

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

BEATRIZ CRISTINA KONOPATZKI HIROTA

ESTUDO MORFOANATÔMICO, FITOQUÍMICO E DO POTENCIAL TÓXICO,
LARVICIDA, ANTIMICROBIANO, ANTIOXIDANTE, ANTI-INFLAMATÓRIO E
ANTINOCICEPTIVO DE *Smilax larvata* Griseb. (SMILACACEAE)

Curitiba

2015

BEATRIZ CRISTINA KONOPATZKI HIROTA

ESTUDO MORFOANATÔMICO, FITOQUÍMICO E DO POTENCIAL TÓXICO,
LARVICIDA, ANTIMICROBIANO, ANTIOXIDANTE, ANTI-INFLAMATÓRIO E
ANTINOCICEPTIVO DE *Smilax larvata* Griseb. (SMILACACEAE)

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em
Ciências Farmacêuticas, Setor de Ciências da
Saúde, Universidade Federal do Paraná, como
requisito parcial à obtenção do título de Doutor em
Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Marilis Dallarmi Miguel

Co-orientador: Prof. Dr. Obdulio Gomes Miguel

Curitiba

2015

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela vida, bênçãos e amparo nos momentos difíceis.

Aos professores Drs. Marilis Dallarmi Miguel e Obdulio Gomes Miguel pela oportunidade, orientação, incentivo, confiança e apoio.

Aos professores Drs. Joice Maria da Cunha, Anderson Barison, Érica Amano, Fábio Seigi Murakami, Vitor Alberto Kerber, Josiane de Fátima Gaspari Dias e Sandra Maria Warumby Zanin pela acolhida calorosa, incentivo e parcerias.

Às amigas Doutoradas Cristina Mayumi Sasaki Miyazaki, Cristiane da Silva Paula de Oliveira, Maria Christina dos Santos Verdam, Cristiane Bezerra da Silva e Cristina Peitz de Lima pela amizade, incentivo e colaboração na realização deste trabalho.

Aos colegas de Pós-graduação Fernanda Ocampos, Vinícius Bednarczuk de Oliveira, Ana Flávia Schwabe Duarte, Thais Fernanda Moreira, pela amizade e colaboração recebida durante o curso. E aos demais colegas do laboratório de Farmacotécnica e Fitoquímica da Universidade Federal do Paraná, que de uma forma contribuíram no desenvolvimento do trabalho.

Aos funcionários e professores do Departamento de Farmácia da Universidade Federal do Paraná que de formas diversas contribuíram para este trabalho.

Ao meu marido Marcelo, pelo companheirismo, compreensão e carinho.

Aos meus pais, Adolar e Vanda, e a meus irmãos Paula, Ana e Marcelo, pelo incentivo, apoio e entusiasmo.

Aos amigos Lilian Hollanda Gassen e Geraldo Leão, pela amizade e apoio.

Vosso coração conhece em silêncio
o segredo dos dias e das noites.
Mas vossos ouvidos têm sede do som
do conhecimento do vosso coração.
Saberei em palavras o que sempre
soubestes em pensamento.

Khalil Gibran

RESUMO

A espécie *Smilax larvata* Griseb.(Smilacaceae), é conhecida no sul do Brasil como “unha-de-gato” e suas partes aéreas são utilizadas na medicina tradicional para o tratamento da inflamação. O presente estudo tem como objetivo gerar informações que contribuam para o conhecimento e controle de qualidade da espécie. Os aspectos abordados incluem o estudo morfoanatômico, determinação de parâmetros de pureza, investigação da composição fitoquímica, avaliação do potencial tóxico, hemolítico, larvicida e antimicrobiano, estudo da atividade antioxidante, e investigação do potencial efeito anti-inflamatório e antinociceptivo de *S. larvata*. O material foi coletado na cidade de Curitiba, Paraná, Brasil. Uma parte foi destinada ao estudo morfoanatômico e determinação de parâmetros de pureza. O restante foi submetido a extração etanólica em aparelho de soxhlet gerando o extrato etanólico bruto. Este foi submetido a partição líquido-líquido com solventes de polaridade crescente obtendo-se as frações *n*-hexano, clorofórmio, acetato de etila e hidroalcoólica. O extrato bruto e frações foram utilizados nos ensaios de atividade biológica. De acordo com o estudo anatômico, a folha de *S. larvata* é simples, hipoestomática e a margem é espinulosa. O mesófilo é dorsiventral. Observa-se a presença de cristais prismáticos e ráfides. Projeções espiniformes são observadas na nervura central da face abaxial da folha e por toda extensão do caule. Este possui um anel esclerenquimático contínuo envolvendo o cilindro vascular no qual os feixes vasculares estão distribuídos de forma atactostélica. Com relação a composição fitoquímica, da fração acetato de etila foram isolados dois flavonoides di-glicosídeos, os quais foram identificados por experimentos de RMN de ¹H, ¹³C, HSQC e HMBC como drabanemoside e canferol 3-*O*- α -L-ramnopiranosil(1 \rightarrow 2)- α -L-ramnopiranoside. Estas substâncias foram isoladas pela primeira vez no gênero no presente estudo. Também foram identificados o canferol, ácido *p*-cumárico e ácido *p*-hidroxibenzoico. O extrato bruto e frações foram inócuos a *Artemia salina*, entretanto, o extrato bruto, fração hexano e clorofórmio foram hemolíticos (1000 μ g.mL⁻¹). O extrato bruto apresentou atividade larvicida contra larvas de *Aedes aegypti* e atividade antifúngica para *Candida albicans*. Todos os extratos reduziram a peroxidação lipídica. O extrato bruto apresentou significativa atividade antinociceptiva. O mecanismo de ação compreende a participação do sistema opioide, com atuação sobre receptores μ e provavelmente sem o envolvimento de receptores TRPA1. Esta propriedade é devida provavelmente aos alcaloides presentes no extrato etanólico bruto de *S. larvata*.

Palavras-chave: *Smilax*, drabanemoside, canferol, *Aedes aegypti*, antioxidante, antinociceptivo.

ABSTRACT

The species *Smilax larvata* Griseb. (Smilacaceae) is known in southern Brazil as "unha-de-gato" and its aerial parts are used in traditional medicine for the treatment of inflammation. This study aims to generate information that contributes to the knowledge and the quality control of the species. The aspects evaluated include morpho-anatomical study, determination of purity parameters, phytochemical composition investigation, toxicity, hemolytic, larvicidal and antimicrobial activities evaluation, study of antioxidant activity, and antiinflammatory and antinociceptive activities investigation of *S. larvata*. The vegetal material was collected in the city of Curitiba, Paraná, Brazil. A part was used in the anatomical study and quality control parameters. The remaining was submitted to an alcoholic extraction in Soxhlet apparatus generating the crude extract. It was submitted to a liquid partition with crescent polarity solvents producing the *n*-hexane, chloroform, ethyl acetate and hydroalcoholic fractions. The crude extract and fractions were used in the biological activities assays. According to the anatomical study, *S. larvata* leaf is simple, hypostomatic and the margin is spinulose. The mesophyll is dorsiventral. Prismatic crystals and raphides were observed. Spiniform projections were observed in the leaf midrib abaxial face and through all stem length. The stem has a sclerenchymatous ring involving the vascular cylinder which vascular bundles has atactostelic distribution. Regarding to the phytochemical composition, from the ethyl acetate fraction were isolated two flavonoid glycosides which were identified through ¹H, ¹³C, HSQC and HMBC NMR experiments, as drabanemoside and kaempferol 3-O- α -L-rhamnopyranosyl (1 \rightarrow 2) - α - L-rhamnopyranoside. These compounds were isolated for the first time on this genus in the present study. Kaempferol, *p*-coumaric acid and *p*-hydroxybenzoic acid were also identified. The crude extract and fractions were harmless to *Artemia salina*, however, the crude extract, hexane and chloroform fractions were hemolytic (1000 μ g.mL⁻¹). The crude extract showed larvicidal activity against *Aedes aegypti* and antifungal activity against *Candida albicans*. All extracts reduced the lipid peroxidation. The crude extract showed significant antinociceptive activity. The mechanism of action consists on opioid system participation, acting on μ receptors probably without TRPA1 receptors involvement. This property is probably due to the alkaloids detected in the crude ethanolic extract of *S. larvata*.

Keywords: *Smilax*, drabanemoside, kaempferol, *Aedes aegypti*, antioxidant, antinociceptive.

LISTA DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| FIGURA 1 – FAMÍLIA DA ORDEM DAS LILIALES | 21 |
| FIGURA 2 – DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA DA FAMÍLIA SMILACACEAE – EM VERMELHO..... | 22 |
| FIGURA 3 – REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DE SUBSTÂNCIAS ISOLADAS E IDENTIFICADAS DE ESPÉCIES DO GÊNERO <i>Smilax</i> | 31 |
| FIGURA 4 – FOTO ILUSTRATIVA DE UM EXEMPLAR DA ESPÉCIE <i>S. larvata</i> (GRISEB)..... | 33 |
| FIGURA 5 – FOTO ILUSTRATIVA DE RAMO AÉREO DE <i>S. larvata</i> (GRISEB)..... | 33 |
| FIGURA 6 – EQUEMA ILUSTRATIVO DA LOCALIZAÇÃO DA ESPÉCIE <i>S. larvata</i> NO BRASIL..... | 33 |
| FIGURA 7 – FLUXOGRAMA DA METODOLOGIA DE PESQUISA..... | 40 |
| FIGURA 8 – <i>Smilax larvata</i> Griseb..... | 59 |
| FIGURA 9 – <i>Smilax larvata</i> Griseb..... | 60 |
| FIGURA 10 – <i>Smilax larvata</i> Griseb..... | 61 |
| FIGURA 11 – <i>Smilax larvata</i> Griseb..... | 62 |
| FIGURA 12 – <i>Smilax larvata</i> Griseb. RESULTADOS DOS TESTES HISTOQUÍMICOS..... | 63 |
| FIGURA 15 – AMPLIAÇÃO DA REGIÃO DE 8,5 A 6,0 PPM DO ESPECTRO DE RMN DE ¹ H DA AMOSTRA AES-3 (600 MHz, MEOD, 30°C)..... | 69 |
| FIGURA 16 – EXPANSÃO DA REGIÃO DE 8,5 A 6,0 PPM E DE 80 A 160 PPM DO ESPECTRO DE CORRELAÇÃO DE ¹ H- ¹³ C DE EXPERIMENTO DE RMN DE HSQC A 600.13 E 150.9 MHZ, MOSTRANDO A CORRELAÇÃO DOS HIDROGÊNIOS AROMÁTICOS DAS SUBSTÂNCIAS AES-3A, AES-3B E AES-3C (MEOD/TMS, 30 °C)... | 70 |
| FIGURA 17 – EXPANSÃO DA REGIÃO DE 8,5 A 6,0 PPM E DE 80 A 180 PPM DO ESPECTRO DE CORRELAÇÃO A LONDA DISTÂNCIA DE ¹ H- ¹³ C DE EXPERIMENTO DE RMN DE HMBC A 600.13 E 150.9 MHZ, MOSTRANDO A CORRELAÇÃO DOS HIDROGÊNIOS AROMÁTICOS DAS SUBSTÂNCIAS AES-3A, AES-3B E AES-3C (MEOD/TMS, 30 °C). | 70 |

| | |
|---|----|
| FIGURA 18 – ESTRUTURA QUÍMICA DO CANFEROL..... | 71 |
| FIGURA 19 – ESTRUTURA QUÍMICA DO ÁCIDO <i>p</i> -CUMÁRICO. | 74 |
| FIGURA 20 – ESTRUTURA QUÍMICA DO ÁCIDO <i>p</i> -HIDROXIBENZOICO..... | 75 |
| FIGURA 21 – CROMATOGRAMA DA CROMATOGRAFIA PREPARATIVA EM FASE REVERSA MOSTRANDO OS PICOS DAS SUBSTÂNCIAS HPLC -3 E HPLC -5..... | 76 |
| FIGURA 22 – ESPECTRO COMPLETO DE RMN DE ¹ H DA SUBSTÂNCIA HPLC-3 (MEOD/TMS, 200.13 MHZ, 30 °C)..... | 78 |
| FIGURA 23 – ESPECTRO DE CORRELAÇÃO DE ¹ H- ¹³ C DE EXPERIMENTO DE RMN HSQC A 600.13 E 150.9 MHZ, MOSTRANDO A CORRELAÇÃO DOS HIDROGÊNIO DA SUBSTÂNCIA HPLC-3 (MEOD/TMS, 30 °C)..... | 78 |
| FIGURA 24 – ESPECTRO DE CORRELAÇÃO A LONGA DISTÂNCIA DE ¹ H- ¹³ C DE EXPERIMENTO DE RMN HMBC A 600.13 E 150.9 MHZ, MOSTRANDO AS CORRELAÇÕES A LONGA DISTÂNCIA DOS HIDROGÊNIO DA SUBSTÂNCIA HPLC-3 (MEOD/TMS, 30 °C)..... | 79 |
| FIGURA 25 – ESPECTRO COMPLETO DE RMN ¹³ C DA SUBSTÂNCIA HPLC-3 (MEOD/TMS, 200.13 MHZ, 30 °C)..... | 79 |
| FIGURA 26 – ESTRUTURA QUÍMICA DO DRABANEMOROSIDE. | 81 |
| FIGURA 27 – ESPECTRO COMPLETO DE RMN DE ¹ H DA SUBSTÂNCIA HPLC-5 (MEOD/TMS, 200.13 MHZ, 30 °C)..... | 83 |
| FIGURA 28 – ESPECTRO COMPLETO DE RMN DE ¹³ C DA SUBSTÂNCIA HPLC-5 (MEOD, 200.13 MHZ, 30 °C). | 84 |
| FIGURA 29 – ESTRUTURA QUÍMICA DO CANFEROL 3-O- α -L- RAMNOPIRANOSIL (1 \rightarrow 2) - α -L-RAMNOPIRANOSIDE..... | 86 |
| FIGURA 30 – FOTOS ILUSTRATIVAS DOS RESULTADOS DO TESTE DE HEMÓLISE EM PLACAS DE ÁGAR SANGUE. | 88 |
| FIGURA 31 – RESULTADO DO TESTE DE HEMÓLISE..... | 88 |
| FIGURA 32 – MORTALIDADE EM NÚMERO DE LARVAS L3 DE <i>A. aegypti</i> | 90 |
| FIGURA 33 – FOTOGRAFIA DO HALO DE INIBIÇÃO FORMADO PELO EXTRATO BRUTO | 91 |
| FIGURA 34 – FOTOGRAFIA DO RESULTADO QUALITATIVO DE ATIVIDADE ANTIOXIDANTE POR REDUÇÃO DO RADICAL DPPH | 93 |
| FIGURA 35 – PORCENTAGEM DE REDUÇÃO DA PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA. | 97 |

| | |
|---|-----|
| FIGURA 36 – EFEITO DO EXTRATO BRUTO DE <i>S. larvata</i> SOBRE O EDEMA DE PATA EM RATOS INDUZIDO POR CARRAGENINA..... | 98 |
| FIGURA 37 – EFEITO DO EXTRATO BRUTO DE <i>S. larvata</i> SOBRE AS CONTORÇÕES ABDOMINAIS INDUZIDAS POR ÁCIDO ACÉTICO EM CAMUNDONGOS..... | 99 |
| FIGURA 38 – EFEITO DO EXTRATO BRUTO DE <i>S. larvata</i> SOBRE A ATIVIDADE LOCOMOTORA ESPONTÂNEA EM RATOS. | 100 |
| FIGURA 39 – EFEITO DO EXTRATO DE <i>S. larvata</i> SOBRE A NOCICEPÇÃO INDUZIDA POR ESTÍMULO TÉRMICO (PLACA QUENTE)..... | 101 |
| FIGURA 40 – EFEITO DO EXTRATO BRUTO DE <i>S. larvata</i> SOBRE A NOCICEPÇÃO INDUZIDA POR FORMALINA 2,5% EM RATOS.... | 102 |
| FIGURA 41 – EFEITO DO PRÉ-TRATAMENTO DOS ANIMAIS COM NALOXONA (1 mg/Kg, i.p.) SOBRE O EFEITO ANTINOCICEPTIVO DO EXTRATO BRUTO DE <i>S. larvata</i> NO MODELO DE NOCICEPÇÃO INDUZIDA POR FORMALINA EM RATOS..... | 103 |
| FIGURA 42 – EFEITO DO EXTRATO BRUTO DE <i>S. larvata</i> SOBRE A MOTILIDADE INTESTINAL DE RATOS. | 104 |
| FIGURA 43 – EFEITO DO EXTRATO BRUTO DE <i>S. larvata</i> SOBRE A NOCICEPÇÃO INDUZIDA POR ÓLEO DE MOSTARDA. | 105 |

LISTA DE GRÁFICOS

| | |
|--|----|
| GRÁFICO 1 – REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DO ESPECTRO DE UV DA SUBSTÂNCIA AES-3 EM METANOL. | 68 |
| GRÁFICO 2 – REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DO ESPECTRO DE UV DA SUBSTÂNCIA HPLC-3 EM METANOL..... | 77 |
| GRÁFICO 3 – REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DO ESPECTRO DE UV DA SUBSTÂNCIA HPLC-5 EM METANOL..... | 82 |
| GRÁFICO 4 – RESULTADOS DO TESTE DE HEMÓLISE EM PORCENTAGEM. .. | 89 |
| GRÁFICO 5 – CURVA DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DA FRAÇÃO ACETATO DE ETILA DE <i>S.larvata</i> | 93 |
| GRÁFICO 6 – CURVA PADRÃO DO ÁCIDO GÁLICO. | 95 |

LISTA DE QUADROS

| | |
|--|----|
| QUADRO 1 – EXEMPLOS DE USO TRADICIONAL DE ESPÉCIES DE <i>Smilax</i> | 24 |
| QUADRO 2 – EXEMPLOS DE SUBSTÂNCIAS ISOLADAS E IDENTIFICADAS DE ESPÉCIES DO GÊNERO <i>Smilax</i> | 30 |
| QUADRO 3 – ENQUADRAMENTO TAXONÔMICO DA ESPÉCIE <i>S. larvata</i> | 32 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|---|----|
| TABELA 1 – PARÂMETROS DE QUALIDADE de <i>S. larvata</i> | 66 |
| TABELA 2 – RENDIMENTO DA EXTRAÇÃO E TEOR DE SÓLIDOS DO EXTRATO ETANÓLICO BRUTO DE <i>S. larvata</i> | 67 |
| TABELA 3 – DESLOCAMENTOS QUÍMICOS DE RMN DE ¹ H, ¹³ C, HSQC E HMBC DO CANFEROL | 71 |
| TABELA 4 – DESLOCAMENTOS QUÍMICOS DE RMN DE ¹ H, ¹³ C, HSQC E HMBC DO ÁCIDO <i>p</i> -CUMÁRICO..... | 73 |
| TABELA 5 – DESLOCAMENTOS QUÍMICOS DE RMN DE ¹ H, ¹³ C, HSQC E HMBC DO ÁCIDO <i>p</i> -HIDROXIBENZOICO..... | 75 |
| TABELA 6 – DESLOCAMENTOS QUÍMICOS DE RMN DE ¹ H, ¹³ C, HSQC E HMBC DO DRABANEMOROSIDE..... | 80 |
| TABELA 7 – DESLOCAMENTOS QUÍMICOS DE RMN DE ¹ H, ¹³ C, HSQC E HMBC DO CANFEROL 3-O- α -L-RAMNOPIRANOSIL (1 \rightarrow 2) - α -L-RAMNOPIRANOSIDE..... | 84 |
| TABELA 8 – RESULTADOS DE TOXICIDADE DOS EXTRATOS DE <i>S. larvata</i> | 87 |
| TABELA 9 – MEIO REACIONAL UTILIZADO NA DETERMINAÇÃO DE FENÓLICOS TOTAIS | 94 |
| TABELA 10 – CONCENTRAÇÃO DE FENÓLICOS TOTAIS NOS EXTRATOS DE <i>S. larvata</i> | 95 |

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

| | |
|---------------------|--|
| °C | Grau Celsius |
| µl | Microlitro |
| A | Absorbância |
| AA% | Atividade Antioxidante |
| AAR% | Atividade Antioxidante Relativa |
| AINE | Anti-inflamatório não-esteróide |
| CCD | Cromatografia em Camada Delgada |
| Cg | Carragenina |
| CHCl ₃ | Clorofórmio |
| CLAE | Cromatografia Líquida de alta eficiência |
| COX | Ciclooxigenase |
| COX | Ciclooxigenase |
| DPPH | 2,2-difenil-1-picrilhidrazil |
| GRISEB. | Grisebach |
| HMBC | Heteronuclear Multiple Bond Correlation |
| HPLC | High Performance Liquid Chromatography |
| HSQC | Heteronuclear Single Quantum Coherence |
| Hz | Hertz |
| M | Mol por litro |
| mg.mL ⁻¹ | Miligrama por mililitro |
| min | Minutos |
| N | Normal |
| nm | Nanômetro |
| p/v | Massa/volume |
| pH | Potencial hidrogeniônico |
| RMN | Ressonância nuclear magnética |
| RMN ¹³ C | Ressonância nuclear magnética de carbono 13. |
| RMN ¹ H | Ressonância nuclear magnética de hidrogênio. |
| TMS | Tetrametilsilano |
| TRPA1 | Transient receptor potential ankyrin 1 |
| UV | Ultravioleta |
| v/v | Volume/volume |

SUMÁRIO

| | |
|--|-----------|
| 1 INTRODUÇÃO..... | 18 |
| 1.1 OBJETIVO GERAL | 19 |
| 1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS..... | 19 |
| 2 REVISÃO..... | 21 |
| 2.1 ASPECTOS GERAIS DA FAMÍLIA SMILACACEAE..... | 21 |
| 2.1.1 Distribuição geográfica da família Smilacaceae..... | 22 |
| 2.2 GÊNERO <i>SMILAX</i> | 23 |
| 2.2.1 Uso na medicina tradicional..... | 23 |
| 2.2.2 Atividades biológicas relatadas..... | 24 |
| 2.2.3 Substâncias isoladas e identificadas | 25 |
| 2.2.4 Espécie <i>Smilax larvata</i> Griseb. | 32 |
| 2.3 INFLAMAÇÃO E AGENTES ANTI-INFLAMATÓRIOS..... | 34 |
| 2.4 A DOR..... | 35 |
| 2.5 OBTENÇÃO DE ANTI-INFLAMATÓRIOS E ANALGÉSICOS A PARTIR DE PRODUTOS NATURAIS..... | 37 |
| 3 METODOLOGIA DE PESQUISA..... | 39 |
| 3.1 FASES DO DESENVOLVIMENTO DE PESQUISA..... | 39 |
| 3.2 OBTENÇÃO DO MATERIAL BOTÂNICO | 41 |
| 3.3 ESTUDO MORFOANATÔMICO | 41 |
| 3.3.1 Lâminas semipermanentes..... | 41 |
| 3.3.2 Testes microquímicos | 42 |
| 3.3.3 Microscopia eletrônica de varredura | 42 |
| 3.4 PARÂMETROS DE PUREZA | 42 |
| 3.4.1 Determinação do teor de água..... | 42 |
| 3.4.2 Determinação de cinzas | 43 |

| | |
|---|----|
| 3.5 ESTUDO FITOQUÍMICO | 43 |
| 3.5.1 Marcha sistemática fitoquímica | 43 |
| 3.5.2 Preparo do extrato alcoólico | 43 |
| 3.5.3 Preparo do extrato aquoso | 44 |
| 3.5.4 Preparo do extrato etanólico bruto e frações orgânicas..... | 44 |
| 3.5.5 Teor de sólidos do extrato etanólico bruto | 44 |
| 3.5.6 Isolamento e identificação: procedimentos gerais | 45 |
| 3.6 ESTUDO DO POTENCIAL TÓXICO, LARVICIDA E ANTIMICROBIANO | 45 |
| 3.6.1 Letalidade frente a <i>Artemia salina</i> | 45 |
| 3.6.2 Avaliação da atividade hemolítica..... | 47 |
| 3.6.3 Avaliação da atividade larvicida contra <i>Aedes aegypti</i> | 48 |
| 3.6.4 Atividade antimicrobiana – Método da Difusão em disco..... | 49 |
| 3.7 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE | 49 |
| 3.7.1 Redução do radical DPPH | 49 |
| 3.7.2 Determinação de fenólicos totais..... | 50 |
| 3.7.3 Avaliação da inibição da peroxidação lipídica pelo método TBARS | 51 |
| 3.8 INVESTIGAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA E ANTINOCICEPTIVA | 52 |
| 3.8.1 Animais | 52 |
| 3.8.2 Avaliação do efeito anti-inflamatório do extrato etanólico bruto de <i>S. larvata</i> pelo método de edema de pata induzido por carragenina..... | 53 |
| 3.8.3 Nocicepção induzida pela injeção intraperitoneal de ácido acético | 53 |
| 3.8.4 Avaliação da atividade locomotora espontânea..... | 53 |
| 3.8.5 Atividade antinociceptiva pelo método de placa quente | 54 |
| 3.8.6 Nocicepção induzida pela injeção intraplantar de formalina | 54 |
| 3.8.7 Estudo do possível mecanismo de ação antinociceptivo: Participação do sistema opióide | 54 |

| | | |
|----------|---|-----------|
| 3.8.8 | Envolvimento do sistema opioide: avaliação do efeito do extrato etanólico bruto na motilidade intestinal | 55 |
| 3.8.9 | Investigação do envolvimento dos receptores TRPA1 | 55 |
| 4 | RESULTADOS E DISCUSSÃO | 57 |
| 4.1 | ESTUDO MORFOANATÔMICO | 57 |
| 4.1.1 | Folha | 57 |
| 4.1.2 | Pecíolo | 58 |
| 4.1.3 | Caule | 64 |
| 4.1.4 | Discussão do estudo morfoanatômico | 64 |
| 4.2 | PARÂMETROS DE PUREZA | 66 |
| 4.3 | ESTUDO FITOQUÍMICO | 67 |
| 4.3.1 | Marcha sistemática de análise fitoquímica | 67 |
| 4.3.2 | Cálculo do rendimento da extração e do teor de sólidos do extrato bruto | 67 |
| 4.4 | Isolamento e identificação | 68 |
| 4.4.1 | Investigação da amostra AES-3 e identificação das substâncias AES-3A, AES-3B, AES-3C presentes na amostra | 68 |
| 4.5 | ESTUDO DO POTENCIAL TÓXICO, LARVICIDA E ANTIMICROBIANO | 86 |
| 4.5.1 | Letalidade frente a <i>Artemia salina</i> | 86 |
| 4.5.2 | Atividade hemolítica | 87 |
| 4.5.3 | Atividade larvicida contra <i>Aedes aegypti</i> | 90 |
| 4.5.4 | Atividade antimicrobiana | 91 |
| 4.6 | ESTUDO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE | 92 |
| 4.6.1 | Método de redução do radical DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazila) | 92 |
| 4.6.2 | Determinação de fenólicos totais | 94 |
| 4.6.3 | Avaliação da redução da peroxidação lipídica | 96 |
| 4.7 | ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA E ANTINOCICEPTIVA | 98 |
| 4.7.1 | Efeito do extrato etanólico bruto de <i>S. lavata</i> sobre o edema induzido por carragenina | 98 |

| | |
|--|------------|
| 4.7.2 Nocicepção induzida pela injeção intraperitoneal de ácido acético | 99 |
| 4.7.3 Efeito do extrato bruto de sobre a atividade locomotora espontânea | 100 |
| 4.7.4 Efeito do extrato bruto de <i>S. larvata</i> sobre a nocicepção induzida por estímulo térmico (placa quente) | 101 |
| 4.7.5 Efeito do extrato bruto de <i>S. larvata</i> sobre a nocicepção induzida pela injeção intraplantar de formalina em ratos. | 102 |
| 4.7.6 Avaliação da participação do sistema opioide no efeito antinociceptivo do extrato bruto de <i>S. larvata</i> em ratos..... | 103 |
| 4.7.7 Efeito do extrato bruto de <i>S.larvata</i> sobre a motilidade intestinal | 104 |
| 4.7.8 Investigação do envolvimento de receptores TRPA1 no efeito antinociceptivo do extrato bruto de <i>S. larvata</i> | 105 |
| 4.7.9 Discussão | 106 |
| 5 CONCLUSÃO | 110 |
| 6 CONSIDERAÇÕES FINAIS..... | 112 |
| REFERÊNCIAS..... | 113 |
| ANEXOS | 133 |

1 INTRODUÇÃO

O presente estudo tem como objetivo fornecer parâmetros de qualidade, desenvolver extratos, bem como o isolamento e identificação de compostos fitoquímicos e avaliação de possíveis atividades biológicas da espécie *Smilax larvata* Griseb., (Smilacaceae). Esta espécie é utilizada pela população de Curitiba no Paraná para tratar processos inflamatórios e conhecida nessa região como “unha-de-gato”. Este nome popular também é utilizado para a espécie *Uncaria tomentosa*, a qual possui atividade anti-inflamatória reconhecida (GATTUSO *et al.*, 2004).

