarinas e óleos voláteis não estão presentes nas folhas dessa espécie.

Os flavonóides (Figura 5) são compostos fenólicos, cuja síntese não ocorre na espécie humana. 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 (SIMÕES et al, 2004).

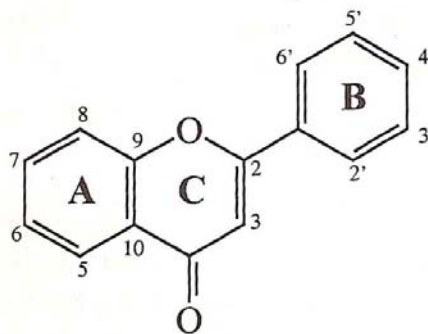


Figura 5 - Núcleo fundamental dos flavonóides e sua numeração.

São conhecidos mais de 4.000 flavonóides, sendo que o número de novas estruturas identificadas praticamente dobrou nos últimos vinte anos. Os flavonóides, nas plantas, apresentam-se, freqüentemente, oxigenados e um grande número ocorre conjugado com açúcares. Como existem em grande quantidade na natureza, a variação de suas estruturas é grande. Esses compostos aromáticos, nos vegetais, desempenham o papel de bloqueadores da radiação ultra-violeta, além de atuarem na pigmentação das espécies. No desenvolvimento de pesquisas científicas, os flavonóides são utilizados como marcadores taxonômicos – substâncias que auxiliam na identificação botânica das plantas. Na ecologia química eles funcionam como indicativos para a polinização por insetos (SIMÕES et al, 2004).

Diversos ensaios *in vivo* e *in vitro* vêm comprovando e determinando a ampla variedade das atividades biológicas dos compostos flavanoídicos. Em seres humanos e animais, os flavonóides apresentam efeitos potenciais como antioxidante, antiinflamatório, protetor cardíaco, analgésico, antialérgico, anti-tumoral, anti-diabético, cicatrizante, entre outros (SIMÕES et al, 2004).

A ação antimicrobiana dos flavonóides, provavelmente, esteja relacionada à capacidade de complexar proteínas extracelulares e solúveis, bem como com estruturas de parede celular bacteriana. Flavonóides mais lipofílicos poderiam atuar provocando o rompimento das membranas microbianas. Delinear um mecanismo de ação para os compostos flavonoídicos não é simples devido aos achados conflitantes: flavonóides com poucos grupos hidroxila nos seus anéis são mais ativos contra microorganismos que aqueles que possuem mais hidroxilas, o que leva a crer que o alvo é a membrana microbiana, uma vez que se acredita que compostos lipofílicos possam romper a estrutura. Todavia, outros autores têm encontrado o efeito oposto: quanto maior a hidroxilação, maior a atividade (CHABOT et al, 1992; SATO et al, 1996).

Os flavonóides podem ser encontrados em maior concentração na uva e na laranja, no brócolis, na cebola e no alho, embora estejam presentes em outras fontes alimentícias. Segundo a literatura, o consumo diário de flavonóides deve ser superior a 500mg. (GAO et al, 1999).

Os compostos fenólicos dentre esses os flavonóides, triterpenos e taninos são substâncias polares, doadoras de elétrons, e portanto excelentes antioxidantes. Muitos flavonóides, como a quercetina, luteonilina e catequinas, são melhores antioxidantes que a vitamina C, vitamina E e  $\beta$ -caroteno em uma mesma concentração molar (Gao et al, 1999).

As saponinas, também presentes nas folhas da açoita-cavalo, são glicosídeos de esteróides ou de terpenos policíclicos, e apresentam característica lipofílica (triterpenos ou esteróides) e hidrofílica (açúcares) (SIMÕES et al, 2004).

As saponinas classificam-se de acordo com a estrutura molecular de sua aglicona. As saponinas triterpênicas são formadas por cinco anéis de seis átomos de carbono; já as saponinas esteroidais possuem três anéis de seis carbono e dois anéis de cinco carbonos (SCHENKEL et al, 2002).

Dentre as propriedades farmacológicas das saponinas, podemos citar a atividade antiinflamatória, hemolítica, antimicrobiana, e antiviral. Muitas propriedades são facilmente detectadas e testadas, porém algumas atividades constatadas, não são empregadas na terapêutica devido aos efeitos tóxicos das saponinas em organismos vivos (SCHENKEL et al, 2002).



As plantas ricas em taninos são empregadas na medicina tradicional, no tratamento de diversas moléstias orgânicas como a diarreia, hipertensão arterial, reumatismo, hemorragia, problemas estomacais e renais, e nos processos inflamatórios (SIMÕES et al, 2004). Segundo De Mello e Santos (2004) esses compostos podem apresentar atividade bactericida, fungicida, moluscida e antiviral.

As atividades farmacológicas dos taninos podem estar relacionadas a habilidade destes compostos em complexar-se com proteínas, polissacarídeos e íons metálicos (Fe, Mn, Cu, Al, Ca) (DE MELLO e SANTOS, 2004). A complexação com proteínas se dá através de interações não-específicas como pontes de hidrogênio e efeitos hidrofóbicos, bem como através de ligações covalentes. Portanto a capacidade de inibir microorganismos pode estar relacionada com a inativação de adesinas, enzimas e proteínas transportadoras do envelope celular (SIMÕES et al, 2004). Os taninos podem ser tóxicos para os fungos filamentosos, leveduras e bactérias (SCALBERT, 1991).

Segundo Tanaka e colaboradores (2003, 2005) o estudo químico da fração clorofórmica do extrato bruto metanólico das folhas resultou no isolamento do ácido  $3\beta$ - $p$ -hidroxibenzoil tormêntico (1), um novo triterpeno com esqueleto básico dos ursenos, e de uma mistura cuja substância majoritária foi o ácido maslínico (2), triterpeno derivado dos oleanos. Posteriormente foi isolado, da fração acetato de etila do extrato bruto das folhas, a vitexina (3), uma flavona C-glicosilada; já o esteróide glicopiranosilsterol (4) foi isolado da fração clorofórmica. O flavonóide epicatequina (5), um flavan-3-ol, foi isolado da fração acetato de etila do extrato bruto metanólico das cascas do caule (Figura 6).

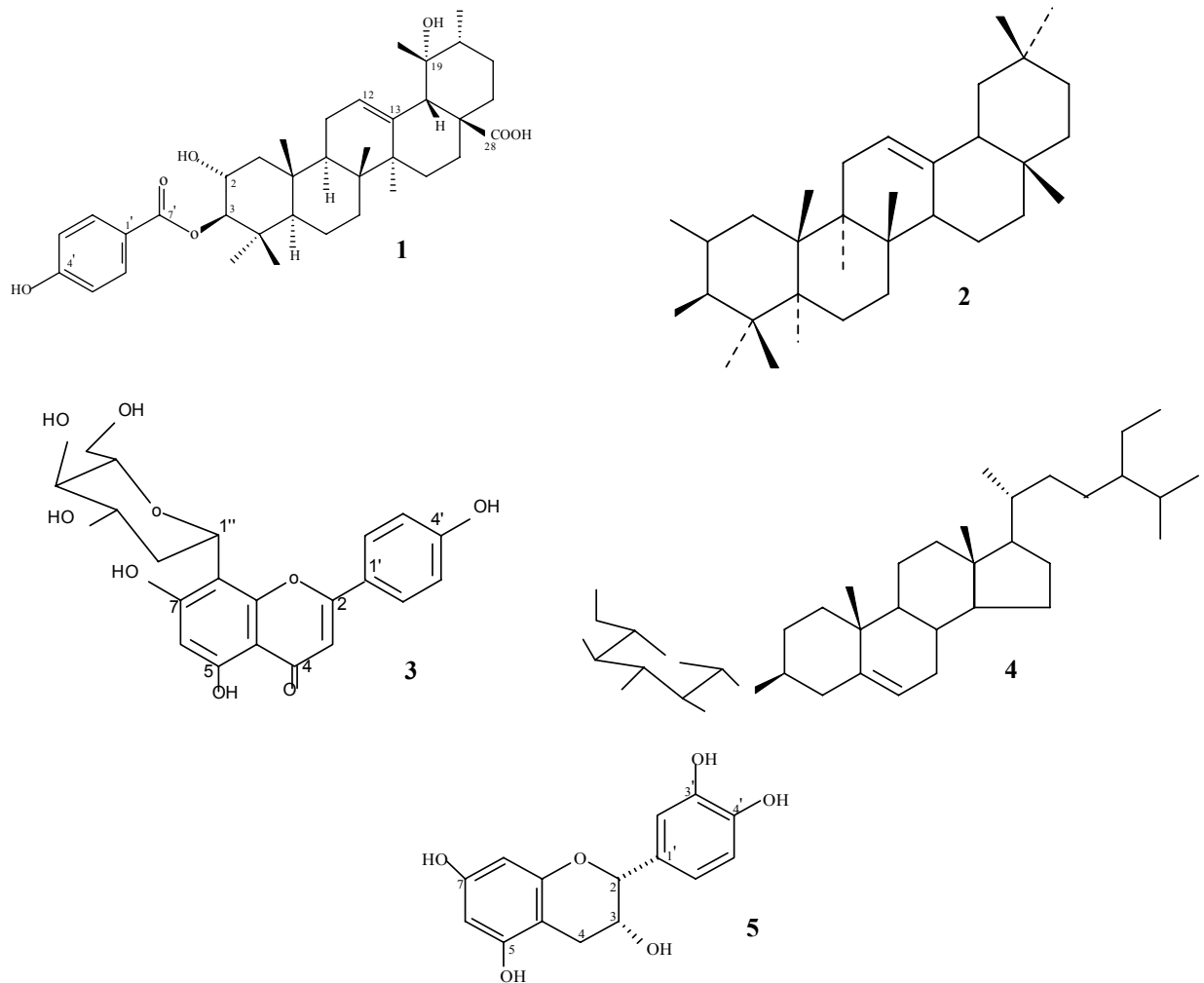


Figura 6 - Constituintes Químicos Extraídos das Folhas da *Luehea divaricata* Martius.  
Fonte: Tanaka e colaboradores (2005)

## 2.4 Sinergismo e antagonismo de princípios ativos

O fato de uma droga vegetal poder apresentar vários princípios ativos com o mesmo efeito pode possibilitar interações sinérgicas sendo superior em eficácia com relação aos compostos isolados (WALRANT, 1990).

A alcachofra apresenta substâncias que se mostram inativas quando analisadas isoladamente, quando presentes em misturas aumentam sua atividade.

Alguns extratos totais de plantas contém saponinas, polifenóis e outros compostos que podem influenciar decisivamente na absorção do princípio ativo, propiciando aumento de sua biodisponibilidade (BONATI, 1980).

Foi demonstrado com o *Hypericum perforatum* a superioridade do efeito antidepressivo com frações totais em relação a compostos isolados, sendo o sinergismo atribuído a substâncias que aumentam a biodisponibilidade das hipericinas (BUTTERWECK et al, 1997).

Muito interessante é a ocorrência, na mesma planta, de substâncias com propriedades antagônicas entre si e que, dificultam a interpretação dos resultados, por mascararem os efeitos. Ações histamínicas e anti-histamínicas foram observadas no mesmo extrato aquoso das folhas de *Ageratum conyzoides* (SILVA et al, 1990).

Variações qualitativas foram demonstradas em diferentes frações de *Croton zehntneri*, enquanto um extrato apresentou atividade espasmogênica e contrátil *in situ* sobre duodeno de coelho e músculo retoabdominal de sapo, o hidrolato propiciou efeito espasmolítico e inibidor das contrações provocadas por acetilcolina; por outro lado, o óleo essencial mostrou-se diurético, exatamente o oposto dos extratos hidroalcoólico, sugerindo que estas diferenças estariam relacionadas à composição química de cada fração (FERNANDES et al, 1978).

A presença de sódio, potássio, cálcio e outros íons inorgânicos num extrato vegetal, de alguma forma, pode ser o fator responsável por certas propriedades farmacológicas e que, portanto, não necessariamente estão relacionadas aos princípios ativos de natureza orgânica (SIXEL E PECINALLI, 2005).

Os efeitos cardíacos do extrato de folhas de *Ruelia sanguinea*, são devidos à presença de potássio. O efeito hipoglicemiante de várias plantas antidiabéticas está relacionado com o cromo, já que apresentam alto teor deste elemento em relação a outros vegetais. Esta relação é devido ao efeito hipoglicemiante da *Atriplex halimus* persistente, após sua queima, sugerindo princípio ativo de natureza inorgânica encontrado nas cinzas (IVORRA et al., 1989).

O planejamento do estudo farmacológico com plantas tidas como medicinais na forma de chás e extratos exige investigações minuciosas em face de inúmeros fatores que comumente dificultam a comprovação em modelos experimentais, já que

são misturas complexas e indefinidas de princípios ativos e outros secundários que, além de variarem constantemente sua composição, podem se potenciar ou antagonizar mutuamente, bem como, com certa frequência, não produzem efeito agudo, em face de períodos de latência que podem alcançar várias semanas (CALIXTO, 2003).

## **2.5 Etnofarmacologia e atividades farmacológicas**

### **2.5.1 Etnofarmacologia**

Conforme Elizabetsky (2006), o mal dos que estudam as superstições é não acreditarem nelas. A etnofarmacologia não trata de superstições e sim do conhecimento popular relacionado a sistemas tradicionais de medicina. Para apreciar o conhecimento popular é preciso admiti-lo como tal - um corpo de conhecimento, um produto do intelecto humano.

Silveira e Silveira (2002) ao observar a cultura de dezesseis famílias indígenas Mbyá-Guarani, da aldeia Jataity, no município de Viamão/RS, constataram que estes mascavam folhas da *Luehea divaricata* Martius (açoita-cavalo) para prevenir afecções bucais, pois na cultura desta aldeia a “palavra” é muito valorizada. Segundo os autores, os índios Mbyá-Guarani não apresentam problemas periodontais.

O conhecimento popular sobre os usos medicinais da açoita-cavalo são referidos por diversos autores. A raiz é considerada um depurativo e antiinflamatório (ALICE et al., 1995). As cascas são muito usadas como antidiarréico, adstringente, antipirético, antitumoral e antianêmico (MAFFEI, 1969; CHIRIANI, 1982). As cascas, folhas e flores são usadas para cicatrizar feridas na pele, lavagem vaginal, diurético, antiartrítico, antileucorréico, como tônico, e em afecções do aparelho respiratório, tais como laringite, bronquite e tosse (ROIG e MESA, 1945; REITZ, 1950; MAFFEI, 1969; TANAKA et al, 2003). As folhas são citadas como fitoterápicos contra disenteria, reumatismo, blenorragia, tumores e também são referidos como antiinflamatório, calmante e antiespasmódico (FREIRE, 1933; GONZÁLES et al, 1937; MAFFEI, 1969; TOURSARKISSIAN, 1980; TANAKA et al, 2005).

### 2.5.2 Atividades farmacológicas

Durante séculos, preparações contendo extratos vegetais vêm sendo empregadas no tratamento de diversas enfermidades (SCHUBERT, 2003). Nas últimas décadas, o aprimoramento no isolamento, purificação e elucidação estrutural de compostos, e a credibilidade na eficácia e segurança clínica, favoreceram a expansão mundial do mercado dos fitomedicamentos (CALIXTO, 2005).

A avaliação da atividade biológica inclui a investigação da atividade farmacológica e toxicológica de substâncias isoladas, frações e extratos totais da droga vegetal (ZANETTI, 2002). Segundo Sonaglio e colaboradores (1999) a necessidade de constatar a atividade biológica de uma planta, e de seus produtos derivados, é abordada considerando a necessidade de comprovação de uma determinada atividade farmacológica atribuída pela medicina popular, ou estabelecendo estratégias para o desenvolvimento tecnológico, pois a validação do processo tecnológico exige a conservação da composição química e da atividade farmacológica a ser explorada.

Atualmente avança o interesse da indústria farmacêutica por espécies vegetais que apresentem efeitos antimicrobianos, pois são inúmeras as doenças causadas por bactérias e fungos, e é grande a resistência que esses adquirem frente as várias drogas empregadas rotineiramente (CHAMBERS e SANDE, 1996; TITRILLINI et al, 1996; AVANCINI et al, 2000; ZANETTI, 2002).

A Farmacopéia Brasileira (1988) indica o emprego de duas metodologias para a determinação da atividade antimicrobiana, o método de difusão em ágar e o turbidimétrico. Segundo Pregnoatto (1999) o método de difusão em ágar, usando discos de papel ou cilindros como reservatórios, é utilizado desde a década de 40 e atualmente é um dos mais utilizados para testar extratos de plantas.

Outros métodos são citados na literatura, como microdiluição em caldo e bioautografia. Segundo Hamburguer e Cordell (1987), a bioautografia é amplamente difundida na busca de novos compostos químicos com atividade microbiana.

Apesar de haver diferentes métodos para avaliar a atividade antimicrobiana, seus resultados não podem ser comparados, pois algumas metodologias favorecem

a interação droga-microorganismo, propiciando melhores resultados (KNOBLOCH et al, 1986; AHMAD e BEG, 2001).

Estudos vêm sendo realizados com o intuito de comprovar a ação antimicrobiana de plantas utilizadas na cultura popular. O extrato de plantas é uma mistura de compostos bioativos que sinergicamente atuam na permeabilidade da membrana e na atividade respiratória celular microbiana, causando a morte (bactericida) ou inibindo o crescimento microbiano (bacteriostático) (SILVEIRA, 1997). Haïcour (1974) demonstrou a atividade bacteriostática do extrato aquoso de *Phyllanthus niruri*, utilizando toda a planta (3 g / 100 ml) contra a *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Bacillus subtilis*, tendo a estreptomicina como padrão. Entretanto ao avaliar a atividade antibacteriana, verificou uma variação de atividade para os extratos das diferentes partes da planta frente ao *B. subtilis*. Avancini e colaboradores (2000) analisando o decocto da *Baccharis trimera* (carqueja), verificaram a ação desse nas bactérias Gram-positivas. Nascimento e colaboradores (2000) relataram a ação antimicrobiana de extratos de plantas usadas na cultura popular como o “alecrim” e a “erva-cidreira” frente a bactérias sensíveis e resistentes à antibióticos sintéticos e constataram, que em alguns casos houve sinergismo entre os antibióticos e os extratos usados, possibilitando que antibióticos ineficazes apresentassem ação sobre bactérias resistentes.

A etnofarmacologia também tem sido aplicada para o tratamento das enfermidades animais, não somente no Brasil como em outros países (LANS e BROWN, 1998). Schmitt e colaboradores (2003), ao submeter o decocto das folhas de *Bryophillum pinnatum* (folha-da-fortuna), frente às bactérias isoladas de cães com lesões de pele, observaram que os resultados obtidos sugeriam a existência de substâncias com atividade antimicrobiana, que atuavam seletivamente sobre bactérias Gram-positivas causadoras de lesões na pele, justificando assim a sua popularidade na etnomedicina.

De Oliveira e colaboradores (2005) submeteram o extrato alcoólico obtido das folhas de *Syzygium cumini* a avaliação do seu potencial antimicrobiano por difusão em ágar, e observaram que o extrato bruto apresentou atividade contra *Staphylococcus aureus*, *Micococcus luteus*, *Pseudomonas aeroginosa*, *Shigella flexneri*, *Candida albicans* e *Candida krusei*. Pela mesma metodologia, Florão e colaboradores (2005) demonstraram que os óleos essenciais obtidos de quatro

espécies de *Baccharis* apresentavam ação bactericida frente a cepas Gram-positivas.

Andresek e colaboradores (2004) evidenciaram que os extratos mais polares (50 % V/V MeOH em acetato de etila e 75 % V/V MeOH em água) da casca do carvalho (*Quercus robur*) foram bactericidas para *Staphylococcus aureus*, e os extratos menos polares (75 % acetato de etila em hexano, 100 % acetato de etila, 5 % metanol em acetato de etila) apresentaram atividade antimicrobiana contra bactérias Gram-negativas e fungos. Logo substâncias ativas contra Gram-negativas e fungos encontram-se em extratos lipofílicos e as ativas contra *S. aureus* estão presentes em extratos lipofóbicos. De acordo com este estudo, desde que diferentes extratos contenham compostos de diferentes polaridades, estes podem apresentar uma tendência a atividade antimicrobiana similar.

Na Nigéria, o extrato aquoso (200 mg/ml) da raiz de *Greura mollis* (Tiliaceae) frente a *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*, apresentou um fraco halo de inibição ( $\leq 15$  mm) pelo método de difusão em ágar, quando comparado com o padrão (ADAMU et al, 2005).

Garcia (2000) ao testar as partes aéreas de *Phyllanthus niruri* e *Phyllanthus tenellus* (Euphorbiaceae), constatou que a fração butanólica apresentou maior atividade contra *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Bacillus subtilis*, *Micrococcus luteus*, *Klebsiella pneumoniae* e *Escherichia coli* quando comparada com as demais frações. O autor infere que a presença de substâncias mais polares das espécies está relacionada à atividade antimicrobiana e essas, provavelmente, possam ser extraídas na forma de infuso.

Manfron (1997) estudando a ação antimicrobiana de *Xanthium cavanillesii* comprovou, por difusão em ágar, a ação do extrato metanólico de raízes, caules, folhas e frutos frente a *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* e *Saccharomyces cerevisiae*, quando comparados com padrões antimicrobianos recomendados pelo Food and Drug Administration (FDA). Pelo mesmo método, Chattopadhyay e colaboradores (2002) demonstraram a atividade do extrato metanólico, aquoso e frações de *Mallotus peltatus*, contra *S. aureus*, *S. saprophyticus*, *S. faecalis*, *B. subtilis*, *E. coli* e *P. mirabilis*, relatando maior atividade na fração butanólica em relação à aquosa,

para os microorganismos testados.

Dezoito espécies medicinais do Rio Grande do Sul, foram selecionadas por Souza e colaboradores (2004) para um screening antimicrobiano. As espécies *Cordia monosperma*, *Echinodorus grandiflorus*, *Ocotea odorefera*, *Pluchea sagittalis*, *Psidium cattleianum*, *Senna neglecta* e *Parapiptadenia rigida* não possuíam nenhum relato na literatura de propriedade antimicrobiana; mas apresentaram atividade contra pelo menos um (1) microorganismo testado. Nenhum dos extratos inativou a *Escherichia coli* e *Candida albicans*, entretanto *Bacillus subtilis* foi o microorganismo mais facilmente inibido (50 % dos extratos testados foram ativos) seguido de *Micrococcus luteus* (39 %), *Sacharomyces cerevisiae* (17 %), *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermidis* (11 %).

Em *Ilex paraguariensis*, Montanha (1990) demonstrou experimentalmente, pelo método de difusão em ágar, com cilindros em placa, que a fração purificada de saponinas obtida das folhas, bem como o seu hidrolizado alcalino de saponinas e o extrato hidroetanólico não foram ativos contra *Candida albicans*. Entretanto a literatura relata que vários fungos são susceptíveis à ação de saponinas, como por exemplo, *Candida albicans* (MARGINEAU et al, 1976; KITAGAWA et al, 1989; SHIMOYAMADA et al, 1990).

Quando avaliados pelo método de difusão em ágar, os microorganismos *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Candida albicans* e *Saccharomyces cerevisiae* demonstraram-se resistentes ao extrato metanólico (50 mg/ml) da *Luehea divaricata* Martius (SOUZA et al, 2004).

Apesar da técnica de difusão em ágar ser empregada rotineiramente, outras metodologias estão ganhando espaço na busca de novos fármacos. Um ensaio simples para a detecção direta de compostos químicos de atividade antimicrobiana é a bioautografia. Neste ensaio um cromatograma, em camada delgada (CCD), com os extratos a serem avaliados é colocado em meio nutritivo, com o respectivo inóculo. As zonas de inibição de crescimento dos microorganismos correspondem aos halos de inibição no cromatograma, que são visualizados por um reagente detector, como trifênil 2, 3, 5 tetrazólio. A bactéria metabolicamente ativa converte o reagente, por reação enzimática, em um complexo colorido denominado formazam, corando-se intensamente de vermelho e os compostos com atividade biológica apresentam zonas limpas, em contraste com o segundo plano colorido do ensaio



bioautográfico (HAMBURGUER e CORDELL, 1987).

Segundo Rahalison (1991), havendo atividade antimicrobiana, substâncias isoladas ou fatores de retenção (Rfs) específicos de substâncias que compõem as complexas frações e/ou extratos das mais variadas plantas, são facilmente constatadas pela bioautografia. Essa proporciona a identificação das substâncias responsáveis pela ação antimicrobiana, por esse motivo tem sido amplamente difundida.

Hoelzel (2001) considera a bioautografia um ensaio eficiente na determinação da atividade antimicrobiana, a qual ressalta a alta sensibilidade da técnica, pois salienta que menos de 2,5  $\mu$ g de substância antimicrobiana forma halo de inibição visível. Para *Waltheria douradinha*, verificou considerável diferença entre a técnica de difusão em ágar e bioautografia, pois as frações hexânica e etérea apresentaram resultados positivos, para bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, somente por bioautografia, levando a autora a concluir que um dos motivos da não detecção da atividade por difusão em ágar, estava na baixa concentração da substância ativa nos extratos.

Extratos polares e apolares de *Chaptalia nutans* foram ativos contra *Micrococcus luteus*, *Escherichia coli* e *Bacillus subtilis*, e inativa contra *Cladosporium cucumerinum*, quando avaliados por bioautografia (HEINRICH et al, 1992). Souza e colaboradores (2004) ao avaliar tal atividade, por difusão em ágar, constataram que esta espécie só era ativa contra *Bacillus subtilis*, levando-os a concluir que os diferentes resultados podem ser atribuídos a diferença de metodologia ou dos extratos.

Zanetti (2002) observou que as frações do extrato etanólico 70 % e o óleo volátil da *Tropaeolum majus* frente a bactérias Gram-positiva e Gram-negativas apresentaram ação antimicrobiana, por bioautografia, sugerindo que entre os compostos ativos pode-se citar o isotiocianato de benzila, composto antimicrobiano presente nessa espécie. Já Gonzaga e colaboradores (2001), pela mesma metodologia, identificaram atividade antimicrobiana para alcalóides dihidrobenzofenantridínicos isolados de *Zanthoxylum rhoifolium*.

A cepa *Staphylococcus aureus* PI 57, pertencente ao clone epidêmico brasileiro (CEB) é resistente a muitos antibióticos utilizados na prática médica, com

exceção da vancomicina. Ao realizar a bioautografia com 100  $\mu\text{g}$  do extrato hexânico de *Mikania glomerata*, frente a essa Gram-positiva, Do Amaral e colaboradores (2001) constataram, que a espécie apresentava melhor ação antimicrobiana do que a vancomicina.

Magalhães e colaboradores (1998) também utilizaram testes de bioautografia com extratos de flavonóides isolados das raízes de *Lonchocarpus montanus*, comprovando a eficiência do ensaio. Através da mesma metodologia, ficou comprovada a atividade dos extratos hexânico e etanólico de folhas e caules de *Piper cernuum* frente a bactérias e fungos (FERNANDES et al, 2002 *apud* SILVA, 2003)

A microdiluição em caldo também é um método bastante utilizado para testar suscetibilidade microbiana, e atualmente é o método de escolha na determinação da concentração inibitória mínima (CIM) e na concentração bactericida mínima (CBM) dos compostos bioativos testados frente aos microorganismos (NCCLS, 1997).

Yu e colaboradores (2004) determinaram pelo método de microdiluição em caldo a concentração inibitória mínima (CIM) e a concentração bactericida mínima (CBM) do óleo essencial de *Scutellaria barbata*. Os resultados do CIM indicaram a inibição de todos os microorganismos testados, exceto a *Salmonella paratyphi-A*. As bactérias Gram-positivas demonstraram maior sensibilidade do que as Gram-negativas e fungos testados, sendo a *S. epidermidis* a de menor CIM (0,77 mg/ml) e menor CBM (0,77 mg/ml). Já as partes aéreas de *Rubus rosaefolius* Smith demonstraram possuir ação bactericida contra *S. aureus* (CBM 12,5 mg/ml), *P. aeruginosa* (CBM 25 mg/ml) e *E. coli* (CBM 12,5 mg/ml) (GUEDES et al., 2005).

O extrato bruto e frações obtidas das folhas de *Zollernia ilicifolia* inibiram o crescimento microbiano em concentrações que variam de 1,56 a 6,25 mg/ml para *P. aeruginosa*; 0,78 a 12,5 mg/ml para *S. aureus*, e 1,56 a 25 mg/ml para *E. coli*, sendo mais ativa as frações diclorometano e acetato de etila. Os resultados apresentados mostram bastante relevância, uma vez que os microorganismos testados estão relacionados à infecção hospitalar e apresentam problemas de resistência aos agentes antimicrobianos utilizados na terapêutica atual (MAGINA et al, 2005).

Os estudos realizados por Duarte e colaboradores (2005) demonstraram, que de uma maneira geral, as lignanas isoladas do extrato hexânico das folhas de

*Phyllanthus amarus* apresentam atividade contra os microorganismos na faixa de concentração avaliada, exceto para *P. aeruginosa*. Os mais sensíveis, inibidos por todas as lignanas testadas foram *Candida albicans* e *Rhodococcus equi*, para os quais foi determinado a CIM entre 100 e 400 mg/ml.

O extrato bruto metanólico das cascas do caule da *Luehea divaricata* e as suas frações aquosa e acetato de etila foram moderadamente ativos contra *Staphylococcus aureus* (CIM 250  $\mu$ g/ml), enquanto a fração butanólica inibiu discretamente o crescimento de *S. aureus* (CIM 500  $\mu$ g/ml) e a fração hexânica apresentou atividade fraca contra a mesma bactéria (CIM 1000  $\mu$ g/ml). As demais frações e o extrato bruto das folhas foram inativos frente a *Bacillus subtilis* e *Escherichia coli*, quando testadas por microdiluição em caldo (TANAKA et al, 2005). A atividade fungicida dos extratos brutos das folhas e das cascas do caule, também foi testada, pelo mesmo método, por Tanaka e colaboradores (2005). Os autores observaram que *Candida albicans*, *Candida krusei*, *Candida parapsilosis* e *Candida tropicalis* são resistentes aos extratos da *L. divaricata*.

A Genética Toxicológica tem por objetivo detectar e entender a ação de determinadas substâncias denominadas genotoxinas sobre o organismo, com especificidade para ácidos nucleicos, especialmente DNA. O termo genotóxico se refere às alterações letais e/ou hereditárias que são transmitidas tanto pelas células somáticas, como pelas germinativas (VOGEL, 1989). A avaliação da atividade mutagênica das amostras frente ao Teste de Ames, permite detectar compostos que causam deslocamento no quadro de leitura, bem como substituição de pares de bases (DA SILVA, 1998). O extrato aquoso das folhas da *Luehea divaricata* apresentou atividade genotóxica frente ao Teste de Ames (*Salmonella* / microssoma) com ativação microssomal (ALICE et al, 1991). Outras espécies da etnomedicina também possuem essa atividade comprovada, como *Bauhinia forficata* (pata-de-vaca) e *Smilax campestris* (japécanga), o que requer maiores cuidados quanto ao uso indiscriminado de plantas na cultura popular (BRESOLIN E VARGAS, 1993; FERREIRA E VARGAS, 1999).

Moraes e colaboradores (2005) avaliaram a atividade antibacteriana e mutagênica de extratos vegetais obtidos da *Alchornea glandulosa* e *Alchornea triplinervia*. A atividade antibacteriana foi avaliada pela técnica de microdiluição em

caldo, com determinação da concentração inibitória mínima, frente a *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*. O extrato clorofórmico de *A. glandulosa* apresentou atividade antibacteriana com CIM de 150 mg/ml para *S. aureus* e de 125 mg/ml para *E. coli*, já o extrato metanólico a CIM foi de 75 mg/ml para *S. aureus* e de 250 mg/ml para *E. coli*. Para a avaliação da mutagenicidade dos extratos vegetais foi empregado o Teste de Ames, que avalia a indução de mutações gênicas por compostos químicos; em diferentes linhagens de *Salmonella typhimurium* (TA98, TAI00, T A97a e TA102), com e sem ativação metabólica. O extrato metanólico de *A. glandulosa* e *A. triplinervia* apresentou atividade mutagênica na linhagem TA98, entretanto o extrato clorofórmico das duas espécies não apresentou nenhum potencial genotóxico. Logo o extrato metanólico de *A. glandulosa* apresentou a melhor atividade antibacteriana, porém, também demonstrou atividade mutagênica, o que requer maiores cuidados quanto ao uso indiscriminado dessa planta.

A utilização de bioensaios para o monitoramento da atividade de extratos, frações e compostos isolados de plantas têm sido freqüentemente incorporada à pesquisa fitoquímica. Dentre esses encontra-se o ensaio de citotoxicidade frente a *Artemia Salina* (BST - Brine Shrimp Test) que é utilizado para avaliar a atividade antitumoral de extratos de plantas (SILVA, 2003), e como um indicador de toxicidade para atividade inseticida (SIQUEIRA et al, 1998).

Os trabalhos de citotoxicidade com espécies vegetais tentam correlacionar essa atividade com ações antifúngica, antiviral, antimicrobiana, parasiticida e antitumoral (COWAN, 1999). Silva (2003) ao avaliar os óleos de *Xanthium cavanillesii* (raízes, caule, folhas e frutos), nas concentrações de 1000, 100 e 10  $\mu$ g/ml, observou um alto índice de citotoxicidade ( $CL_{50} \leq 10 \mu$ g/ml) frente a *Artemia salina*, pois apresentaram uma  $CL_{50}$  de 1,19  $\mu$ g/ml. Conforme Ortega e colaboradores (2000) e Silva (2003), os resultados obtidos pelo bioensaio da *Artemia salina*, com *Xanthium cavanillesii* são promissores e este estudo pode ter seqüência com diferentes linhagens celulares de cultivo proveniente de cânceres humanos, como KB (Células de carcinoma nasofaríngeo humano), UISO - SQC - 1 (Células escamosas de carcinoma de cérvix) e 4CT - 15 (Células de carcinoma aderente de cólon). Pelo mesmo método e concentrações, Walker e colaboradores (2002) testaram o extrato metanólico das folhas da *L. divaricata*, e concluíram que quanto a citotoxicidade a espécie é citotóxica, pois sua  $CL_{50}$  foi de 1,7  $\mu$ g/ml.

Ao avaliar a atividade antiproliferativa do extrato bruto das folhas da *L. divaricata* frente a linhagens de células tumorais humanas, Tanaka e colaboradores (2005) observaram o efeito citostático sem seletividade, do extrato bruto das folhas, na concentração de 250  $\mu\text{g/ml}$ , inibindo em aproximadamente 85 % o crescimento celular das linhagens UACC.62, MCF.7 e C786.0, e efeito citocida com seletividade nesta mesma concentração para as linhagens OVCA.3 (~ 20 % de morte), K.562 (~ 30 % de morte) e NCL.ADR (~ 50 % de morte). O extrato bruto de cascas dos caules apresentou efeito citostático na concentração de 25  $\mu\text{g/ml}$ , com pequena seletividade entre as linhagens C786.0 (~60 % de inibição), NCI.460 (~75 % de inibição), K.562 (~ 80 % de inibição), NCL.ADR (~ 80 % de inibição) e na concentração de 250  $\mu\text{g/ml}$  também com pequena seletividade para as linhagens HT.29 (~ 98 % de inibição), MCF.7 (~ 90 % de inibição), PC.03 (~95 % de inibição), NCI.460 (~ 100 % de inibição) e C786.0 (~ 90 % de inibição), e efeito citocida na concentração de 250  $\mu\text{g/ml}$ , com pequena seletividade para as linhagens NCI.ADR (~ 10 % de morte), K.562 (~ 40 % de morte) e UACC.62 (~50 % de morte).

Toda substância química, dependendo da concentração e via de administrada, pode ser tóxica. O estudo da toxicidade aguda e crônica de produtos fitoterápicos está normatizado pela Secretaria de Vigilância Sanitária, com testes toxicológicos em etapas anteriores ao desenvolvimento tecnológico do produto final, onde é destacada, num primeiro momento, a toxicidade aguda. Os testes são os mesmos recomendados para os produtos farmacêuticos de origem sintética e semi-sintética e contribuem de forma relevante para esclarecer os riscos eminentes que uma planta pode causar (DI STASI et al, 1996; LARINI, 1997).

Segundo Brito (1994), a partir dos ensaios toxicológicos pode-se precisar o índice de letalidade, as alterações de comportamento, os órgãos atingidos, entre outras questões como alterações hematológicas. Os experimentos evidenciam o risco de intoxicação aguda pela droga e a forma de prevenir, além fornecer suporte na determinação de doses para os demais testes.

O método preferencial, para avaliar toxicidade aguda, utiliza roedores. Estes animais são submetidos ao produto em teste, e são mantidos por 7 a 14 dias, o que permite o estudo de efeitos tardios, bem como a ocorrência de recuperação da ação tóxica nos animais. Ao final do ensaio avalia-se o observado e calcula-se a  $DL_{50}$

(HEUVEL, 1990).

Bianchi e colaboradores (1996), ao verificar a toxicidade aguda do extrato etanólico das folhas da *Luehea divaricata*, observaram que a dose de 500 mg/kg, quando administrado por via oral, causava morte de 25 % dos camundongos. Já Walker e colaboradores (2002) constataram, pela mesma via de administração, que as doses 625, 1250, 2500 mg/kg do extrato metanólico e das frações hexânica, clorofórmica, acetato de etila e n-butanólica não apresentavam efeitos tóxicos em camundongos albinos adultos.

Atualmente, as substâncias com potencial antioxidante têm sido requeridas pelas indústrias de alimentos, cosméticos e medicamentos, estimulando, assim, a investigação da atividade antioxidante de compostos orgânicos.

Segundo Anderson e Phillips (1999), para que os organismos produzam energia, eles necessitam utilizar o poder oxidativo do oxigênio ( $O_2$ ), nesse processo há necessidade de formação de dois elétrons desemparelhados. Algumas biomoléculas, no entanto, por não terem elétrons desemparelhados, não reagem com o oxigênio. Os radicais livres são moléculas ou átomos com um elétron não compartilhado. O elétron desemparelhado altera a reatividade química, tornando o radical mais reativo que o átomo ou molécula correspondente, demonstrando haver alteração. Os antioxidantes são doadores de um átomo de hidrogênio ou um elétron e são requeridos para extinguir radicais livres, responsáveis por causar danos severos às membranas, proteínas e DNA. A propriedade antioxidante pode ser caracterizada como a doação de um elétron, alquilação de metais de transição com função catalítica ou inibição de elementos oxidativos (HALLIWELL, 1999).

A atividade antioxidante pode ser avaliada por metodologias *in vitro* e *in vivo*. Os métodos fotolorimétricos do DPPH (2,2 difenil, 1-picrilhidrazila) e do  $\beta$ -caroteno-linolenato são os mais utilizados para mensurar a atividade de misturas ou de compostos isolados *in vitro* (ANDERSON E PHILLIPS, 1999).

O método do DPPH baseia-se na redução desse radical na presença de antioxidantes doadores de hidrogênio, em solução alcoólica. O radical ao capturar os hidrogênios, passa para sua forma estável DPPH-H, mudando a coloração do meio reacional de violeta para amarelo. O DPPH é um radical estável e mostra forte banda de absorção em 517 nm (POHLIT et al, 2004).

Segundo Jayaprakasha e colaboradores (2001), o  $\beta$ -caroteno é um composto antioxidante de cor alaranjada. O  $\beta$ -caroteno-linolenato é um sistema modelo, que resiste a rápida descoloração na ausência de antioxidante, no entanto, o método baseia-se no mecanismo de diminuição da cor do  $\beta$ -caroteno, que é resultado do fenômeno mediado pelos hidroxiperóxidos formados da oxidação do ácido linoléico. Em emulsão, o radical livre ácido linoléico é formado a partir da abstração de um (1) átomo de hidrogênio, quando esse é atacado fortemente por moléculas insaturadas de  $\beta$ -caroteno. O composto perde seu cromóforo e a sua característica alaranjada, o qual pode ser monitorado espectrofotometricamente. A presença dos extratos pode impedir o branqueamento do  $\beta$ -caroteno por neutralizar o radical livre e outros radicais formados no sistema. Os compostos precisam prevenir a peroxidação do ácido linoléico, para serem considerados antioxidantes.

Existe um número considerável de evidências epidemiológicas que mostram a associação entre dietas ricas em frutas e a diminuição dos índices de doenças cardiovasculares, neurodegenerativas e o câncer. Este efeito protetor tem sido atribuído, principalmente, a presença de compostos naturais, como polifenóis, carotenóides e vitamina C, os quais apresentam reconhecida atividade antioxidante. Oliboni e colaboradores (2005), afirmam que a capacidade antioxidante dos vinhos já esteja bem estabelecida, porém dados acerca do suco de uva são poucos e contraditórios. Em vista disso, submeteram amostras de suco de uva tinto e branco ao radical DPPH e evidenciaram que ambos possuem importante atividade antioxidante, apesar dos tintos apresentarem maior concentração de polifenóis totais. Já Varela e colaboradores (2005) testaram vinhos espumantes produzidos na região nordeste do Estado do Rio Grande do Sul. Os resultados mostraram que, tanto *brut* como *demi-sec*, apresentaram importante capacidade antioxidante.

Algumas variáveis influenciam nos resultados dos ensaios da atividade antioxidante. Rodrigues e colaboradores (2006) estudaram a atividade antioxidante de soluções hidroetanólicas de folhas de *Arctostaphylos uva-ursi* pelo método fotocolorimétrico do DPPH. Ao variar os parâmetros proporção droga:solvente (1:20 e 1:10; p/v), teor alcoólico (70 % e 90 %) e tempo de maceração (4 a 8 dias), observaram que os melhores resultados são obtidos quando a concentração da droga aumenta, enquanto o teor alcoólico e o tempo de maceração diminuem.