A questão da nomenclatura correta é de extrema importância no estudo, comercialização e controle de qualidade de plantas medicinais. Por vezes, caracteres morfológicos mais evidentes como presença de espinhos, inflorescências e outros são levados em consideração na nomenclatura popular, resultando em incerteza quanto a real identidade da espécie. O fato das espécies *S. larvata* e *U. tomentosa* não pertencerem à mesma família taxonômica, e ainda assim compartilharem o mesmo nome tradicional, exemplifica a importância do estudo anatômico e determinação de parâmetro de qualidade para a correta identificação das espécies vegetais.

Recentemente espécies do gênero *Smilax* tem sido intensamente investigadas devido a relatos de uso farmacológico na medicina tradicional. É extensamente documentado e provado que as plantas medicinais são uma fonte de moléculas inéditas. A busca por substâncias que exerçam atividade biológica resulta dos efeitos colaterais, desenvolvimento de resistência e alto custo das drogas atualmente comercializadas. Além da necessidade de alternativas quanto a agentes terapêuticos, este trabalho vem ao encontro das políticas de pesquisa e desenvolvimento de fitoterápicos incentivadas pelo governo brasileiro. A utilização de fitoterápicos no Sistema Único de Saúde está preconizado em programas como o PNPIC (Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares no SUS) e na Portaria 2048 / 2009.

No caso de agentes com atividade larvicida, os efeitos observados nos organismos não-alvo e no ecossistema causados pelos produtos atuais incentiva a pesquisa por alternativas que sejam seguras do ponto de vista ecotoxicológico.

O presente estudo está disposto da seguinte maneira: procedeu-se a coleta e o preparo do material vegetal. Uma parte do material vegetal foi destinada ao estudo morfoanatômico e determinação de parâmetros de pureza. Com outra parte procedeu-se a extração em aparelho de Soxhlet, e a partir dos extratos gerados investigou-se a composição fitoquímica, a toxicidade, a atividade larvicida, antimicrobiana e antioxidante *in vitro*, e a atividade anti-inflamatória e antinociceptiva *in vivo*.

1.1 OBJETIVO GERAL

Contribuir na investigação da morfoanatomia, composição fitoquímica, e das atividades biológicas dos extratos de *Smilax larvata* Griseb. (Smilacaceae).

1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Coletar e identificar a espécie;
- b) Gerar parâmetros para o controle de qualidade;
- c) Isolar substâncias presentes na espécie por meio de técnicas cromatográficas;
- d) Determinar a estrutura química das substâncias isoladas através de técnicas espectroscópicas de RMN de ^1H e ^{13}C , HMBC e HSQC;
- e) Realizar estudos do potencial tóxico e hemolítico do extrato bruto e frações *S. larvata*;
- f) Realizar estudos da atividade larvicida e antimicrobiana do extrato bruto de *S. larvata*;
- g) Investigar a atividade antioxidante do extrato bruto e frações de *S. larvata*;
- h) Avaliar o efeito anti-inflamatório do extrato bruto pelo método de edema de para induzido por carragenina;
- i) Avaliar o efeito antinociceptivo do extrato bruto pelo método de contorções induzidas por ácido acético;
- j) Avaliar o efeito antinociceptivo do extrato bruto pelo método de nocicepção induzida por placa quente;
- k) Avaliar o efeito antinociceptivo e anti-inflamatório do extrato bruto pelo método da formalina;

- l) Investigar o efeito do extrato bruto na atividade locomotora espontânea;
- m) Investigar o envolvimento do sistema opioide no efeito do extrato bruto;
- n) Investigar o efeito do extrato bruto sobre a motilidade intestinal;
- o) Investigar a atuação do extrato bruto em receptores TRPA1.

2 REVISÃO

2.1 ASPECTOS GERAIS DA FAMÍLIA SMILACACEAE

A família Smilacaceae, uma das maiores entre as angiospermas, compreende cinco gêneros: *Anikenton*, *Coprosmanthus*, *Heterosmilax*, *Nemexia* e *Smilax* (LIST, 2013). Cronquist (1981) descreveu 12 gêneros pertencentes a família Smilacaceae, entretanto estes agora estão distribuídos entre as famílias Liliales e Asparagales. Como representado no esquema da figura 1, a família Smilacaceae está incluída na ordem das Liliales, classificada recentemente como uma família irmã da Liliaceae (STEVENS, 2012).

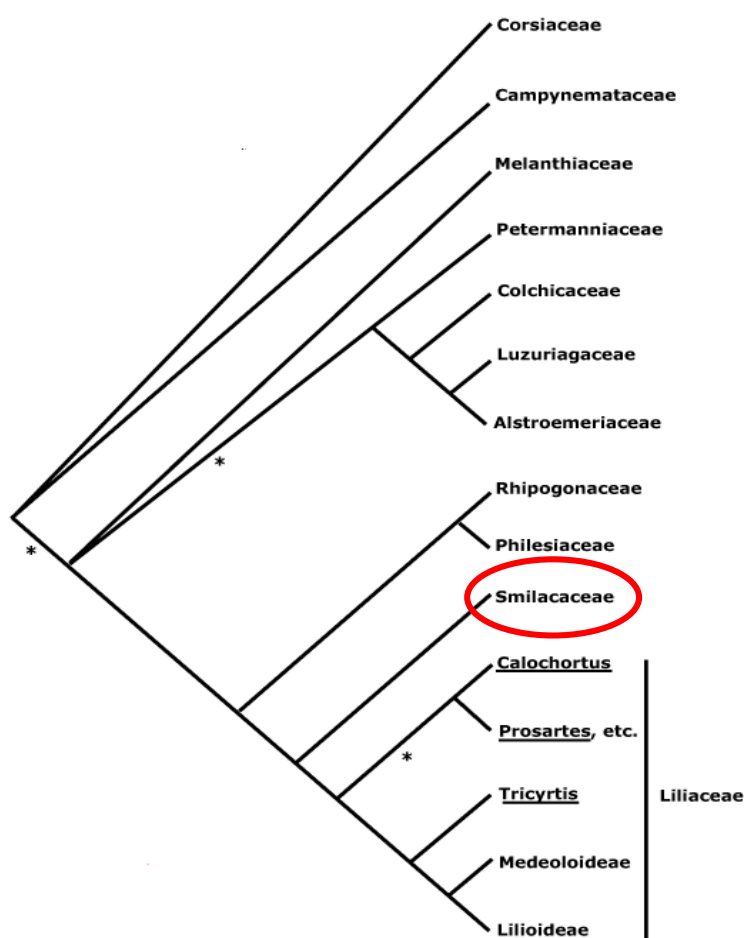


FIGURA 1 – FAMÍLIA DA ORDEM DAS LILIALES

*Denota ramificação com 50-80% de apoio. Todas outras ramificações tem <80% de apoio.

Fonte: STEVENS, 2012.

Devido a esta mudança de classificação, pode-se verificar em literatura vários artigos que ainda descrevem espécies do gênero *Smilax* como pertencentes a família Liliaceae.

A família Smilacaceae é composta por plantas herbáceas ou arborizadas, esguias ou trepadeiras geralmente pouco eretas. São descritas também como arbustos com galhos, elevados e rastejantes. As hastes possuem muitas folhas, geralmente ramificadas, frequentemente com espinhos recurvados, algumas vezes entrelaçados, não apresentando crescimento secundário. Geralmente produzem saponinas esteroidais, e algumas vezes taninos (proantocianidinas). As flores de alguns gêneros apresentam-se como inflorescências terminais, em outros, como no gênero *Smilax*, flores individuais e pequenas. Em alguns outros gêneros as flores são grandes e chamativas. Os frutos possuem de 1-3 sementes (CRONQUIST, 1981).

2.1.1 Distribuição geográfica da família Smilacaceae

A família Smilacaceae está distribuída em regiões de clima pantropical a temperado (Figura 2).

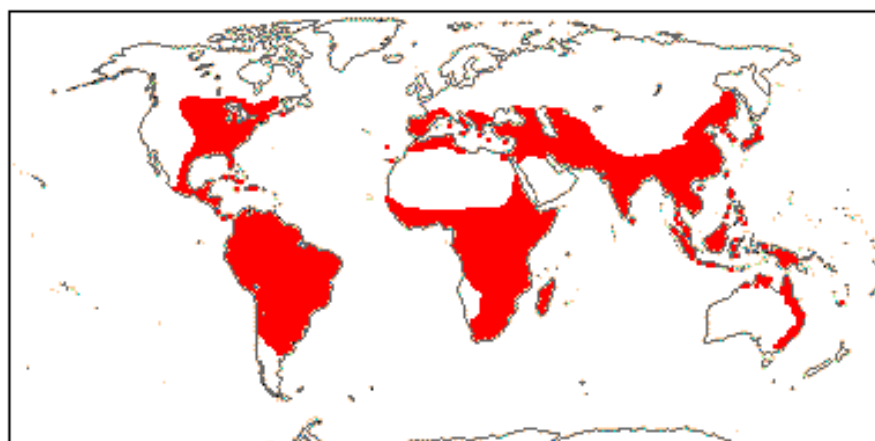


FIGURA 2 – DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA DA FAMÍLIA SMILACACEAE – EM VERMELHO.

Fonte: STEVENS, 2012.

2.2 GÊNERO *SMILAX*

2.2.1 Uso na medicina tradicional

Espécies do gênero *Smilax* têm sido extensamente estudadas devido ao seu uso como alimento e na medicina popular em todo o mundo. As propriedades alimentícias do gênero possuem registros que remontam desde os tempos coloniais, quando espécies de *Smilax* foram utilizadas como decoctos e adoçantes. Relatos apontam seu uso como ingrediente em bebidas e como substituto do aspargo. Várias partes do vegetal são utilizadas para estes fins, como folhas, frutos, raízes e brotos jovens (AO *et al.*, 2011; WOO, DO, e SON, 1992; COX *et al.*, 2005).

Em relação ao uso medicinal do gênero, existe uma variedade de registros do uso de *Smilax* na medicina tradicional chinesa e em outras localidades. Alguns deles apresentam-se no quadro 1.

| Espécie | Uso tradicional | País | Referência |
|-----------------------|--|----------------|-------------------------------|
| <i>S. glabra</i> | Brucelose, sífilis, nefrite aguda e crônica e intoxicação por metais como chumbo, mercúrio e cádmio. | China | (XIA <i>et al.</i> , 2010) |
| <i>S. china</i> | Reumatismo, artrite, gota, câncer, doenças inflamatórias | China | (WU <i>et al.</i> , 2010) |
| <i>S. zeylanica</i> | Desordens da pele, dores, inchaço, abscessos, reumatismo | Índia | (RAJESH e PERUMAL, 2014) |
| <i>S. glycyphylla</i> | Agente flavorizante, prevenção do escorbuto, doenças pulmonares, reumatismo, sífilis. | Austrália | (COX <i>et al.</i> , 2005) |
| <i>S. canariensis</i> | Diurético | Ilhas Canárias | (ABDALA <i>et al.</i> , 2008) |

Continuação quadro 1.

| | | | |
|------------------------|---|----------------|--------------------------------|
| <i>S. domingensis</i> | Diurético, infecções cutâneas, doenças venéreas, alergias, infecção urinária. | Guatemala | (CÁCERES <i>et al.</i> , 2012) |
| <i>S. rotundifolia</i> | Analgésico, antirreumático, auxiliar na expulsão da placenta após o parto, câibras musculares, espasmos, dor de cabeça, alimento. | Estados Unidos | (USDA, 2014) |
| <i>S. officinalis</i> | Anti-reumático, anti-sifilítico, diurético. | Brasil | (SOARES <i>et al.</i> , 2014) |

QUADRO 1 – EXEMPLOS DE USO TRADICIONAL DE ESPÉCIES DE *Smilax*

O gênero *Smilax* compreende aproximadamente 310 espécies, das quais 33 estão distribuídas no Brasil em diferentes ecossistemas. As espécies deste gênero são conhecidas na população brasileira como “salsaparrilha” e algumas delas tem sido utilizadas na medicina tradicional deste o século XVI (SOARES *et al.*, 2014).

2.2.2 Atividades biológicas relatadas

Devido ao intenso uso na medicina tradicional e como alimento, investigações acerca das possíveis atividades biológicas de espécies de *Smilax* tem sido realizadas.

Sobre a espécie *Smilax glabra*, relatou-se que a administração de extrato aquoso dos rizomas em ratos resultou em inibição da inflamação primária e secundária (JIANG e XU, 2003). O extrato desta espécie puro ou combinado com ácido meso 2-3 dimercaptosuccínico exibiu efeito protetor no estresse oxidativo induzido por chumbo em ratos (XIA *et al.*, 2010). O extrato etanólico e aquoso exerceu atividade citotóxica em linhagens de células de carcinoma hepático humano (HepG2) (SAMARAKOON *et al.*, 2010). A fração solúvel em água do extrato etanólico inibiu o crescimento de linhagens de células de câncer de mama MCH-7, linhagem de células de câncer de cólon HT-29 em camundongos e células H22 de hepatoma. Os

mecanismos de apoptose associados ao tratamento com extrato foram: aumento da permeabilidade de membrana mitocondrial, produção de espécies reativas de oxigênio, elevação de cálcio intracelular, deslocalização do citocromo C e ativação da caspase-3 (YUJING *et al.*, 2011.)

Com relação a espécie *Smilax china*, o extrato aquoso dos tubérculos exerceu atividade anti-inflamatória e antinociceptiva em ratos (SHU, GAO e YANG, 2006). Saponinas esteroidais foram isoladas do extrato butanólico da referida espécie juntamente com outras 13 substâncias descritas previamente. A atividade anti-inflamatória foi investigada e os resultados indicaram que todas as saponinas isoladas inibiram significativamente a atividade da COX-2 (SHAO *et al.*, 2007). O extrato acetato de etila dos rizomas apresentou atividade anticâncer *in vitro* (LI *et al.*, 2007).

O extrato das raízes de *Smilax lanceaefolia* Roxb. apresentou atividade antioxidante frente ao ensaio do DPPH (LAITONJAM e KONGBRAILLATPAM, 2010). O extrato metanólico das folhas de *Smilax zeylanica* apresentou significativa atividade antidiabética pois diminuiu os níveis de glicose no sangue em ratos com diabetes induzido por estreptozotocina (RAJESH, PERUMAL e SUNDARRAJAN, 2010). A atividade antioxidante pela redução da peroxidação lipídica e outros métodos *in vitro* foi constatada no extrato aquosos de *Smilax glyciophilla* (COX *et al.*, 2005).

2.2.3 Substâncias isoladas e identificadas

Além da atividade biológica dos extratos, investigações acerca da composição fitoquímica, assim como o isolamento e identificação de substâncias inéditas de espécies de *Smilax*, apresentam-se relatadas em literatura.

O gênero *Smilax* tem-se mostrado uma fonte de metabólitos secundários os quais apresentaram diversas atividades biológicas. Exemplos de moléculas isoladas e identificadas de espécies deste gênero estão resumidas no quadro 2 e figura 3.

| Espécie | Substâncias isoladas | Atividades biológicas relacionadas | Referências |
|----------------------|---|---|---------------------------------------|
| <i>S. aspera</i> | <p>Cianidina 3-O-rutinoside, Pelargonidina 3-O-rutinoside</p> <ul style="list-style-type: none"> • (25S)-26-O-β-D-glicopiranosil-5β-furostan-1β,3β,22α,26-tetraol-1-O-β-D-glicopiranosideo; • (25S)-26-O-β-D-glicopiranosil-5β-furostan-1β,2β,3β,5β,22α,26-hexaol; • (25S)-26-O-β-D-glucopiranosil-5β-furostan-3β,22α,26-triol-3-O-α-L-rhamnopiranosil-(1→2)-O-β-D-glicopiranosil-(1→2)-O-β-D-glicopiranosideo; • (25S)-26-O-β-D-glicopiranosil-5β-furostan-3β,22α,26-triol-3-O-β-D-glicopiranosil-(1→2)-O-β-D-glicopiranosideo; <i>trans</i>-resveratrol; (+) catequina; (-) epicatequina | Corante | (LONGO e VASAPOLLO, 2006) |
| <i>S. corbutaria</i> | <ul style="list-style-type: none"> • (2R,3R)-2-acetyl astilbina; (2R,3R)-3-acetyl astilbina; (2R,3R)-4-acetyl astilbina; (2R,3R)-3-acetil engeletina; (2R,3S)-4-acetil isoastilbina; • 2-(4-hidroxifenil)-3,4,9,10-tetraidro-3,5-diidroxi-10-(3,4-diidroxifenil)-(2R,3R,10R)-2H,8H-benzo [1,2-b:3,4-b] dipiran-8-one; • 2-(4-hidroxifenil)-3,4,9,10-tetraidro-3,5-diidroxi-10-(3,4-diidroxifenil)-(2R,3R,10S)-2H,8H-benzo [1,2-b:3,4-b0] dipiran-8-one; • 3,4-diidro-7-hidroxi-4-(3,4-diidroxifenil)-5-[(1E)-2-(4-hidroxifenil) etenyl]-2H-1-benzopirano-2-one; • 3,4-diidro-7-hidroxi-4-(3,4-diidroxifenil)-5-[(1E)-2-(3,4-diidroxifenil) etenil]-2H-1-benzopirano-2-one; | Potencial atividade estrogênica e antiestrogênica | (WUNGSINTAWEEKU <i>et al.</i> , 2011) |

| Continua quadro 2. | | | |
|--------------------|--|---|--|
| Espécie | Substâncias isoladas | Atividades biológicas relacionadas | Referências |
| | <ul style="list-style-type: none"> • 3,4-diidro-7-hidroxi-4-(4-hidroxi-3-metoxifenil)-5-[(1E)-2-(4-hidroxifenil) etenil]-2H-1-benzopirran-2-one; • 5,7,30,40-tetraidroxi-3-fenilcoumarina; • Astilbina, neoastilbina, Isoastilbina, Neoisoastilbina, Engeletina, Isoengeletina, (+) taxifolina, (+) diidrocanferol, naringenina, eriodictiol, homoeriodictiol, quercetina, quercetrina, luteolina, (-) catequina, (-) epicatequina, cinchonaina Ia; • catequina-(7,8-b,c)-4b-(3,4-diidroxifenil)-2(3H)-piranona, • cinchonaina Ib, rinchoina Ia, cinchonaina Id, • (4S,8R,9S)-4,8-bis(3,4-diidroxifenil)-3,4,9,10-tetraidro-5,9-diidroxi-2H,8H-benzo[1,2-b:3,4-b0]dipiran-2-one;cinchonaina Ic • (4R,8R,9S)-4,8-bis(3,4-diidroxifenil)-3,4,9,10-tetraidro-5,9-diidroxi-2H,8H-benzo[1,2-b:3,4-b0]dipiran-2-one; • filocumarina, epiflocumarina, <i>trans</i>-resveratrol, piceatanol, isorapontigenina, eucrifina, (-) siringaresinol, ácido 5-O-cafeoilchiquímico, | Potencial atividade estrogênica e antiestrogênica | (WUNGSINTA WEEKU <i>et al.</i> , 2011) |
| <i>S. china</i> | <ul style="list-style-type: none"> • Aldeído protocatecuico, ácido clorogênico, ácido cafeico, polidatina, resveratrol, astilbina, rutina, oxiresveratrol, engeletina | Atividade anti-hiperuricêmica | (CHEN <i>et al.</i> , 2011) |

| Continua quadro 2. | | | |
|--------------------|---|---|--------------------------------|
| Espécie | Substâncias isoladas | Atividades biológicas relacionadas | Referências |
| <i>S. china</i> | • <i>Trans/cis</i> resveratrol; oxiresveratrol; verafenol; <i>cis</i> -scirpusina A | Inibidores da enzima β -secretase | (JEON <i>et al.</i> , 2007) |
| | • Smilaxchinoside A-D; | Atividade anti-inflamatória | (SHAO <i>et al.</i> , 2007) |
| | • Sieboldogenina | Atividade anti-inflamatória | (KHAN <i>et al.</i> , 2009) |
| | • 15-hidroxi-pseudoprotodioscina; 15-metoxi-pseudoprotodioscina | - | (HUANG, LIU, e SHAO, 2009) |
| | • Diidrocanferol; resveratrol; oxiresveratrol; scirpusina A; canferol 7-O- β -D-glicosídeo; diidrocanferol 3-O- α -L-ramnosídeo | Atividade antitumoral | (WU <i>et al.</i> , 2010) |
| | • Dioscina; oxiresveratrol | Inibidores da tirosinase | (LIANG <i>et al.</i> , 2012) |
| <i>S. excelsa</i> | • 3-O- [4-O-acetil- α -L-ramnopiranosil-(1 \rightarrow 2)-(α -L-ramnopiranosil-(1 \rightarrow 4))- β -D-glicopiranosil]-26-O- [β -D-glicopiranosil]-22 α -hidróxi-(25R)-furost-5-ene-3beta,26-diol; • 3-O- [2-O-acetyl- α -L-ramnopiranosil-(1 \rightarrow 2)-(α -L-ramnopiranosil-(1 \rightarrow 4))- β -D-glicopiranosil]-26-O- [β -D-glicopiranosil]-22 α -hidróxi-(25R)-furost-5-ene-3beta,26-diol; • Protodioscina; • Pseudoprotodioscina; Dioscina | - | (IVANOVA <i>et al.</i> , 2009) |

| Continua quadro 2. | | | |
|--------------------------|---|--|--------------------------------|
| Espécie | Substâncias isoladas | Atividades biológicas relacionadas | Referências |
| <i>S. exce/sa</i> | <ul style="list-style-type: none"> • 3-O- [3-O-acetil-α-L-ramnopiranosil-(1 \rightarrow 2)-(α-L-ramnopiranosil-(1 \rightarrow 4))-β-D-glicopiranosil]-26-O-β-D-glicopiranosil]-22α-hidroxi-(25R)-furost-5-ene-3beta,26-diol. | - | (IVANOVA <i>et al.</i> , 2009) |
| <i>S. bracteata</i> | <ul style="list-style-type: none"> • Smilasides (G-L) | Atividade antioxidante | (ZHANG <i>et al.</i> , 2008) |
| <i>S. glabra</i> | Smilaxin | Imunoestimulante, antiproliferativa e inibidora da transcriptase reversa HIV-1 | (CHU e NG, 2006) |
| <i>S. bockii</i> Warb | <ul style="list-style-type: none"> • 3β-hidroxipregna-5,16-dien-20-one-3-O-α-L-ramnopiranosil(1 \rightarrow 4)-α-L-ramnopiranosil(1 \rightarrow 4)-[α-L-ramnopiranosil(1 \rightarrow 2)]-β-D-glicopiranoside; • 3β-hidroxipregna-5,16-dien-20-one-3-O-α-L- ramnopiranosil (1 \rightarrow 2)-[α-L-ramnopiranosil (1 \rightarrow 4)]-β-D-glicopiranoside; • Dioscina; metil protodioscina; • 26-O-β-D-glicopiranosil-22α-metoxil-(25R)-furost-5-en-3β, 26-diol 3-O-α-L-ramnopiranosil (1 \rightarrow 4)-α-L- ramnopiranosil (1 \rightarrow 4)-[α-L- ramnopiranosil (1 \rightarrow 2)]-β-D-glicopiranoside | Intensificador de fator de crescimento do nervo | (XU <i>et al.</i> , 2008) |

| Continua quadro 2. | | | |
|--|--|---|----------------------------------|
| Espécie | Substâncias isoladas | Atividades biológicas relacionadas | Referências |
| <i>S. aspera</i> subsp. <i>mauritanica</i> | <ul style="list-style-type: none"> • (25S)-5 β-spirostane-3-ol 3-O-α-L-rhamnopyranosil-(1\rightarrow2)-β-D-glicopiranosil-(1\rightarrow2)-β-D-glicopiranoside; • (25S)-3β,5β,22α-furostane-3,22,26-triol 3-O-α-L-ramnopyranosil-(1\rightarrow2)-β-D-glicopiranosil-(1\rightarrow2)-β-D-glicopiranosil 26-O-β-D-glicopiranosil 26-O-β-D-glicopiranoside; • Curillina G; Asparagosideo E; Asparosideo A e B; resveratrol | Curillina G: atividade antifúngica | (BELHOUCHE <i>et al.</i> , 2008) |
| <i>S. ornata</i> | Sarsaparillose B, sarsaparillose C, sarsaparillose, $\Delta^{20(22)}$ -sarsaparillose, parillin | Atividade antiprolifetativa em células tumorais | (CHALLINOR <i>et al.</i> , 2012) |

QUADRO 2 – EXEMPLOS DE SUBSTÂNCIAS ISOLADAS E IDENTIFICADAS DE ESPÉCIES DO GÊNERO *Smilax*

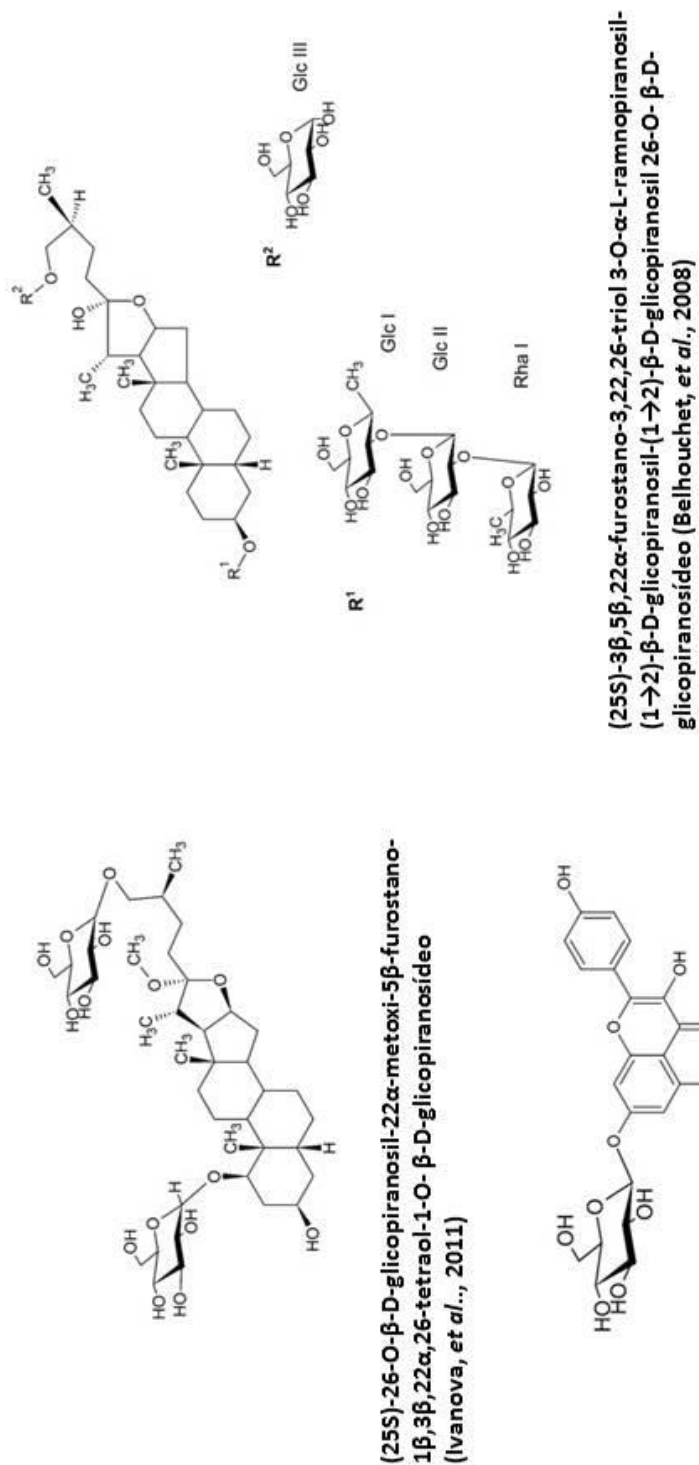


FIGURA 3 – REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DE SUBSTÂNCIAS ISOLADAS E IDENTIFICADAS DE ESPÉCIES DO GÊNERO *Smilax*.

2.2.4 Espécie *Smilax larvata* Griseb.

O quadro 3 apresenta o enquadramento taxonômico da espécie *Smilax larvata* Griseb. segundo os sistemas estabelecidos pela APG III (ANDREATA, 2012), ENGLER (JOLY, 2002) e Cronquist (1988).

| | ANDREATA (2012) | JOLY (2002) | CRONQUIST (1988) |
|---------|--------------------------------|--------------------------------|---------------------------------|
| Divisão | Angiospermae | Angiospermae | Angiospermas |
| Classe | | Monocotyledoneae | Monocotiledônias |
| Ordem | Liliales | Liliiflorae | Liliales |
| Família | Smilacaceae | Liliaceae | Smilacaceae |
| Gênero | <i>Smilax</i> | <i>Smilax</i> | <i>Smilax</i> |
| Espécie | <i>Smilax larvata</i> (Griseb) | <i>Smilax larvata</i> (Griseb) | <i>Smilax larvata</i> (Griseb). |

QUADRO 3 – ENQUADRAMENTO TAXONÔMICO DA ESPÉCIE *S. larvata*.

Pode-se observar pelo quadro 3 a reclassificação da espécie *S. larvata* como pertencente à família Smilacaceae. As espécies do gênero *Smilax* são de difícil classificação, uma vez que apresentam uma grande variabilidade a qual pode ser manifestada até no mesmo indivíduo, principalmente nas folhas e ramos aéreos (GUIMARÃES, ANDREATA, e COSTA, 2011).

Até o momento não existem estudos sobre as atividades biológicas da espécie *S. larvata* (Figura 4-5). Entretanto, esta vem sendo utilizada pelos moradores da cidade de Curitiba, Paraná, como anti-inflamatório. Alguns moradores relatam que o nome popular desta espécie seria “unha-de-gato”, porém, este nome já é empregado para a espécie *Uncaria tomentosa*, também utilizada para o tratamento de condições inflamatórias (GATTUSO *et al.*, 2004). A espécie *S. larvata* encontra-se representada pelas fotografias das figuras 4 e 5. Sua ocorrência é limitada ao Brasil conforma apresentado na figura 6.



FIGURA 4 – FOTO ILUSTRATIVA DE UM EXEMPLAR DA ESPÉCIE *S. larvata* (GRISEB).
FONTE: A AUTORA, 2011.

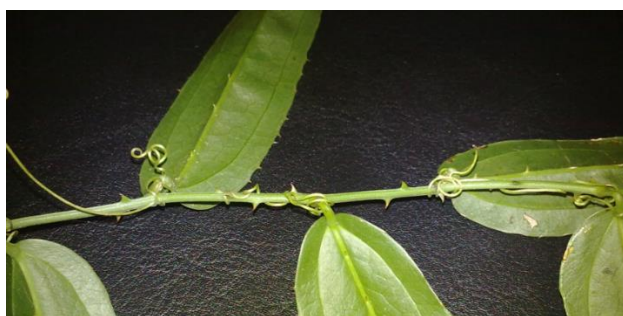


FIGURA 5 – FOTO ILUSTRATIVA DE RAMO AÉREO DE *S. larvata* (GRISEB).
FONTE: A AUTORA, 2011.



FIGURA 6 – EQUEMA ILUSTRATIVO DA LOCALIZAÇÃO DA ESPÉCIE *S. larvata* NO BRASIL
(EM AZUL E VERMELHO). FONTE: ANDREATA, 2012.

2.3 INFLAMAÇÃO E AGENTES ANTI-INFLAMATÓRIOS

A inflamação é uma resposta adaptativa fundamental para o organismo humano a qual compreende uma complexa interação entre as células do sistema imune e mediadores moleculares (ABDALA *et al.*, 2014). Normalmente, a condição inflamatória ocorre como resposta do tecido a lesão celular podendo manifestar-se a partir de qualquer agente lesivo, como físico (queimadura, radiação, trauma), biológico (microrganismos, reações imunológicas) ou químico (substâncias cáusticas) (CARVALHO, 2006). O papel da inflamação é proteger o organismo no sentido de remover e/ou destruir o agente lesivo através da ativação de uma cascata de eventos e produção de mediadores inflamatórios - como prostaglandinas, leucotrienos, histamina, bradicinina, fator de ativação de plaquetas e interleucina 1 (ABDALA *et al.*, 2014) - e em última instância, restaurar o tecido lesado (FERNANDES *et al.*, 2014). As manifestações clínicas do processo inflamatório são calor, rubor, edema e dor / perda de função (WANNMACHER e FERREIRA, 2006).

Apesar do caráter protetor da inflamação, em algumas circunstâncias este sistema de defesa pode atuar de forma inapropriada contra substâncias externas inócuas ao corpo (pólen, por exemplo) ou contra os próprios tecidos do corpo, no caso de distúrbios auto-imunes. Os agentes anti-inflamatórios ou imunossupressores são utilizados no tratamento desses casos (RANG e DALE 2004).

Os anti-inflamatórios pertencem a três grandes grupos: não-esteroides (AINE), esteroides e os anti-inflamatórios de longa ação (WANNMACHER e FERREIRA, 2006).

Um exemplo de AINE é o ácido acetilsalicílico, o qual alivia os sintomas da inflamação principalmente pela inibição da enzima cicloxigenase e redução de síntese de prostanoides. Os corticoides, exemplo de anti-inflamatório esteroide, previnem a formação de prostaglandinas pela liberação de lipocortina, a qual inibe a fosfolipase A2 e conseqüentemente reduz a liberação de ácido araquidônico (ABDALA *et al.*, 2014). Tanto os corticoides como os AINEs não afetam a evolução da doença básica (ou seja, da doença que deflagrou o processo inflamatório) (WANNMACHER e FERREIRA, 2006).

Os anti-inflamatórios de ação longa, além de exercerem um efeito sintomático, são considerados potencialmente capazes de alterar o curso natural da doença ou processo inflamatório. Nesta categoria estão incluídos os agentes antimaláricos (cloroquina e hidroxicloroquina), colchicina, compostos de ouro, sulfasalazina, d-penicilamina e agentes imunomoduladores (ciclofosfamida, metrotexato) (WANNMACHER e FERREIRA, 2006).

Todas as classes de anti-inflamatórios apresentam reações indesejáveis. O uso prolongado de anti-inflamatórios esteroides e AINEs, por exemplo, podem causar gastrite a qual pode evoluir para úlceras estomacais, e em casos extremos, hemorragia severa. Devido a estes efeitos, os produtos naturais tem sido alvo de investigações farmacológicas, uma vez que plantas medicinais tem sido utilizadas desde a antiguidade no tratamento da inflamação e dor (ABDALA *et al.*, 2014).

2.4 A DOR

De acordo com a Associação Internacional para o Estudo da Dor (*International Association for the Study of Pain - IASP®*), a dor é “uma experiência sensorial e emocional desagradável associada a dano real ou potencial de tecidos ou descrita em termos de tal dano”. Esta definição indica que a dor pode ocorrer sem a presença de lesão tecidual (WHITE e STEIN, 2010).

O termo “nocicepção” refere-se ao processo sensorial desencadeado, e “dor” refere-se a percepção de um sentimento ou sensação que um indivíduo designa como dor e descreve variavelmente como irritativa, dolorosa, pungente, persistente, pulsátil ou intolerável. Assim, de acordo com a definição de dor vista anteriormente, um indivíduo com lesões teciduais pode não apresentar um comportamento que indique dor, e outra pessoa pode ter uma sensação de dor sem lesão evidente (PATEL, 2010).

A habilidade de detectar estímulos nocivos é essencial para a sobrevivência e bem-estar do organismo. Este fato é ilustrado pelos casos de indivíduos os quais sofrem de anormalidades congênicas que os incapacitam na detecção de estímulos dolorosos. Essas pessoas não podem sentir a dor penetrante de um objeto pontiagudo, o calor de uma chama ou até mesmo o desconforto associado a danos internos, como um osso rompido (BASBAUM *et al.*, 2009).

A percepção do estímulo sensorial nocivo é realizada pelos nociceptores. Os nociceptores são terminações nervosas livres, não especializadas, não mielinizadas, que traduzem os estímulos em impulsos nervosos que o cérebro interpreta para produzir a sensação de dor. Os corpos celulares destas terminações nervosas situam-se nos gânglios trigeminais no caso do nervo trigeminal ou nos gânglios raquidianos. Ramificações destas fibras nervosas estendem-se para a periferia e para a medula espinhal ou tronco cerebral (PATEL, 2010). As fibras C possuem são de pequeno e médio diâmetro, não mielinizadas e conduzem o impulso nervoso lentamente. As fibras A δ apresentam maior diâmetro que as fibras C, são ligeiramente mielinizadas e conduzem o impulso nervoso rapidamente (JULIUS e BASBAUM, 2001).

Estudos têm mostrado que a atividade das fibras A δ causa sensação de dor aguda e bem localizada, enquanto a atividade das fibras C causa dor difusa. Nos estados crônicos é possível ocorrer uma distorção da via fisiológica normal, podendo desencadear a hiperalgesia (resposta aumentada da dor a um estímulo doloroso), alodinia (dor provocada por um estímulo não nocivo) ou dor espontânea, sem qualquer estímulo precipitante (RANG e DALE 2004).

Existem no organismo humano mecanismos importantes de modulação de percepção da dor, dentre os quais podemos citar o sistema opioide endógeno. O sistema opioide é composto por receptores para os derivados do ópio, também conhecidos como receptores opioides, localizados no tronco cerebral, tálamo, córtex – sistema ascendente de transmissão da dor – núcleo da rafe e outros locais que compõem a vias inibitórias descendentes (PATEL, 2010; INTURRISI, 2002). Os receptores opioides apresentam-se em três tipos (μ , κ e δ), e todos pertencem a família de receptores acoplados a proteína G. Os analgésicos opioides interagem de forma complexa com estes receptores gerando a ação farmacológica (INTURRISI, 2002).

Por séculos os opioides tem sido utilizados como potentes analgésicos no tratamento da dor aguda ou crônica, no alívio da dor moderada à severa, principalmente em pacientes com câncer ou após grandes intervenções cirúrgicas. O uso crônico de opioides apresenta efeitos colaterais severos que incluem inibição da motilidade gastrointestinal (por exemplo disfunção intestinal induzida por opioides e constipação), depressão respiratória e dependência física (SOBCZAK *et al.*, 2014).

Apesar do uso consolidado dos opioides, a busca por substâncias analgésicas que apresentem menos efeitos colaterais é intensa. Na literatura é descrita uma variedade de estudos acerca da ação antinociceptiva de extratos vegetais e produtos naturais isolados objetivando a busca de novos analgésicos.

Além dos receptores opioides existem uma gama de receptores que estão envolvidos na modulação da dor, dentre eles o receptor de potencial transitório A1 (TRPA1). Estes receptores estão presentes no gânglio dorsal, gânglio trigeminal e gânglio nodoso. Podem ser expressos também em células não neuronais como as pulmonares, células do epitélio alveolar e trato urinário. Os receptores TRPA1 apresentam-se como canais catiônicos os quais são envolvidos na dor de origem inflamatória. Estudos prévios relataram a atividade antagonista de receptores TRPA1 por alcaloides (CHEN e HACKOS, 2015).

2.5 OBTENÇÃO DE ANTI-INFLAMATÓRIOS E ANALGÉSICOS A PARTIR DE PRODUTOS NATURAIS

Muitos fármacos da atualidade são derivados direta ou indiretamente de substâncias produzidas por plantas superiores (DAVID e DAVID, 2006). O renovado interesse pelos medicamentos a base de plantas deve-se a fatores relativamente atuais, como o aumento de informação sobre os constituintes ativos (nos aspectos qualitativos e quantitativos) pela realização de maior número de ensaios clínicos sobre esses medicamentos, principalmente os que possuem extratos padronizados; o aparecimento de novas formas farmacêuticas e de outros tipos de administração; o desenvolvimento de métodos analíticos que garantem o controle de qualidade, tanto da matéria-prima como do produto acabado; o fato de utilizar plantas cultivadas, portanto devidamente selecionadas e padronizadas; e o aumento das investigações e publicações especializadas de nível internacional de grande rigor científico (CUNHA e ROQUE, 2010).

Os fármacos obtidos de fontes naturais podem ser classificados como derivados de fontes naturais não modificados, derivados de fontes naturais modificados ou semi-sintéticos, e os derivados sintéticos, porém modelados a partir de um protótipo natural (DAVID e DAVID, 2006).

Dentre as espécies vegetais investigadas, as quais apresentam atividade anti-inflamatória, podemos citar a Camomila (*Matricaria recutita* L.) cuja atividade é devida a presença de terpenóides (camazuleno, α -bisabolol) e flavonas (apigenina) (DAVID e DAVID, 2006). O Alcaçuz (*Glycyrrhiza glabra* L.) é utilizado no tratamento de doenças alérgicas, distúrbios inflamatórios e úlceras gástricas. As saponinas triterpênicas são consideradas os principais componentes, sendo a glicirrizina a substância predominante. A farmacopéia alemã apresenta a monografia para o extrato fluido padronizado de alcaçuz, com teores entre 2,0 e 4,0% de glicirrizina (SCHENKEL, GOSMANN e ATHAYDE, 2007).

Em relação aos opiodes que ocorrem naturalmente podemos citar a morfina, codeína e noscapina. Dentre os semi-sintéticos estão incluídos a hidromorfona, oxicodona e diacetilmorfina (heroína) (SCHÄFER, 2010).

Estudos prévios atestaram a atividade anti-inflamatória e antinociceptiva de várias espécies do gênero *Smilax*. Dentre estas podemos citar a *S. china* (KHAN *et al.*, 2009; SHU, GAO, e YANG, 2006), *S. glabra* (JIEYUN *et al.*, 1997) e *S. bockii* Warb. (XU *et al.*, 2005). Uma vez que estudos vem apresentando este gênero como uma potencial fonte de novos agentes analgésicos e anti-inflamatórios, torna-se imprescindível a investigação sob este ponto de vista de espécies de *Smilax* da flora brasileira.

3 METODOLOGIA DE PESQUISA

3.1 FASES DO DESENVOLVIMENTO DE PESQUISA

As fases do desenvolvimento da pesquisa estão resumidas no fluxograma da Figura 7.

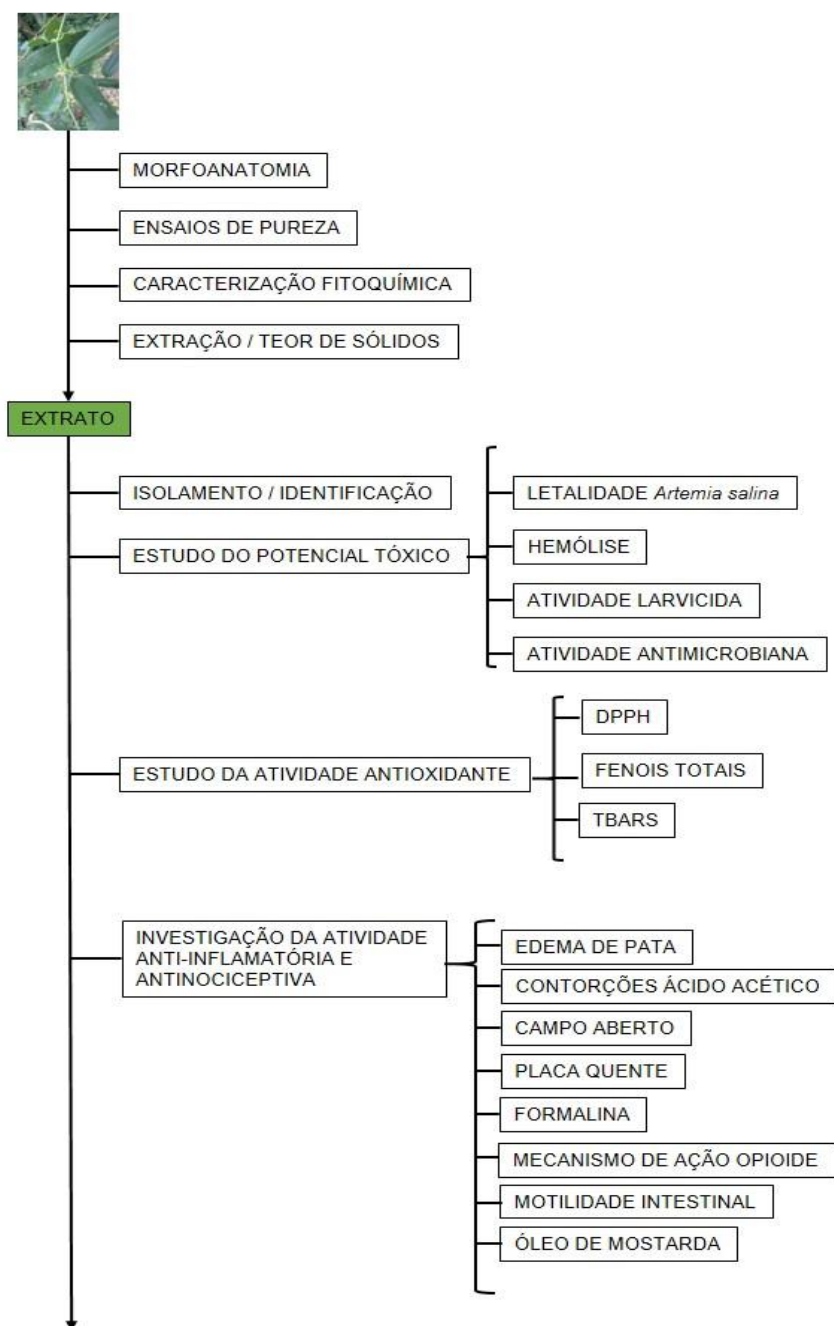


FIGURA 7 – FLUXOGRAMA DA METODOLOGIA DE PESQUISA.

3.2 OBTENÇÃO DO MATERIAL BOTÂNICO

As partes aéreas de *Smilax larvata* Griseb. foram coletadas no município de Curitiba, Paraná, Brasil, coordenadas 25°26'45"S 49°20'51"W, nos meses de novembro de 2010 e 2011. A espécie foi identificada pelo Curador Osmar dos Santos Ribas, no Museu Botânico de Curitiba, onde a exsicata está registrada sob nº 386302.

3.3 ESTUDO MORFOANATÔMICO

O estudo morfoanatômico foi realizado com folha desenvolvida, a partir do quarto nó, e caule jovem obtido entre 5 a 30 cm do ápice caulinar. Para a determinação da morfologia externa foliar foi adotada a classificação de Hickey (1973). A análise anatômica baseou-se na classificação adotada por Apezato-da-Glória e Guerreiro (2006), Ferrufino-Acosta (2010), Mauseth (1988) e Cutter (1986). Para a determinação do padrão de deposição de cera epicuticular adotou-se a classificação segundo Eglinton e Hamilton (1967). O material foi fixado em FAA 70 (formalina 5 mL, ácido acético glacial 5 mL, etanol 70% 90 mL) (JOHANSEN, 1940) e posteriormente acondicionado em etanol a 70% (v/v) (BERLYN e MIKSCHE, 1976). A anatomia das partes aéreas foi documentada por meio de fotografias feitas com câmera digital e de ilustrações dos ramos vegetativos. O estudo morfoanatômico foi realizado com o material vegetal da segunda coleta.

3.3.1 Lâminas semipermanentes

Para a montagem de lâminas semipermanentes foram feitos cortes transversais a mão livre do material fixado. Foram analisados o terço inferior do limbo da folha, pecíolo e caule. A coloração empregada foi azul de astra e fuccina básica (ROESER, 1972). As lâminas semipermanentes foram montadas com glicerina 50% (v/v) (BERLYN e MIKSCHE, 1976) e para a lutagem foi utilizado esmalte incolor (BECAK e PAULETE, 1976).

3.3.2 Testes microquímicos

Para a realização dos testes microquímicos foram feitas secções transversais à mão livre do material fixado, utilizando-se os seguintes reativos: floroglucina clorídrica para verificação de lignina (FOSTER, 1949), Sudan III e Sudan Black para substâncias lipofílicas (PEARSE, 1985), cloreto férrico para compostos fenólicos (JOHANSEN, 1940), lugol para amido (BERLYN e MIKSCHE, 1976), Dragendorff para alcaloides (SVENDSEN e VERPOORTE, 1983), Coomassie blue para proteínas (FISHER, 1968) e PAS (Ácido Periódico / Reagente de Schiff) para polissacarídeos neutros (McMANUS, 1948). Os resultados foram registrados por meio de fotomicrografias no microscópio fotônico Olympus BX40 – DC 30.

3.3.3 Microscopia eletrônica de varredura

A análise ultraestrutural de superfície foi realizada através de fotomicrografias obtidas por Microscopia Eletrônica de Varredura – MEV (SOUZA, 1998.). A lâmina foliar foi previamente fixada e desidratada em série etanólica crescente, em seguida procedeu-se o ponto crítico de CO₂ no equipamento Bal-Tec CPD-030. Posteriormente a amostra foi aderida a suporte, metalizada com ouro no equipamento Balzers Union FL 9496, submetida a alto vácuo e observada no microscópio eletrônico de varredura JEOL JSM-6360LV.

3.4 PARÂMETROS DE PUREZA

3.4.1 Determinação do teor de água

Transferiu-se cerca de 1 g, exatamente pesados, de droga vegetal para cadinho previamente dessecado e pesado. Dessecou-se a amostra em estufa a 100 – 105°C durante 5 horas antes da primeira pesagem. O ensaio deu-se por concluído quando duas pesagens sucessivas não diferiram entre si por mais de 5 mg. Calculou-se a porcentagem de água em relação a droga seca ao ar (FARMACOPÉIA, 2010).

3.4.2 Determinação de cinzas

Pesou-se exatamente 1 g da droga pulverizada, transferiu-se para cadinho previamente calcinado, resfriado e pesado. Distribuiu-se a amostra uniformemente no cadinho, incinerou-se aumentando paulatinamente a temperatura, não ultrapassando 600°C, até que todo o carvão foi eliminado. Resfriou-se em dessecador e pesou-se. Calculou-se a porcentagem de cinzas em relação a droga seca ao ar (FARMACOPÉIA, 2010).

3.5 ESTUDO FITOQUÍMICO

Para a investigação fitoquímica foram utilizadas as partes aéreas – folhas, caule, espinhos - as quais foram submetidas à seleção visual. Foram descartados materiais oxidados, atacados por fungos e insetos, partes danificadas e material orgânico estranho. Em seguida as amostras foram secas em temperatura ambiente e a sombra. Após a secagem o material foi triturado e acondicionado em recipiente apropriado e protegido da luz. O material vegetal utilizado foi proveniente da primeira coleta.

3.5.1 Marcha sistemática fitoquímica

Foi realizada a marcha sistemática fitoquímica de acordo com Moreira (1979), a qual constitui-se de um conjunto de reações de coloração e/ou precipitação, sendo de caráter qualitativo, objetivando detectar as classes das substâncias presente nos extratos aquoso e etanólico do material vegetal.

3.5.2 Preparo do extrato alcoólico

As partes aéreas de *S. larvata* foram secas, trituradas (40 g) e adicionadas a 200 mL de etanol 70% (v/v). Deixou-se em maceração em banho-maria por uma hora a 70°C. Após este período o extrato macerado foi filtrado e seu volume completado com etanol 70% (v/v) para 200 mL. Procedeu-se com este extrato macerado as

pesquisas de alcaloides, leucoantocianidinas, flavonoides, cumarinas, antraquinonas, esteroides e triterpenos.

3.5.3 Preparo do extrato aquoso

As partes aéreas de *S. larvata* foram secas, trituradas (40 g) e adicionadas a 200 mL de água destilada e maceradas em banho-maria por uma hora a 70°C. Após este período o extrato foi filtrado e seu volume completado com água destilada para 200 mL. Procedeu-se então as pesquisas de heterosídeos antociânicos, heterosídeos saponínicos, heterosídeos cianogenéticos, taninos, aminogrupos e ácidos voláteis.

3.5.4 Preparo do extrato etanólico bruto e frações orgânicas

As partes aéreas de *S. larvata* secas (material vegetal coletado em 2010) e trituradas (940 g) foram submetidas a extração exaustiva em aparelho de Soxhlet utilizando etanol (6 L) como líquido extrator. O extrato foi filtrado (filtro 80 g/m²) e concentrado em rota evaporador rotatório até 1/3 de seu volume, gerando o extrato etanólico bruto (EEB) (145 g). Uma parte do EEB (140 g) foi submetido a partição líquido-líquido em aparelho de Soxhlet com solventes de polaridade crescente. As frações foram concentradas em evaporador rotatório gerando as frações orgânicas *n*-hexano (15 g), clorofórmio (3,7 g), acetato de etila (3,4 g) e hidroalcoólica (50,5 g).

3.5.5 Teor de sólidos do extrato etanólico bruto

Tomou-se 3 mL do extrato etanólico bruto concentrado e colocou-se em placa de Petri previamente dessecada por 30 minutos em estufa a 105°C e pesada. A amostra foi levada a estufa a 105°C até apresentar peso constante. O sólido remanescente foi pesado. O ensaio foi realizado em triplicata e os resultados foram expressos em mg/mL (FARMACOPÉIA, 2010).