Tseng e colaboradores (1997) avaliaram a atividade antioxidante dos extratos de flores de *Hibiscus sabdariffa*, frente ao radical livre DPPH, e constataram que a fração acetato de etila apresentava maior percentagem no índice de inibição que as demais frações. Pelo mesmo método a fração acetato de etila das folhas de *Ilex paraguarienses*, demonstrou potencial antioxidante superior em relação a fração n-butanólica; segundo Schubert (2003), o potencial antioxidante da fração acetato de etila está relacionado a presença de compostos fenólicos antioxidantes como quercetina, rutina e derivados do ácido clorogênico.

Os extratos alcoólicos das folhas e galhos da *Eugenia brasiliensis* e *Eugenia braurepaireana* foram submetidos ao DPPH. Os extratos dos galhos de ambas espécies apresentaram maior capacidade antioxidante em relação aos das folhas, devido ao alto teor de compostos fenólicos. Porém, Dias e colaboradores (2005) afirmam que as folhas dessa espécie apresentam uma concentração três vezes maior de flavonóides em relação aos galhos.

Por esta metodologia fotolorimétrica pode-se mensurar e comparar a atividade antioxidante de compostos isolados de produtos naturais. Castro e Gamboa (2004) ao testar os irudoides isolados das partes aéreas de *Verbena littoralis*, observaram que estes apresentavam moderado potencial antioxidante. Da mesma forma Pohlit e colaboradores (2004), ao comparar a atividade antioxidante de diacetil catecol e 4-nerolidilcatecol, verificaram potencial ação redutora do núcleo catecol em relação ao composto com cadeia lateral. Essa diferença está relacionada ao maior efeito estérico esperado pela aproximação do catecol ao DPPH comparado a aproximação do composto com cadeia lateral ao radical, durante a etapa de redução.

A *Crateagus aronia* é uma das espécies utilizadas no tratamento de enfermidades cardiovasculares, na medicina popular de Israel. As folhas dessa espécie apresentam flavonóides, proantocianidinas, triterpenos, esteróides e ácidos orgânicos. Ljubuncic e colaboradores (2005) avaliaram a atividade antioxidante de diferentes concentrações do extrato aquoso das folhas dessa espécie. A concentração de 100  $\mu$ g/ml foi a que apresentou maior percentual de redução da oxidação quando comparado ao controle positivo, sugerindo que a relação concentração de extrato e efeito está envolvida na habilidade de inibir o processo oxidativo pelo método do  $\beta$ -caroteno-linolenato.



Alguns autores afirmam que substâncias com poder redutor podem ser bons antioxidantes. Segundo Jayaprakasha e colaboradores (2001), o extrato da semente de *Vitis vinifera*, obtido pela mistura acetato de etila e água, apresenta catequinas, procianidinas, epicatequinas e flavonóides em geral. Ao testar a concentração de 100 ppm de diferentes extratos, obtidos de diferentes proporções da mistura acetato de etila e água, pelo método de peroxidação *in vitro*, observaram que o poder redutor variava de 65 a 90%.

As especiarias culinárias são, principalmente, utilizadas para dar cor, odor e sabor aos alimentos. Os povos do Oriente Médio, anos a.C., já utilizavam os temperos como conservantes, provavelmente por serem bons antioxidantes. Kulisic e colaboradores (2004) compararam, pelo método  $\beta$ -caroteno-linolenato, o potencial antioxidante do óleo essencial do orégano com antioxidantes naturais e sintéticos como BHT, ácido ascórbico e  $\alpha$ -tocoferol. A ordem decrescente do potencial antioxidante, BHT >  $\alpha$ -tocoferol > óleo essencial > ácido ascórbico, confirma que o orégano possui potencial redutor, sendo útil na conservação dos alimentos.

Segundo Tepe e colaboradores (2005), a atividade antioxidante de extratos de plantas não deve ser avaliada por um único método. A combinação de métodos *in vivo* e *in vitro* é fundamental para julgar o potencial redutor de mistura de compostos ou de compostos isolados; entretanto Kulisic e colaboradores (2004) afirmam que os resultados obtidos por diferentes métodos podem não refletir o verdadeiro potencial redutor das substâncias testadas, pois os resultados estão intimamente relacionados com a escolha do método, a forma de extração e concentração do extrato, e até mesmo com a natureza dos compostos.

Os resultados obtidos a partir dos métodos *in vitro*, DPPH e  $\beta$ -caroteno-linolenato (BCB), não são comparáveis e sim se complementam, pois cada método possui a sua especificidade e a sua sensibilidade. O método BCB pode ajudar especialmente na investigação de antioxidantes lipofílicos, logo esta metodologia é a mais apropriada para os óleos essenciais. Já o método DPPH pode ser útil para se obter informações preliminares de compostos com habilidade na captura de radicais livres. Esse método requer amostras pequenas, e é sensível para substâncias hidrofílicas. Substâncias polares, como ácido ascórbico apresentam forte atividade por esse método (KULISIC et al., 2004; TEPE et al., 2005).

Tepe e colaboradores (2005) estudaram a atividade antioxidante do óleo essencial e das frações de *Cyclotrichium organifolium* por DPPH e BCB. Ao submeterem as amostras a esses dois sistemas testes complementares, observaram que a oxidação foi efetivamente inibida por frações polares no teste de DPPH, as frações menos polares apresentaram maior potencial redutor pelo teste do BCB. Confirmando, assim, o uso desses dois testes para se determinar o potencial antioxidante da espécie estudada.

A maior parte das doenças do corpo causa dor. Além disso, a capacidade de diagnosticar diferentes doenças depende, em grande extensão, do conhecimento sobre as diferentes qualidades de dor. A dor é sobretudo um mecanismo de proteção do corpo; ocorre sempre que qualquer tecido estiver sendo lesado, e faz com que o indivíduo reaja para remover o estímulo doloroso (GUYTON e HALL, 1997).

A humanidade sempre conviveu com a dor. O preceito de toda a medicina antiga era *Diminum est opus sedare dolorem*, “a cura da dor é uma obra divina”. Foram encontrados, em escavações do antigo Egito, papiros que contam que a egípcia Polidona, esposa de Taon, ensinava a bela Helena a arte de misturar as ervas que apagam toda a lembrança da dor. A luta do homem contra a dor e todas as suas mazelas continua até o dia de hoje (MILLER, 1951). A única diferença é que usamos outros métodos para o seu controle.

Dor, segundo a International Association for The Study of Pain (IASP), é uma experiência sensorial e emocional desagradável associada à lesão residual real ou potencial (TJOLSEN e HOLE, 1997; DOUGLAS, 1999). Sendo assim, podemos dizer que a dor é uma resposta que alerta os indivíduos para a ocorrência de alterações na integridade e na funcionalidade do organismo, permitindo que mecanismos de defesa ou de fuga sejam adotados (MILLAN, 1986; TRAUB, 1997).

Existem várias formas de classificar a dor, sendo a sua duração ao longo do tempo um dos critérios mais adotados. A dor pode ser classificada como aguda ou crônica. A dor aguda tem função de alerta, caracteriza-se por ser de curta duração (alguns segundos até poucas horas), desaparecendo com a resolução do processo que a originou. Como exemplo, podemos citar o contato com uma chapa quente ou a dor pós-operatória, que cessam assim que a lesão é curada. A etiologia da dor aguda é geralmente evidente e seu diagnóstico é facilmente definido. Além disso, é

controlada com eficiência usando-se as drogas existentes no mercado (BERNARD et al, 1996; LOESER e MELZACK, 1999; PORTENOY e LESAGE, 1999).

A dor crônica, por sua vez, é aquela que persiste além do tempo necessário para a cura da lesão, estendendo-se por meses ou anos. Esse tipo de dor é consequência de processos patológicos, que agredem as estruturas somáticas ou viscerais, e de disfunções do sistema nervoso central (SNC) ou do sistema nervoso periférico (SNP). Muitas vezes a etiologia da dor crônica é multifatorial, o que torna seu diagnóstico e tratamento mais complexo, envolvendo múltiplas abordagens e nem sempre alcançando pleno êxito na sua erradicação. Como exemplo de dor crônica podemos citar aquela causada por tumores metastáticos ou aquela associada a processos inflamatórios crônicos, como a artrite reumatóide (ASHBURN e STAATS, 1999).

A percepção de estímulos nocivos, denominada por Sherrington (1906) de nocicepção não significa o mesmo que a sensação de dor. A dor representa uma experiência complexa e, muitas vezes, subjetiva, incluindo componentes afetivos, culturais e psicológicos, enquanto a nocicepção é a sensação determinada pela estimulação das fibras aferentes primárias, que transmitem o impulso nociceptivo até a medula dorsal (DUBNER e BENNET, 1983; MEYER et al., 1994).

Segundo Jones (1992) os animais não são capazes de verbalizar os componentes subjetivos da dor, neles não se avalia dor, mas nocicepção. Logo, os termos dor e analgesia são mais apropriados para o ser humano, enquanto nocicepção e antinocicepção são mais adequados aos animais.

A nocicepção desencadeia no animal comportamentos típicos, como lambar ou morder a área lesada, vocalização, ou reflexo de retirar a parte do corpo agredida do contato com o estímulo nocivo. As drogas que suprimem os comportamentos nociceptivos são denominadas antinociceptivas, e aquelas que o induzem são chamadas de pró-nociceptivas ou alogênicas (DOUGLAS, 1999).

As drogas antinociceptivas não são, obrigatoriamente, analgésicas, visto que a supressão do comportamento nociceptivo pode ser desencadeada por outros fatores, como prejuízo motor e sedação, que diferem de analgesia (DOUGLAS, 1999).

O termo nociceptor é uma abreviatura de “nocirreceptor” e denota um receptor para o estímulo nociceptivo (RANG e DALE, 1991). Esse termo foi introduzido por Sherrington (1906) que definiu nociceptores como terminações livres de neurônios aferentes primários, que podem ser despolarizados por estímulos mecânicos, térmicos ou químicos (KRESS e ZEILHOFER, 1999).

A percepção da dor se inicia na periferia pela estimulação dos nociceptores, cujos corpos celulares encontram-se nos gânglios das raízes dorsais e projetam seus axônios até o corno dorsal da medula (Figura 7). Os nociceptores inervados pelas fibras A $\delta$ , que são fibras mielinizadas, de condução rápida e pelas fibras C, que não são mielinizadas e transmitem o estímulo de forma mais lenta (GUYTON e HALL, 1997). O estímulo deve exceder o limiar para que seja interpretado pelo sistema sensorial (BJÖRKMAN, 1995).

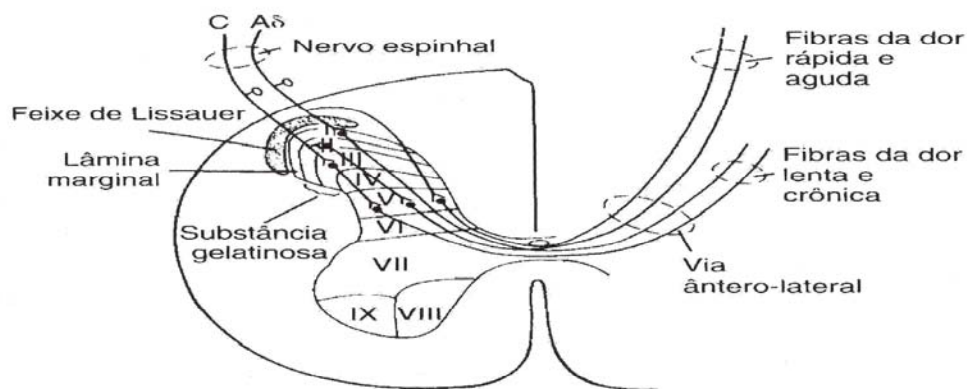


Figura 7 - Aferências medulares dos nociceptores: corte transversal da medula espinhal, mostrando as sinapses das fibras C e A $\delta$  nas lâminas I, II, III e V.

Fonte: Reproduzido de Guyton e Hall, 1997.

Os mecanismos pelos quais os estímulos térmicos, químicos e mecânicos desencadeiam o aparecimento do potencial de ação na fibra aferente primária (primeiro passo na percepção da sensação nociceptiva) ainda não estão completamente elucidados. Existem evidências de que estímulos algogênicos induzem correntes de cátions através de estruturas protéicas especializadas, culminando na despolarização do aferente primário e na liberação de neurotransmissores no corno dorsal da medula (BONICA, 1990). Substâncias endógenas, como o ácido araquidônico, neuropeptídeos, cininas, aminoácidos

excitatórios, entre outros, são produzidas e/ou liberadas pelo tecido lesionado e estimulam receptores presentes na membrana destes neurônios. Além disso, os mediadores inflamatórios liberados facilitam a neurotransmissão e sensibilizam o nociceptor (BJÖRKMAN, 1995).

A ativação dos nociceptores periféricos provoca, além da sensação nociceptiva, uma resposta de defesa chamada reflexo de retirada. Esse reflexo tem o objetivo de preservar a área atingida evitando um dano tecidual maior. Quando o impulso chega ao corno dorsal, pequenos neurônios comunicam-se com o corno motor anterior. Essa comunicação permite que reflexos musculares sejam acionados de forma a remover a parte do corpo agredida do contato com o agente agressor (MILLAN, 1999).

A estimulação da fibra aferente primária, além de desencadear o reflexo de retirada e a condução do estímulo nociceptivo para os centros superiores, também provoca a liberação de neuropeptídeos e outras substâncias algogênicas, pelos terminais axonais colaterais da própria fibra aferente primária, conferindo-lhe um papel eferente na transmissão do estímulo nociceptivo. Na verdade, tais substâncias estimulam fibras aferentes vizinhas, ativam células do sistema imunológico e aumentam a permeabilidade vascular, desencadeando uma resposta inflamatória, que por ser secundária à ativação do aferente primário é denominada inflamação neurogênica (MILLAN, 1999).

A informação nociceptiva chega ao corno dorsal da medula espinhal através de fibras aferentes primárias. A partir deste local, a informação é transmitida via fibras ascendentes aos centros supra-espinhais, onde ocorre a interpretação e localização da dor. Entretanto, a avaliação dos primeiros neurologistas, que consideravam a medula como simples sistema de transmissão da informação nociceptiva, está longe de ser verdade. Hoje se sabe que sistemas integrados estão presentes na medula espinhal, envolvendo a percepção e modulação dos estímulos nocivos e não nocivos (GUYTON e HALL, 1997; SMITH, 1984).

Os neurônios aferentes primários fazem sinapse com neurônios secundários na medula espinhal, mais especificamente nas lâminas I a V do corno dorsal. A liberação dos neurotransmissores nociceptivos das fibras aferentes primárias provoca ativação dos neurônios secundários no corno dorsal da medula. Esses neurônios secundários, por sua vez, fazem parte das vias que transmitem o estímulo

doloroso da medula para o encéfalo. A via mais importante de transmissão do estímulo nociceptivo na medula espinhal é o trato espinotalâmico ascendente (Figura 8), localizado na substância branca ventral contralateral ao local da estimulação. Como o próprio nome sugere, as fibras espinotalâmicas projetam-se para o tálamo, onde se dá a percepção de que existe uma sensação nociceptiva (GUYTON e HALL, 1997; BEAR et al., 2002).

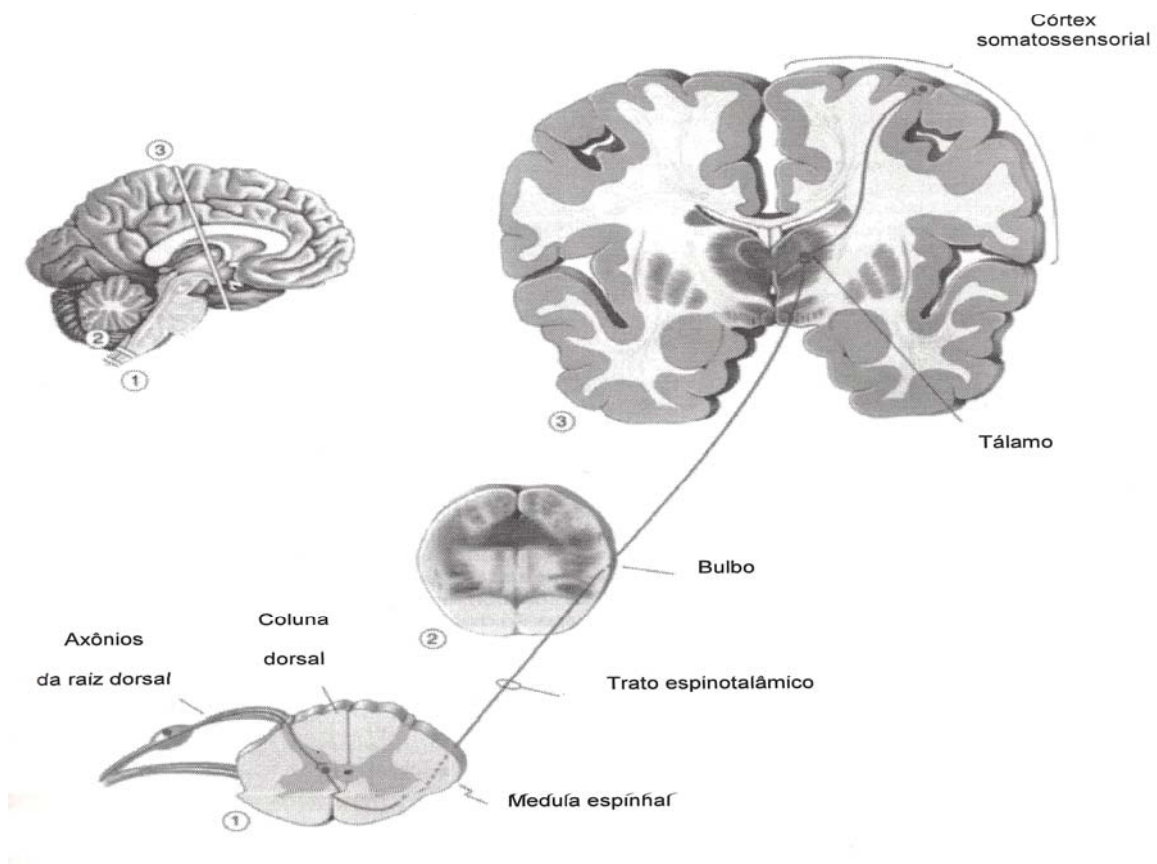


Figura 8 - A via espinotalâmica – principal via pela qual a informação da dor é transmitida ao tálamo e ao córtex.  
Fonte: Adaptado de BEAR et al., 2002.

O tratamento da dor é composto, basicamente, por dois grandes grupos de drogas analgésicas: os opióides, que são drogas derivadas do ópio e incluem a morfina, a codeína e uma ampla variedade de congêneres semi-sintéticos derivados deles, e as drogas antiinflamatórias não – esteroidais (DAINES). Embora os opióides sejam muito efetivos, principalmente no tratamento da dor aguda, sua utilização é limitada, pelo fato desses apresentarem muitos efeitos colaterais, como a constipação, náuseas, vômitos, broncoconstrição, hipotensão, bradicardia e

depressão respiratória. Além disso, a tolerância aos opióides instala-se rapidamente e a dependência física é visível após poucos dias de tratamento (MARTIN e SLOAN, 1977; RAINSFORD e VELO, 1992; REISINE e PASTERNAK, 1996).

As DAINES têm vantagem sobre os analgésicos opióides por não provocarem tolerância e dependência com o uso crônico. No entanto, também pode produzir efeitos indesejáveis como hemorragias, úlcera gástrica, falência renal e hepática, reações cutâneas, agranulocitose e crises asmáticas (NUKI, 1983; LARREGINA et al, 1994; BORNE, 1995). Estão entre as drogas mais largamente utilizadas de todos os agentes terapêuticos, e incluem uma grande variedade de drogas, de diferentes classes químicas (ácidos salicílicos, como o ácido acetil salicílico (AAS); ácidos propiônicos, como o naproxeno e o ibuprofeno; ácidos acéticos, como a indometacina; fenomatos, como o ácido mefenâmico; oxicans, como o piroxicam; pirazolonas, como a dipirona e a fenilbutazona; entre outros). A maioria das DAINES possui atividade antiinflamatória, analgésica e antipirética (RANG et al., 1995).

Vários modelos experimentais avaliam a nocicepção química em animais. O teste das contorções abdominais induzidas pelo ácido acético e o teste de formalina são os mais utilizados em camundongos (SANTOS et al, 1998).

O teste das contorções abdominais é um modelo de dor inflamatória visceral (dor tônica), e é usado como ferramenta na investigação de novos agentes antiinflamatórios e/ou analgésicos. A presença do ácido na cavidade peritoneal estimula diretamente as fibras de condução lenta (fibra C) produzindo uma dor lenta e sustentada, assim como uma reação inflamatória local, que contribui para a atividade nociceptiva. Apesar da indução da contorção no abdômen por ácido acético ser um modelo nociceptivo periférico, este não é específico, pois vários compostos tais como antidepressivos tetracíclicos e anti-histamínicos inibem a indução por ácido acético (MIRANDA et al, 2001).