3.5.6 Isolamento e identificação: procedimentos gerais

Para cromatografia líquida em coluna foi utilizada sílica gel 60 (70-230 mesh) da Merck®. A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) foi realizada em cromatógrafo Merck Elite Lachrom, constituído de bomba quaternária (modelo L-2130), detector UV-DAD (modelo L-2455) e válvula com loop de 100 µL. O cromatógrafo foi equipado com uma coluna preparativa de fase reversa RP₁₈ (7,8 mm d.i. x 30 cm de comprimento e diâmetro de partícula de 10 µm) e pré-coluna (7,8 mm d.i. x 5 cm) contendo o mesmo enchimento.

Os experimentos de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) foram realizados nos espectrômetros Brukers AVANCE III HD 600, AVANCE III 400 e DPX 200, operando a 14,1; 9,4 e 4,7 T, observando ¹H e ¹³C a 600,13; 400,13; 200,13 e 150,90; 100,61 e 50,32 MHz respectivamente. O espectrômetro Bruker AVANCE III HD 600 foi equipado com uma probe de detecção inversa quadrinuclear de 5 mm com gradiente z. O espectrômetro Bruker AVANCE III 400 foi equipado com uma probe de detecção inversa multinuclear de 5mm com gradiente z ou com uma probe de detecção direta multinuclear de 5 mm com gradiente z. O equipamento DPX 200 foi equipado com uma probe de detecção direta quadrinuclear de 5 mm. Os espectros de ¹H e ¹³C {¹H} foram adquiridos com janela de ~ 11 ppm e 240 ppm, respectivamente. Os experimentos de correlação de ¹H-¹³C de uma ligação (HSQC) e a longa distância (HMBC) foram otimizados com médias de constantes de acoplamento ¹J_(H,C) e ^{LD}J_(H,C) de 140 e 8 Hz respectivamente. Todos os deslocamentos químicos de ¹H e ¹³C foram expressos em ppm em relação ao TMS (sinal de referência interno a 0.00 ppm). Todos os solventes utilizados foram de grau analítico, enquanto que para a CLAE utilizou-se metanol de grau espectroscópico e a água foi ultrapurificada.

3.6 ESTUDO DO POTENCIAL TÓXICO, LARVICIDA E ANTIMICROBIANO

3.6.1 Letalidade frente a *Artemia salina*

4.6.1.1 Preparo da solução salina

A água do mar artificial foi preparada dissolvendo-se 14,31 g de sal para 400 mL de água purificada, sendo o sal da marca Instant Ocean Sea Salt. Ajustou-se o pH para 9,0 com Na_2CO_3 para evitar o risco de morte dos náuplios por diminuição do pH durante a incubação. Um pH superior a 6 é essencial para o desenvolvimento de *Artemia salina*, e um pH superior a 10,5 deve ser evitado (LEWAN, ANDERSON e MORALEZ-GOMEZ, 1992).

4.6.1.2 Preparo da amostra

O extrato etanólico bruto e as frações orgânicas de *S. larvata* foram levadas à secura em banho-maria (40°C), pesou-se 1000 mg das amostras e adicionou-se solvente (etanol ou metanol) em quantidade suficiente para obter a concentração inicial da solução de 10 mg/mL, a qual foi denominada solução 1. Tomou-se 1mL da solução 1 e adicionou-se mais 9 mL de solvente. Esta foi denominada solução 2 sendo a concentração final desta de 1 mg/mL (MEYER *et al.*, 1982).

4.6.1.3 Eclosão dos ovos

Os ovos de *Artemia salina* (200 mg/400 mL) foram colocados para eclodir em água salgada por 48 horas, sob aeração contínua e expostos à luz diurna sob temperatura controlada (27 a 30) °C em pH entre 8-9. Na primeira hora do processo foi mantida iluminação (20W) sobre o recipiente (UTYAMA, 2003).

4.6.1.4 Avaliação da toxicidade

Após a eclosão dos ovos, transferiu-se 30 náuplios de *A. salina* para cada tubo do tipo vial contendo as amostras e para os tubos controles. Os controles negativos consistiram de tubos com os solventes utilizados para dissolver a amostra, o qual é evaporado em estufa juntamente com o solvente das amostras. Ajustou-se o volume de todos os tubos com mar artificial para 2,5 mL.

Os resultados são expressos em CL_{50} e para o seu cálculo foi utilizado o programa estatístico Probitos.

3.6.2 Avaliação da atividade hemolítica

4.6.2.1 Teste de atividade hemolítica em placas de ágar-sangue

Em placas de Ágar-sangue (Newprov[®]) colocou-se discos de papel estéreis impregnados com 1000 μ g do extrato bruto e frações hexano, clorofórmio, acetato de etila e hidroalcoólica. As placas foram incubadas a 36°C por 24h. Após este período verificou-se a formação ou não de halo de hemólise. Como controle positivo utilizou-se solução de Triton 1000 μ g. Discos impregnados com os solventes utilizados foram submetidos ao teste para descartar a influência destes (FLACH, KARNOPP e CORÇÃO, 2005).

4.6.2.2 Determinação das porcentagens de hemólise

O sangue de carneiro de origem comercial foi homogenizado através de leve agitação manual. Foram transferidos 5 mL do sangue para um tubo de ensaio e centrifugados por 5 minutos a 3000 rpm. O sobrenadante foi desprezado e lavando-se com PBS gelado a solução foi centrifugada novamente por 5 minutos a 3000 rpm, sendo este procedimento repetido no mínimo 3 vezes. O volume de eritrócitos lavados que restou foi diluído a 10% em PBS.

Preparou-se alíquotas de 200 μ L de suspensão de eritrócitos a 10% em PBS (tampão fosfato) as quais foram incubadas com 200 μ L de extrato bruto e frações diluídos em PBS nas concentrações de 100 μ g/mL, 200 μ g/mL, 500 μ g/mL e 1000 μ g/mL. As soluções foram incubadas por 3h em estufa com temperatura controlada a 37°C. Alíquotas de 200 μ L da mesma suspensão de eritrócitos foram incubadas com 200 μ L de H₂O deionizada para determinação da hemólise total, e com 200 μ L de PBS (solução tampão fosfato) para mensuração da hemólise basal.

Após a incubação as soluções foram centrifugadas a 3000 rpm por 5 min. A porcentagem de hemólise foi determinada por espectrofotometria, mensurando-se a absorbância do sobrenadante em leitora de microplacas Thermo Plate ajustada em

540 nm. Visualmente a hemólise pode ser detectada através da coloração vermelha do sobrenadante, em caso de não ocorrência, é visível a formação de um pellet bem definido de eritrócitos. Para a quantificação da hemólise, o valor foi calculado em porcentagem, considerando-se o valor de 100% a absorbância lida no tubo de hemólise total (BANERJEE *et al.*, 2008; CHAUDHURI *et al.*, 2007).

3.6.3 Avaliação da atividade larvicida contra *Aedes aegypti*

Os ovos de *Aedes aegypti* da linhagem Rockefeller foram fornecidos pelo IBEX/Entomologia/LAFICAVE/IOC/FIOCRUZ - Rio de Janeiro-RJ; sendo utilizada como padrão de susceptibilidade a inseticida para a espécie *Aedes aegypti* (Hartberg WK, 1970). Para a eclosão dos ovos, estes foram colocados em bandeja de plástico com 500 mL de água mineral, e em seguida levados para estufa BOD, ajustando-se a temperatura (27 ± 2) °C e a umidade relativa (80 ± 5) %. Nessas condições os ovos embrionados deram origem às larvas do mosquito, que foram utilizadas no presente estudo. O extrato etanólico bruto foi pesado, dissolvido em dimetilsulfóxido (DMSO) a 0,2% e agitado em ultra-som. Posteriormente acrescentou-se água isenta de cloro (20 mL), e a solução foi distribuída em copo plástico (5 mL), à temperatura ambiente, sendo utilizadas 3 concentrações (10, 100 e 1000 µg/mL), com 4 repetições de 15 larvas cada. A dieta das larvas consistiu de ração de peixe (aldon basic, MEP 200 complex) do período de eclosão até o 3° estágio larval. Utilizou-se como controle negativo solução aquosa de DMSO 0,2% e como controle positivo o Temefós. A mortalidade foi verificada após 24 horas de exposição das larvas à solução do extrato bruto. Larvas moribundas, incapazes de atingir a superfície da água quando tocadas, foram consideradas como mortas (WHO, 1981).

Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão das médias. A significância estatística das diferenças foi avaliada por ANOVA One-way, seguido do teste de Tukey. A diferença foi considerada significativa quando $p < 0,05$. A CL_{50} e CL_{90} foram calculadas utilizando-se o pacote estatístico Probitos com intervalo de confiança de 95%.

3.6.4 Atividade antimicrobiana – Método da Difusão em disco

O teste de difusão em disco é aceito pelo FDA (Food and Drug Administration) e estabelecido como padrão pelo NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards) (BARRY e THORNSBERRY, 1991).

A metodologia consistiu no preparo de placas de Petri com ágar Mueller Hinton para bactérias (ágar nutriente para *Agrobacterium tumefaciens*) e ágar Sabouraud Dextrose para fungos. Os inóculos bacterianos de *Staphylococcus aureus* (ATCC6538), *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 12228) - Gram positivas, *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 2785), *Agrobacterium tumefaciens* (1050 LBA) - (Gram negativas) e *Candida albicans* (ATCC 10231) (fungos e leveduras) foram ajustados a uma concentração de 1×10^8 UFC/mL de acordo com a escala 0,5 de McFarland. Com auxílio de um swab estéril a suspensão ajustada foi espalhada na superfície da placa com meio de cultura (OSTROSKI *et al.*, 2008).

Em seguida, discos de papel de filtro estéreis com 10 mm de diâmetro foram impregnados com 10 µL de solução de extrato etanólico bruto e frações orgânicas (100 mg/mL), que corresponde a uma concentração de 1 mg, e após secagem em ambiente estéril foram transferidos para a superfície do ágar inoculado. Como controle negativo utilizou-se um disco contendo solvente empregado na solubilização das amostras. Como controle positivo foram utilizados discos de Cetoconazol (50 µg) e Cloranfenicol (30 µg) (COGO, *et al.*, 2010). As placas então foram incubadas a temperatura de 35°C durante 16-20 horas (27°C por 48 horas para *A. tumefaciens*) (KUETE *et al.*, 2008). Após o período de incubação, o diâmetro de inibição foi mensurado em milímetros.

3.7 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

3.7.1 Redução do radical DPPH

Esse ensaio foi realizado por duas metodologias, uma qualitativa e uma quantitativa. A técnica qualitativa baseia-se na análise da amostra por meio de

cromatografia em camada delgada (CCD), seguida da revelação por uma solução de DPPH (CONFORTI *et al.*, 2002). Selecionou-se a fase móvel e promoveu-se a migração ascendente do extrato bruto e frações na cromatoplaça de sílica gel SG-60 Merck®, com dimensões 5 X 2,5 cm, sendo a corrida total de 3 cm. A revelação foi realizada com uma solução de DPPH a 0,2% (p/v) em metanol. Após 30 min sob luz natural verificou-se o resultado. A presença de manchas amarelas contra um fundo púrpura indica a presença de compostos antioxidantes na amostra. Como padrão, utilizou-se a vitamina C e Rutina. As amostras foram diluídas na concentração de 10 mg/mL.

Para o ensaio quantitativo, utilizou-se a metodologia empregada por Choi e colaboradores (2002). Preparou-se a solução de DPPH minutos antes do ensaio a 0,3 mM/L em etanol absoluto. Soluções estoque de amostras em concentrações crescentes foram preparadas e a 2,5 mL de cada solução adicionou-se 1 mL da solução de DPPH e deixou-se reagir em repouso por 30 min a temperatura ambiente. As mesmas soluções amostra (2,5 mL) adicionadas a 1 mL de etanol constituíram o branco da reação. Para controle negativo utilizou-se 1 mL da solução de DPPH adicionados a 2,5mL de solvente, sem amostra. Vitamina C e a Rutina constituíram o controle positivo. Após os 30 min, mediu-se a absorbância (Abs) das soluções em 518 nm. O ensaio foi realizado em triplicata. Mediu-se a porcentagem da atividade antioxidante (AA%) através da fórmula: $100 - [(Abs \text{ amostra} - Abs \text{ branco}) / Abs \text{ controle positivo}] \times 100$.

Os valores das concentrações e suas respectivas AA% foram compiladas em gráfico em que a abscissa representa a concentração da amostra e a ordenada é a média da AA% das amostras de cada concentração. A equação da reta desse gráfico, do tipo $y = ax + b$, serve de base para determinação do valor do IC₅₀ que é o valor da concentração necessária para exercer 50% da atividade antioxidante. A diferença entre os dados obtidos foi analisada por ANOVA de uma via e a significância pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

3.7.2 Determinação de fenólicos totais.

A concentração de polifenóis totais foi determinada pelo método colorimétrico de Folin-ciocalteu descrito previamente (POZHARITSKAYA *et al.*, 2010) com

modificações. Foram preparadas soluções estoque do extrato bruto e frações orgânicas na concentração de 1 mg/mL. Adicionou-se as soluções das amostras 200 µL de reagente Folin-ciocalteu e água destilada até completar 4 mL. O meio reacional foi agitado e posteriormente adicionou-se 400 µL de solução de carbonato de sódio a 10%, e agitou-se novamente.

Após a adição de todos os reagentes, o meio reacional foi deixado em repouso por 30 minutos. Em seguida a leitura foi realizada e aparelho de UV/Vis no comprimento de onda de 760 nm. Para a quantificação foi utilizada uma curva padrão de ácido gálico nas seguintes concentrações: 2,5; 5; 7,5; 10; 12,5; 15; 17,5 e 20 µg/mL. O coeficiente de correlação (R^2) foi calculado e o teor de polifenóis totais foi expresso em mg equivalente de Ácido Gálico.

3.7.3 Avaliação da inibição da peroxidação lipídica pelo método TBARS

4.7.3.1 Preparo dos reagentes

Pesou-se 3mg do extrato bruto e frações orgânicas, padrão BHT e diluiu-se em etanol. Preparou-se uma solução de SDS (Dodecil Sulfato de Sódio) a 0,55% em água destilada e diluiu-se 5 g de gema de ovo em 100 mL de solução de SDS recém preparada. Preparou-se soluções de TBA (Ácido Tiobarbitúrico) 0,4% em SDS, ABAP (Cloreto de 2,2-azo-bis-ácido) 0,035% em água destilada, e ácido acético 20% em água destilada. Todos os reagentes foram preparados na hora do ensaio (MOREIRA *et al.*, 2013).

4.7.3.2 Procedimento

Colocou-se em tubos de ensaio 100 µL da solução de amostra, 500 µL da solução de gema; 50 µL da solução de ABAP, 1500 µL de ácido acético a 20%, 1500 µL da solução de TBA e 400 µL de água destilada. Deixou-se os tubos em banho-maria a 95°C por 1 hora. Após o resfriamento adicionou-se 1500 µL de butanol. Os tubos foram agitados levemente por 10 vezes cada um. Após repouso por 10 min centrifugou-se por 3 min. A leitura foi realizada em espectrofotômetro a 532 nm. Para

zerar o espectrofotômetro utilizou-se butanol, para controle positivo utilizou-se BTH, para o branco da amostra substituiu-se o ABAP por água destilada, para controle negativo substituiu-se a amostra por etanol. O procedimento foi realizado em quintuplicata.

Por fim, calculou-se a porcentagem de redução da peroxidação (RP%) pela fórmula $RP\% = (\text{absorbância da amostra sem antioxidante}) - (\text{absorbância da amostra com antioxidante}) / (\text{absorbância da amostra sem antioxidante}) \times 100$ (STOILOVA *et al.*, 2007). Os resultados foram expressos como média e desvio padrão. Comparou-se as médias utilizando análise de variância (ANOVA) e as diferenças entre as médias pelo Teste de Tukey ($p < 0,05$).

3.8 INVESTIGAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA E ANTINOCICEPTIVA

3.8.1 Animais

No estudo foram utilizados ratos machos Wistar (180 - 220g) e camundongos machos Swiss (18 - 35g), mantidos em temperatura controlada de $(22 \pm 2) ^\circ\text{C}$, em ciclo de 12 h claro e 12 h escuro e com água e ração *ad libitum*. Para a realização dos experimentos os animais ficaram 12 h em jejum, a administração do extrato (doses de 100, 200 ou 400 mg/Kg) e do veículo (soro fisiológico e 4 gotas de Twen 80) foram realizados por gavagem (*p.o.*). Cada ensaio farmacológico foi composto por quatro grupos ($n = 6 - 8$), referentes a três doses testadas e o grupo controle. Os animais foram distribuídos homoganeamente entre os grupos e mantidos no laboratório para aclimação por pelo menos 1 hora antes da realização dos experimentos. Os animais foram obtidos no biotério da UFPR e os experimentos foram realizados no departamento de farmacologia desta universidade. Todos os procedimentos foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, registro nº 704 (anexo).

Todos os testes farmacológicos descritos foram realizados com o extrato etanólico bruto de *S. larvata*.

3.8.2 Avaliação do efeito anti-inflamatório do extrato etanólico bruto de *S. larvata* pelo método de edema de pata induzido por carragenina

Para a avaliação do potencial anti-inflamatório do extrato em estudo, utilizou-se o teste de edema de pata induzido por carragenina. Este ensaio vem sendo aplicado amplamente na investigação de atividade anti-inflamatória de extratos vegetais. Uma hora após os tratamentos, administraram-se 0,1mL de carragenina (200 µg/pata) sub-plantar na pata direita e 0,1mL de salina na pata esquerda (ratos). O volume da pata foi mensurado com auxílio de paquímetro antes (medida basal) e após a injeção de carragenina nos intervalos de 1, 2, 3, 4 e 5 horas. As diferenças de volume da pata foram calculadas pelo método trapezoide e expresso em área sob a curva – AUC (unidades arbitrárias) (PEREIRA *et al.*, 2012.).

3.8.3 Nocicepção induzida pela injeção intraperitoneal de ácido acético

Neste modelo, após 1 h da administração dos tratamentos, foram induzidas contorções abdominais em camundongos de acordo com procedimento previamente descrito (KOSTER, ANDERSON e deBEER, 1959.; CARBONERO *et al.*, 2008). As contrações da musculatura abdominal, juntamente com a extensão de uma das patas posteriores, ocorrem em resposta à injeção intraperitoneal, em camundongos, de ácido acético a 0,6% diluído em solução salina. O número de contorções abdominais foi contado cumulativamente durante 30 min. As doses utilizadas foram calculadas por extrapolação alométrica (PACHALY e BRITO, 2001). Utilizou-se para o cálculo as doses empregadas nos ratos (100, 200 e 400 mg/kg) e as taxas metabólicas de ratos e camundongos. As doses calculadas para os camundongos foram de 164, 327 e 654 mg/kg.

3.8.4 Avaliação da atividade locomotora espontânea

Para excluir a possibilidade de prejuízo no desempenho motor dos animais após o tratamento com o extrato, foi avaliada a atividade locomotora espontânea em um aparato de campo aberto. A avaliação por este método consiste de uma caixa de

madeira medindo 40 x 60 x 50 cm, sendo o fundo desta arena dividido em 6 quadrados idênticos. O animais (ratos) receberam os tratamentos e após 1 h foram colocados individualmente na arena e observados por um período de 5 min. Contou-se o número de quadrantes cruzados com todas as patas (MEOTTI *et al.*, 2006).

3.8.5 Atividade antinociceptiva pelo método de placa quente

Com os mesmos animais utilizados no teste do campo aberto avaliou-se a atividade antinociceptiva pelo teste de placa quente. Os animais receberam os tratamentos e após 60 min foram colocados em contato com uma superfície metálica aquecida (50 ± 1) °C. Um tempo de corte de 30 s foi utilizado. Cada animal foi colocado individualmente e o tempo que este levou para sacudir ou lambe a pata ou pular foi cronometrado e marcado como tempo de latência em resposta ao calor (NA *et al.*, 2012).

3.8.6 Nocicepção induzida pela injeção intraplantar de formalina

O modelo de nocicepção induzida pela injeção intraplantar (i.pl.) de formalina permite avaliar dois tipos distintos de nocicepção: a de origem neurogênica (estimulação direta dos nociceptores) e a de origem inflamatória (caracterizada pela liberação de mediadores inflamatórios) (HUNSKAAR e HOLE, 1987; TJØLSEN *et al.*, 1992). Após 1 h da administração do extrato nas doses 100, 200, 400 mg/Kg ou veículo (soro fisiológico e 4 gotas de Twen 80) *p.o.*, administrou-se 50 µl de formalina a 2,5% (0,92% de formaldeído) na região intraplantar da pata posterior direita em ratos. Após a injeção de formalina os animais foram observados de 0-5 min (fase neurogênica) e de 15-60 min (fase inflamatória), sendo avaliado o número de flinches (sacudidas) com a pata direita por 60 min, sendo a contagem cumulativa de 5 em 5 minutos (LAPA *et al.*, 2008).

3.8.7 Estudo do possível mecanismo de ação antinociceptivo: Participação do sistema opióide

Neste ensaio dividiu-se os animais em três grupos: veículo, extrato na dose efetiva e naloxona. Os ratos do grupo “naloxona”, uma antagonista opioide, foram pré-tratados com naloxona (1 mg/kg, *i.p*) 30 min antes da administração de extrato na dose de 200 mg/Kg. Após 60 min dos tratamentos com o extrato e veículo, a resposta nociceptiva foi avaliada em relação à nocicepção induzida pela injeção intraplantar de formalina (Meotti *et al.*, 2006).

3.8.8 Envolvimento do sistema opioide: avaliação do efeito do extrato etanólico bruto na motilidade intestinal

Para avaliar se o extrato etanólico bruto de *S. larvata* atua sobre os receptores opioides μ e, assim como a morfina, inibe a motilidade intestinal, foi realizado o teste de avaliação da motilidade intestinal de acordo com (STICKNEY e NORTHUP, 1959). Os animais foram divididos em cinco grupos e tratados com: veículo, extrato (100, 200 ou 400 mg/Kg *p.o.*) ou morfina (5 mg/Kg, *s. c.*). Um hora após o tratamento com extrato ou veículo, ou 30 min após a morfina, todos os grupos receberam o corante vermelho de fenol (1,5 mL; 0,05% em carboximetilcelulose, *p.o.*). Após 15 minutos da administração do corante os animais foram eutanaziados, os intestinos foram removidos e o deslocamento percorrido pelo corante foi mensurado com uma régua em cm. A porcentagem da inibição da motilidade intestinal foi calculada com a seguinte fórmula: Inibição da motilidade intestinal (%) = (deslocamento do pigmento / comprimento total do intestino delgado) x 100.

3.8.9 Investigação do envolvimento dos receptores TRPA1

Estudos prévios tem demonstrado que os receptores TRPA1 estão relacionados à resposta nociceptiva induzida pela formalina (McNAMARA *et al.*, 2007). Para avaliar se existe o envolvimento dos receptores TRPA1 no possível efeito antinociceptivo do extrato, foi realizado o teste do óleo de mostarda. Os animais (ratos) foram divididos em quatro grupos. Dois grupos foram tratados com o extrato (200 mg/Kg, *p.o.*) e o restante recebeu veículo. Uma hora após os tratamentos, um grupo extrato e um grupo veículo receberam uma injeção subcutânea na pata direita de óleo de mostarda (50 μ L; 0,5% em óleo de milho). Os grupos que restaram constituíram o

controle negativo, recebendo uma injeção intraplantar de igual volume de óleo de milho. O número de flinches foi contado cumulativamente por 30 min em intervalos de 5 minutos.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 ESTUDO MORFOANATÔMICO

4.1.1 Folha

A folha de *Smilax larvata* Griseb. é simples, completa, curtamente peciolada, medindo aproximadamente 11 (8-16) cm de comprimento, de textura coriácea. O limbo é simétrico, com formato ovado-lanceolado, apresenta ápice agudo e base arredondada. O pecíolo é equipado com uma par de gavinhas (Figuras 8 B e 8 C). O pecíolo é equipado com um par de gavinhas as quais emergem do caule (Figura 8 G). A margem é espinulosa, apresentando projeções espiniformes por toda sua extensão e na nervura central na face abaxial (Figura 8 C). A face adaxial apresenta cor verde escura, enquanto a face abaxial é verde clara. O caule apresenta projeções espiniformes por toda a extensão (Figuras 8 A e 8 F).

A venação das folhas é do tipo acródoma com três nervuras principais, sendo a nervura central a mais evidente (Figura 8 C). Nos cortes paradérmicos, observa-se nervuras secundárias (Figura 9 A), acompanhadas por uma grande quantidade de ráfides e cristais prismáticos de tamanho e forma variados (Figuras 9 A e 9 B).

Na face adaxial, a deposição da cera epicuticular é escamiforme (Figura 9 C) e na face abaxial é estriada (Figura 9 D). Em vista frontal, as paredes anticlinais das células epidérmicas são sinuosas tanto na face adaxial, quanto na abaxial. (Figura 9 E). Na face abaxial pode-se observar a presença de estômatos anomocíticos, os quais apresentam células-guarda de formato reniforme, inseridos no mesmo nível das células adjacentes (Figure 9 F).

Na análise da secção transversal pode-se observar que a epiderme é uniestratificada, apresentando espessamento nas paredes anticlinais e periclinais, sendo recoberta por cutícula fina (Figura 10 B). O mesofilo é dorsiventral, apresentando 2-3 camadas constituídas por células sinuosas e justapostas próximas a face adaxial, e de 3-5 camadas de células amorfas distantes umas das outras próximas a face abaxial (Figura 10 B). A nervura central apresenta formato côncavo-

convexo com curvatura pronunciada na face abaxial, composta por 3-5 feixes vasculares colaterais, compostos por protoxilema, metaxilema e floema primário, envolvidos por células lignificadas (Figura 10 A). Feixes vasculares colaterais de pequeno porte estão distribuídos ao longo da lâmina foliar e envolvidos por fibras (Figura 10 C). Os ensaios histoquímicos revelaram a presença de alcaloides, substâncias lipofílicas, amido, compostos fenólicos, polissacarídeos e proteínas (Figura 12).

4.1.2 Pecíolo

O pecíolo apresenta formato côncavo na face adaxial (Figura 10 D). A epiderme é uniestratificada. O córtex é composto por 1-2 camadas de colênquima angular e mais internamente observa-se a presença de parênquima. Encontram-se ráfides em algumas células parenquimáticas (Figura 10 E). Observa-se a presença de feixes vasculares colaterais circundados por células lignificadas (Figura 10 D).

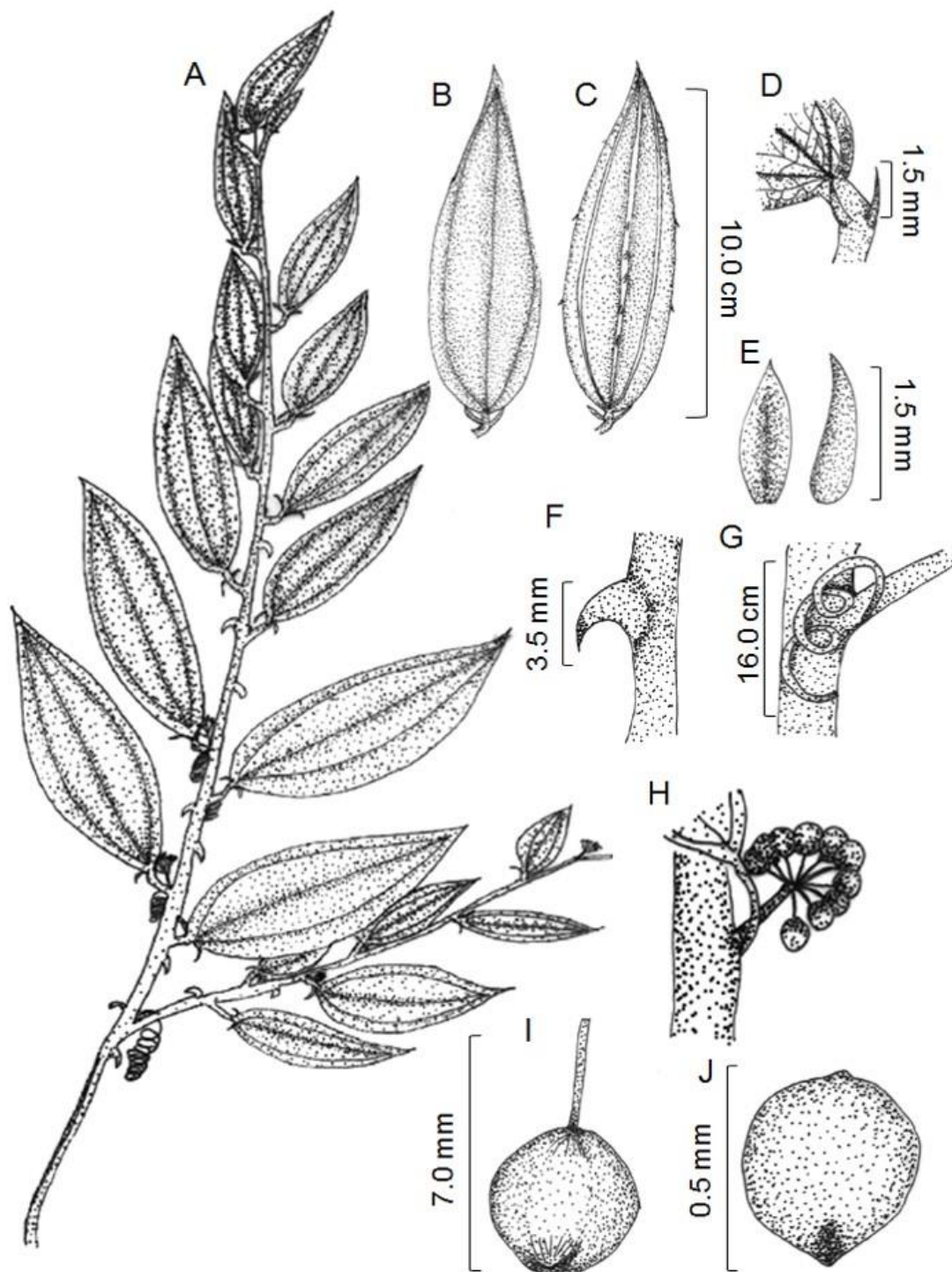


FIGURA 8 – *Smilax larvata* Griseb.

A: ramo vegetativo; B-C: folhas; F: projeções espiniformes; G: gavinhas; H-I: frutos; J: semente.

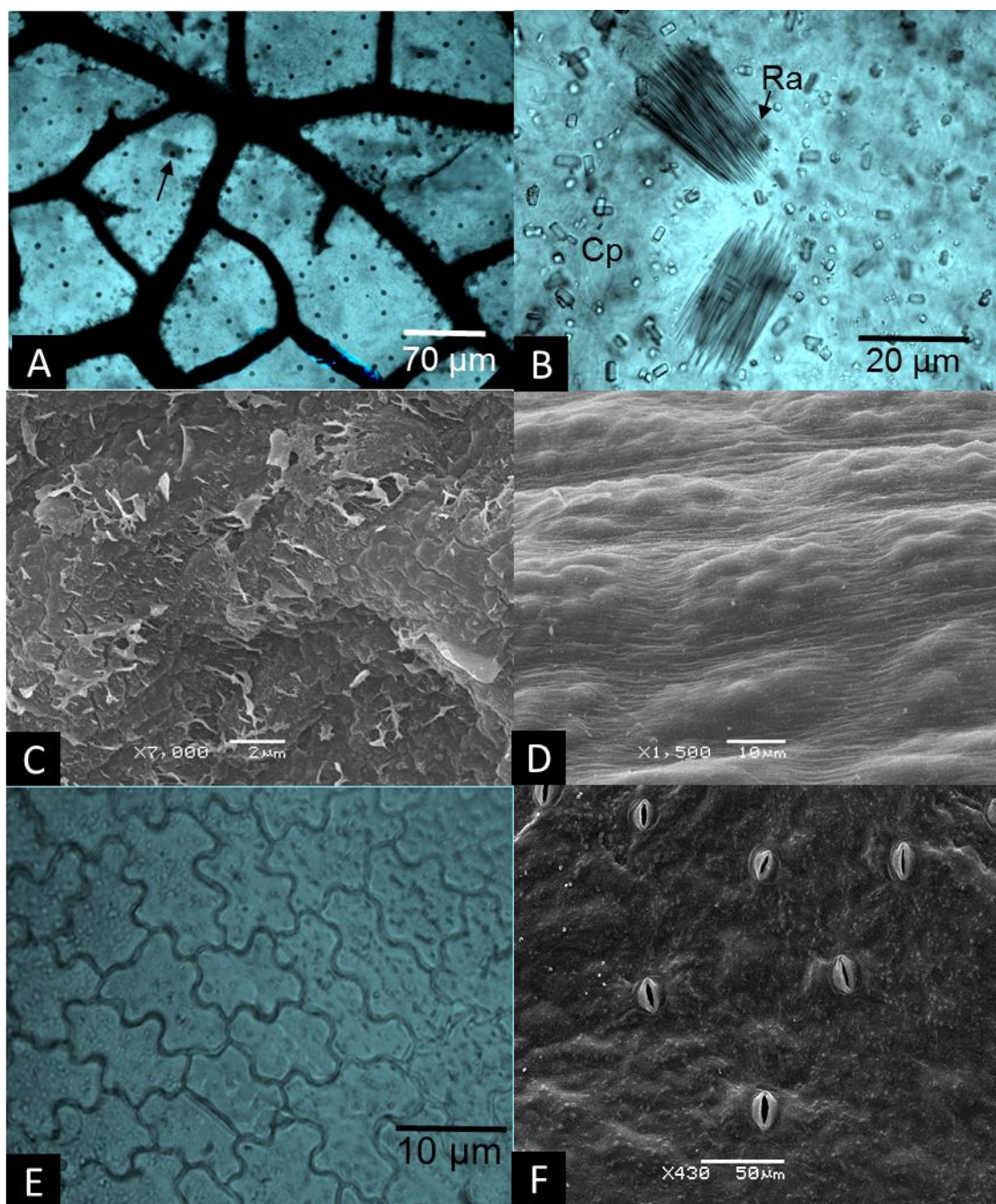


FIGURA 9 – *Smilax larvata* Griseb.

A – B: Fotomicrografias de cortes paradérmicos da folha. A: nervuras secundárias; B: detalhe das ráfides e cristais prismáticos. C – D: fotomicrografias em microscópio eletrônico de varredura da deposição de cera epicuticular da folha. C: face adaxial; D: face abaxial. E: vista frontal da epiderme da face adaxial; F: fotomicrografias em microscópio eletrônico de varredura da face abaxial. Ra = ráfides; Cp = cristais prismáticos.

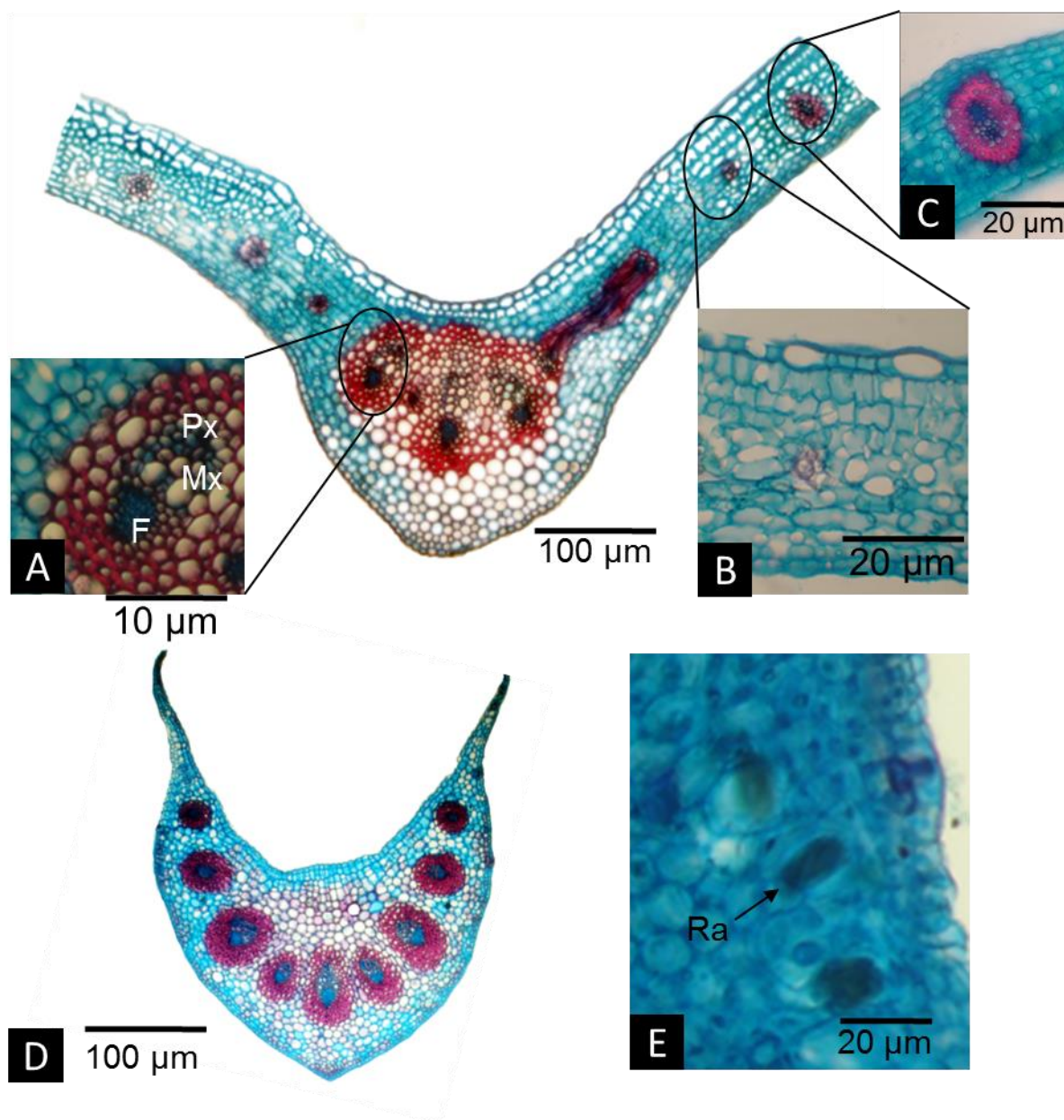


FIGURA 10 – *Smilax larvata* Griseb.

A - C: Fotomicrografias da folha. A: detalhe do feixe vascular da nervura central; B: mesofilo dorsiventral; C: feixe vascular da lâmina foliar. D – E: Fotomicrografias do pecíolo. D: Detalhe dos feixes vasculares; E: detalhe das ráfides. Px = protoxilema; Mx = metaxilema; F = floema primário; Ra = ráfides.

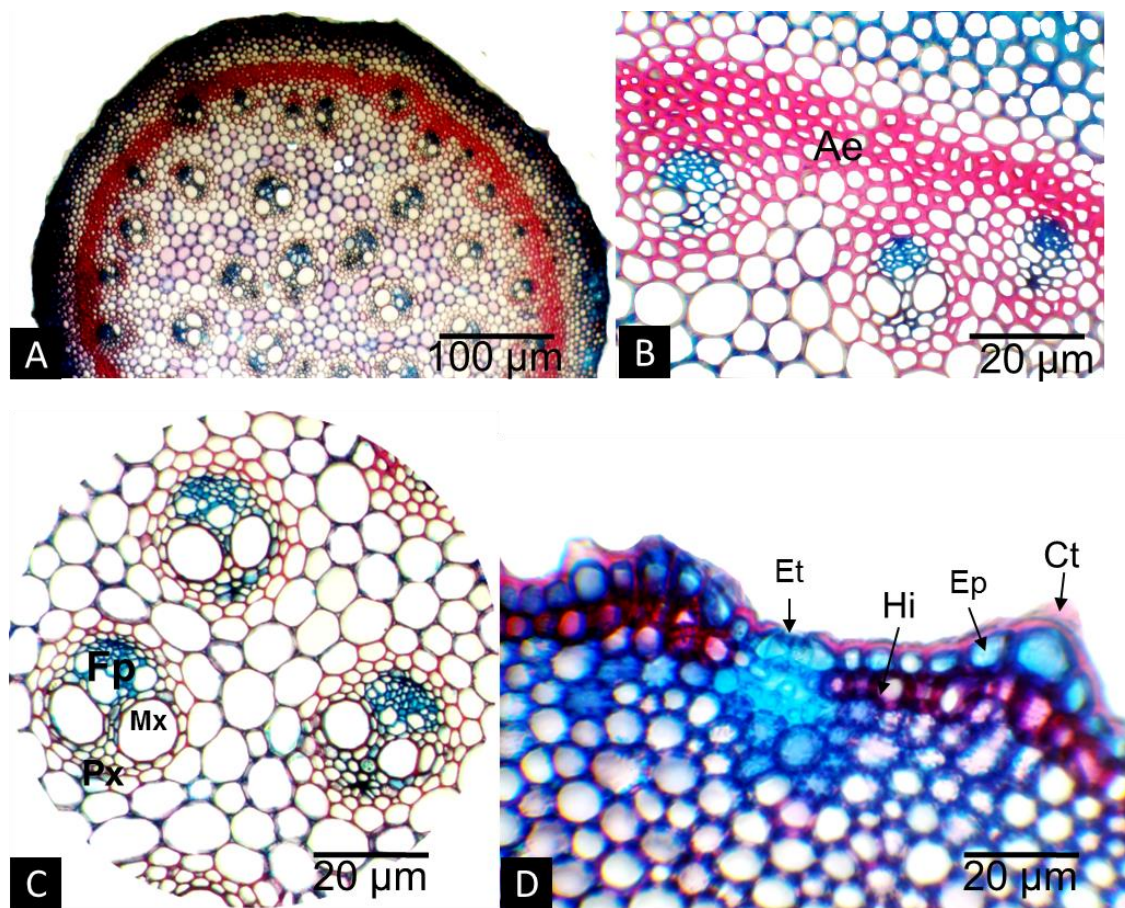


FIGURA 11 – *Smilax larvata* Griseb.

A – D: Fotomicrografias do caule. A: vista transversal; B: detalhe do anel esclerenquimático; C: feixes vasculares colaterais. D: Detalhe do estômato. Ae = ane esclerenquimático; Fp = floema primário; Mx = metaxilema; Px = protoxilema; Et = estômato; Es = espinho; Hi = hipoderme; Ep = epiderme; Ct = cutícula.

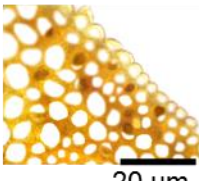
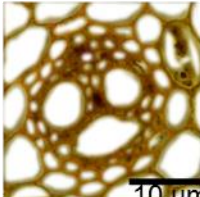
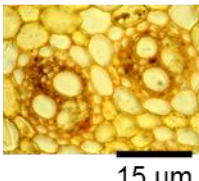
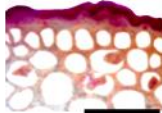
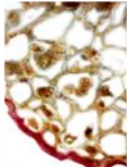
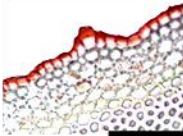
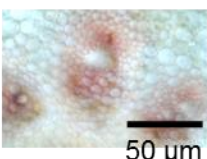
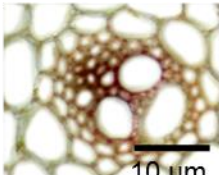
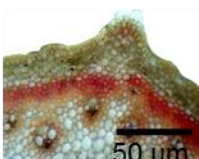
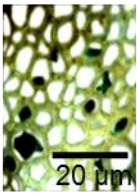
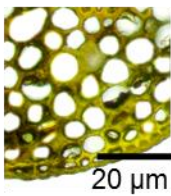
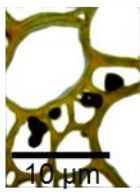
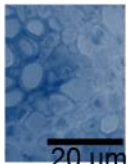
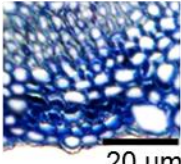
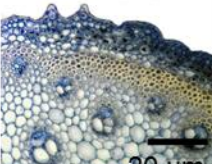
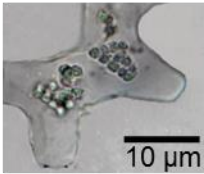
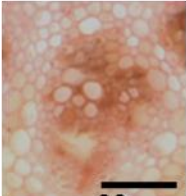
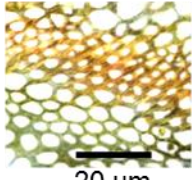
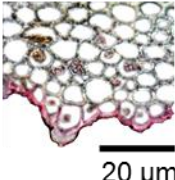
| Reagentes | Folha | Pecíolo | Caule |
|-----------------|--|---|--|
| Dragendorff |  20 µm |  10 µm |  15 µm |
| Sudan III |  50 µm |  20 µm |  20 µm |
| Lignina |  50 µm |  10 µm |  50 µm |
| Cloreto férrico |  20 µm |  20 µm |  10 µm |
| Proteínas |  20 µm |  20 µm |  20 µm |
| Amido |  10 µm | + | + |
| Schiff |  30 µm |  20 µm |  20 µm |

FIGURA 12 – *Smilax larvata* Griseb. RESULTADOS DOS TESTES HISTOQUÍMICOS.

4.1.3 Caule

A epiderme é uniestratificada, recoberta por cutícula, com a presença de algumas células com as paredes anticlinais maiores que as periclinais, e estômatos. (Figura 11 D). Abaixo da epiderme observa-se a hipoderme unisseriada e lignificada, seguida internamente de 4-6 camadas de colênquima angular e um anel esclerenquimático o qual envolve todo o cilindro vascular (Figura 11 A e 11 B). Este é composto por feixes vasculares colaterais com distribuição atactostélica. Os feixes vasculares são compostos por protoxilema, metaxilema e floema primário, sendo cada feixe envolvido por células lignificadas (Figura 11 C). Nos testes microquímicos constatou-se a presença de lipídios, amido, compostos fenólicos, proteínas, lignina, alcaloides, e polissacarídeos (Figura 12).

4.1.4 Discussão do estudo morfoanatômico

Após a análise anatômica de *S. larvata*, observa-se que esta é uma espécie de trepadeira, não apresentando crescimento secundário, características de acordo com a descrição de Cronquist (1981) para espécies do gênero *Smilax*. A morfologia das folhas pode variar entre as espécies deste gênero. Na *Smilax syphilitica* as folhas apresentam forma ovado-lanceolada e venação acródoma, entretanto, não apresentam projeções na lâmina foliar (SILVA, ANDREATA e APPEZZATO-DA-GLÓRIA, 2012). O mesmo ocorre com *Smilax polyantha* Griseb., a qual a forma da folha varia entre ovada e ovado lanceolada, com cinco nervuras principais e margem inteira (MARTINS e APPEZZATO-DA-GLÓRIA, 2006). A margem espinulosa pode ser determinante na diferenciação entre espécies de *Smilax*, uma vez que muitas delas não apresentam esta característica, e as que apresentam, uma variação da quantidade de projeções é observada. Por exemplo, as folhas de *Smilax cristalensis* e *Smilax cuprea* apresentam margem espinulosa raramente inteira; na *Smilax gracilior* a margem foliar pode ser inteira ou espinulosa, e em *Smilax havanensis* e *Smilax ilicifolia* as margens foliares são intensamente espinulosas (FERRUFINO-ACOSTA, 2010).

Em relação ao padrão de deposição de cera epicuticular, essa também pode variar entre espécies de *Smilax*. A ornamentação da cutícula de *Smilax quinquenervia*

e *Smilax campestris* Griseb. é rugosa-microtuberculada, enquanto na *S. polyantha* esta é escamiforme (GUIMARÃES, ANDREATA e COSTA, 2011). Apesar da cera epicuticular apresentar variações, Silva e colaboradores (2012) advertem que esta não deve ser a única característica determinante na distinção entre espécies de *Smilax*.

O mesofilo dorsiventral também foi observado nas espécies *S. brasiliensis*, *S. campestris*, *S. goyazana*, *S. cissoides*, *S. oblongifolia* e *S. rufescens*. Nestas espécies o mesofilo apresenta 1-4 camadas de células em forma de “M” (MARTINS *et al.*, 2013) justapostas próximas a face adaxial, enquanto que na *S. larvata* foram observadas de 2-3 camadas. As diferenças observadas no mesofilo constituem fatores importantes na caracterização de espécies, sendo úteis na prevenção de adulteração de matérias-primas no processo de comercialização (GATTUSO *et al.*, 2004). A localização e classificação dos estômatos pode ser levada em consideração na caracterização de *S. larvata*. De acordo com Martins e colaboradores (2013) as folhas de *S. campestris*, *S. cissoides*, *S. fluminensis*, *S. oblongifolia* e *S. rufescens* são hipostomáticas; as de *S. brasiliensis* e *S. goyazana* são anfiestomáticas. Guimarães e colaboradores (2011) relatam que as folhas de *S. quinquenervia* são anfiestomáticas e de *S. subsessiliflora* são hipostomáticas. Os estômatos são paracíticos, e anomocíticos respectivamente.

Quanto a presença de cristais prismáticos, Duarte (2007) adverte que a ocorrência destes é sujeita a mudanças do ambiente, dependendo da maior ou menor concentração de cálcio no solo, portanto não deve ser considerada uma característica determinante na diferenciação entre espécies.

Com relação ao pecíolo, este apresenta estrutura acentuadamente côncava, diferenciando-se de indivíduos de *S. syphilitica* coletados no Amazonas, os quais são ligeiramente côncavos e apresentam reentrâncias na sua estrutura. Os feixes vasculares envolvidos por células lignificadas também constituem um aspecto de diferenciação, uma vez que outras espécies do gênero, como em *S. aff. syphilitica*, os feixes vasculares estão dispostos em um único cilindro e as células circundantes não são lignificadas (SILVA, 2010).

O caule pode ser considerado um componente chave para a identificação de espécies deste gênero de acordo com Andreatta (2006). A espécie *S. larvata* apresenta ramos aéreos com casca lisa e projeções espiniformes, diferindo de outras espécies como *S. fluminensis* que apresenta ramos com pontas agudas (ANDREATA,

2006). Analisando-se a secção transversal do caule, o grau de lignificação das células que compõem o anel esclerenquimático que envolve o cilindro vascular pode ser considerado como uma característica de diferenciação, pois pode apresentar-se como descontínuo ou diminuído em outras espécies de *Smilax* (MARTINS et al., 2013).

Com relação a nomenclatura popular, a qual no sul do Brasil denomina a *S. larvata* como uma “unha-de-gato”, pode-se constatar um engano muito comum na área de plantas medicinais. Na literatura consta que espécies do gênero *Smilax* são conhecidas popularmente pelo nome de “salsaparrilha”, sendo que a Farmacopéia Brasileira de 1929 já apresentava plantas deste gênero com este nome (MARTINS e APPEZZATO-DA-GLÓRIA, 2006). Cronquist (1981) afirmava que o condimento salsaparrilha é extraído dos tubérculos de espécies de *Smilax*, e Ferrufino-Acosta (2010) em sua revisão taxonômica do gênero corrobora esta nomenclatura. Existem demais denominações para espécies de *Smilax* como “pate”, “canyugo”, “raiz-da-China” e “laurel” (FERRUFINO-ACOSTA, 2010). Entretanto não foram encontrados registros que identificassem uma espécie de *Smilax* como “unha-de-gato”. A presença de espinhos é a única estrutura anatômica em comum com a espécie *Uncaria tomentosa* (verdadeira unha-de-gato), sendo provavelmente esta a razão para a identificação incorreta pela população de Curitiba.

4.2 PARÂMETROS DE PUREZA

Os resultados de determinação do teor de água, expresso em porcentagem de umidade e do teor de cinzas estão apresentados na tabela 1.

TABELA 1 – PARÂMETROS DE QUALIDADE de *S. larvata*

| UMIDADE (%) | CINZAS (%) |
|--------------|------------|
| 10,11 ± 0,2* | 4,9 ± 0,1* |

*Resultados expressos em média ± desvio padrão.

Parâmetros como o teor de umidade e cinzas estão previstos na Farmacopéia Brasileira, sendo largamente utilizados no controle de qualidade de uma droga vegetal (FARMACOPÉIA, 2010). Soares e colaboradores (2014) apresentaram recentemente

um panorama da comercialização de salsaparrilha em São Paulo, Brasil. Os autores detectaram a presença de alto teor de matéria orgânica estranha nos exemplares adquiridos nos mercados desta localidade. Os altos teores deste tipo de matéria interfere na qualidade da droga vegetal, pois diminui a quantidade de substâncias ativas comprometendo a atividade farmacológica. Ensaio de pureza, como determinação de umidade e cinzas, são capazes de detectar esta forma de adulteração e devem ser utilizados para inibir o comércio de produtos fora do padrão de qualidade.

4.3 ESTUDO FITOQUÍMICO

4.3.1 Marcha sistemática de análise fitoquímica

Nos extratos analisados foram detectados os grupos químicos flavonoides, cumarinas, esteroides, triterpenos, alcaloides, taninos e aminogrupos. Estes resultados estão de acordo com estudos prévios de outras espécies de *Smilax*. Rajesh e Perumal (2014) detectaram em *S. zeylanica* a presença de alcaloides, fenólicos, taninos, carboidratos e flavonoides glicosídeos.

4.3.2 Cálculo do rendimento da extração e do teor de sólidos do extrato bruto

Os resultados dos cálculos do rendimento da extração e do teor de sólidos do extrato etanólico bruto estão descritos na tabela 2.

TABELA 2 – RENDIMENTO DA EXTRAÇÃO E TEOR DE SÓLIDOS DO EXTRATO ETANÓLICO BRUTO DE *S. larvata*.

| RENDIMENTO DA EXTRAÇÃO PLANTA SECA (%) | TEOR DE SÓLIDOS (mg/mL) |
|---|----------------------------|
| 15,39 | 480 ± 4,2 * |

*Resultado expresso em média ± desvio padrão.

O cálculo do teor de sólidos de extratos vegetais está previsto na Farmacopéia Brasileira (FARMACOPÉIA, 2010), como um ensaio útil no controle de qualidade de extratos vegetais. Com este parâmetro, pode-se mensurar corretamente a quantidade de sólidos presente em um volume de extrato o qual exerce uma atividade biológica.

4.4 ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO

4.4.1 Investigação da amostra AES-3 e identificação das substâncias AES-3A, AES-3B, AES-3C presentes na amostra

A fração acetato de etila foi submetida a cromatografia líquida em coluna. Esta fração foi cromatografada na proporção de 2,4 g de fração para 14,6357 g de sílica. Foram eluídas misturas de hexano/ acetato de etila/ metanol com ordem crescente de polaridade de 5%, iniciando com hexano/ acetato de etila 50% v/v, passando a acetato de etila / metanol até 100% de metanol.