O teste da formalina é um dos modelos de nocicepção induzida quimicamente. Este ensaio é um dos mais utilizados para evidenciar mecanismos de analgesia e dor, com melhores resultados dos que usam estímulos mecânicos e térmicos. A injeção intraplantar de formalina na pata de ratos e/ou camundongos representa, nos primeiros cinco minutos após sua administração (fase neurogênica), o efeito irritante da formalina nas fibras-C sensoriais e após quinze minutos da administração a resposta inflamatória da dor (fase inflamatória). Analgésicos com

ação central, como morfina, inibem ambas as fases. Já as drogas de ação periférica, tais como antiinflamatórios não esteróides e corticóides, inibem apenas a fase inflamatória (SHIBATA et al, 1989).

Segundo Elizabetsky e Castilhos (1990), nas últimas décadas, têm se concentrado esforços a procura de novas drogas analgésicas. Estima-se que os analgésicos sejam a maior categoria terapêutica, entretanto busca-se compostos com maior ação e menor efeito colateral. Os produtos naturais são importantes fontes de novas substâncias químicas analgésicas.

Muitas espécies de plantas são utilizadas como analgésicos, principalmente em dores crônicas como artrite reumatóide (MILLS e BONE, 2000). Miranda e colaboradores (2001) testaram o extrato aquoso da parte interna da casca de *Tabebuia avellanedae*, conhecida como pau d' arco, é utilizada no nordeste brasileiro como analgésico, antiinflamatório e antineoplásico. Administrações, por via oral (v.o.), de concentrações de 100, 200 e 400 mg/kg inibiram a nocicepção induzida por ácido acético. Já 200 e 400 mg/kg reduziram os efeito da formalina (1 %) apenas na fase inflamatória.

Segundo Santos e colaboradores (1998), o extrato hidroalcoólico (EH) de *Phyllanthus fraternus* (7,4 mg/kg), *Phyllanthus amarus* (0,3 mg/kg), *Phyllanthus orbiculatus* (1,8 mg/kg) e *Phyllanthus stipulatus* (26,5 mg/kg), administrado pela via intraperitoneal (i.p.), inibe as contorções abdominais e o efeito da formalina, em ambas as fases. Entretanto, as concentrações de 50 - 400 mg/kg administradas por v.o., demonstraram ser menos potentes e eficazes do que as administradas pela via i.p., comprovando que para essas espécies a via intraperitoneal é mais satisfatória que a via oral.

O decocto da casca da *Curatella americana* (cajueiro-bravo) é utilizado, no Brasil, no tratamento da úlcera gástrica. Moreira e colaboradores (1999) afirmam que o extrato hidroalcoólico (EHA) da casca dessa espécie apresenta atividade analgésica periférica e antiinflamatória. Adzu e colaboradores (2003) testaram a potência nociceptiva do extrato aquoso (EA) da *Sphaerantus senegalensis*, utilizada na Nigéria para aliviar dores reumáticas, e observaram que os efeitos foram significativos ( $p < 0,05$ ) quando comparados com o grupo controle.



Monsef e colaboradores (2004) avaliaram o EHA de sementes secas de *Peganum harmala*, rico em alcalóides. A dose administrada (30 mg/kg) induziu a redução da resposta a dor em 100%, nas duas fases do teste da formalina, sugerindo que alcalóides podem ser bons agentes antinociceptivos. Já Heidari e colaboradores (2005) afirmam que 100 mg/kg do extrato metanólico das pétalas de *Echium amoenum* induzem significativamente a redução da resposta a dor na segunda fase da formalina, quando comparado com o controle. Esse extrato apresenta antocianidinas, flavonóides e traços de alcalóides. Segundo Mills e Bone (2000), a presença de flavonóides em extratos de plantas têm demonstrado atividade analgésica *in vivo*.

Segundo Lipp (1989) e Elizabetsky (2003) o planejamento de um modelo experimental para comprovar uma propriedade terapêutica, das plantas utilizadas na medicina tradicional, deve considerar o contexto, já que os próprios conceitos de saúde e doença variam em cada cultura, portanto é fundamental conhecer suas formas específicas de cultivo, coleta, preparo e administração.

A inobservância de um efeito farmacológico em modelos experimentais, pode levar o pesquisador a duvidar das informações populares e rotular a espécie como placebo. Portanto, se, de um lado a pesquisa confirma o uso popular da planta, e contribui com subsídios de caráter científico, naquele sentido, a obtenção de alguns resultados negativos preliminares não assegura de modo absoluto sua ineficácia (ELIZABETSKY, 2003).

## **3 MATERIAL E MÉTODOS**

### **3.1 Material vegetal**

O material vegetal constitui-se de folhas íntegras e frescas da *Luehea divaricata* Martius, coletadas no município de Santa Maria/RS, no período de floração, que ocorre em dezembro devido às necessidades de luz do vegetal.

A identificação foi realizada no Departamento de Farmácia Industrial (DFI) da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), pelo biólogo Msc. Gilberto Dolejal Zanetti; e um exemplar encontra-se registrado no Herbário do Departamento de Farmácia Industrial (HDFI) pela exsicata HDFI 225.

### **3.2 Equipamentos e acessórios**

- Autoclave
- Alça de Cromo-Níquel
- Banho ultrassônico
- Capela de fluxo laminar horizontal
- Evaporador rotatório acoplado a banho d'água
- Estufa de secagem e esterilização
- Espectrofotômetro ultravioleta / visível
- Moinho de facas
- Seringa descartável
- Estufa bacteriológica
- Vidraria de laboratório

- Balança analítica e semi-analítica
- Placas de microdiluição
- Cromatofolhas de sílica gel G60 F<sub>254</sub>
- Pinça de metal
- Cilindros de inox
- Cubetas
- Frascos de Roux
- Pipetas automáticas
- Ponteiras

### **3.3 Solventes e reagentes**

- Cloreto 2, 3, 5 trifenil tetrazólio
- Hexano PA
- Clorofórmio PA
- Ácido Acético Glacial PA
- TWEEN 80
- Dimetilsufóxido (DMSO)
- Álcool metílico PA
- Acetato de etila PA
- Butanol PA
- Dimetilformamida

### 3.4 Substâncias de referência

- Amoxicilina – potência 978,09 µg/mg
- Nistatina – potência 2.464,38 UI/mg
- Sulfato de Morfina
- DPPH (2,2-difenil; 1-picrilhidrazila)
- β-caroteno
- Ácido linoléico
- Benzilpenicilina Potássica
- Sulfato de Gentamicina
- Cloranfenicol
- Nistatina
- Sulfato de Estreptomicina

### 3.5 Microorganismos

Para a determinação da atividade antimicrobiana, foram utilizadas cepas de microorganismos originários da American Type Culture Collection (ATCC) disponíveis no Departamento de Farmácia Industrial, CCS – UFSM (Tabela 1).

Tabela 1 – Microorganismos utilizados na determinação da Atividade Antimicrobiana da *Luehea divaricata* Martius.

<b>Microorganismos</b>	
<b><i>Staphylococcus aureus</i></b>	ATCC 6538p
<b><i>Staphylococcus epidermidis</i></b>	ATCC 12228
<b><i>Escherichia coli</i></b>	ATCC 11103
<b><i>Klebsiella pneumoniae</i></b>	ATCC 10031
<b><i>Candida albicans</i></b>	ATCC 44373
<b><i>Saccharomyces cerevisiae</i></b>	ATCC 2606

### 3.6 Animais

Foram utilizados camundongos albinos machos adultos (25 – 35 g), fornecidos pelo Biotério Central da UFSM, mantidos em ciclo claro-escuro natural, em temperatura de  $22 \pm 1^\circ\text{C}$ , com alimento e água *ad libitum*.

### 3.7 Meios de cultura

Os meios de cultura empregados para determinar atividade antimicrobiana frente aos extratos vegetais e padrões seguiram as recomendações do FDA (1996) modificado.

#### 3.7.1 Difusão em ágar

Meio para o antibiótico nº 01

Peptona .....	6,0 g
Caseína de digesto pancreático..	4,0 g
Extrato de levedura .....	3,0 g
Extrato de carne .....	1,5 g
Dextrose .....	1,0 g
Ágar .....	15,0 g
Água destilada q. s. p. ....	1000,0 ml

pH de 6,5 a 6,6, após a esterilização.

Meio para o antibiótico nº 2

Peptona .....	6,0 g
Extrato de levedura .....	3,0 g

Extrato de carne .....	1,5 g
Ágar .....	15,0 g
Água destilada q. s. p.....	1000,0 ml

pH de 6,5 a 6,6, após a esterilização.

#### Meio para antibiótico nº 5

Peptona.....	6,0 g
Extrato de levedura.....	3,0 g
Extrato de carne.....	1,5 g
Ágar.....	15,0 g
Ágar destilada q. s. p. ....	1000,0 ml

pH de 7,8 a 8,0 após a esterilização.

#### Meio para antibiótico nº 11

Peptona.....	6,0 g
Caseína de digesto pancreático...	4,0 g
Extrato de levedura.....	3,0 g
Extrato de carne.....	1,5 g
Dextrose.....	1,0 g
Ágar.....	15,0 g
Água destilada q. s. p.....	1000,0 ml

pH de 7,8 a 8,0 após a esterilização.

#### Meio para antibiótico nº 19

Peptona .....	9,4 g
Extrato de levedura .....	4,7 g

Extrato de carne .....	2,4 g
Cloreto de sódio .....	10,0 g
Ágar .....	23,5 g
Água destilada q. s. p.....	1000,0 ml

pH de 6,0 a 6,2, após a esterilização.

### 3.7.2 Bioautografia

#### Ágar simples

Cálcio nutriente .....	8,0 g
Ágar – ágar .....	15,0 g
Água destilada q. s. p.....	1000,0 ml

#### Ágar Mueller – Hinton

Infuso de carne .....	300,0 g
Caseína hidrolisada .....	17,5 g
Amido .....	1,5 g
Ágar – ágar .....	17,0 g
Água destilada q. s. p. ....	1000,0 ml

#### Caldo triptona – soja

Caseína tratada por suco pancreático .....	17,0 g
Farinha de soja por digestão papaínica .....	3,0 g
Dextrose .....	2,5 g
Fosfato de potássio dibásico .....	2,5 g
Cloreto de sódio .....	5,0 g

Água destilada q. s. p..... 1000,0 ml

### 3.7.3 Microdiluição em Caldo

#### Ágar BHI

Infusão de coração-cérebro .....	17,5 g
Digesto pancreático de gelatina .....	16,0 g
Dextrose .....	2,0 g
Cloreto de sódio .....	5,0 g
Fosfato dissódico .....	2,5 g
Ágar .....	15,0 g
Água destilada q. s. p. ....	1000,0 ml

Os componentes foram misturados e fervidos para efetuar a solução, seguindo-se esterilização por autoclavação a 120°C por 15 minutos.

#### Ágar Sabouraud

Peptona .....	10,0 g
Dextrose .....	20,0 g
Ágar .....	15,0 g
Ágar destilada q. s. p. ....	1000,0 ml

Os componentes foram misturados e fervidos para efetuar a solução, seguindo-se a esterilização por autoclavação a 120°C por 15 minutos.

#### Caldo Mueller-Hinton

Infusão desidratada de carne .....	17,5 g
Hidrolisado de caseína .....	10,0 g
Amido .....	2,0 g



Água destilada q. s. p. .... 1000,0 ml

Os componentes sólidos foram solubilizados em água, fundidos e esterilizados em autoclave a 120°C por 15 minutos.

#### Caldo Yeast Nitrogen Base (YNB) Tamponado

YNB .....	6,7 g
L-asparagina .....	1,5 g
Dextrose .....	10,0 g
Tampão de fosfato (pH 7,0) q. s. p. ....	100,0 ml

### 3.8 Preparo do material vegetal, extratos e fracionamento

O material coletado foi desidratado em estufa ( $\pm 25^{\circ}\text{C}$ ) e triturado à grosso modo. Após pulverizado em moinho de facas, a droga foi armazenada em frasco âmbar para posterior obtenção dos extratos.

A droga em pó foi macerada a frio por 14 dias, em metanol. Após foi retirado o solvente em evaporador rotatório a vácuo obtendo-se um resíduo seco. O resíduo foi retomado em água e submetido a fracionamento por extração seqüencial com solventes de polaridade crescente, obtendo-se as frações hexânica, clorofórmica, acetato de etila e butanólica (Figura 9).

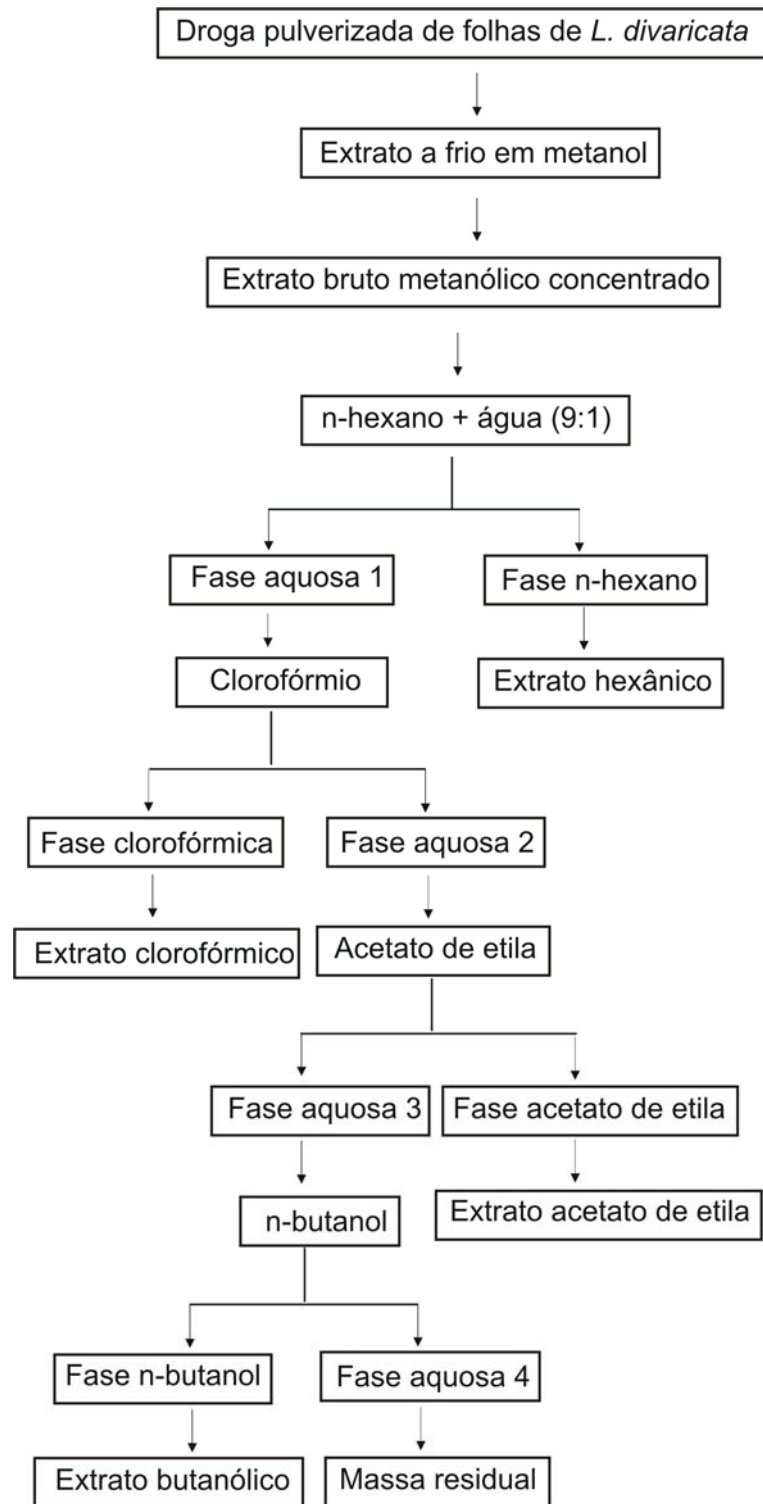


Figura 9 – Protocolo Experimental de Partição Líquido-Líquido e Obtenção das Frações Orgânicas da *Luehea divaricata* Martius (açoita-cavalo).

### **3.9 Atividade antimicrobiana**

#### 3.9.1 Difusão em ágar

##### 3.9.1.1 Preparação das suspensões

###### 3.9.1.1.1 Suspensão bacteriana

Os microorganismos utilizados foram mantidos em tubo de ensaio contendo 10 ml de meio para antibiótico nº 1. Para o desenvolvimento dos ensaios foram efetuadas novas culturas, em tubos com o mesmo meio, durante 24 horas, a temperatura de 32 - 35°C. As culturas crescidas sob os meios inclinados foram submetidas à lavagem com 0,6 ml de solução fisiológica estéril. Os lavados foram transferidos para superfície de frasco de Roux contendo 50 ml de meio para antibiótico nº 01, que foi incubado à temperatura de 32 - 35°C durante 24 horas. A superfície do ágar foi lavada com cerca de 6 ml de solução fisiológica estéril. Para a padronização do inóculo, dilui-se a suspensão de germes com solução fisiológica estéril até a obtenção de transmitância de 25%, em espectrofotômetro, no comprimento de onda de 580 nm, utilizando-se tubos de leitura com 13 mm de diâmetro. As suspensões foram estocadas sob refrigeração, durante uma semana. A quantidade de microorganismo padronizado, inoculado em meio, utilizado como camada semeada, foi a sugerida pelo Code of Federal Regulation (1996), modificado.

###### 3.9.1.1.2 Suspensão de fungos

Os microorganismos utilizados foram mantidos em tubo de ensaio inclinado contendo 10 ml de meio para antibiótico nº 19. As culturas crescidas sobre os meios inclinados foram submetidas a lavagem com 0,6 ml de solução fisiológica estéril. Os lavados foram transferidos para superfície de frasco de Roux contendo 50 ml de

meio para antibiótico nº 19, estéril, que foi incubado à temperatura de 25 - 30°C, durante 48 horas. A superfície do ágar foi lavada com 6 ml de solução fisiológica estéril até a obtenção de transmitância de 25% em espectrofotômetro no comprimento de onda de 580 nm, utilizando-se tubos de leitura com 13 mm de diâmetro. As suspensões foram estocadas, sob refrigeração, durante quatro semanas. A quantidade de microorganismo padronizado, inoculado em meio, utilizado como camada semeada, foi sugerida pelo Code of Federal Regulation (1996).

### 3.9.1.2 Preparação das placas para o ensaio

#### 3.9.1.2.1 Camada básica

Para a realização dos ensaios individuais, transferiu-se 21 ml do meio após sua esterilização, para cada placa de Petri, disposta em superfície rigorosamente plana, com tampa levemente entreaberta, para evitar a condensação de água evaporada e permitir a solidificação do meio.

#### 3.9.1.2.2 Camada semeada

Para a realização dos ensaios individuais, o meio indicado para a camada semeada foi colocado em banho-maria (48 - 50°C), imediatamente após sua autoclavação. Na temperatura indicada, adicionou-se a suspensão padronizada do microorganismo, após homogeneização foram transferidos 4 ml do meio inoculado para cada placa de Petri contendo a camada base.

### 3.9.1.3 Preparação das amostras

#### 3.9.1.3.1 Extrato metanólico e frações

No balão volumétrico de 10,0 ml foi diluída a amostra (800 mg) em 4,0 ml de dimetilformamida, e completou-se o volume com água destilada estéril. A partir dessa, obteve-se as concentrações de 20,0 mg/ml, 40,0 mg/ml e 80,0 mg/ml, quando a razão entre as doses era 2 (gentamicina e estreptomicina); 24,2 mg/ml, 44,0 mg/ml e 80,0 mg/ml quando a razão entre as doses era 1,82 (nistatina); 32,77 mg/ml, 51,2 mg/ml e 80,0 mg/ml quando a razão entre as doses era 1,56 (penicilina e cloranfenicol).

#### 3.9.1.4 Preparação das soluções padrões

As soluções padrões foram preparadas de acordo com a F. Bras. IV (1988) e FDA (1996), com modificações.

##### 3.9.1.4.1 Solução padrão de benzilpenicilina potássica

No balão volumétrico de 50 ml foram colocados 31 mg de benzilpenicilina potássica e completou-se o volume com solução tampão fosfato de potássio a pH 6,0, de modo a obter a concentração de 1000 UI/ml. Através de diluições com o mesmo diluente, prepararam-se as concentrações de 0,64 UI/ml, 1,0 UI/ml e 1,56 UI/ml.

##### 3.9.1.4.2 Solução padrão de sulfato de gentamicina

O Sulfato de gentamicina (32,78 mg), previamente dissecado, foi transferido para o balão volumétrico de 20 ml e completou-se com solução tampão fosfato de

potássio pH 8,0, de modo a obter a concentração de 1 mg/ml. Através de diluições com o mesmo diluente, prepararam-se as concentrações de 1 µg/ml, 2 µg/ml, 4 µg/ml.