Foram obtidas 150 alíquotas de 20 mL cada. A alíquota 3 (15mg) apresentou cristais de cor amarela no fundo da frasco e foi denominada AES-3. Esta foi submetida a análise no UV (Gráfico 1), os comprimentos de onda apresentaram absorvância máxima em 269, 293 (sh) e 361 nm. Estes valores de absorvância indicam que componentes da amostra AES-3 são da classe dos flavonoides (MABRY, MARKHAM, e THOMAS, 1970).

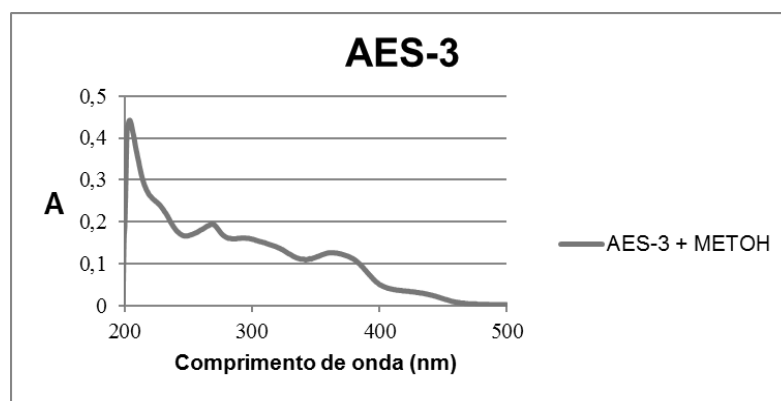


GRÁFICO 1 – REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DO ESPECTRO DE UV DA SUBSTÂNCIA AES-3 EM METANOL.

A amostra AES-3 foi dissolvida em metanol deuterado e analisada em espectrômetros de RMN Bruker® Avance III 600 MHz. O espectro de ^1H (Figura 15) apresenta na região entre δ 8,0 e 6,0 ppm vários dubletos referentes a hidrogênios ligados a anel aromático *p*-substituído, indicando a presença de mais de uma substância. Considerando os sinais mais proeminentes e analisando as constantes de acoplamento, foram identificadas três substâncias presentes na amostra: AES-3A, AES-3B e AES-3C.

4.4.1.1 Identificação da substância AES-3A

O espectro de RMN de ^1H (Figura 15) apresentou um dubleto em δ 8,08 (2H, $J = 8.8$ Hz) e δ 6,9 ppm (2H, $J = 8.8$ Hz) característico de anel hidrogênio ligado a anel aromático substituído na posição *para*. Os dubletos em δ 6,18 (1H, $J = 2.0$ Hz) e δ 6,4 ppm (1H, $J = 2.0$ Hz) caracterizam hidrogênios ligados a anel aromático na posição *meta*, os quais correspondem aos hidrogênios H-6 e H-8 respectivamente.

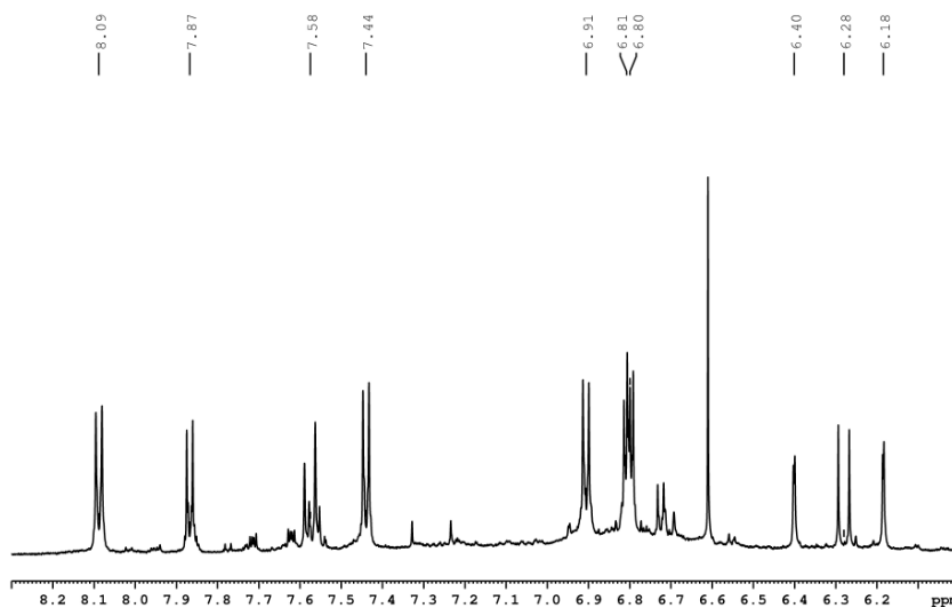


FIGURA 13 – AMPLIAÇÃO DA REGIÃO DE 8,5 A 6,0 PPM DO ESPECTRO DE RMN DE ^1H DA AMOSTRA AES-3 (600 MHz, MEOD, 30°C).

Pelos espectros de HSQC (Figura 16) foram obtidos os deslocamentos dos sinais dos carbonos diretamente ligados aos hidrogênios e pelos espectros de HMBC (Figura 17) os deslocamentos dos carbonos acoplados a longa distância. De acordo com a literatura consultada, a substância AES-3A, um dos componentes da mistura AES-3, demonstrou tratar-se do canferol (Figura 18) (Jiang, et al., 2013). Os valores dos deslocamentos dos carbonos estão compilados na tabela 3.

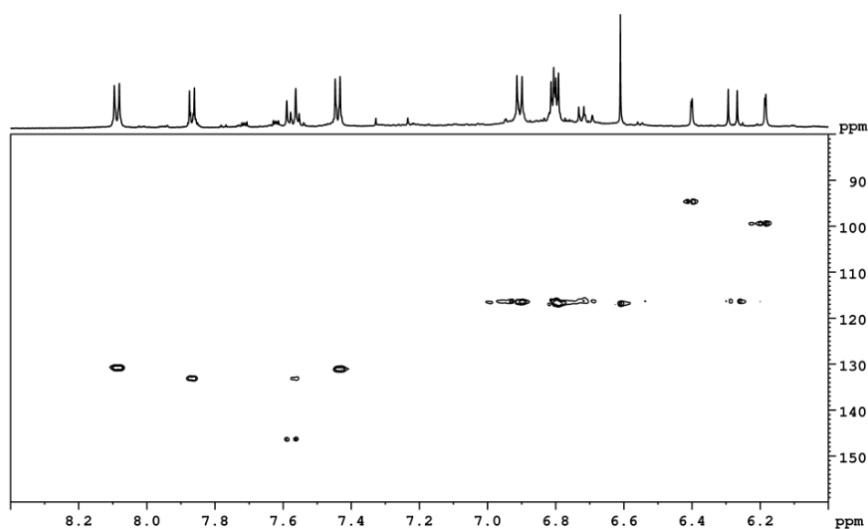


FIGURA 14 – EXPANSÃO DA REGIÃO DE 8,5 A 6,0 PPM E DE 80 A 160 PPM DO ESPECTRO DE CORRELAÇÃO DE ^1H - ^{13}C DE EXPERIMENTO DE RMN DE HSQC A 600.13 E 150.9 MHZ, MOSTRANDO A CORRELAÇÃO DOS HIDROGÊNIOS AROMÁTICOS DAS SUBSTÂNCIAS AES-3A, AES-3B E AES-3C (MEOD/TMS, 30 °C).

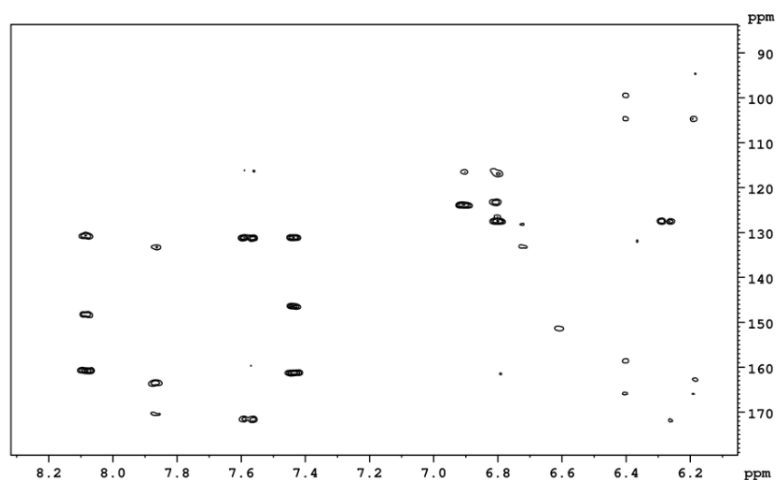


FIGURA 15 – EXPANSÃO DA REGIÃO DE 8,5 A 6,0 PPM E DE 80 A 180 PPM DO ESPECTRO DE CORRELAÇÃO A LONGA DISTÂNCIA DE ^1H - ^{13}C DE EXPERIMENTO DE RMN DE HMBC A 600.13 E 150.9 MHZ, MOSTRANDO A CORRELAÇÃO DOS HIDROGÊNIOS AROMÁTICOS DAS SUBSTÂNCIAS AES-3A, AES-3B E AES-3C (MEOD/TMS, 30 °C).

TABELA 3 – DESLOCAMENTOS QUÍMICOS DE RMN DE ^1H , ^{13}C , HSQC E HMBC DO CANFEROL

| Carbono | Experimental (CD_3OD) ^1H (m, J Hz) | (JIANG <i>et al.</i> , 2013) (CD_3OD) ^1H (m, J Hz) | HMBC (CD_3OD) ^{13}C (δ ppm) | HSQC (CD_3OD) ^{13}C (δ ppm) | (JIANG <i>et al.</i> , 2013) (CD_3OD) ^{13}C (δ ppm) |
|---------|--|---|---|---|--|
| 2 | - | - | - | 148.1 | 148.5 |
| 3 | - | - | - | - | 137.2 |
| 4 | - | - | - | - | 177.5 |
| 5 | - | - | - | 158.3 | 162.3 |
| 6 | 6.18 (d, 2.0) | 6.17 (d, 2.0) | 165,8, 162,2, 104,4, 94,5 | 99.5 | 99.5 |
| 7 | - | - | - | 165.8 | 165.7 |
| 8 | 6.40 (d, 20) | 6.38 (d, 2.0) | 165.8, 158.3, 99.5, 104.4 | 94.5 | 94.7 |
| 9 | - | - | - | 162.6 | 160.7 |
| 10 | - | - | - | 104.4 | - |
| 1' | - | - | - | 123.8 | 123.9 |
| 2'6' | 8.08 (d, 8.8) | 8.07 (d, 8.8) | 130.7, 148.1, 160.8 | 130.7 | 130.8 |
| 3'5' | 6.90 (d, 8.8) | 6.90 (d, 8.8) | 123.8 | 116.5 | 116.5 |
| 4' | - | - | - | 160.8 | 158.4 |

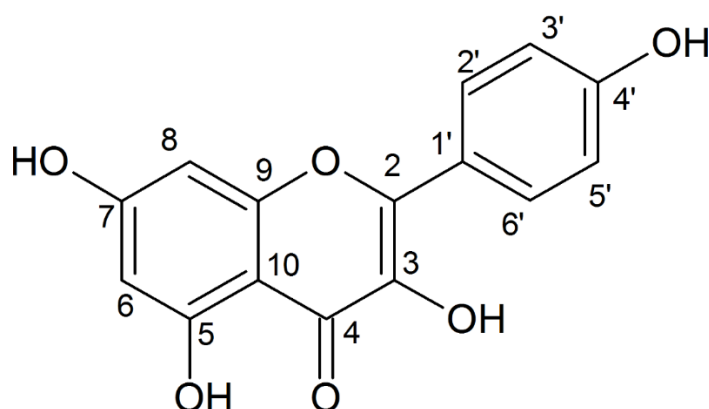


FIGURA 16 – ESTRUTURA QUÍMICA DO CANFEROL.

O canferol, como outros flavonoides, possui uma estrutura difenilpropano (C6-C3-C6) e sua biossíntese é realizada com a participação de enzimas relativamente comuns no reino vegetal, resultando em uma larga distribuição entre as espécies vegetais (CALDERÓN-MONTAÑO *et al.*, 2011). Esta substância já foi identificada em várias famílias botânicas e sua presença foi detectada no gênero *Smilax* nas espécies *Smilax bockii*, na forma de canferol e canferol 7-O- β -D-glucopiranosídeo (XU *et al.*, 2005), e na espécie *Smilax china* como canferol 7-O- β -D-glicosídeo (LI *et al.*, 2007).

As atividades biológicas do canferol foram extensamente reladas em literatura, dentre estas podemos citar atividade antioxidante, anti-inflamatória, anti-cancerígena e antimicrobiana (CALDERÓN-MONTAÑO *et al.*, 2011).

Cos e colaboradores (1998) elaboraram uma classificação para os flavonoides segundo seus efeitos sobre a xantina oxidase e habilidade de sequestro de radicais superóxido. O canferol foi classificado como um inibidor da xantina oxidase sem atividade de sequestro de radicais superóxido. A xantina oxidase catalisa a oxidação da hipoxantina e xantina em ácido úrico, desempenhando um papel crucial na gota (COS *et al.*, 1998)

Posteriormente, Calderón-Montaño e colaboradores (2011) apresentam vários mecanismos pelos quais o canferol exerce sua atividade antioxidante. Dentre eles a inibição da xantina oxidase, sequestro de ânions superóxido, sequestro de radicais hidroxila e peroxinitrito, redução da formação de radical hidroxila pela reação de Fenton uma vez que possui a propriedade de quelar íons ferro e cobre, aumenta a atividade de enzimas antioxidantes como a superóxido-dismutase, catalase, e heme-oxigenase 1, previne a peroxidação lipídica e a oxidação de lipoproteínas de baixa densidade (LDL).

As propriedades anti-inflamatórias de flavonoides tem sido estudadas com sucesso em ensaios *in vitro* e *in vivo* (SURVAY *et al.*, 2011). A literatura reporta a atividade anti-inflamatória do canferol por meio de diferentes mecanismos de ação, como inibidor de enzimas como a COX-2, lipoxigenases e óxido-nítrico sintetase e outros mecanismos relacionados ao seu poder antioxidante (CALDERÓN-MONTAÑO *et al.*, 2011).

4.4.1.2 Identificação da substância AES-B

Pela análise das constantes de acoplamento dos sinais encontrados no espectro de hidrogênio da amostra AES-3 (Figura 15) pode-se observar um par de dubletos em δ 7.44 (2H, $J = 8.6$ Hz) e 6.8 ppm (2H, $J = 6.08$ Hz), os quais foram designados como hidrogênio H 2'6' e H 3'5' respectivamente. Dois dubletos em δ 7.58 (1H, $J = 15.9$ Hz) e δ 6.28 ppm (1H, $J = 15.9$ Hz) caracterizam presença de hidrogênios ligados a carbono secundário. Pela constante de acoplamento pode-se inferir que estão ligados ao carbono na posição *trans*. Considerando os dados dos espectros de HSQC (Figura 16) e HMBC (Figura 17) e dados da literatura (Tabela 4), identificou-se a substância AES-3B (outro componente da amostra AES-3), sendo esse o ácido *p*-cumárico (Figura 19).

TABELA 4 – DESLOCAMENTOS QUÍMICOS DE RMN DE ^1H , ^{13}C , HSQC E HMBC DO ÁCIDO *p*-CUMÁRICO.

| Carbono | Experimental (CD_3OD) ^1H (m, J Hz) | (BERGMAN <i>et al.</i> , 2001) (CDO_3CD) ^1H (m, J Hz) | HMBC (CD_3OD) ^{13}C (δ ppm) | HSQC (CD_3OD) | (BERGMAN <i>et al.</i> , 2001) (CDO_3CD) ^{13}C (δ ppm) |
|---------|--|---|---|------------------------------------|--|
| 1 | - | - | - | 127.4 | 127.17 |
| 2/6 | 7.44 (d, 8.6) | 7.45 | 131.0, 146.3, 161.2 | 131.0 | 131.06 |
| 3/5 | 6.80 (d, 8.6) | 6.80 | 127.4 | 116.8 | 116.76 |
| 4 | - | - | - | 161.2 | 161.04 |
| 7 | 7.58 (d, 15.9) | 7.60 | 131.0, 171.4, 116.8 | 146.3 | 146.68 |
| 8 | 6.28 (d, 15.9) | 6.28 (J=16 Hz) | 127.4, 171.4 | 116.3 | 115.49 |
| 9 | - | | | 171.4 | 171.06 |

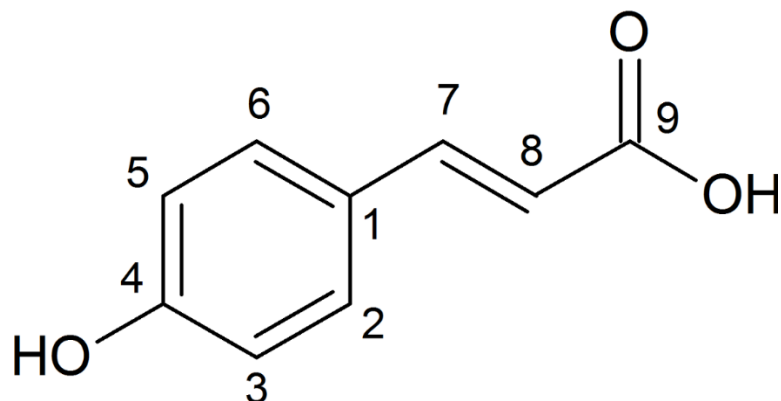


FIGURA 17 – ESTRUTURA QUÍMICA DO ÁCIDO *p*-CUMÁRICO.

O ácido *p*-cumárico (ou 4-cumárico) é um fenilpropanoide (C6-C3) derivado da deaminação de uma molécula de L-tirosina formada a partir do ácido chiquímico (SIMÕES *et al.*, 2007 p. 468). Esta molécula faz parte da rota de biossíntese de uma vasta gama de produtos naturais, dentre os quais pode-se citar ligninas, lignanas, cumarinas, flavonoides, terpenos, entre outros (DEWICK, 2002). Sendo um metabólito comum a diversas rotas metabólicas, pode ser amplamente encontrado em cereais, frutas e vegetais, além de ser um dos constituintes de bebidas como o vinho (LUCERI *et al.*, 2007).

Estudos sugerem que o ácido *p*-cumárico adicionado a dieta exerceu efeito antioxidante e anti-inflamatório na mucosa de cólon *in vivo* (GUGLIELMI *et al.*, 2003; LUCERI *et al.*, 2004.) e atividade antiplaquetária *in vivo* (LUCERI *et al.*, 2007). Outras propriedades descritas são atividade antilisterial (WEN, DELAQUIS, STANICH, & TOIVONEN, 2003) e antibacteriana (HERALD e DAVIDSON, 1983).

4.4.1.3 Identificação da substância AES-C

O espectro de hidrogênio da amostra AES-3 (Figura 15) apresentou dois dubletos em δ 7.87 (2H, J = 8.8) e δ 6.81 (2H, J = 8.8), característico de hidrogênio ligados anel aromático *p*-substituído. Pelo espectro de HMBC (Figura 17), o hidrogênios em δ 7.87 acopla a longa distância com um carbono em δ 170.2 ppm, o que indica presença de uma carbonila. Avaliando-se os acoplamentos verificados no

espectro de HSQC (Figura 16) e os dados de literatura (Tabela 5), identificou-se a terceira substância (AES-3C) da amostra AES-3 como o ácido *p*-hidroxibenzoico (Figura 20).

TABELA 5 – DESLOCAMENTOS QUÍMICOS DE RMN DE ^1H , ^{13}C , HSQC E HMBC DO ÁCIDO *p*-HIDROXIBENZOICO.

| Carbono | Experimental (CD_3OD) ^1H (m, J Hz) | (DHAKAL <i>et al.</i> , 2009) (CD_3OD) ^1H (m, J Hz) | HMBC (CD_3OD) ^{13}C (δ ppm) | HSQC (CD_3OD) | (DHAKAL <i>et al.</i> , 2009) (CD_3OD) ^{13}C (δ ppm) |
|---------|--|---|---|------------------------------------|--|
| 1 | - | - | - | 123.3 | 122.6 |
| 2/6 | 7.87 (d, 8.8) | 7.87 (d, 8.8) | 163.4, 133.1, 170.2 | 133.1 | 132.9 |
| 3/5 | 6.81 (d, 8.8) | 6.81 (d, 8.76) | 116.3, 123.2 | 116.3 | 116.0 |
| 4 | - | - | - | 163.4 | 163.3 |
| 1' | - | - | - | 170.2 | 170.1 |

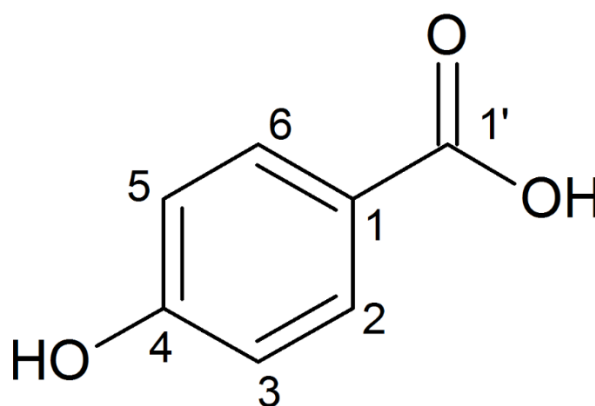


FIGURA 18 – ESTRUTURA QUÍMICA DO ÁCIDO *p*-HIDROXIBENZOICO.

O ácido *p*-hidroxibenzoico (ou 4-hidroxibenzoico) é um ácido benzoico (C₆-C₃) e nas plantas pode ser formado diretamente a partir dos intermediários iniciais da rota metabólica do ácido chiquímico, assim como a partir de rotas alternativas como a partir de derivados do ácido cinâmico. Neste caso o ácido *p*-cumárico pode atuar como

um precursor do ácido p-hidroxibenzoico (DEWICK, 2002). Em bactérias esta substância é produzida a partir do ácido corísmico (DEWICK, 2002).

As atividades biológicas relatadas em literatura para o ácido p-hidroxibenzoico incluem atividade antimicrobiana (CHO *et al.*, 1998), antifúngica, antimutagênica, e estrogênica (KHADEM e MARLES, 2010)

O ácido p-hidroxibenzoico tem sido os alvo de estudos relacionados ao câncer de mama, pois este é um produto metabólico de conservantes utilizados em produtos de consumo. Os resultados de alguns estudos indicam a atividade estrogênica desta substância em linhagens de células de câncer de mama (PUGAZHENDHI, POPE, e DARBRE, 2005).

4.4.1.4 Isolamento e identificação da substância HPLC-3

A alíquota 72 obtida pela cromatografia líquida em coluna da fração aceto de etila foi submetida a cromatografia preparativa em CLAE. Utilizou-se para a fase móvel (B) metanol e (D) água e o seguinte método: B40% e D60% 0,0 min; B40% e D60% 15 min; B45% e D55% 16 min; B45% e D55% 30 min; B95% e D5% 40 min; B95% e D5% 51 min; B40% e D60% 53 min; B40% e D60% 55min. Obteve-se as substâncias isoladas HPLC -3 (34.4mg) e HPLC -5 (18.5mg). O cromatograma da cromatografia preparativa está representado na figura 21.

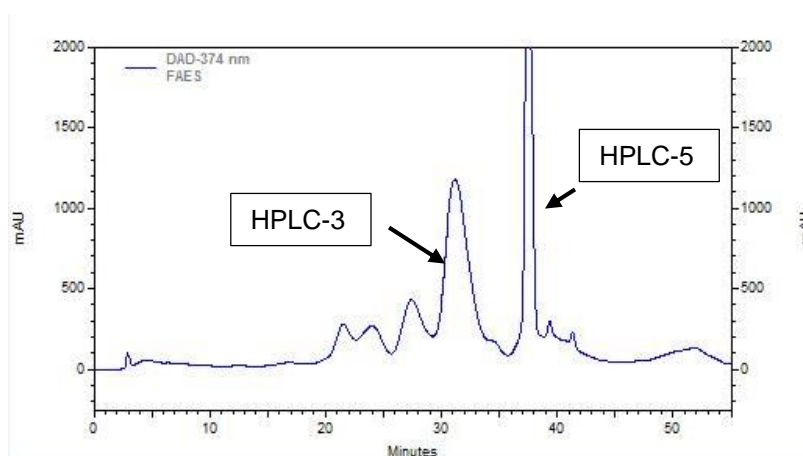


FIGURA 19 – CROMATOGRAMA DA CROMATOGRAFIA PREPARATIVA EM FASE REVERSA MOSTRANDO OS PICOS DAS SUBSTÂNCIAS HPLC -3 E HPLC -5.

Após o isolamento da substância HPLC-3, esta foi submetida a uma espectroscopia de varredura em UV gerando o espectro representado no gráfico 2.

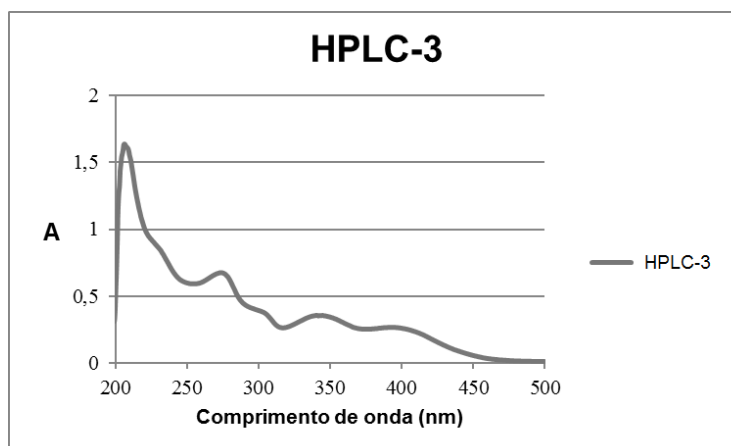


GRÁFICO 2 – REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DO ESPECTRO DE UV DA SUBSTÂNCIA HPLC-3 EM METANOL.

Observa-se pelo gráfico 2 que os comprimentos de onda de absorbância máxima são 274, 297 (sh), 344 e 392 nm. Estes valores indicam que a substância HPLC-3 apresenta absorbâncias características de flavonoides (MABRY, MARKHAM, e THOMAS, 1970). Em seguida a substância em estudo foi submetida aos experimentos de RMN de ^1H e ^{13}C , HSQC e HMBC.

O espectro de ^1H da substância HPLC-3 (Figura 22) apresentou dois dubletos em $\delta 6.91$ e $\delta 8.03$ ppm, ambos com constantes de acoplamento (J) de 8.8 Hz e integrando para dois hidrogênios, característico de hidrogênios 2'6' e 3'5' de flavonoides. Dois dubletos em $\delta 6.37$ e $\delta 6.17$ ppm, ambos com $J=1.9$ Hz e integrando para 1 H caracterizam acoplamento na posição meta em sistema aromático, sendo estes sinais típicos de H-6 e H-8 de flavonoides. Dois dubletos na região de $\delta 5.09$ e $\delta 5.51$ ppm ($J=1.5$ e 5.0 Hz) indicaram a presença de dois hidrogênios anoméricos, característico de moléculas glicosídicas, condição confirmada pelos sinais na região de $\delta 4$ a $\delta 3$ ppm. Pela análise dos espectros de HMBC (Figura 24), constatou-se que o hidrogênio em anomérico em $\delta 5.51$ ppm acopla a longa distância com o carbono em $\delta 134,7$ ppm da aglicona, caracterizando a ligação glicosídica. O valor do deslocamento e a constante de acoplamento dos hidrogênios anoméricos indicam que esses ligam-se aos carbonos anoméricos na posição α (SAN FELICIANO *et al.*, 2007)

O segundo hidrogênio anomérico em δ 5.09 ppm indica a presença de ramnose. O espectro de HSQC permitiu correlacionar os hidrogênios anoméricos aos seus respectivos carbonos (Figura 23).