#### 3.9.1.4.3 Solução padrão de cloranfenicol

Em balão volumétrico de 50 ml foram colocados 25,10 mg de cloranfenicol e adicionou-se o álcool etílico 95 % a concentração de 10.000 µg/ml e completou-se o volume com água destilada, de modo a obter a concentração de 1 mg/ml. Através de diluições com o mesmo diluente, prepararam-se as concentrações de 0,64 µg/ml, 1,0 µg/ml e 1,56 µg/ml.

#### 3.9.1.4.4 Solução padrão de sulfato de estreptomicina

No balão volumétrico de 50 ml foram colocados 36,65 mg de sulfato de estreptomicina previamente dessecados e completou-se o volume com água destilada, de modo a obter a concentração de 1,0 mg/ml. Através de diluições com o mesmo diluente, prepararam-se as concentrações de 3,2 µg/ml, 6,4 µg/ml e 12,8 µg/ml.

#### 3.9.1.4.5 Solução padrão de nistatina

No balão volumétrico de 100 ml foram colocados 18,57 mg de nistatina, previamente dessecados, e completou-se o volume com dimetilformamida até concentração de 1000 UI/ml. Através de diluições com o tampão fosfato pH 6,0, preparou-se as concentrações de 30,0 UI/ml, 54,6 UI/ml e 99,4 UI/ml.

## 3.9.1.5 Esquema dos ensaios

Tabela 2 – Protocolo do Ensaio Microbiológico por Difusão em Ágar

Microorganismo	Padrão Referência	Meio Camada Base	Meio Camada Semeada	Volume Inóculo em ml/100 ml meio	Temperatura de Incubação (°C)
<b><i>S. aureus</i></b>	Benzilpenicilina potássica	1	1	1,0	32 - 35
<b><i>S. epidermidis</i></b>	Sulfato de gentamicina	11	11	0,03	36 - 37,5
<b><i>E. coli</i></b>	Cloranfenicol	1	1	0,7	36 - 37,5
<b><i>K. pneumoniae</i></b>	Sulfato de estreptomicina	5	5	0,1	36 - 37,5
<b><i>C. albicans</i></b>	Nistatina	19	19	1,0	29 - 31
<b><i>S. cerevisiae</i></b>	Nistatina	19	19	1,0	29 - 31

## 3.9.1.6 Execução do ensaio

Para cada amostra foram feitas seis repetições, com cada microorganismo. No meio adicionado às placas foram efetuados seis orifícios com 9 mm de diâmetro, dispostos aproximadamente a intervalos de 60° e com raio de 2,8 cm. Foram adicionados 100 µl de cada uma das diluições do padrão (antimicrobiano), preparadas conforme o item 3.8.2.5 em três concentrações diferentes e denominadas P<sub>1</sub>, P<sub>2</sub>, P<sub>3</sub>; já as amostras obtidas a partir do Extrato Bruto (EB) e frações em três concentrações diferentes foram denominadas A<sub>1</sub>, A<sub>2</sub>, A<sub>3</sub>. As placas permaneceram 10 minutos em temperatura ambiente antes da incubação, para a difusão dos padrões e amostras no meio de cultura. Estas foram incubadas durante 16-18 horas à temperatura indicada na Tabela 2. Após a incubação, efetuou-se a medida dos diâmetros das zonas de inibição em mm, com auxílio de um paquímetro digital. Foram determinadas as médias das zonas de inibição do padrão e da amostra para cada ensaio. Os ensaios foram realizados conforme a metodologia descrita na F. Bras. IV (1988) e no Code of Federal Regulations (1996) com modificações.

### 3.9.2 Bioautografia

#### 3.9.2.1 Suspensões microbianas

Para a obtenção dos inóculos, as culturas de microorganismos indicadoras foram transferidas, com o auxílio de uma alça de cromo-níquel, para tubos de ensaio contendo 5,0 ml de caldo triptona-soja, padronizado pela escala de MacFarland. Assim, obteve-se um inóculo contendo aproximadamente  $10^6$  UFC/ml, equivalente a metade da escala 1 de MacFarland, utilizada na proporção de 0,5% ao meio de ágar Mueller-Hinton.

#### 3.9.2.2 Determinação da atividade antimicrobiana

A atividade antimicrobiana das frações foi determinada pelo método de bioautografia conforme Hamburger e Cordell (1987) e Rahalison e colaboradores (1991). Utilizou-se bactérias Gram-positivas, Gram-negativas e fungos, e como padrão a amoxicilina (978,09  $\mu$ g/ml) e nistatina (2464, 38 UI/mg), preparados conforme FDA (1996).

As cepas dos microorganismos foram repicadas de 15 em 15 dias em tubos de ensaio com ágar simples, inclinados e incubados a 37°C por 24 horas, e mantidos em temperatura ambiente.

O ensaio de bioautografia foi realizado em placas de Petri (10 x 100 mm de diâmetro). Em cada placa de Petri, depositou-se uma cromatoplaça de sílica gel G60 F<sub>254</sub> de 50 x 60 mm com cromatogramas desenvolvidos com o sistema de solventes clorofórmio: metanol (80:20).

Adicionou-se 10 ml do meio de cultura inoculado com o microorganismo indicador, e liquefeito, sobre o cromatograma. Após solidificação do meio, as placas de Petri foram incubadas a 35°C, por 24 horas, para bactérias e a 25°C, por 48 horas, para fungos. Decorrido o período de incubação, os cromatogramas foram revelados com uma solução aquosa de cloreto de 2, 3, 5 trifenil tetrazólio (20 mg/ml)



e incubadas à 35°C por 2 - 4 horas. Após este período os halos de inibição foram visualizados, e registrado fotograficamente.

### 3.9.3 Microdiluição em caldo

#### 3.9.3.1 Técnica M-27A do NCCLS (1997) de microdiluição em caldo para avaliação da concentração inibitória mínima (CIM) frente a fungos leveduriformes

A técnica M-27A é utilizada na determinação da suscetibilidade de leveduras a agentes antifúngicos. O ensaio foi realizado em duplicata, e utilizado como padrão um controle de crescimento positivo. O teste foi adaptado para bactérias, alterando-se apenas o meio de cultura, o tempo e a temperatura de incubação da placa.

#### 3.9.3.2 Preparação das placas de microdiluição para os testes

Para a execução dos testes foram utilizadas placas de microdiluição com cavidades cuja capacidade é de até 500 µl, dispostas em 8 linhas e 12 colunas, num total de 96 cavidades. As placas e suas tampas foram primeiramente lavadas numa solução de hipoclorito a 10% através de movimentos repetidos, mergulhando-se e retirando-se da solução alternadamente, por 10 vezes. A seguir, placas e tampas foram secas a 32°C. Após a secagem, foram colocados em capela de fluxo laminar sob luz ultravioleta – C por um período mínimo de 1 hora, para esterilização. Depois de esterilizadas, as placas foram enroladas em papel e armazenadas até o momento de serem utilizadas.

### 3.9.3.3 Preparação da amostra para a avaliação da atividade antimicrobiana

Uma alíquota do extrato metanólico e das frações foi dissolvida em uma mistura de DMSO: TWEEN 80 a 0,5% (1:4) de maneira a se obter uma solução estoque a 25 mg/ml.

A solução estoque foi diluída no meio de cultura, para se obter as concentrações intermediárias de 10.000, 5.000, 2.000, 1.000, 500, 100 e 50  $\mu\text{g/ml}$ , de maneira que as concentrações finais testados foram 5.000, 2.500, 1.000, 500, 250, 50 e 25  $\mu\text{g/ml}$ .

### 3.9.3.4 Preparação do inóculo

As leveduras foram inoculadas em tubos com ágar Sabouraud e incubadas a 30°C durante 24 horas. A seguir, foi preparada uma suspensão de microorganismos em salina 0,85% estéril, ajustando-se a turvação de acordo com a escala (0,5) de MacFarland. A suspensão de levedura foi diluída no caldo YNB diluído a 1:50 e novamente a 1: 20.

A preparação do inóculo das espécies bacterianas foi realizada da mesma forma, substituindo-se apenas os meios ágar Sabourand e YNB por ágar BHI e caldo Mueller-Hinton, respectivamente.

### 3.9.3.5 Inoculação no meio de cultura

Cada cavidade da placa de microdiluição já contendo 0,1 ml da concentração da droga teste, foi inoculada com 0,1 ml de suspensão de microorganismos. A cavidade do controle positivo continha 0,1 ml do inóculo e 0,1 ml do meio, sem a droga teste. Após inoculação, a placa foi fechada, identificada e inoculada conforme período de tempo preconizado pela metodologia para cada microorganismo. O teste foi realizado em duplicata.

### 3.9.3.6 Incubação

As microplacas inoculadas com bactérias foram incubadas a 35°C por 24 horas; já as inoculadas com fungos leveduriformes foram incubados a 30°C por 48 horas, ou até que o movimento do controle positivo pudesse ser evidenciado.

### 3.9.3.7 Leitura do teste

A leitura foi realizada após o período de incubação, mediante composição visual com o controle de crescimento positivo, determinando-se como CIM a menor concentração da substância testada onde não foi visualizado crescimento do microorganismo.

## 3.10 Atividade antioxidante

### 3.10.1 Determinação da atividade antioxidante pelo método do DPPH

A avaliação da atividade antioxidante pelo método fotolorimétrico do DPPH (2,2-difenil; 1-picrilhidrazila), seguiu a metodologia de Kulisic e colaboradores (2004) modificada.

No ensaio foram preparadas soluções de 200; 100; 50; 25; 125; 6,25; 3,125; 1,5625 µg/ml do extrato metanólico e das frações, em metanol. A 2,5 ml das amostras, adicionou-se 1 ml da solução de DPPH em metanol. Após 1 hora foram feitas as leituras das absorbâncias a 517 nm, cujo radical apresenta o máximo de absorção.

Uma solução de DPPH (1 ml,  $6 \times 10^{-5}$  M) em 2,5 ml de metanol foi usada como controle negativo; e como branco foi utilizada uma solução do extrato metanólico e das frações (2,5 ml, 200 µg/ml) em 1 ml de metanol. Uma preparação de quercetina em metanol foi utilizada, como padrão nas mesmas concentrações das amostras. O

ensaio foi realizado em triplicata e a média das absorvâncias, de cada amostra, foi calculada.

A percentagem de inibição do radical DPPH, pelas amostras, foi calculada de acordo com a fórmula:

$$\% \text{ Inibição} = ((A_{C(o)} - A_{A(T)}) / A_{C(o)}) \times 100$$

Onde:

- $A_{C(o)}$  é a absorvância do controle negativo no  $t = 0$  min;
- $A_{A(T)}$  é a absorvância da amostra no  $t = 60$  min.

### 3.10.2 Determinação da atividade antioxidante pelo método do $\beta$ -Caroteno-Linolenato

A atividade antioxidante do extrato bruto e das frações também foi avaliada pelo método do  $\beta$ -caroteno-linolenato utilizando-se espectrofotometria UV/Visível, conforme Mokbel e Hashinaga (2006).

Uma emulsão foi preparada com 3,34 mg de  $\beta$ -caroteno, 40 mg de ácido linoleico, 400 mg de TWEEN 40 e 1 ml de clorofórmio. Após evaporação do clorofórmio, adicionou-se 100 ml de  $H_2O_2$  0,01 M, sob agitação vigorosa.

Em tubos de ensaio, colocou-se 2 ml da emulsão e 100  $\mu$ l do extrato bruto e das frações a 50; 25; 12,5  $\mu$ g/ml, em metanol. Foi feito um controle com 2 ml da emulsão e 100  $\mu$ l de metanol, e um branco a partir de uma emulsão sem  $\beta$ -caroteno.

Durante o ensaio, os tubos foram mantidos em banho-maria a 50°C. As leituras de cada amostra foram realizadas de quinze em quinze minutos, durante cento e vinte minutos, a 470 nm. O ensaio foi realizado em triplicata e as médias das absorvâncias foram calculadas. A percentagem de inibição foi calculada a partir da fórmula:

$$\% \text{ Inibição} = \left[ \frac{A_{A(120)} - A_{C(120)}}{A_{C(0)} - A_{C(120)}} \right] \times 100$$

Onde:

$A_{C(0)}$  = absorbância do controle no  $t = 0$  min;

$A_A(120)$  = absorbância da amostra no  $t = 120$  min;

$A_C(120)$  = absorbância do controle no  $t = 120$  min.

### 3.11 Atividade antinociceptiva

#### 3.11.1 Preparação dos reagentes

Todas as drogas foram preparadas no mesmo dia da realização do experimento. O volume administrado, para cada camundongo, obedeceu a relação de 10 ml/kg.

##### 3.11.1.1 Solução de ácido acético 0,8 %

O ácido acético 0,8 % foi preparado em água destilada, a partir de uma solução de ácido acético glacial P.A.

##### 3.11.1.2 Solução de indometacina

Foi preparada uma solução aquosa de bicarbonato a 5 %, na qual a indometacina foi dissolvida numa concentração de 7 mM.

### 3.11.1.3 Solução de morfina

Foi preparada uma solução, na concentração de 650  $\mu\text{M}$  (usada no Teste da Formalina), em TWEEN 80 5 %, em salina.

### 3.11.1.4 Solução de formalina 1,5 %

A solução de formalina 1,5 % foi preparada a partir de uma solução de formaldeído a 37 % P.A., utilizando-se água ultrapurificada como veículo. O formaldeído 37 % foi previamente filtrado em papel filtro analítico e a solução de formalina 1,5 % foi preparada a partir desse filtrado.

## 3.11.2 Testes comportamentais

### 3.11.2.1 Teste das contorções abdominais

Uma hora após a administração de 250; 500 e 1000 mg/kg, denominadas respectivamente  $T_1$ ,  $T_2$ ,  $T_3$  do extrato bruto ou veículo (água), por via oral (10 ml/kg), os camundongos foram submetidos ao teste das contorções abdominais, realizado conforme Hayashi e Takemori (1971). Os animais receberam injeção intraperitoneal (i.p.) de ácido acético a 0,8 %, e 5 minutos após foram transferidos para um campo aberto (arena retangular medindo 28 x 18 x 12 cm, dividida em 15 quadrados de igual tamanho). Durante dez minutos, observou-se o número de contorções abdominais. A contorção era considerada quando havia contração dos músculos abdominais, seguida de alongamento do corpo e estiramento das patas traseiras. O ensaio foi feito em triplicata, com um  $n = 8$  para cada amostra, e a média do número de contorções foi calculada.

### 3.11.2.2 Teste da formalina

O experimento foi conduzido de acordo com Hunskaar e Hole (1987). Os camundongos receberam 250; 500; 1000 mg/kg denominadas respectivamente T<sub>1</sub>, T<sub>2</sub>, T<sub>3</sub> do extrato bruto ou veículo (água), por via oral (10 ml/kg). Uma hora após, injetou-se subcutaneamente 20 µl de formalina 1,5 % na pata traseira direita dos animais. Imediatamente após a injeção de formalina, os animais foram transferidos para um campo aberto e foi observada a duração do comportamento de lambar a pata injetada durante 30 minutos. O intervalo de 0 - 5 minutos foi considerado como fase neurogênica, e o intervalo de 5-30 minutos foi adotado como fase inflamatória. Nesse experimento, a morfina (6,5 µmol/kg, i.p.) foi utilizada como controle positivo (SHIBATA et al., 1989). O ensaio foi feito em triplicata, com um n = 8 para cada amostra, e a média dos tempos da fase neurogênica e inflamatória foi calculada.

### 3.12 Análise estatística

Os resultados obtidos pelo método difusão em ágar e contorções abdominais induzidas por ácido acético foram analisados por análise de variância (ANOVA), e as diferenças mínimas significativas pelo teste de Tukey. O nível de significância foi de 5 %.

## 4 RESULTADOS

### 4.1 Extração e fracionamento

O extrato metanólico obtido de folhas (2700 g) secas e moídas teve um rendimento de 303 g. As frações hexânica, clorofórmica, acetato de etila e butanólica obtidas por extração seqüencial renderam respectivamente 11,32; 2,34; 4,05; 17,82 %.

### 4.2 Atividade antimicrobiana

O extrato bruto e as frações hexânica, clorofórmica, acetato de etila e butanólica apresentaram atividade antimicrobiana pelo método de difusão em ágar (Figura 10), bioautografia e microdiluição em caldo.

#### 4.2.1 Difusão em ágar

As amostras empregadas para avaliar a atividade antimicrobiana induziram a formação de halos de inibição determinando a sensibilidade dos microorganismos testados (Tabelas 3 - 6). O extrato bruto e as frações da *Luehea divaricata* Martius foram testadas frente a *Candida albicans* ATCC 44373 e *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 2606 mas não apresentaram halo de inibição.



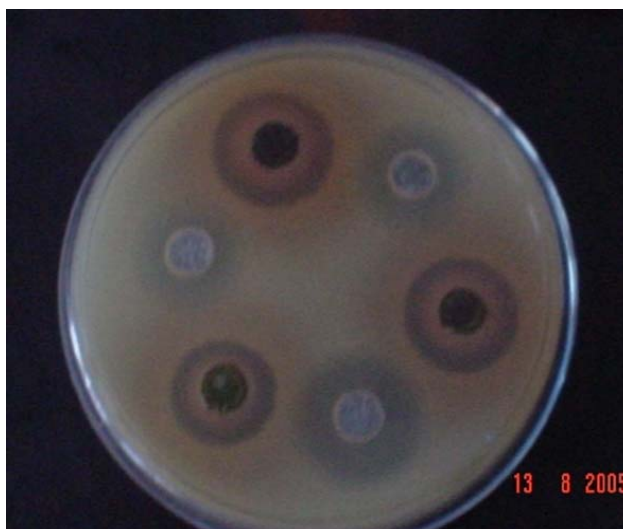


Figura 10 – Fotografia do ensaio microbiológico por Difusão em Ágar.

Tabela 3 – Perfil de suscetibilidade de *S. aureus* ATCC 6538p ao extrato bruto (EB), as frações da *L. divaricata* Martius e a benzilpenicilina potássica.

Tratamento	EB	Fr. Hex	Fr. CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	Fr. AcOEt	Fr. ButOH
P1	19,17	19,30	19,54	30,62	30,62
A1	14,22	12,73	12,62	15,76	15,22
P2	20,75	21,30	20,02	31,82	32,08
A2	15,96	14,37	13,98	16,63	16,51
P3	23,16	22,26	20,90	32,70	33,94
A3	17,16	15,27	15,01	17,92	17,65
CV	17,81%	22,50%	20,87%	34,00%	32,18%

Obs.: As médias foram comparadas pela ANOVA e as diferenças mínimas significativas pelo teste de Tukey. O nível de significância foi de 5 % ( $p < 0.0001$ ).

Tabela 4 - Perfil de suscetibilidade de *S.epidermidis* ATCC 12228 ao extrato bruto (EB), as frações da *L. divaricata* Martius e ao sulfato de gentamicina.

Tratamento	EB	Fr. Hex	Fr. CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	Fr. AcOEt	Fr. ButOH
P1	8,80	9,60	17,98	15,33	14,85
A1	11,55	9,72	19,38	14,55	14,55
P2	10,22	10,53	20,82	17,21	16,20
A2	14,49	12,02	22,30	16,98	16,22
P3	11,76	11,49	24,53	20,09	18,98
A3	17,34	14,19	24,46	18,88	17,98
CV	24,96%	15,32%	12,42%	12,14%	10,53%

Obs.: As médias foram comparadas pela ANOVA e as diferenças mínimas significativas pelo teste de Tukey. O nível de significância foi de 5 % ( $p < 0.0001$ ).

Tabela 5 - Perfil de suscetibilidade de *E. coli* ATCC 11103 ao extrato bruto (EB), as frações da *L. divaricata* Martius e ao cloranfenicol.

Tratamento	EB	Fr. Hex	Fr. CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	Fr. AcOEt	Fr. ButOH
P1	19,67	21,86	19,25	21,21	19,46
A1	17,36	18,16	18,90	21,01	21,47
P2	21,02	23,49	20,97	21,96	21,11
A2	20,28	18,53	17,83	20,20	24,56
P3	22,46	22,46	18,90	22,81	21,78
A3	19,82	20,43	19,72	22,53	24,03
CV	8,39%	10,38%	5,42%	4,59%	9,35%

Obs.: As médias foram comparadas pela ANOVA e as diferenças mínimas significativas pelo teste de Tukey. O nível de significância foi de 5% ( $p < 0.0001$ ).

Tabela 6 - Perfil de suscetibilidade de *K. pneumoniae* ATCC 10031 ao extrato bruto (EB), as frações da *L. divaricata* Martius e ao sulfato de estreptomicina.

Tratamento	EB	Fr. Hex	Fr. CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	Fr. AcOEt	Fr. ButOH
P1	11,18	12,37	11,45	17,20	14,41
A1	17,89	12,18	11,88	15,44	16,51
P2	16,35	16,56	16,19	19,80	19,12
A2	16,48	14,92	15,70	18,16	18,73
P3	20,13	20,61	19,89	23,07	22,60
A3	19,38	16,97	16,68	22,02	21,43
CV	18,85%	20,37%	20,76%	15,11%	16,13%

Obs.: As médias foram comparadas pela ANOVA e as diferenças mínimas significativas pelo teste de Tukey. O nível de significância foi de 5% ( $p < 0.0001$ ).