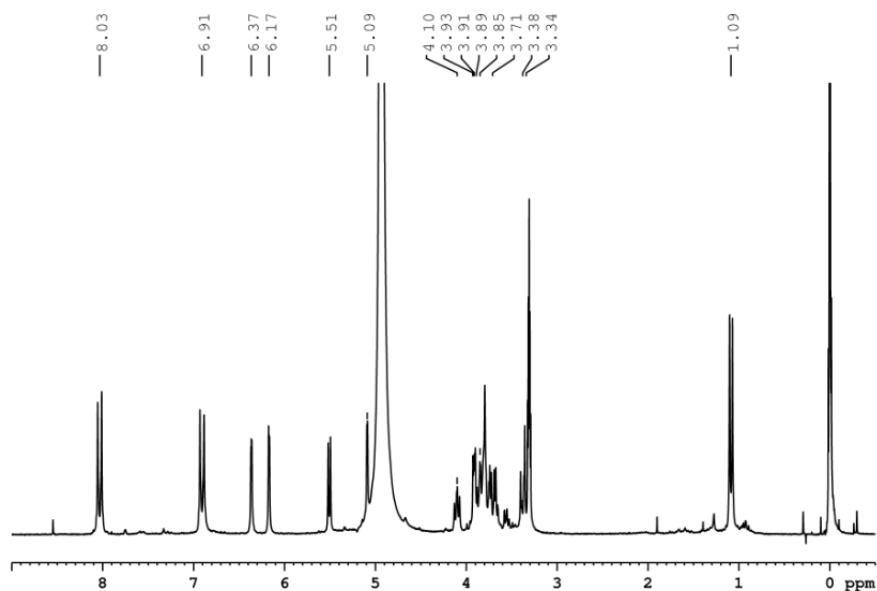


FIGURA 20 – ESPECTRO COMPLETO DE RMN DE ^1H DA SUBSTÂNCIA HPLC-3 (MEOD/TMS, 200.13 MHZ, 30 °C).

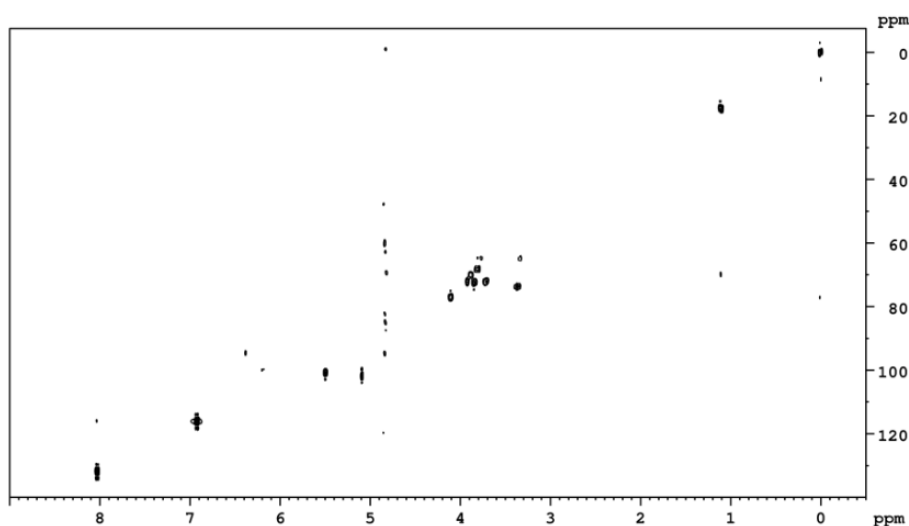


FIGURA 21 – ESPECTRO DE CORRELAÇÃO DE ^1H - ^{13}C DE EXPERIMENTO DE RMN HSQC A 600.13 E 150.9 MHZ, MOSTRANDO A CORRELAÇÃO DOS HIDROGÊNIOS DA SUBSTÂNCIA HPLC-3 (MEOD/TMS, 30 °C).

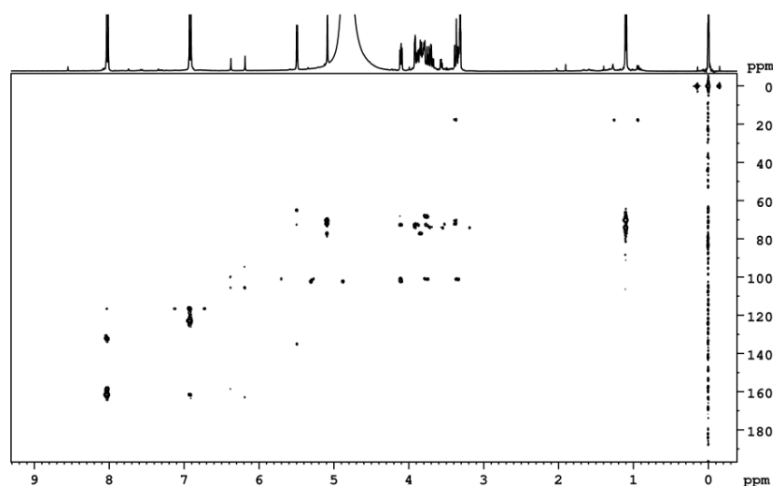


FIGURA 22 – ESPECTRO DE CORRELAÇÃO A LONGA DISTÂNCIA DE ^1H - ^{13}C DE EXPERIMENTO DE RMN HMBC A 600.13 E 150.9 MHZ, MOSTRANDO AS CORRELAÇÕES A LONGA DISTÂNCIA DOS HIDROGÊNIOS DA SUBSTÂNCIA HPLC-3 (MEOD/TMS, 30 °C).

O espectro de ^{13}C da substância HPLC-3 (Figura 25) apresentou 25 carbonos, 15 carbonos na região de 90 e 180 ppm característicos de estrutura básica de flavonoides, e 10 carbonos distribuídos na região de 60 a 80 ppm, indicando a presença de duas unidades glicosídicas. O carbono em $\delta 17.7$ confirma que uma das unidades glicosídicas é a ramnose. O glicosídeo ligado a aglicona apresenta então cinco carbonos, sendo esse identificado como a arabinose.

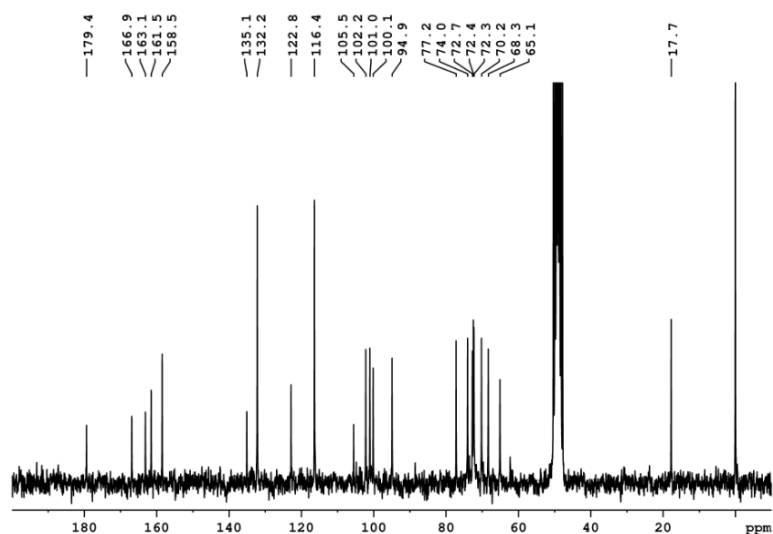


FIGURA 23 – ESPECTRO COMPLETO DE RMN ^{13}C DA SUBSTÂNCIA HPLC-3 (MEOD/TMS, 200.13 MHZ, 30 °C).

De acordo com os espectros analisados e dados da literatura (Tabela 6), identificou-se a substância HPLC-3 como o flavonoide Drabanemoside (Figura 26).

TABELA 6 – DESLOCAMENTOS QUÍMICOS DE RMN DE ^1H , ^{13}C , HSQC E HMBC DO DRABANEMOROSIDE.

| Carbono | Experimental (CD_3OD) ^1H (m, J Hz) | (MOON <i>et al.</i> , 2010) (CD_3OD) ^1H (m, J Hz) | HMBC (CD_3OD) ^{13}C (δ ppm) | Experimental (CD_3OD) ^{13}C (δ ppm) | (MOON <i>et al.</i> , 2010) (CD_3OD) ^{13}C (δ ppm) |
|-----------------|--|---|---|---|--|
| 2 | - | - | - | 158.5 | 158.3 |
| 3 | - | - | - | 134.7 | 135.0 |
| 4 | - | - | - | 179.4 | 179.3 |
| 5 | - | - | - | 162.1 | 162.9 |
| 6 | 6.17 (d, 1.9) | 6.18 (d, 2.4) | 94.3, 105.5, 163.2, 166.9 | 100.2 | 99.8 |
| 7 | - | - | - | 166.5 | 165.6 |
| 8 | 6.37 (d, 1.9) | 6.38 (d, 2.4) | 100.2, 105.5, 166.9 | 94.3 | 94.7 |
| 9 | - | - | - | 158.4 | 158.4 |
| 10 | - | - | - | 105.5 | 105.8 |
| 1' | - | - | - | 123.1 | 122.7 |
| 2'6' | 8.03 (d, 8.8) | 8.03 (d, 8.8) | 131.9, 198.7, 161.4 | 131.9 | 132.1 |
| 3'5' | 6.91 (d, 8.8) | 6.90 (d, 8.8) | 116.0, 123.1 | 116.0 | 116.3 |
| 4' | - | - | - | 161.4 | 161.3 |
| α -D-ARA | | | | | |
| 1'' | 5.5 (d, 5.0) | 5.52 (d, 5.2) | 65.0, 72.7, 134.7 | 101.1 | 101.0 |
| 2'' | 4.10 (dd, 6.7; 5.01) | 4.10 (dd, 6.4; 5.2) | 72.7, 101.1, 102.2 | 77.2 | 77.7 |
| 3'' | 3.85 (m) | 3.82 (dd, 6.4; 2.8) | 77.2, 101.1 | 72.7 | 72.8 |
| 4'' | 3.91 (m) | 3.78 (m) | - | 68.3 | 68.4 |

Continua Tabela 6.

| | | | | | |
|-----------------|-------------------------------------|---|---------------------|-------|-------|
| 5'' | 3.34 (dd, 11.4; 2.3) 3.78 (m) | 3.76 (dd, 11.2; 5.2, H _b) 3.34 (m, H _a) | 77.2, 101.1 | 65.0 | 65.2 |
| α -L-RHA | | | | | |
| 1''' | 5.09 (d, 1.,5) | 5.09 (d, 1.6) | 70.2, 72.2, 77.2 | 102.2 | 102.2 |
| 2''' | 3.92 (dd, 3.4; 1.5) | 3.91 (dd, 3.2; 1.6) | 72.3, 74.0 | 72.5 | 72.5 |
| 3''' | 3.71 (m) | 3.70 (dd, 9.6; 3.2) | 74.0 | 72.3 | 72.3 |
| 4''' | 3.37 (dd, 9.6; 9.5) | 3.35 (t, 9.6) | 17.7, 70.2, 72.3 | 74.0 | 74.0 |
| 5''' | 3.89 (dq, 9.5; 6.2) | 3.87 (dq, 9.6; 6.0) | 72.3 | 70.2 | 70.2 |
| 6''' | 1.09 (d, 6.2) | 1.09 (d, 6.0) | 70.2, 74.0 | 17.7 | 17.9 |

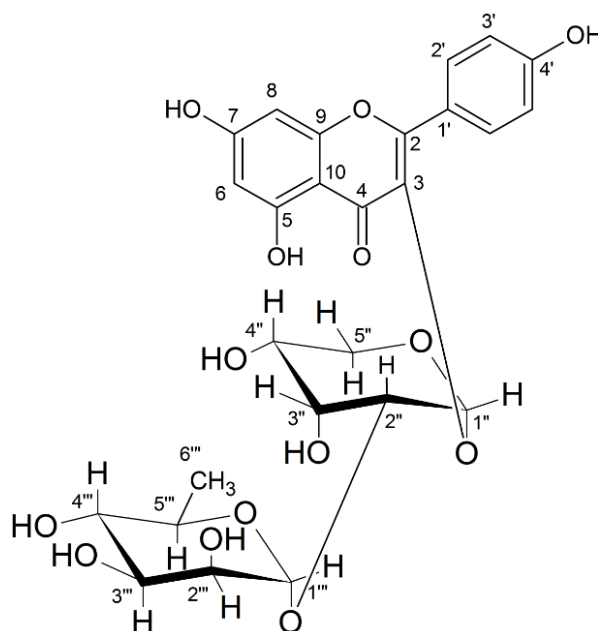


FIGURA 24 – ESTRUTURA QUÍMICA DO DRABANEMOROSIDE.

A estrutura do drabanemoside foi descrita recentemente por Moon e colaboradores (2010) como um novo flavonoide. Neste estudo, o drabanemoside apresentou moderada atividade citotóxica em linhagens de células de câncer pulmonar. Os autores comentam o isolamento e identificação prévio de um isômero do drabanemoside, o canferol 3-O-[α -L-ramnopiranosil-(1 \rightarrow 2)- α -L-arabinofuranoside] entretanto, o estudo não teve como objetivos avaliar possíveis atividades biológicas da substância.

O drabanemoside foi isolado por Li e colaboradores (2013) e de acordo com o estudo a substância não apresentou atividade citotóxica e anti-inflamatória *in vitro* significativa.

4.4.1.5 Isolamento e identificação da substância HPLC-5

A substância HPLC-5 foi isolada pelo mesmo processo realizado para a substância HPLC-3. Adquiriu-se um espectro de varredura em UV da substância HPLC-5. Este está representado pelo Gráfico 3.

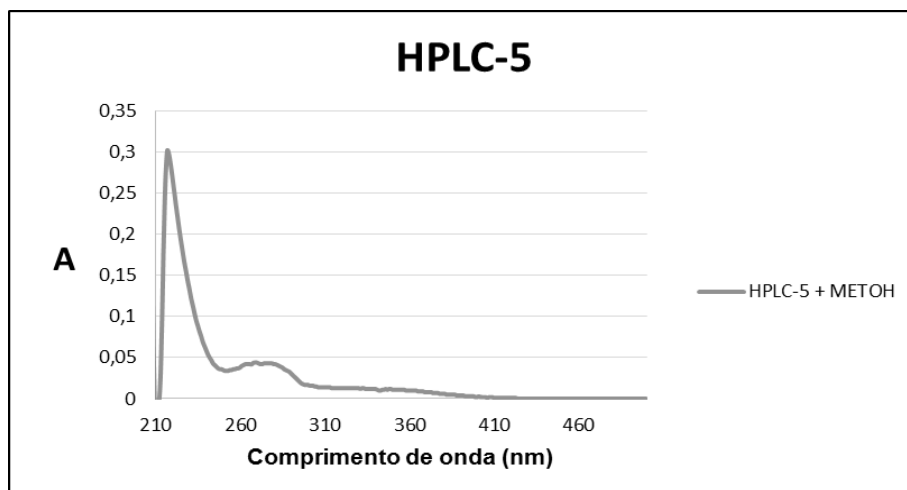


GRÁFICO 3 – REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DO ESPECTRO DE UV DA SUBSTÂNCIA HPLC-5 EM METANOL.

Esta substância também apresentou absorção máxima entre 200 e 400 nm (286, 277 e 340 nm), indicando a possibilidade desta ser um flavonoide (MABRY, MARKHAM e THOMAS 1970).

O espectro de ^1H da substância HPLC-5 (Figura 27) apresentou dois dubletos em δ 6.94 e δ 7.76 ppm, ambos com $J=8.8$ Hz e integrando para dois hidrogênios,

indicando sistema 2'6' e 3'5' de flavonoides. Dois dubletos em δ 6.19 e δ 6.37 ppm, ambos com $J=2.0$ Hz e integrando para 1 hidrogênio caracterizam acoplamento na posição meta em sistema aromático, sendo estes sinais típicos de H-6 e H-8 de canferol. Sinais na região de δ 4 a δ 3 ppm indicam a presença de glicosídeo.

Pode-se afirmar que a substância HPLC-5 é distinta da HPLC-3 devido as diferenças observadas nos espectros de RMN. Os sinais em δ 0.92 e δ 1.23 ppm do espectros de ^1H integram para 3H, indicando a presença de duas metilas. Dois dubletos em δ 5.00 (1H, $J = 1.55$) e δ 5.51 (1H, $J = 1.55$) são característicos de hidrogênios anoméricos (SILVERSTEIN, WEBSTER, e KIEMLE, 2007).

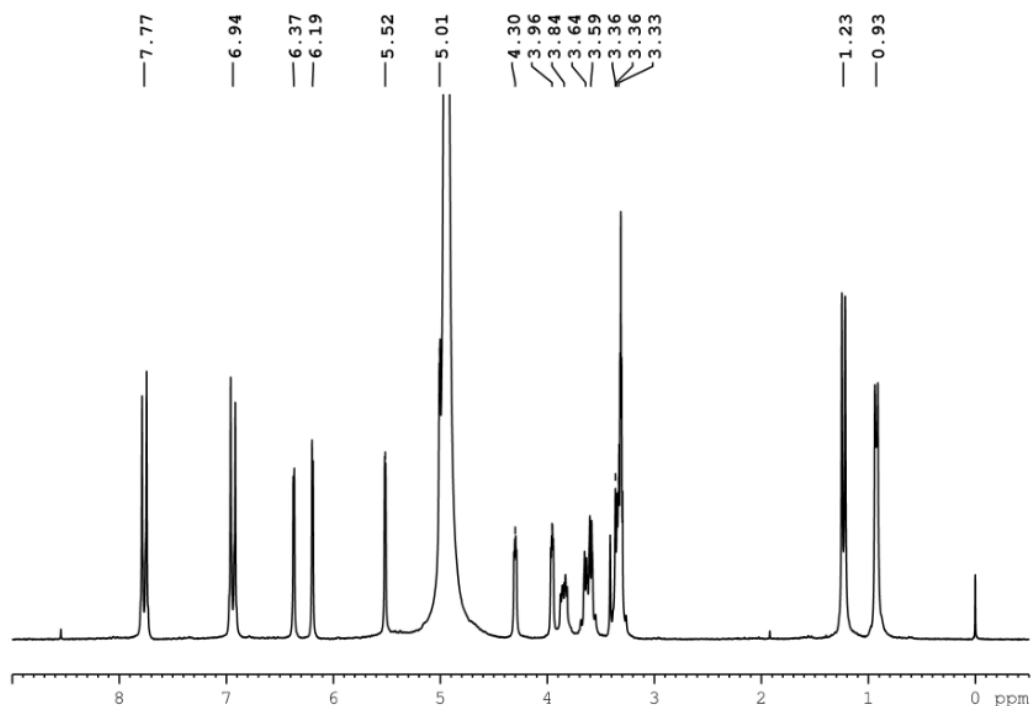


FIGURA 25 – ESPECTRO COMPLETO DE RMN DE ^1H DA SUBSTÂNCIA HPLC-5 (MEOD/TMS, 200.13 MHz, 30 °C).

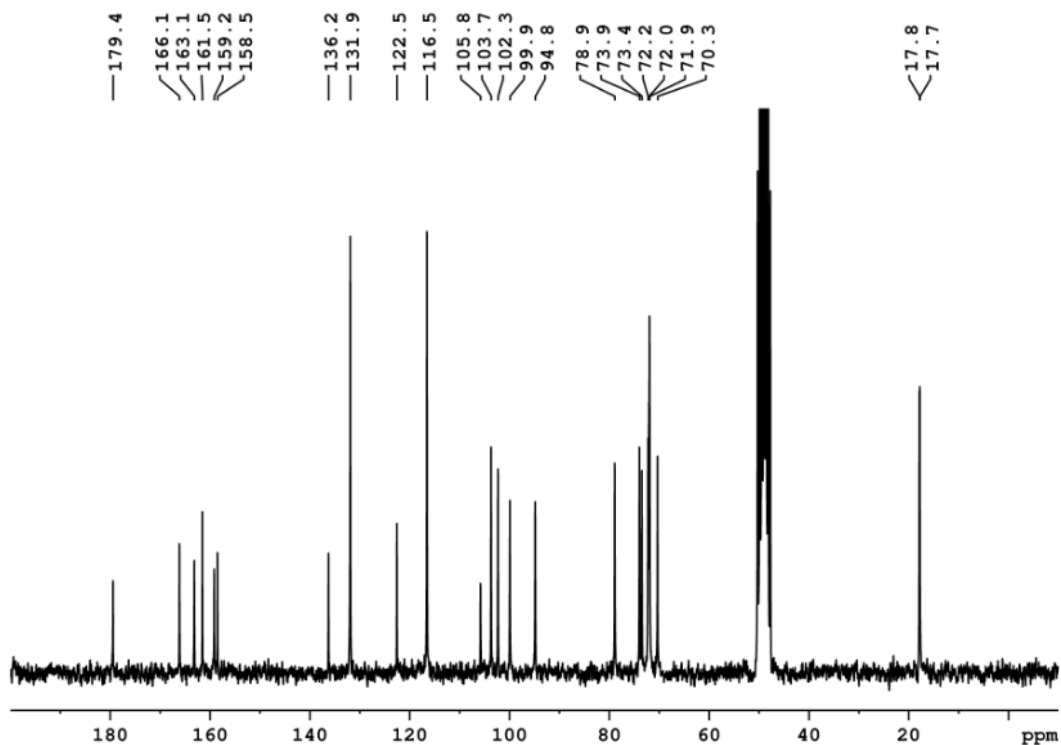


FIGURA 26 – ESPECTRO COMPLETO DE RMN DE ^{13}C DA SUBSTÂNCIA HPLC-5 (MEOD, 200.13 MHZ, 30 °C).

O espectro de ^{13}C (Figura 28) apresentou 15 carbonos na região de 90 a 180 ppm indicando estrutura de flavonoide. Sinais entre 60 e 80 ppm caracterizam presença de açúcar e os sinais em $\delta 17.7$ e $\delta 17.8$ ppm confirmam que as unidades glicosídicas são duas ramnosas. Comparando-se os dados obtidos com a literatura (CHEN *et al.*, 2004) (Tabela 7), a substância HPLC-5 foi identificada como canferol 3-O- α -L-ramnopiranosil(1 \rightarrow 2)- α -L-ramnopiranoside (Figura 29).

TABELA 7 – DESLOCAMENTOS QUÍMICOS DE RMN DE ^1H , ^{13}C , HSQC E HMBC DO CANFEROL 3-O- α -L-RAMNOPIRANOSIL (1 \rightarrow 2) - α -L-RAMNOPIRANOSIDE

| Carbono | Experimental (CD_3OD) ^1H (m, J Hz) | (CHEN <i>et al.</i> , 2004) (CD_3OD) ^1H (m, J Hz) | Experimental (CD_3OD) ^{13}C (δ ppm) | CHEN <i>et al.</i> , 2004) (CD_3OD) ^{13}C (δ ppm) |
|---------|--|---|---|--|
| 2 | - | | 159.2 | 159.0 |
| 3 | - | | 136.2 | 136.2 |

Continua Tabela 7

| | | | | |
|----------------|------------------------|------------------------|-------|-------|
| 4 | - | | 179.4 | 179.2 |
| 5 | | | 163.1 | 162.9 |
| 6 | 6.19 (d, 2.0) | 6.15 (d, 2.0) | 99.90 | 99.8 |
| 7 | - | - | 166.1 | 165.5 |
| 8 | 6.37 (d, 2.0) | 6.31 (d, 2.0) | 94.8 | 94.8 |
| 9 | - | - | 158.5 | 158.2 |
| 10 | - | - | 105.8 | 105.8 |
| 1' | - | - | 122.5 | 122.4 |
| 2'6' | 7.76 (d, 8.8) | 7.72 (d, 8.8) | 131.9 | 131.8 |
| 3'5' | 6.94 (d, 8.8) | 6.91 (d, 8.8) | 116.5 | 116.4 |
| 4' | - | - | 161.5 | 161.3 |
| α-L-RHA | | | | |
| 1'' | 5.51 (d, 1.6) | 5.49 (d, 1.6) | 102.3 | 102.2 |
| 2'' | 4.30 (dd, 3.1; 1.6) | 4.32 (dd, 3.2; 1.6) | 78.9 | 78.8 |
| 3'' | 3.84 (dd, 9.3; 3.1) | 3.86 (dd, 9.5; 3.2) | 72.2 | 72.1 |
| 4'' | 3.36 (dd, 9.5; 9.3) | 3.36 (t, 9.5) | 73.9 | 73.9 |
| 5'' | 3.35 (m) | 3.40 (m) | 72.0 | 71.9 |
| 6'' | 0.92 (d, 5.6) | 0.94 (d, 5.6) | 17.8 | 17.8 |
| α-L-RHA | | | | |
| 1''' | 5.00 (d, 1.6) | 5.03 (d, 1.6) | 103.7 | 103.5 |
| 2''' | 3.95 (dd, 3.2 1.6) | 3.98 (dd, 3.2; 1.6) | 71.9 | 71.8 |
| 3''' | 3.59 (m) | 3.61 (dd, 9.5; 3.2) | 72.0 | 71.9 |
| 4''' | 3.34 (m) | 3.33 (t, 9.5) | 73.4 | 73.3 |
| 5''' | 3.64 (m) | 3.63 (m) | 70.3 | 70.2 |
| 6''' | 1.23 (d, 6.3) | 1.23 (d, 6.0) | 17.7 | 17.7 |

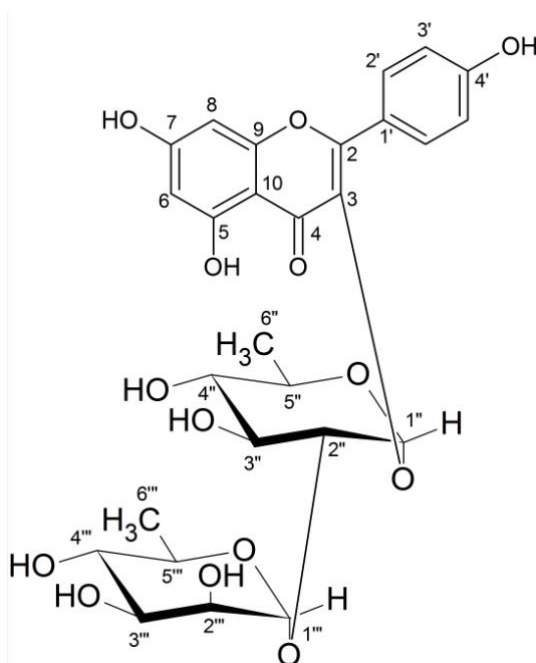


FIGURA 27 – ESTRUTURA QUÍMICA DO CANFEROL 3-O- α -L-RAMNOPIRANOSIL (1 \rightarrow 2) - α -L-RAMNOPIRANOSIDE.