#### 4.2.2 Bioautografia

Os microorganismos *S. aureus*, *S. epidermidis*, *E. coli* e *K. pneumoniae* apresentaram sensibilidade às frações hexânica, clorofórmica, acetato de etila e butanólica pelo método de bioautografia (Figura 11 A – B). As amostras testadas não foram ativas frente a *Candida albicans* ATCC 44373 e *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 2606.

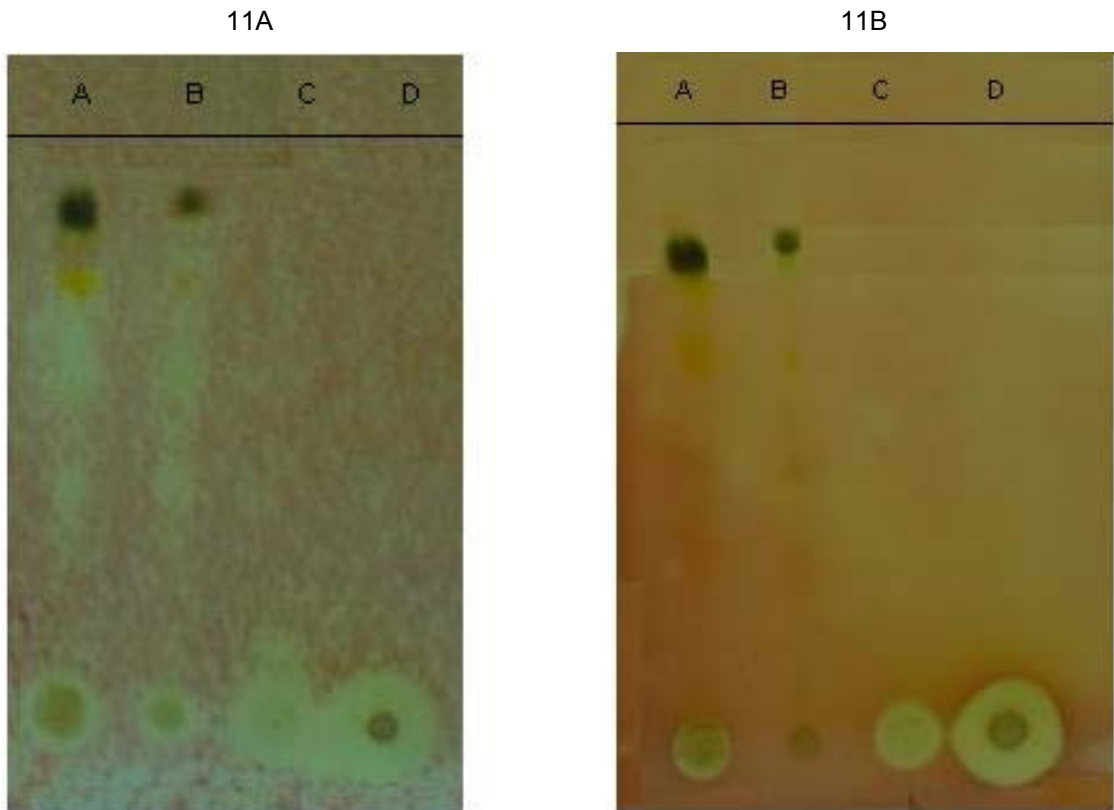


Figura 11 – Bioautografia das frações do extrato bruto das folhas da *Luehea divaricata* Martius. 11A – *E. coli*; 11B – *S. aureus*. Legenda: A – fração hexânica; B – fração clorofórmica; C – fração acetato de etila; D – fração butanólica.

#### 4.2.3 Microdiluição em caldo

Os valores da Concentração Inibitória Mínima (CIM) do extrato bruto e das frações frente aos microorganismos testados foram determinados por microdiluição em caldo (Tabela 7). Já para as frações hexânica e clorofórmica não foi possível observar atividade antimicrobiana frente as cepas testadas, por esse método.

Tabela 7 – Perfil de suscetibilidade de *S. aureus*, *E. coli*, *K.pneumoniae*, *C. albicans*, *S. cerevisiae* ao extrato bruto e as frações acetato de etila e butanólica da *L. divaricata* Martius.

Microorganismos	CIM ( $\mu\text{g/ml}$ )		
	EB	Fr. AcOEt	Fr. ButOH
<i>S. aureus</i>	375	500	500
<i>E. coli</i>	1500	500	500
<i>K. pneumoniae</i>	750	250	250
<i>C. albicans</i>	750	1000	1000
<i>S. cerevisiae</i>	1500	2000	2000

### 4.3 Atividade antioxidante

O extrato bruto e as frações hexânica, clorofórmica, acetato de etila e butanólica apresentaram atividade antioxidante pelo método DPPH (Figura 12) e  $\beta$ -caroteno-linolenato (BCB) (Figura 13).

#### 4.3.1 Método DPPH

As absorvâncias da substância controle (quercetina), do extrato bruto e das frações hexânica, clorofórmica, acetato de etila e butanólica, depois de 30 minutos em contato com a solução de DPPH em metanol, foram obtidas por espectrofotômetro UV-Vísivel. A partir dessas foi obtido o percentual de inibição, que corresponde a atividade antioxidante das amostras testadas (Tabela 8).

Tabela 8 – Atividade Antioxidante pelo método DPPH expresso em porcentagem de inibição do extrato bruto e das frações da *L. divaricata* Martius.

Concentração da amostra (µg/ml)	Quercetina	EB	Fr. Hex	Fr. CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	Fr. AcOEt	Fr. ButOH
25,00	93,54	91,06	90,33	26,20	89,64	91,14
12,50	78,14	73,36	88,76	17,86	90,93	91,64
6,25	41,48	36,90	51,01	12,98	65,00	86,72
3,125	22,68	14,78	25,74	7,98	34,00	51,17

Obs.: Valores em porcentagem de inibição do oxidante.

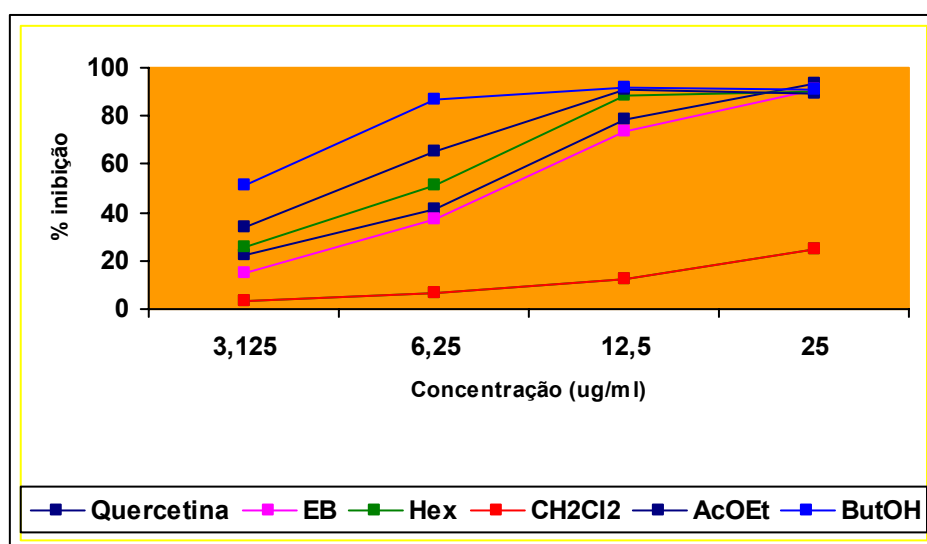


Figura 12 – Percentual da atividade antioxidante da substância controle, do extrato bruto e das frações da *Luehea divaricata* Martius frente ao oxidante DPPH.

#### 4.3.2 Método $\beta$ -caroteno-linolenato

As absorbâncias da substância controle (quercetina), do extrato bruto e das frações hexânica, clorofórmica, acetato de etila e butanólica, foram obtidas de 15 em 15 minutos durante 2 horas por espectrofotômetro UV-Vísivel. A partir dessas foi calculado o percentual de inibição, que corresponde a atividade antioxidante das amostras testadas (Tabela 9).

Tabela 9 - Atividade Antioxidante pelo método  $\beta$ -caroteno-linolenato expresso em percentagem de inibição do extrato bruto e das frações (25  $\mu\text{g/ml}$ ) da *L. divaricata* Martius.

Tempo	% Inibição					
	Quercetina	EB	Fr. Hex	Fr. $\text{CH}_2\text{Cl}_2$	Fr. AcOEt	Fr. ButOH
00'	100	100	85	81	100	100
15'	81	100	55	44	100	100
30'	77	90	46	27	90	64
45'	62	42	40	20	38	29
60'	51	25	29	1	20	11
75'	48	16	24	—	7	1
90'	38	9	18	—	1	—
105'	25	1	16	—	—	—
120'	18	—	9	—	—	—

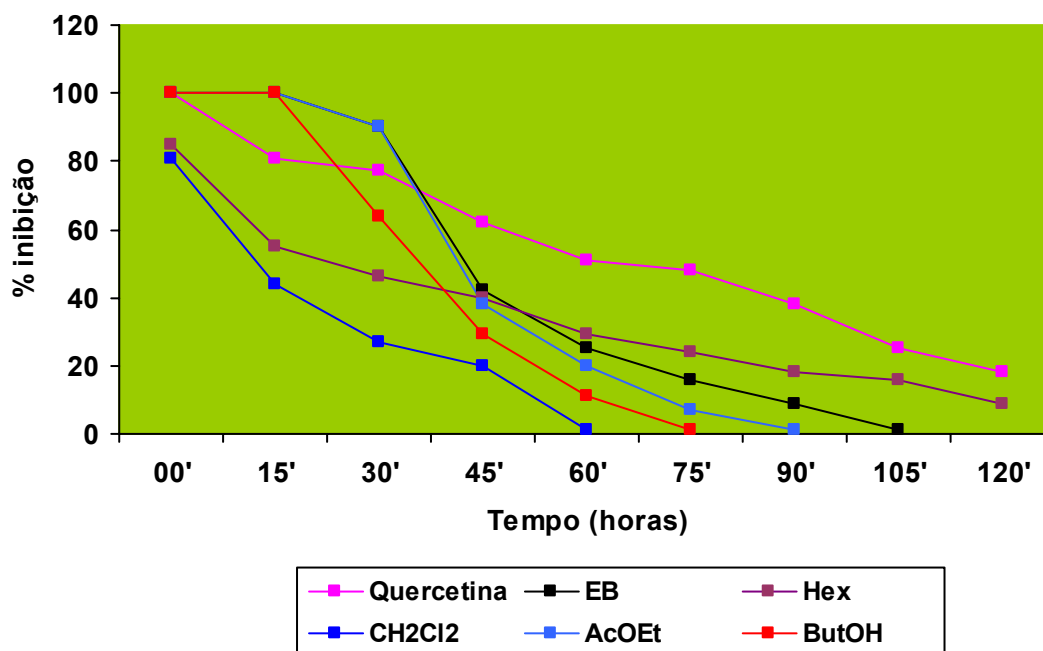


Figura 13 – Percentual da atividade antioxidante da substância controle, do extrato bruto e das frações das folhas da açoita-cavalo avaliados pelo método  $\beta$  – caroteno – linolenato.

### 4.3.3 Atividade antinociceptiva

O extrato bruto (1000 mg/kg) das folhas da *Luehea divaricata* Martius apresentou atividade antinociceptiva pelo teste das contorções abdominais induzidas pelo ácido acético 0,8 %. Pelo teste da formalina apresentou atividade negativa na Fase Neurogênica e positiva na Fase Inflamatória.

#### 4.3.3.1 Teste das contorções abdominais

O ensaio foi feito em triplicata, com um n = 8 para cada amostra, e a média do número de contorções foi calculada e comparado pela ANOVA (Tabela 10).

Tabela 10 – Efeitos da administração do extrato metanólico da *Luehea divaricata* Martius sobre o número de contorções abdominais induzidas por ácido acético 0,8%, em camundongos.

Tratamento (p.o.)	Número de Contorções
Veículo	32,66
T <sub>1</sub>	31,08
T <sub>2</sub>	27,25
T <sub>3</sub>	15,95
Indometacina (100mg/kg)	12,70
CV	33,55%

Obs.: As médias foram comparadas pela ANOVA e as diferenças mínimas significativas pelo teste de Tukey. O nível de significância foi de 5 % ( $p < 0.0001$ ). n = 08.



## 4.3.3.2 Teste da formalina

O ensaio foi realizado em triplicata, com um  $n = 8$  para cada amostra, e a média dos tempos da fase neurogênica e inflamatória foi calculada (Figura 14 A e B).

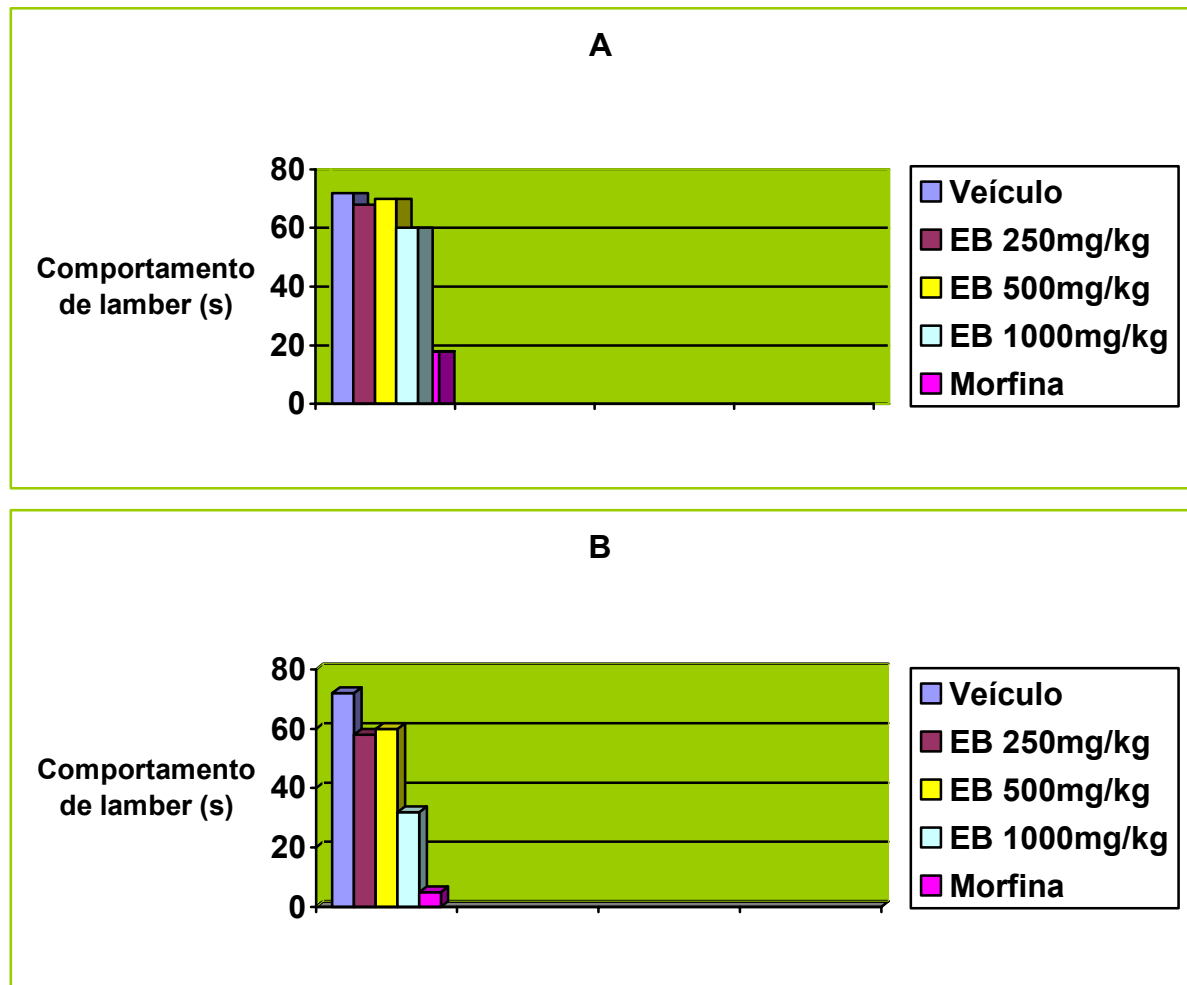


Figura 14 – Efeito da administração do extrato metanólico da *Luehea divaricata* Martius sobre o comportamento de lamber a pata (em segundos), no teste da formalina.

(A) Fase Neurogênica e (B) Fase Inflamatória.

Dados expressos pela média aritmética.  $n = 08$ .

## 5 DISCUSSÃO

A metodologia utilizada para avaliar a atividade antimicrobiana de plantas é um fator importante (NCCLS, 1997). De acordo com a Farmacopéia Brasileira IV (1988) o método, o inóculo, meio de crescimento, tempo de leitura do teste e os microorganismos são fatores que devem ser levados em consideração para haver reprodutibilidade dos resultados.

As concentrações, testadas por difusão em ágar, das amostras do extrato metanólico e das frações da *L. divaricata* Martius foram ativas frente a *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538p), *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 12228), *Escherichia coli* (ATCC 11103), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 10031). Souza e colaboradores (2004) testaram pelo mesmo método, o extrato metanólico (50 mg/ml) das folhas dessa espécie e constataram a resistência dos microorganismos *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Escherichia coli*, *Candida albicans* e *Saccharomyces cerevisiae* ao extrato metanólico, provavelmente tais resultados negativos estejam relacionados a concentração testada pelos autores.

As frações acetato de etila e butanólica demonstraram maior atividade frente às bactérias em relação às frações menos polares provavelmente por terem maior concentração de compostos com potencial antimicrobiano do que as demais frações. Segundo Tanaka e colaboradores (2005) as frações polares do extrato bruto das folhas da *L. divaricata* apresentam flavonóides, triterpenos e taninos e, conforme Simões e colaboradores (2004), esses compostos possuem ação antimicrobiana.

Entretanto Andresek e colaboradores (2004) afirmam que diferentes extratos com compostos de diferentes polaridades freqüentemente apresentam uma tendência similar da atividade antimicrobiana, já que a droga vegetal pode conter vários princípios ativos com o mesmo efeito possibilitando interações sinérgicas e superior eficácia em relação aos compostos isolados (WALRANT, 1990).

Na avaliação da atividade antimicrobiana por bioautografia observamos que todas as frações apresentaram atividade frente a *E. coli* (Gram-negativa) que vem contrapor aos resultados de Souza e colaboradores (2004). A fração acetato de etila não apresentou atividade frente a *K. pneumoniae* (Gram-negativa). As frações mais polares foram ativas contra as bactérias Gram-positivas. A *Candida albicans* e *Saccharomyces cerevisiae* apresentaram resistência as concentrações das amostras testadas por difusão em ágar e bioautografia, o que não se comprova por microdiluição em caldo, provavelmente por termos avaliado concentrações maiores da amostra.

Ao avaliarmos o extrato bruto das folhas da *L. divaricata* Martius, por microdiluição em caldo frente a *Candida albicans* e *Saccharomyces cerevisiae*, constatamos que a CIM estava entre 750 µg/ml e 1.500 µg/ml; segundo Tanaka e colaboradores (2005), esses valores refletem a inibição discreta do crescimento fúngico. Já para *S. aureus* foi moderadamente ativo (CIM 375 µg/ml) e frente às Gram-negativas apresentou uma fraca atividade (CIM 750 a 1.500 µg/ml). As frações acetato de etila e butanólica foram moderadamente ativas contra *E. coli*, *K. pneumoniae* e *S. aureus* (CIM 250 a 500 µg/ml) e fracamente ativas contra os fungos (CIM 1.000 a 2.000 µg/ml). Pelo mesmo método, Tanaka e colaboradores (2005) afirmam que o extrato bruto e as frações aquosa e acetato de etila das cascas do caule dessa espécie foram moderadamente ativos contra *S. aureus* (CIM 250 µg/ml), já a fração butanólica inibiu discretamente o crescimento de *S. aureus* (CIM 500 µg/ml) e a fração hexânica apresentou atividade fraca contra a mesma bactéria (CIM 1.000 µg/ml).

Nas frações hexânica e clorofórmica não foi possível detectar atividade antimicrobiana nas concentrações testadas (500 – 3000 µg/ml), o que não se confirma por outros métodos. Conforme Simões e colaboradores (2004) essas frações são ricas em lipídios, ceras e pigmentos dificultando, dessa forma, a visualização da atividade antimicrobiana por microdiluição em caldo.

Pelo mesmo método Magina e colaboradores (2005) testaram o extrato bruto e frações obtidas das folhas de *Zollernia ilicifolia* e observaram que as amostras inibiram o crescimento microbiano em concentrações de 780 a 2.500 µg/ml para bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. Duarte e colaboradores (2005)

demonstraram a atividade antifúngica das lignanas isolados da fração hexânica das folhas de *Phyllanthus amarus* cuja CIM variou de 10.000 a 40.000  $\mu\text{g/ml}$ . Tanto Magina e colaboradores (2005) quanto Duarte e colaboradores (2005) consideram seus resultados relevantes.

A atividade antioxidante de metabólitos secundários tem sido bastante investigada. Os agentes oxidantes, produzidos por reações químicas em nosso organismo, são uma possível causa das doenças crônico-degenerativas e do envelhecimento precoce. Com isso a atividade antioxidante de metabólitos secundários tem merecido atenção de pesquisadores com crescente investimento da indústria farmacêutica e de cosméticos.

O extrato bruto e as frações acetato de etila e butanólica apresentaram um percentual de inibição do DPPH de 91,06, 90,93 e 91,64 % respectivamente, já a quercetina inibiu o radical livre em 93,54 % na concentração de 25  $\mu\text{g/ml}$ . As frações hexânica e clorofórmica foram menos eficazes, provavelmente pela menor concentração de compostos fenólicos. O extrato bruto e as frações a 25  $\mu\text{g/ml}$  foram testados pelo método BCB; observamos uma atividade antioxidante de 100 % do extrato bruto e das frações mais polares, e de 85 % para a fração hexânica, entretanto essa mantém a atividade por mais tempo que as demais frações. Ljubuncic e colaboradores (2005) avaliaram a atividade antioxidante por BCB de diferentes concentrações do extrato aquoso das folhas de *Crateagus aronia*, e observaram que 100  $\mu\text{g/ml}$  é a concentração de maior percentual redutor.

O fato da atividade antioxidante de substâncias solúveis em solventes mais polares já era esperado, pois estes garantem a presença de compostos fenólicos na amostra como os flavonóides e saponinas, os quais segundo Simões e colaboradores (2004), apresentam atividade antioxidante. A quercetina é conhecida por ser um potente antioxidante e esta atividade é favorecida pela presença de grupos hidroxilas nas posições 5, 7, 3', 4', que são fundamentais para esta atividade. Alterações, em um destes grupos, por glicosilação provoca decréscimo da atividade antioxidante, como no caso da rutina (Simões et al, 2004).

Tseng e colaboradores (1997), fazendo uso do método DPPH testaram as frações e o extrato bruto das flores de *Hibiscus sabdariffa* e evidenciaram um maior percentual de inibição da fração acetato de etila, assim como Schubert (2003) ao

estudar as folhas de *Ilex paraguariensis* (erva-mate). Ambos afirmam que o potencial antioxidante da fração acetato de etila está relacionado a presença de compostos fenólicos antioxidantes como quercetina, rutina e derivados do ácido clorogênico.

De acordo com Kulisic e colaboradores (2004) e Tepe e colaboradores (2005), compostos lipofílicos, como os presentes nos óleos essenciais, apresentam atividade antioxidante e esta deve ser investigada pelo método  $\beta$ -caroteno-linolenato (BCB), pois é mais sensível para essas substâncias do que o DPPH. Tepe e colaboradores (2005) confirmaram ao estudar as frações de *Cyclotrichium organofolium*, a complementariedade desses dois sistemas testes, ao observar que as frações polares inibiam a oxidação do radical DPPH e as frações menos polares apresentavam maior potencial redutor pelo teste do BCB.

O extrato bruto (1000 mg/kg) apresentou significativa atividade analgésica pelo teste das contorções abdominais quando comparado com o grupo controle. Já pelo teste da formalina observamos a atividade da amostra apenas na fase inflamatória, provavelmente porque os compostos analgésicos da *L. divaricata* Martius não possuem ação central assim como os antiinflamatórios não-esteroidais e corticóides. Heidari e colaboradores (2005) afirmam que o EB (100 mg/kg) das pétalas de *Echium amoenum*, ricas em flavonóides, induz a redução da resposta a dor na segunda fase da formalina que é a Fase Inflamatória, o que vem ao encontro dos resultados obtidos para a *L. divaricata* que também possui flavonóides.

Os resultados obtidos no presente estudo sugerem que os compostos das folhas da *L. divaricata* Martius podem ser promissores como novas drogas com potencial antimicrobiano, antioxidante e analgésico, porém mais estudos são necessários para esclarecer o mecanismo de ação dessas substâncias. É importante, também, avaliar os possíveis efeitos tóxicos desses compostos a curto e a longo prazo, já que existe grande interesse dos pesquisadores em descobrir drogas que aliem bom efeito terapêutico e baixa ocorrência de efeitos colaterais.

## 6 CONCLUSÃO

- O extrato metanólico da *Luehea divaricata* Martius e suas frações apresentaram atividade antimicrobiana frente a *S. aureus*, *S. epidermidis*, *K. pneumoniae*, *E. coli*, pelos diferentes métodos analisados.
- As frações acetato de etila e butanólica demonstraram maior atividade antimicrobiana frente às bactérias Gram-positivas.
- Pela difusão em ágar e bioautografia as concentrações das amostras estudadas não demonstraram atividade antifúngica frente à *Candida albicans* e *Saccharomyces cerevisiae*.
- Pelo método DPPH o extrato bruto, a fração acetato de etila e butanólica apresentaram atividade antioxidante similar a quercetina.
- As diferentes amostras testadas apresentaram atividade antioxidante. A fração hexânica demonstrou melhor atividade antioxidante pelo método BCB do que as demais frações.
- O extrato bruto das folhas da espécie estudada apresentou atividade analgésica periférica pelo Teste das Contorções Abdominais e da Formalina.
- O extrato bruto da *Luehea divaricata* Martius demonstrou atividade antiinflamatória na segunda fase do Teste da Formalina.

## 7 REFERÊNCIAS

ADAMU, H. M.; ABAYEH, O. I.; AGHO, M. G.; ABDULLAHI, A. L.; UBA, A.; DUKKU, H. V.; WUFEM, B. M. An ethnobotanical survey of Bauchi State herbal plants and their antimicrobial activity. **Journal of Ethnopharmacology**, 99, 1-4, 2005.

ADZU, B. et al. Anti-inflammatory and anti-nociceptive effects of *Sphaeranthus senegalis*. **Journal of Ethnopharmacology** 84, 169-179, 2003.

AHMAD, I. & BEG, A. Z. Antimicrobial and phytochemical studies on 45 indian medicinal plants against multi-drug resistant human pathogens. **Journal of Ethnopharmacology**, 74, 113-123, 2001.

ALICE, C. B. et al. **Plantas medicinais de uso popular. Atlas Farmacognóstico**. Canoas: Editora da ULBRA/RS, 1995.

ALICE, C. B.; SILVA, G. A. A. B. **Caderno de Farmácia**, 1, 83, 1985.

ALICE, C. B.; VARGAS, V. M. F.; SILVA, G. A. A. B.; SIQUEIRA, N. C. S.; SHOPOND, E. E. S.; GLEVE, J.; HENRIQUES, J. A. P.; HENRIQUES, A. T. Screening of plants used in south Brazilian folk medicine. **Journal of Ethnopharmacology**, 35 (2), 165 -171, 1991.

ANDERSON, O. & PHILLIPS, B. J. Comparative *in vitro* and *in vivo* effects of antioxidants. **Food and Chemical Toxicology**, 37, 1015 - 1025, 1999.

ANDREENSEK, A. et al. Antimicrobial and antioxidative enrichment of oak (*Quercus robur*) bark by rotation planar extraction using Extrachrom®. **International Journal of Food Microbiology**, 2004.

ARCENIO, F. et al. Avaliação da atividade IMAO e anti-bacteriana de extratos de *Mikania glomerata* Sprengel. In: Simpósio Brasileiro de Plantas Medicinais, 2001, Curitiba, **Anais...** Curitiba: Sociedade Brasileira de Farmacognosia, 2001, p. OR-4.

ASHBURN, M. A. & STAATS, P.S. Management of chronic pain. **Lancet** 353, 1865 – 1869, 1999.

AVANCINI, C. A. M.; WIEST, J. M.; MUNDSTOCK, E. Atividade bacteriostática e bactericida do decocto de *Baccharis trimera* (Less.) D. C. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia** 52, 230 – 234, 2000.

BALICK, M. J. & COX, P. A.; **Plants, people and culture. The science of ethnobotany**. New York: Scientific American Library, 1997.

- BARROSO, G. M. et al. **Sistemática das Angiospermas do Brasil**, 1978.
- BEAR, M. F.; CONNORS, B. W.; PARADISO, M. A. **Neurociência - Desvendando o Sistema Nervoso**. 2. ed. Porto Alegre: Artmed, 2002.
- BERNARD, J. F.; BESTER, H.; BESSON, J. M. Involvement of the spinobarabrachio – amygdaloid and hipothalamyc pathways in the autonomic and effective emotional aspects of pain. **Progress in Brain Research**, 107, 243-255, 1996.
- BIANCHI, N. R. et al. Estudo da toxicidade de *Luehea divaricata*. **Rev. Bras. Farm**, v. 77, n. 2, 49-50, 1996.
- BJÖRKMAN, R. Central antinociceptive effects of non – steroidal anti – inflammatory drugs and paracetamol. **Acta Anaesthesiologica Scandinavica**, 39 (supplement 103), 1 – 44, 1995.
- BONATI, A. Problems relating to the preparation and use of extracts from medicinal plants. **Fitoterapia**, 11, 5-12,1980.
- BONICA, J. J. Anatomic and physiologic basic of nociception and pain. In: BONICA, K.; LOESER, J. D.; CHAPMAN, C. R.; FORDYCE, W. E. **The management of Pain**. 2. ed. Philadelphia - London: Lea & Febiger, 1990.
- BORNE, R. F. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs. In: FOYE, W. G.; LEMKE, T. L.; WILLIAMS, D. A. **Medicinal Chemistry**. Baltimore: Willians & Wilkings, 1995.
- BORTOLUZZI, R. C.; WALKER, C. I. B.; MANFRON, M. P.; ZANETTI, G. D. Análise Química Qualitativa e Morfo-histológica de *Luehea divaricata* Mart. **XVIII Simpósio de Plantas Mediciniais do Brasil, Anais**, Cuiabá/MG, 2002.
- BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE, SECRETARIA DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, Portaria n. 6/95 de 31.01.1995. Diário Oficial da União, v. 200, seção I, p. 1523-1524, 06.02.1995. In: SIMÕES, C. M. O. et. al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Porto Alegre - Florianópolis: UFRGS/ UFSC, 2002.
- BRESOLIN, S. & VARGAS, V. M. F. Mutagenic potencies of medicinal plants screened in the Ames Test. **Phytotherapy Research**, 7, 260-262, 1993.
- BRITO, A. A. **Manual de ensaios toxicológicos in vivo**. Campinas: UNICAMP, 1994.
- BRUSCHI, M. L.; FRANCO, S. L.; NOVELLO, C. R. Projeto de Manipulação e desenvolvimento de medicamentos e correlatos a base de plantas na disciplina de farmacotécnica. In: Simpósio de Plantas Mediciniais do Brasil, 2000. Recife. **Anais ... Recife - UFPE**, 2000.
- BUTTERWECK, V. et al. Effects of the total extract and fractions of *Hypericum perforatum* in animal assays for antidepressant activity. **Pharmacopsychiatry**, 30, 117-124, 1997.



CALIXTO, J. B. Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytotherapeutic agents). **Braz. J. Med. Biol. Rev.**, Ribeirão Preto, 33, 179-189, 2000.

\_\_\_\_\_. Biodiversidade como fonte de medicamentos. **Cienc. Cult.**, v. 55, n. 3, 37-39, 2003.

\_\_\_\_\_. Controle de qualidade: da planta ao medicamento. **VII Jornada Paulista de Plantas Mediciniais. Livro de Resumos e Programação**, 2005.

CASTRO, O. & GAMBOA, I. C. Iridoids from the arterial parts of *Verbena littoralis* (Verbenaceae). **Phytochemistry**, 65, 2369 – 2372, 2004.

CHABOT, S.; BEL-RHLID, R.; CHENEVERT, R. et al. Hyphal growth promotion *in vitro* of the VA mycorrhizal fungus. *Gigaspora margarita* Becker and Hall, by the activity of structurally specific flavonoid compounds under CO<sub>2</sub> - enriched conditions. **New Phytology**, 122, 461 - 467, 1992.

CHAMBERS, H. F. & SANDE, M. A. In: Goodman, A. G. et al. **As bases da farmacologia terapêutica**. 9. ed. Rio de Janeiro. Farmacos antimicrobianos, cap. 43, p. 757-776, 1996.

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

CHIRIANI, C. H. B. **La vuelta a los vegetales - tratado moderno de fitoterapia**. Buenos Aires: Hachette, 1982.

CHOI, C. W.; KIM, S. C.; HIVANG, S. S. ; CHOI, B. K.; AHN, H J.; LEI, 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. Obtido por meio eletrônico. Disponível em <http://www.sciencedirect.com.htm>. Acesso em: 06/09/04.

CODE OF FEDERAL REGULATIONS, FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. Washington: Office of the Federal Register. Title 21, parts 300 to 499, 1996.

COLE, M. O. Key Antifungal, Antibacterial and Anti-insect. **Biochem. Syst.: Ecol.** v. 22, n. 8, 837-856, 1994.

COWAN, M. M. Plant Products as Antimicrobial Agents. **Linical Microbiology Reviews**, 564 – 582, 1999.

CUNHA, M. C. S. **Revisão das espécies do gênero *Luehea* Willd. (Tiliaceae), ocorrentes no Estado do Rio de Janeiro**. Rio de Janeiro: Curso de Pós-graduação em Botânica, UFRJ, 1981. Dissertação de Mestrado.

DA SILVA, J.; MATOS, S. M. H.; HEUSER, V.; PERES, W.; MARRONI, N.; GONZALÉS-GALLEGO, J.; ERDTMANN, B. Avaliação da genotoxicidade dos flavonóides quercetina e rutina através do ensaio cometa. **Genetics and Molecular Biology. Livro de Resumos**, 1998.

DAVID, J. P. L.; NASCIMENTO, J. A. P.; DAVID, J. M. Produtos fitoterápicos: uma perspectiva de negócio para a indústria, um campo pouco explorado pelos farmacêuticos. **Infarma**, v. 16, n. 9-10, p. 71-76, 2004.

DE ARAÚJO, G. L.; POSSE, J. C.; DA SILVA, F. G., KELECON, A; TEIXEIRA, L. A; SHAPARIN, N.; ROCHA, L. Planejamento Racional para a Investigação da Atividade Antimicrobiana em Plantas Superiores - Bioautografia. Resumo 22º Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, **Anais**, Poços de Caldas, 1999.

DE MAGALHÃES, P. M. **VII Jornada Paulista de Plantas Mediciniais. Livro de Resumos e Programação**, 2005.

DE MELLO, J. C. P.; SANTOS, S. C. Taninos. In: SIMÕES, C. M. O., et al. **Farmacognosia da planta ao medicamento**. Editora da UFSC/UFMS, 2004.

DE OLIVEIRA, G. F. et al. Antimicrobial activity of alcoholic extract from *Syzygium cumini* L. Skeels (jambolão) leaves. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 41 (supl. 1), 306, 2005.

DI STASI, J. C. et al. In: DI STASI, L. C. et. al. **Plantas medicinais: arte e ciência. Um Guia de Estudo Interdisciplinar**. Química de produtos naturais: principais constituintes ativos, 1996.

DIAS, M. et al. Atividade antioxidante de duas espécies de Eugenia. **VII Jornada Paulista de Plantas Mediciniais. Livro de Resumos e Programação**. Campinas, 23 a 25 de novembro de 2005.

DIMITRI, M. J. **Enciclopédia Argentina de Agricultura Y Jardineria**. Buenos Aires: ACME, 2, 730-734, 1980.

DO AMARAL, R. R.; ARCENIO, F.; CARVALHO, E. S.; TEIXEIRA, L. A.; ARAÚJO, G. L.; SHARAPIN, N.; TESTA, B.; GNERE, C.; ROCHA, L. Avaliação da atividade IMAO e antibacteriana de extratos de *Mikania glomerata* sprengel. **Rev. Bras. Farmacognosia**, 13, 24-27, 2001.

DOUGLAS, C. R. **Tratado de Fisiologia Aplicado à Ciência da Saúde**. São Paulo: Robe Editorial, 1999.

DUARTE, M. C. T.; REHDER, V. L. G.; SILVESTRE, A; DE MELO, L. V.; DELARMELINA, C; FIGUEIRA, G. M. Atividade antimicrobiana de lignanas isoladas de *Phyllanthus amarus* Shum & Thonn. **VII Jornada Paulista de Plantas Mediciniais. Livro de Resumos e Programação**. Campinas, 23 a 25 de novembro de 2005.

DUBNER, R. & BENNET, G. J. Spinal mechanisms of nociception. **Anual Review of Neuroscience**, 6, 11-14, 1983.

ELISABETSKY, E. Etnofarmacologia. **Ciênc. Cult.**, v. 55, n. 3, p. 35-36, 2003.

\_\_\_\_\_. Remédio tem ciência? **V Jornada Catarinense e I Jornada Internacional de Plantas Mediciniais. Livro de Resumos**, Joinville, SC, 2006.

ELISABETSKY, E. & CASTILHOS, Z. C. Plants used as analgesic by Amazonian caboclos as a basic for selecting plants for investigation. **Intenational Journal of Crude Drug Research**, 28, 309 – 320, 1990.

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

FERNANDES, A. A. et. al. Canelas silvestres nordestinas: aspectos botânicos, químicos e farmacológicos. **V Simpósio Plantas Mediciniais do Brasil**. Supl. Cien. Cult., 32, 26-36, 1978.

FERREIRA, I. C. F. S. & VARGAS, V. M. F. Mutagenicity of medicinal plant extracts in *Salmonella* - microsome assay. **Phytotherapy Research**, 13, 391 – 400, 1999.

FLORÃO, A.; NARDIN, J. M.; ROCHA, F. H; PICHETH, C. F.; SANTOS, A. M. W; Antibacterial effects of the essenteal oils from four species of *Baccharis*. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 41 (supl. 1), 317, 2005.

FREIRE, F. W. **Plantas medicinais brasileiras**. São Paulo, 34, 252-494, 1933.

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

GARCIA, C. M. Determinação da atividade antimicrobiana e caracterização físico-química e biológica de *Phyllanthus niruri* L. e *Phyllanthus tenellus* Roxb. (Euphorbiaceae). Santa Maria: Curso de Pós – Graduação em Ciências e Tecnologia Farmacêutica, UFSM, 2000. Dissertação de Mestrado.

GARCIA, E. S. et al. In. SIMÕES, C. M. O. et. al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Porto Alegre : Florianópolis: UFRGS/ UFSC, 2002.

GONZAGA, W. de A. et al. Atividade antimicrobiana dos alcalóides benzofenantridínicos 6-acetonilaldeído e 6-acetonilaldeído. In: Sjomada de novos investigadores de la A. U. G. M, **Anais...** Rosário: Universidad Nacional de Rosário, 217, 2001.

GONZÁLES, M.; LOMBARDO, A.; VALLARINO, A. J. **Plantas de la medicina vulgar del Uruguay**. Montevideo: Cérrito, 1937.

GUEDES, A.; GRANDO, C. A.; DALMARCO, E. M. Análise fitoquímica e atividade antimicrobiana de *Rubus rosaefolius* Smith. **VII Jornada Paulista de Plantas Mediciniais. Livro de Resumos e Programação**. Campinas, 23 a 25 de novembro de 2005.

GUYTON & HALL. **Tratado de Fisiologia Médica**. Rio de Janeiro: Guanabara – Koogan S. A., 551 – 552, 1997.

HAÏCOUR, R. Comparaison chez *Phyllanthus niruri* de l'activité antibactérienne des décoctions de diverses portions de la plante et de cultures de tissus qui en proviennent. **Comptes Rendus des Seances de l'Academie des Sciences Série D**, 278, 3323 – 3325, 1974.

HALLIWELL, B. Antioxidant defence mechanisms: from the beginning to the end (of the beginning). **Free Rad. Res.**, 31, 261-272, 1999.

HAMBURGER, M. O. & CORDELL, G. A. A direct bioautographic TLC assay for compounds possessing antibacterial activity. **Journal of Natural Products**, v. 50, Issue 1, January-february, 19-22, 1987.

HAYASHI, G. & TAKEMORI, A. E. The type of analgesic - receptor interaction involved in certain analgesic assays. **European Journal of Pharmacology**, 16, 63-66, 1971.

HEIDARI, M. R. et al. Evaluation of the analgesic effects of *Echium amoenum* Fisch & C. A. Mey. extract in mice: Possible mechanism involved. **Journal of Ethnopharmacology**, 2005.

HEINRICH, M.; KUHN, M.; WRIGHT, C. W.; RIMPLER, H.; PHILLIPSON, J. D.; SHANDELMAIER, A.; WARHURST, O. C. Parasitological and microbiological evaluation of mixed Indian medicinal plants (México). **Journal of Ethnopharmacology**, 36, 81-85, 1992.

HEUVEL, M. The international validation of a fixed-dose procedure as an alternative to the classical LD<sub>50</sub> test. **Chem. Toxic.**, v. 28, n. 7, 469-483, 1990.

HOELZEL, S. M. da S. M. **Estudo fitoquímico morfo-histológico e atividade antibacteriana das cascas das raízes de *Waltheria douradinha* S. Hill**. Santa Maria: Programa de Pós-graduação em Química, UFSM, 2001. Tese de Doutorado.

HUNSKAAR, S. & HOLE, K. The formalin test in mice: dissociation between inflammatory and non-inflammatory pain. **Pain**, 30, 103-104, 1987.

INQUE, M. T.; RODERJAN, C. V.; KUNIYOSHI, S. **Projeto Madeira do Paraná**. Curitiba. Fundação de Pesquisas Florestais do Paraná, 1984.

IVORRA, M. O.; PAIJA, M.; VILLA, A. A review of natural products and plants on potential antidiabetic drug. **Journal of Ethnopharmacology** 27, 243-275, 1989.

JAYAPRAKASHA, G. K. et al. Antioxidant activity of grape seed (*Vitis vinifera*) extracts on peroxidation models in vitro. **Food Chemistry**, 73, 285-290, 2001.

JONES, S. L. Dipyrone into the nucleus raphe magnus inhibits the rat nociceptive tail - flick reflex. **European Journal of Pharmacology**, 318, 37-40, 1996.

JONES, S. L. Anatomy of pain. In: SINATRA, R. S.; HORD, A. H.; GINSBERG, B.; PREBLE, L. **Acute Pain: Mechanisms & Management**. St. Louis: Mosby – Year Book, 1992.

JÚNIOR, L. C. **Plantas Medicinais e Aromáticas. Noções de História, Botânica, Propagação e Cultivo**. Universidade de São Paulo/SP, 1-10, 1995.

KINGHORN, A. D. & BALADRIN, M. **Human medicinal agents from plants**. Washington: American Chemical Society, 1993.

KITAGAWA, I.; KOBAYASHI, M.; SON, B. W.; SUZUKI, S.; KYOGOKU, Y. Marine natural products. XIX Pervicosides A, B and lanostane – type triterpene – oligoglycosides sulphates from the sea cucumber *Holothuria pervica*. **Chem. Pharm. Bull**, 37, 1230-1234, 1989.

KNOBLOCH, K. et al. Action as terpenoids on energy metabolism. In: BRUNKE, E.J. **Progress in essential oil research**. Berlin: Walter de Gruyter, 1986.

KRESS, M. & ZEILHOFER, H. U. Capsaicin, protons and heat: new excitement about receptors. **Trends Pharmacological Sciences**, 20, 112-118, 1999.

KULISIC, T. et al. Use of different methods for testing antioxidative activity of oregano essential oil. **Food Chemistry**, 85, 633-640, 2004.

LANS, C. & BROWN, G. Observation on ethnoveterinary medicines in Trinidad and Tobago. **Preventive Veterinary Medicine**, 35, 125-142, 1998.

LARINI, L. **Toxicologia**. 1 ed. São Paulo: Masnole, 1997.

LARREGINA, A.; AGGIO, M. C.; ALVAREZ, R. V. Incidence a probable etiology of toxic agranulocytosis in definitive population in the province of Buenos Aires (1963-1973). **Medicina** 54, 13-16, 1994.

LIN CHAU MING. Aspectos agrônômicos no controle de qualidade de plantas medicinais. **VII Jornada Paulista de Plantas Medicinais. Livro de Resumos e Programação**, 2005.

LIPP, F. J. Methods for the Ethnopharmacological field work. **Journal of Ethnopharmacology**, 25, 139-150, 1989.

LJUBUNCIC, P. et al. Antioxidant activity of *Crataegus aronia* aqueous extract used in traditional Arab medicine in Israel. **Journal of Ethnopharmacology**, 2005.

LOESER, J. D. & MELZACK, R. Pain, an overview. **Lancet**, 353, 1607-1609, 1999.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras: Manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. Plantarum: Nova Odessa, 1988.

\_\_\_\_\_. **Árvores Brasileiras**. Nova Odessa: Plantarum, 1992.

MAFFEI, B. R. **A Plantas medicinales. Montevideo: Nuestra Tierra**. Editora Universidade/UFRGS, Porto Alegre, 1969.

MAGALHÃES, A. F. et al. Testes biológicos do extrato metanólico e substâncias isoladas das raízes de *Louchocharpus montanus*, AZ –TOZZI. **Ceres**, v. 43,n. 260, p. 358, 1998.

MAGINA, M. D. A.; TAUANA, W.; DALMARCO, E. Atividade antimicrobiana do extrato bruto e frações de *Zollernia ilicifolia* (Brongniart) Vogel (Fabaceae). **VII Jornada Paulista de Plantas Mediciniais. Livro de Resumos e Programação**. Campinas, 23 a 25 de novembro de 2005.

MANFRON, M. P. **Xanthium cavanillesii Schouw: avaliação fitoquímica, determinação da toxicidade e da atividade antimicrobiana**. Rio Claro: Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, 1997. Tese de Doutorado.

MARDEGAN, R. de C.; FOGLIO, M. A.; DUARTE, M. C. T.; FURLETTI, V. F.; HÖFLING, J. F. Atividade antimicrobiana de *Mentha piperita*. **VII Jornada Paulista de Plantas Mediciniais. Livro de Resumos e Programação**. Campinas, 23 a 25 de novembro de 2005.

MARGINEAU, C.; CUCU, V.; GRECU, L.; PARVU, C. Anticandida action of a saponin from Primula. **Planta Médica**, 30, 35-38, 1976.

MARTIN W. R. & SLOAN, J. W. Neuropharmacology and neurochemistry of subjective effects, analgesia, tolerance and dependence produced by narcotic analgesics. **Handbook of Experimental Pharmacology**. Berlin: Springer - Verlag, 1977.

MENDES, B. G. Atividade antibacteriana do óleo volátil extraído de *Lavanda sp.* cultivada em Ituporanga - Santa Catarina. **VII Jornada Paulista de Plantas Mediciniais. Livro de Resumos e Programação**. Campinas, 23 a 25 de novembro de 2005.

MEYER, R. A.; CAMPBELL, J. N.; RAJA, S. N. Peripheral mechanisms of Pain. In: WALL, P. D.; MELZACK, R. **Text book of Pain**. Edinburgh: Churchill Livingstone, 1994.

MILLAN, M. J. Multiple opioid systems and pain: a review. **Pain**, 26, 303-349, 1986.

\_\_\_\_\_. The role of descending noradrenergic and serotonergic pathways in the modulation of nociception: focus on receptor multiplicity. In: DICHEMAN, A.; BESSON, J. M. The Pharmacology of Pain. **Handbook of Experimental Pharmacology**. Berlin: Springer – Verlag, 1997.

\_\_\_\_\_. The induction of pain: an integrative review. **Progress in Neurobiology** 57, 1-164, 1999.

MILLER, R. F.; Triumph over pain. In: FÜLÖP-MILLER, René. **O triunfo sobre a dor - a história da anestesia**. (Tradução de Cecília Reis). 2. ed. Rio de Janeiro: José Olympio, 11-20, 1951.

MILLS, S. & BONE, K.; **Principles and practice of Phytotherapy**. Churchill Livingstone, Edinburgh, páginas 23 – 24, 31 – 34, 229 – 231, 2000.

MIRANDA, F. G. G. et al. Antinociceptive and antiedematogenic properties and acute toxicity of *Tabebuia avellanedae* Lor. ex Griseb inner bark aqueous extract. **BMC Pharmacology**, 2001.

MOKBEL, M. S. & HASHINAGA, F. Evaluation of the antioxidant activity of extracts from buntan (*Citrus grandis*) fruit tissues. **Food Chemistry**, 94, 529-534, 2006.

MONSEF, H. R. Antinociceptive effects of *Peganun harmala* L. alkaloid extract on mouse formalin test. **J. Pharm Pharmaceut. Sci.** 7(1), 65-69, 2004.

MONTANHA, J. A. **Estudo químico e biológico das saponinas de *Ilex paraguariensis* St. Hill. Aquifoliaceae**. Porto Alegre: Curso de Pós – Graduação em Ciências Farmacêuticas, UFRGS, 1990. Dissertação de Mestrado.

MORAES, H. P.; SANTOS, F. V.; CALVO, T. R.; LEITE, C. Q. F.; VILEGAS, W.; VARANDA, E. A.; BAUAB, T. M. Avaliação da atividade antibacteriana e da mutagenicidade de extratos vegetais obtidos de duas espécies do gênero *Alchornea*. **VII Jornada Paulista de Plantas Mediciniais. Livro de Resumos e Programação**. Campinas, 23 a 25 de novembro de 2005.

MOREIRA, M. S. A. et. al. Studies in the anti-inflammatory and analgesic activity of *Curatella americana* L. **Journal of Ethnopharmacology** 67, 171-177, 1999.

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

NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts. Approved standard document M – 27A, 1997.

NUKI, G. Nonsteroid analgesic and inflammatory agents. **British Medical Journal** 287, 39-42, 1983.

OLIBONI, L. S. et al. Avaliação da capacidade antioxidante de sucos de uva produzidos na região nordeste do Estado do Rio Grande do Sul. **Revista da Associação dos Farmacêuticos do Estado do Rio Grande do Sul**, 21, p.17, janeiro/abril 2005.

OLIVEIRA, R. B.; GODOY, S. A. P.; COSTA, F. B. **Plantas Tóxicas. Conhecimento e Prevenção de Acidentes.** Editora Holos, 2003.

ORTEGA, et al. **Congresso Nacional de Plantas.** Tlahui – Medic n. 10. Medicinas Tradicionales Y Alt. P. 6, 2000.

PIO CORRÊA, M. P. **Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas.** Rio de Janeiro: Desenvolvimento Florestal. Ministério da Agricultura, 1984.

POHLIT, A. M.; PINTO, A. C. S.; MACARI, P. Comparação da atividade antioxidante de 4-nerolidilcatecol, catecol e derivados acetilados. **XXVI Reunião Anual sobre Evolução, Sistemática e Ecologia Micromoleculares.** Instituto de Química, Universidade Federal Fluminense, Rio de Janeiro - RJ, 1 a 3 de dezembro de 2004.

PONTIROLI, A. **Flora de la Provincia de Buenos Aires.** Buenos Aires: INTA, 1965.

PORTENOY, R. K. & LESAGE, R. Management of cancer pain. **Lancet**, 353, 1695 - 1700, 1999.

PREGNOLATTO, B. P. et al. **Rev. Ciências Farmacêuticas.** São Paulo, v. 20, n. 2, 449 - 458, 1999.

RAHALISON, L. et. al..A bioautografic agar overlay method for the detection of antifungal compounds from higher plants. *Phytochemical analysis*, 2, 199-203, 1991.

RAINSFORD, K. D. & VELO, G. P. **Side effects of anti-inflammatory / analgesic drugs.** Lancaster: Kluver Academic Publishers, 1992.

RANG, H. P. & DALE, M. M. Drugs used to suppress inflammatory and immune reactions. In: RANG, H. P.; DALE, M. M. **Pharmacology.** Edinburgh, London, Melbourne and New York: Churchill - Livingstone, 1991.

RANG, H. P.; DALE, M. M.; RITTER, J. M. **Pharmacology.** 3. ed. Edinburgh, London, Melbourne and New York: Churchill-Livingstone, 1995.

REISINE, T. & PASTERNAK, G. Opioid analgesics opioides and antagonists. In: HARDMANN, J. G.; LIMBIRD, L. E.; MOLINOFF, P. B.; RUDDON, R. W.; GOODMAN GILMAN, A. **Pharmacological Basis of Therapeutics.** Atlampa: Mc Graw Hill Interamericana, 1996.

REITZ, R. Plantas medicinais de Santa Catarina. **Anais.** Botânicos do Herbário Barbosa Rodrigues, 2, 71-116, 1950.

REITZ, R.; KLEIN, R. M.; REIS, A. **Projeto Madeira do Rio Grande do Sul,** 1988.



RODRIGUES, P. O. et al. Atividade antioxidante de soluções hidroetanólicas de folhas de *Arctostaphylos uva-ursi* (L.) Spreng pelo método do DPPH. **V Jornada Catarinense e I Jornada Internacional de Plantas Mediciniais. Resumos.** Joinville, 8 a 12 de maio de 2006.

ROIG, Y. & MESA, J. T. **Plantas medicinales aromáticas o venenosas de Cuba.** Havana: Cultural, 1945.

SANTOS, A. R. S. et al. Antinociceptive properties of extracts of new species of plants of the genus *Phyllanthus* (Euphorbiaceae). **Journal of Ethnopharmacology**, 72, 229-238, 1998.

SANTOS, R. I. Metabolismo básico e origem dos metabólitos secundários. In: SIMÕES, C. M. O. et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**, 2001.

SATO, M.; FUJIWARA, S.; TSUCHIYA, H. et al. Flavones with antibacterial activity against cariogenic bacteria. **Journal of Ethnopharmacology**, 54, 171-176, 1996.

SCALBERT, A. Antimicrobial properties of tannins. **Phytochemistry**, 30, 3875 - 3883, 1991.

SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; ATHAYDE, M. L. Saponinas. In: SIMÕES, C. M. O., et al. **Farmacognosia da planta ao medicamento**, 2002.

SCHMITT, A. C. et al. Avaliação da atividade antimicrobiana *in vitro* da planta *Bryophyllum pinnatum* Kurz (folha-da-fortuna) colhida em Várzea Grande, Mato Grosso, Brasil. **Acta Scientiae Veterinariae**, 31(1), 55 – 58, 2003.

SCHUBERT, A. **Variação anual de metilxantinas totais e saponinas em duas populações de *Ilex paraguariensis* ST. Hil.. Avaliação da atividade antimicrobiana e antioxidante de frações de folhas e frutos.** Santa Maria: Curso de Pós - Graduação em Ciência e Tecnologia Farmacêutica, UFSM, 2003. Dissertação de Mestrado.

SHERRINGTON, C. S. **The integrative action of the nervous system.** Scribner, New York, 1906.

SHIBATA, M.; OHKUTO, T.; TAKAHASHI, H.; INOKI, R. Modified formalin test: characteristic biphasic response. **Pain**, 38, 347-352, 1989.

SHIMOYAMADA, M.; SUZUKI, M.; SONTA, H.; MARUYAMA, M.; OKUBO, K. Antifungal activity of the saponin fraction obtained from *Asparagus officinalis* L. and its active principle. **Agric. Biol. Chem.**, 54, 2553-2557, 1990.

SILVA, K. L. **Plantas do gênero *Bauhinia*, composição química e potencial farmacológico.** Itajaí: Curso de Farmácia, Universidade do Vale do Itajaí/SC, 2000. Monografia do Curso de Farmácia.

SILVA, M. J. M.; MELO, C. L.; VALE, M. R. Efeitos farmacológicos do *Ageratum conyzoides* na musculatura lisa, possivelmente relacionados com sistema gerador de AMPcíclico. **V Reunião Anual da Feder. das Soc. Brasil. Biol. Experim.** Caxambu (MG), Resumos, p. 279, 1990.

SILVA, R. M. *Xanthium cavanillesii* Schouw. **Farmacobotânica e Constituintes Químicos Voláteis**. Santa Maria: Curso de Pós Graduação em Ciência e Tecnologia Farmacêutica, 2003. Dissertação de Mestrado.

SILVEIRA, C. F. S. *Zanthoxylum rhoifolium* Lamarck (Rutaceae): **Determinação da atividade antimicrobiana e caracterização físico-química e biológica**. Santa Maria: Curso de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Farmacêutica, UFSM, 1997. Dissertação de Mestrado.

SILVEIRA, Y. L. & SILVEIRA, E. Plantas da medicina tradicional indígena Mbyá - Guarani utilizadas para patologias bucais. **XXII Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil. Resumos**. Cuiabá, 19 a 22 de novembro de 2002.

SIMÕES, C. M. O. et. al. **Farmacognosia; da planta ao medicamento**. Porto Alegre - Florianópolis: UFRGS/ UFSC, 2004.

SIMÕES, C. M. O.; MENTZ, L. A.; SCHENKEL, E. P.; IRGANG, B. E.; STEHMANN, J. R. **Plantas da Medicina popular no Rio Grande do Sul**. Porto Alegre. Editora da Universidade/UFRGS, 1995.

SIQUEIRA, M. J.; BONM, D. M.; PEREIRA, N. F. G. **Química Nova**. v. 21, n. 5, p. 557, 1998.

SIXEL, J. P. & PECINALLI, N. R. Características farmacológicas gerais das plantas medicinais. **Infarma**, v. 16, n. 13-14, p. 74-77, 2005.

SMITH, T. W. The mechanisms of pain and opioid-induced analgesic. **Molecular Aspects Aspects Medical** 7, 509-545, 1984.

SONAGLIO, D. et al. In: SIMÕES et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Porto Alegre – Florianópolis: UFRGS\UFSC. Desenvolvimento tecnológico e produção de fitoterápicos, 1999.

SOUZA, G. C. et al. Ethnopharmacological studies of antimicrobial remedies in the south of Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, 90, 135-143, 2004.

SOUZA, G. H. B.; CARVALHO, I. C. T.; UJIKAWA, K., NETO, J. J. Atividade antimicrobiana de óleos essenciais extraídos de plantas utilizadas na medicina popular brasileira. Jornada Paulista de Plantas Medicinais. **Anais**. Araraquara, UNESP, p. 92-93, 1997.

TANAKA, J. C. A. et al. A new Tormentic Acid derivative from *Luehea divaricata* Mart, (Tiliaceae). **J. Braz. Chem. Soc.**, v. 14, n. 3, 475-478, 2003.

TANAKA, J. C. A. et al. Constituintes químicos de *Luehea divaricata* Martius (Tiliaceae). **Química Nova**, vol. 28, n. 5, 834-837, 2005.

TEPE, B. et al. Antimicrobial and antioxidative activity of the essential oil and various extracts of *Cyclotrichium organifolium* (Labill.) Manden. & Scheng. **Journal of Food Engineering**, 69, 335-342, 2005.

TJOLSEN, A. & HOLE, K. Animal models of analgesia. In: DICKENSON, A.; BESSON, J. M. **The pharmacology of Pain**, Germany: Ed. Springer, 1997.

TOURSARKISSIAN, M. **Plantas medicinales de la Argentina**. Buenos Aires: Hemisferio Sur, 1980.

TRAUB, R. J. The spinal contribution of the induction of central sensibilization. **Brain Research**, 778, 34-42, 1997.

TRITILLINI, B. et al. Chemical composition and antimicrobial activity of essential oil of *Piper angustifolium*. **Planta Médica**, v. 62, n. 4, 272-373, 1996.

TSENG, T. H. et al. Protective effects of dried flower extracts of *Hibiscus sabdariffa* L. against oxidative stress in rat primary hepatocytes. **Food and Chemical Toxicology**, 35 (12), 1159-1164, 1997.

VARELA, Q. D. et al. Avaliação da capacidade antioxidante de vinhos espumantes elaborados na serra gaúcha. **Revista da Associação dos Farmacêuticos do Estado do Rio Grande do Sul**, 21, p. 29, janeiro/abril 2005.

VIEIRA, P. C. Estratégias para o isolamento de princípios ativos de plantas. **VII Jornada Paulista de Plantas Mediciniais. Livro de Resumos e Programação**, 2005.

VOGEL, E. W. & SZZAKMARY. **Basic Principles and Evaluation of Results of Assays Measuring Genotoxic Damage in Somatic Cells of Drosophila**. 5 ICEMS Cleveland, 1989.

WALKER, C. I. B.; BORTOLUZZI, R. C.; MANFRON, M. P.; ZANETTI, G. D. Toxicidade Aguda e Controle Botânico de Qualidade da *Luehea divaricata* Mart. **XVII Jornada Acadêmica Integrada, Anais**, Santa Maria - UFSM, 2002.

WALRANT, P. V. F. Como detectar ações farmacológicas de extratos vegetais em modelos experimentais "in vivo". **XI Simpósio de Plantas Mediciniais do Brasil**. João Pessoa (PB): Programa e Resumos, 1990.

WERLE, A. L. C. **Avaliação Farmacológica do Extrato de Casearia sylvestris Swartz**. Santa Maria: Curso de Pós - Graduação em Ciência e Tecnologia Farmacêutica, UFSM, 2004. Dissertação de Mestrado.

YU, J.; LEI, J.; YU, H.; GAI, X.; ZOU, G. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Scutellaria barbata*. **Phytochemistry**, 65, 881-884, 2004.

ZACCHINO, S. et al. **Phytomedicine** 5, 389, 1998.

ZANETTI, G. D. ***Tropaeolum majus* L. morfo-histologia, fitoquímica, atividade antimicrobiana e toxicidade**. Santa Maria: Curso de Pós – Graduação em Ciências e Tecnologia Farmacêutica, UFSM, 2002. Dissertação de Mestrado.