O canferol 3-O- α -Lramnopyranosil (1 \rightarrow 2)- α -L-ramnopyranoside foi isolado em outras espécies como *Cinnamomum osmophleum* (CHEN *et al.*, 2004) e *Cassia hirsute* (RAO *et al.*, 1999). Em ambos estudos enfatizou-se a identificação estrutural da molécula. Assim, o estudo de possíveis atividades biológicas desta substância é recomendado.

As substâncias drabanemoroside e canferol 3-O- α -Lramnopyranosil (1 \rightarrow 2)- α -L-ramnopyranoside foram isoladas pela primeira vez no gênero *Smilax* no presente estudo.

4.5 ESTUDO DO POTENCIAL TÓXICO, LARVICIDA E ANTIMICROBIANO

4.5.1 Letalidade frente a *Artemia salina*.

Os resultados do ensaio de letalidade frente a *Artemia salina* estão apresentados na tabela 8. Neste ensaio foram testados o extrato etanólico bruto e frações orgânicas.

TABELA 8 – RESULTADOS DE TOXICIDADE DOS EXTRATOS DE *S. larvata*

| AMOSTRAS | CL50 µg/mL | INTERVALO DE CONFIANÇA 95% |
|-------------------------|------------|-------------------------------|
| EXTRATO BRUTO | >1000 | - |
| FRAÇÃO HEXANO | >1000 | - |
| FRAÇÃO CLOROFÓRMIO | >1000 | - |
| FRAÇÃO ACETATO DE ETILA | >1000 | - |
| FRAÇÃO HIDROALCOÓLICA | >1000 | - |
| SULFATO DE QUINIDINA | 50,1 | (53,8 – 70,2) |

Os resultados apresentados na Tabela 8 evidenciam que todas as amostras apresentaram dose letal acima de 1000 µg/mL, dados que de acordo com Meyer e colaboradores (1982) indicam que possivelmente estas amostras não apresentem toxicidade. Para controle positivo foi utilizado o sulfato de quinidina.

4.5.2 Atividade hemolítica

Foi realizado o ensaio de atividade hemolítica em placas de Ágar-sangue com o extrato bruto e frações orgânicas de *S. larvata*. Todas as amostras apresentaram resultado negativo, sem presença de halo de hemólise, como mostra a Figura 30. Nesta figura estão representadas as fotos das placas de Ágar-sangue, na qual foram colocados discos impregnados com o extrato etanólico bruto (à esquerda), o controle do solvente utilizado, no caso o metanol (ao centro) e o controle positivo, Triton (à direita). O mesmo resultado foi observado em todas as amostras testadas.

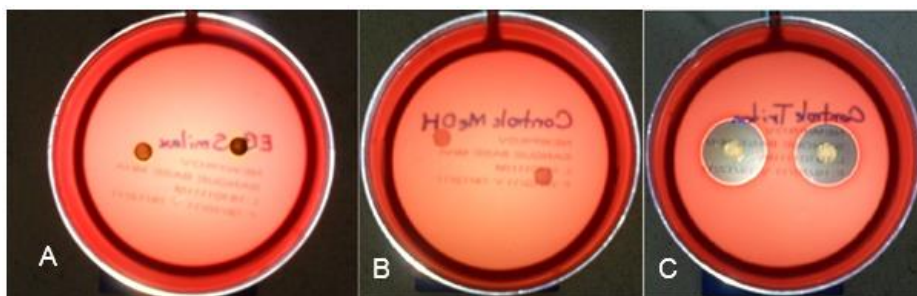


FIGURA 28 – FOTOS ILUSTRATIVAS DOS RESULTADOS DO TESTE DE HEMÓLISE EM PLACAS DE ÁGAR SANGUE.

A = Extrato Bruto; B = Controle do solvente – Metanol, C = Controle Positivo

O resultado negativo no teste de hemólise em placas de Ágar-sangue é um indicativo de que os extratos da planta em estudo não danificam os eritrócitos.

Observando os resultados parciais do teste de hemólise e do teste de letalidade frente a *Artemia salina*, podemos sugerir que o uso desta espécie pela população não é prejudicial do ponto de vista toxicológico. Para confirmar este resultado, foi realizado um segundo teste de hemólise no qual o extrato fica em contato direto com uma solução de eritrócitos. Os resultados do segundo ensaio de hemólise foram documentados com fotografia feita com câmera digital (Figura 31) e com os valores das absorbâncias calculou-se a porcentagem de hemólise (Gráfico 4).

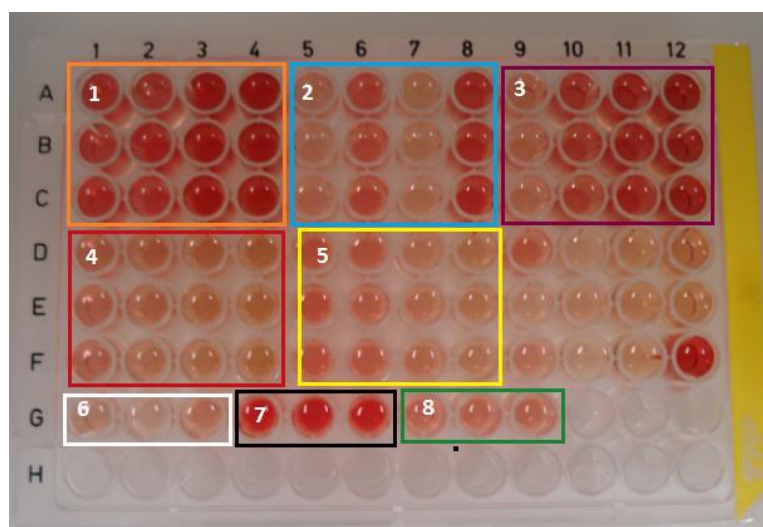


FIGURA 29 – RESULTADO DO TESTE DE HEMÓLISE.

1= Fração hexano; 2= extrato etanólico bruto; 3= fração clorofórmio; 4= fração acetato de etila; 5= fração hidroalcoólica; 6= branco; 7= controle positivo; 8= controle do solvente.

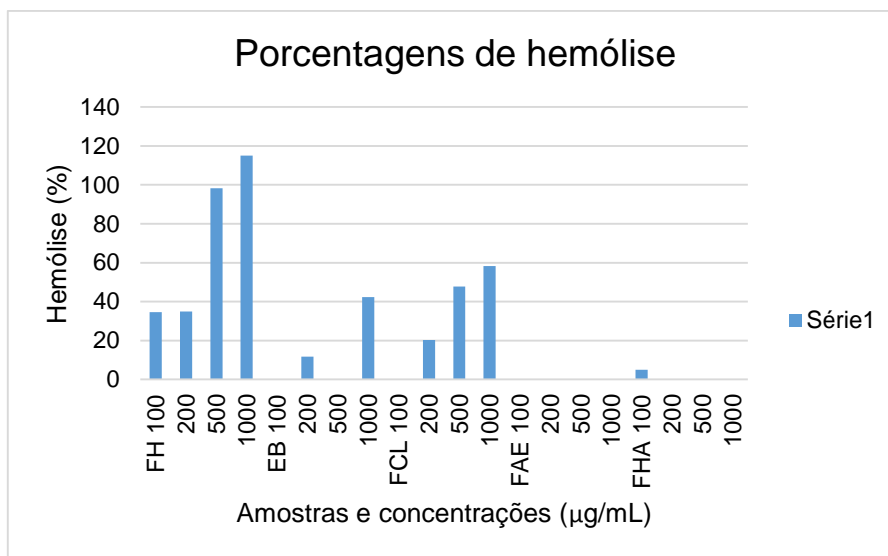


GRÁFICO 4 – RESULTADOS DO TESTE DE HEMÓLISE EM PORCENTAGEM.

FH= Fração hexano; EB= extrato etanólico bruto; FCL= fração clorofórmio; FAE= fração acetato de etila; FHA= fração hidroalcoólica.

Foi observado que nesta metodologia a fração hexano e clorofórmio apresentaram atividade hemolítica. Este resultado é explicado pelo fato de que os extratos estão em contato direto com os eritrócitos quando comparado ao método que utiliza a placa de ágar-sangue. O fato do extrato bruto apresentar resultado negativo nas concentrações de 100, 200 e 500 µg/mL evidencia presença de substâncias que antagonizam os componentes responsáveis pela atividade nas frações. Entretanto, na concentração de 1000 µg/mL o extrato bruto apresentou atividade hemolítica de 42,27%. No caso da fração acetato de etila, a maior concentração de compostos como flavonoides (NIERO *et al.*, 2003), os quais raramente apresentam atividade hemolítica (ASGARY, NADERI e ASKARI, 2005) corroboram com o resultado negativo.

A fração hidroalcoólica, na qual geralmente concentram-se as saponinas, apresentou resultado negativo. Hassan e colaboradores (2010) afirmam que dentre várias atividades biológicas, as saponinas apresentam atividade hemolítica. Portanto estes pesquisadores utilizaram o teste de hemólise para a pesquisa desta classe de substâncias em extratos vegetais. Uma vez que os testes fitoquímicos não apontaram presença de saponinas nesta espécie, conclui-se que os resultados são coerentes. Estes dados sugerem que é possível avançar em pesquisas com o propósito de

desenvolvimento de um fitoterápico considerando-se obviamente a baixa atividade hemolítica do extrato bruto, fração acetato de etila e a fração hidroalcoólica.

4.5.3 Atividade larvicida contra *Aedes aegypti*

O extrato etanólico bruto de *S. larvata* apresentou atividade larvicida contra larvas no terceiro instar de *Aedes aegypti*, com $CL_{50} = 225 \mu\text{g/mL}$ e $CL_{90} = 350 \mu\text{g/mL}$. Este resultado pode ser considerado satisfatório para o objeto de investigação, uma vez que segundo Ciccia e colaboradores (2000) a concentração letal abaixo de $500 \mu\text{g/mL}$ indica um efeito tóxico sobre as larvas. Observou-se uma correlação positiva entre a concentração de extrato etanólico bruto utilizada e a mortalidade (Figura 32, painel A), tendência também apresentada pelo controle positivo (Figura 32, painel B).

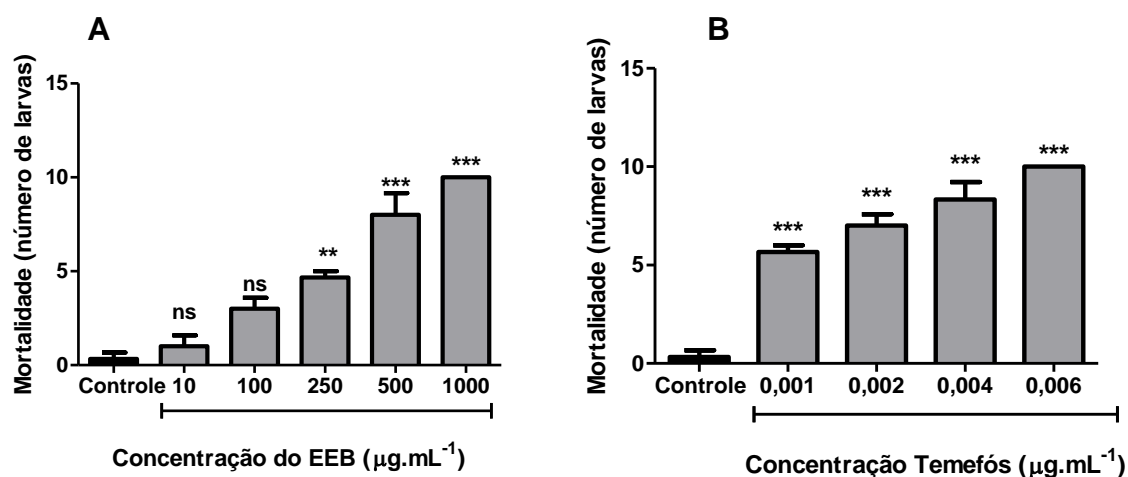


FIGURA 30 – MORTALIDADE EM NÚMERO DE LARVAS L3 DE *A. aegypti*.

A: UTILIZANDO O EXTRATO ETANÓLICO BRUTO DE *S. larvata* (EEB). B: CONTROLE POSITIVO TEMEFÓS. * $P < 0,05$, ** $<0,01$, *** $, 0,001$ COMPARADO COM O CONTROLE (ANOVA 1 VIA E TESTE DE TUKEY).

Investigações anteriores mostraram que produtos naturais são uma potencial fonte de moléculas as quais podem ser utilizadas em programas de controle de pestes. Espécies vegetais de diferentes famílias botânicas tiveram sua atividade larvicida documentada previamente (GHOSH, CHOWDHURY, e CHANDRA, 2012). Ciccia e

colaboradores (2000) investigaram a atividade larvicida do extrato de plantas Sul Americanas contra o *A. aegypti*, as espécies *Abuta grandifolia* e *Minthostachys setosa* mostraram atividade significativa. Omena e colaboradores (2007) testaram esta propriedade em 51 plantas medicinais brasileiras, sendo duas espécies do gênero *Amona* as mais efetivas.

Cáceres e colaboradores (2012) descrevem a atividade de espécies de *Smilax* sobre *Leishmania braziliensis* L. *mexicana* e *Trypanosoma cruzi in vitro*. Inúmeras espécies deste gênero apresentaram também atividade citotóxica, dentre elas destacam-se *S. aspera*, *S. china* e *S. scobinicaulis* (Wu *et al.*, 2010; IVANOVA *et al.*, 2011; ZHANG *et al.*, 2013). Quanto a atividade larvicida contra *A. aegypti* não foram encontrados até o presente momento registros de investigações no gênero.

A atividade biológica sobre as larvas (L₃) de *A. aegypti*, aliada ao baixo potencial tóxico verificado na investigação sobre a *Artemia salina*, indicam que extrato bruto de *S. larvata* é uma potencial fonte de compostos larvicidas ecologicamente corretos, uma vez que o extrato não apresenta substâncias tóxicas hidrossolúveis capazes de afetar organismos não-alvo e o meio ambiente.

4.5.4 Atividade antimicrobiana

Neste ensaio foram testados o extrato etanólico bruto e frações orgânicas. O resultado do ensaio em difusão em disco está representado na Figura 33.

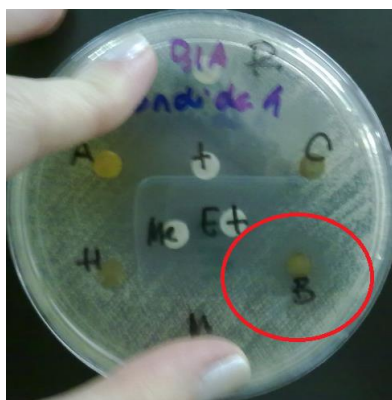


FIGURA 31 – FOTOGRAFIA DO HALO DE INIBIÇÃO FORMADO PELO EXTRATO BRUTO

O extrato etanólico bruto na concentração de 1 mg apresentou um halo de inibição ($11 \pm 1,0$) mm contra o microrganismo *C. albicans*. Comparando com o cetoconazol 50 μg (35 ± 5) mm, o extrato mostrou uma atividade moderada. No estudo executado por Karaman e colaboradores (2003), halos de inibição formados por extratos vegetais a partir de 7 mm foram considerados promissores quanto a atividade antimicrobiana. Belhouchet e colaboradores (2008), Sautour e Lacaille-Dubois (2005) creditaram a atividade antimicrobiana às saponinas identificadas nas espécies *S. aspera* subsp. *mauritanica* e *S. medica* respectivamente. De acordo com a marcha fitoquímica, demonstrou-se no presente estudo indicações de que a espécie *S. larvata* não apresenta saponinas. A fração hidroalcoólica, na qual deveria concentrar-se esta classe de substância, apresentou resultado negativo no ensaio antimicrobiano.

Uma vez que nenhuma fração orgânica teve atividade neste teste, podemos inferir que o desempenho do extrato etanólico bruto é provavelmente devido ao sinergismo entre uma variedade de metabólitos secundários.

4.6 ESTUDO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

4.6.1 Método de redução do radical DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazila)

O teste qualitativo foi realizado com o extrato bruto e frações orgânicas. Este ensaio permite uma visualização de possível atividade antioxidante pelo aparecimento de manchas amarelas frente ao fundo púrpura. Os resultados das cromatografias são mostrados na figura 34.



FIGURA 32 – FOTOGRAFIA DO RESULTADO QUALITATIVO DE ATIVIDADE ANTIOXIDANTE POR REDUÇÃO DO RADICAL DPPH

VIT C = Vitamina C, RUT = Rutina, EB = Extrato etanólico bruto, FC = Fração clorofórmio, AE = fração acetato de etila, HA = fração hidroalcoólica

Podemos observar que a espécie em estudo apresenta potencial antioxidante e que este está concentrado na fração acetato de etila. Visto que desta fração foram isolados o canferol e o ácido *p*-cumárico, duas substâncias com atividade antioxidante reconhecida, pode-se inferir que os resultados são coerentes. Existem substâncias antioxidantes na fração hidroalcoólica, porém a atividade não apresenta-se significativa comparando-se com os padrões.

No ensaio quantitativo, o IC₅₀ da fração acetato de etila (Gráfico 5) foi de 58,17 µg/mL, valor considerado alto se comparado com os padrões Vitamina C (4,3 µg/mL) e Rutina (5,83 µg/mL).

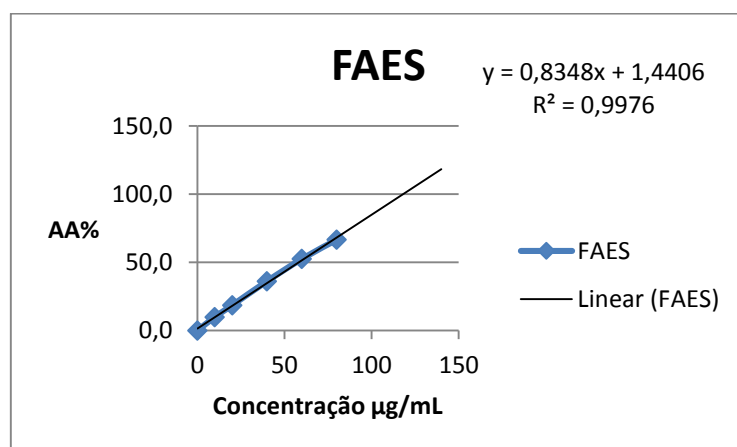


GRÁFICO 5 – CURVA DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DA FRAÇÃO ACETATO DE ETILA DE *S.larvata*.

O método do DPPH é um ensaio amplamente utilizado para a busca de compostos antioxidantes. O mecanismo de ação antioxidante detectado por este ensaio ocorre pelo sequestro de radicais livres (PYRZYNSKA e PEKAL, 2013). Analisando os resultados gerados por este método, pode-se concluir que os extratos de *S. larvata* apresentaram baixa concentração de substâncias que atuam por este tipo de mecanismo. A fração acetato de etila é a mais promissora, devido a concentração de compostos fenólicos neste extrato. Estudos tem demonstrado que a atividade antioxidante de extratos vegetais está diretamente relacionada a concentração de fenólicos (RAJESH, PERUMAL, e SUNDARRAJAN, 2010.). Dando continuidade à investigação da atividade antioxidante de *S. larvata*, verificou-se o teor de fenólicos totais dos extratos.

4.6.2 Determinação de fenólicos totais

O extrato etanólico bruto e frações orgânicas foram submetidos ao teste de determinação de fenólicos totais utilizando-se o reagente Folin-ciocalteu. A composição do meio reacional encontra-se representada na tabela 9.

TABELA 9 – MEIO REACIONAL UTILIZADO NA DETERMINAÇÃO DE FENÓLICOS TOTAIS

| Amostra | EB | FH | FCL | FAE | FHA |
|---|-------|-------|-------|-------|-------|
| Volume utilizado da amostra (μL) | 320 | 640 | 320 | 160 | 320 |
| Água (μL) | 3.080 | 2.760 | 3.080 | 3.240 | 3.080 |
| Folin-ciocalteu (μL) | 200 | 200 | 200 | 200 | 200 |
| Carbonato de Sódio 10% (μL) | 400 | 400 | 400 | 400 | 400 |

EB= Extrato bruto; FH= fração hexano; FCL= fração clorofórmio; FAE= fração acetato de etila; FHA= fração hidroalcoólica.

Os resultados obtidos foram comparados a uma curva padrão de ácido gálico representada no gráfico 6.

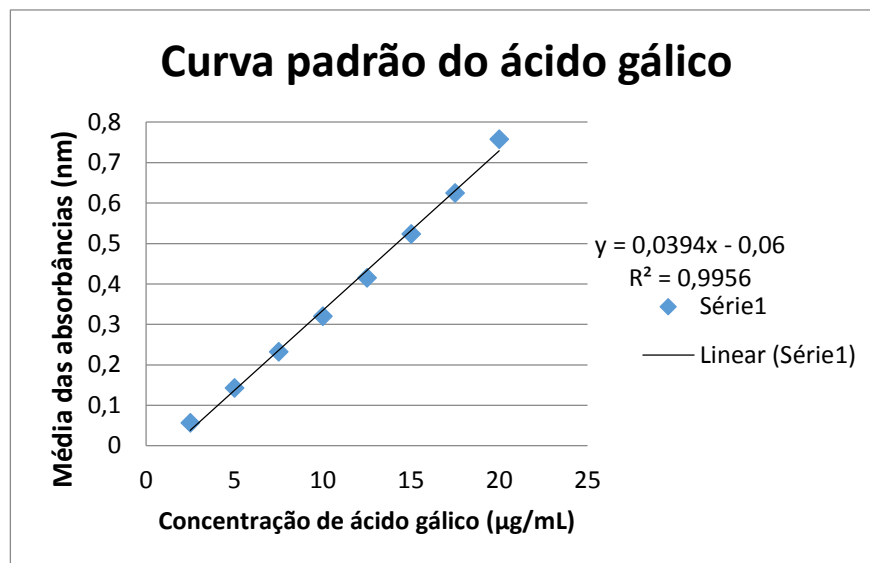


GRÁFICO 6 – CURVA PADRÃO DO ÁCIDO GÁLICO.

Utilizando-se a equação $\text{Abs} = (0,0394 \cdot \text{concentração de ácido gálico}) - 0,06$ gerada pela curva padrão de ácido gálico, o extrato e frações orgânicas apresentaram as concentrações de fenólicos totais expressas na tabela 10.

TABELA 10 – CONCENTRAÇÕES DE FENÓLICOS TOTAIS NOS EXTRATOS DE *S. larvata*.

| Amostra | Concentração ($\mu\text{g/mL}$) | Média das Absorvâncias | Equivalente de Ácido gálico ($\mu\text{g/mL}$) | Fenólicos totais (mg/g) |
|---------|-----------------------------------|------------------------|--|-------------------------|
| EB | 80 | 0,232 | 7,40 | 92,5 |
| FH | 160 | 0,141 | 5,10 | 31,9 |
| FCL | 80 | 0,655 | 18,15 | 226,8 |
| FAE | 40 | 0,398 | 11,62 | 290,6 |
| FHA | 80 | 0,197 | 6,51 | 81,4 |

A partir destes dados calculou-se a porcentagem de fenólicos totais no material vegetal seco, sendo o teor calculado de 1,42g / 100g material vegetal seco. Este dado pode ser utilizado no controle de qualidade da espécie.

Comparando os resultados obtidos com dados da literatura, pode-se constatar que a espécie *S. larvata* contém baixa quantidade de compostos fenólicos. O extrato de *Smilax zeylanica* por exemplo, contém 620 mg equivalentes de ácido gálico / mg de extrato seco (RAJESH e PERUMAL, 2014), quantidade superior a fração acetato de etila de *S. larvata* (290,6 mg EAG/g de extrato). Estes resultados estão de acordo com os verificados no ensaio do DPPH. Entretanto, a investigação da atividade antioxidante de extratos vegetais deve compreender metodologias que avaliem esta propriedade por diferentes mecanismos de ação. Neste sentido, o extrato e frações orgânicas foram testados quanto a sua capacidade de inibir a peroxidação lipídica.

4.6.3 Avaliação da redução da peroxidação lipídica

A peroxidação lipídica (degradação oxidativa de lipídios poli-insaturados em alimentos) resulta na formação de hidroperóxidos de cadeia curta - aldeídos, cetonas – e outros compostos oxigenados considerados responsáveis pela rancificação de produtos e relacionados com doenças do coração, câncer e envelhecimento em animais estudados em laboratório. O principal produto da peroxidação lipídica é o malondialdeído, o qual pode ser mensurado pelo teste de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) (BOTSOGLOU *et al.*, 1994).

No ensaio TBARS o extrato bruto e a fração clorofórmio (3mg/mL) reduziram a peroxidação lipídica em 62,3 e 81,5% respectivamente, superando o BHT (RP%=48,1) (Figura 35). O extrato aquoso apresentou desempenho semelhante ao padrão, 48,8% para a mesma concentração. Nesta investigação a espécie em estudo apresentou uma atividade antioxidante considerada expressiva pela inibição da peroxidação lipídica, uma vez que o extrato bruto e a fração clorofórmio superaram o desempenho do padrão BHT, o qual é amplamente comercializado devido a sua reconhecida capacidade antioxidante.

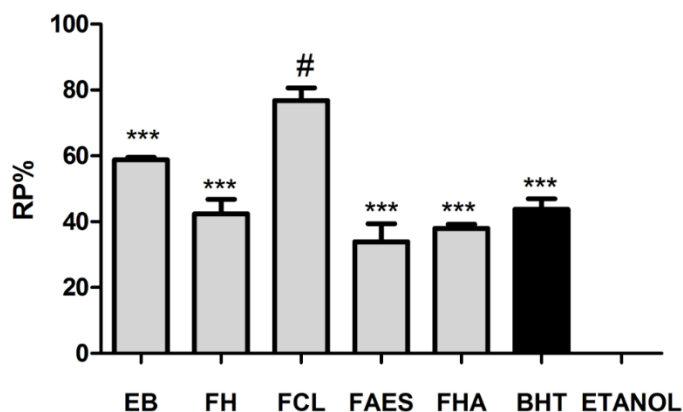


FIGURA 33 – PORCENTAGEM DE REDUÇÃO DA PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA.

Butil-hidroxi-tolueno (BHT), extrato bruto (EB), fração hexano (FH), fração clorofórmio (FCL), fração acetato de etila (FAES), fração hidroalcoólica (FHA) *** $p < 0,001$ do controle etanol, e # $p < 0,1$ do grupo BHT.

Estudos prévios demonstram que outras espécies de *Smilax* atuam como agentes antioxidantes por mecanismos de ação diferente do sequestro de radicais livres, como eliminação de ânions superóxido, inibição da peroxidação lipídica, inibição da degradação de deoxiribose e poder redutor (COX *et al.*, 2005; JEONG *et al.*, 2011). Uma vez que a quantidade de fenólicos é baixa em *S. larvata*, a atividade antioxidante desta espécie deve-se também a presença de outros metabólitos. O estudo fitoquímico detectou, além de flavonoides, a presença de cumarinas e alcaloides. Bubols e colaboradores (2013) e O'Brien, Carrasco-Pozo, e Speisky (2006) relataram a capacidade destas classes de substâncias de reduzirem a peroxidação lipídica, e sendo compostos de polaridade intermediária, a presença destes justifica o significativo desempenho da fração clorofórmio no teste realizado.

4.7 ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA E ANTINOCICEPTIVA

Todos os ensaios de atividade anti-inflamatória e antinociceptiva foram realizados com o extrato etanólico bruto de *S. larvata*.

4.7.1 Efeito do extrato etanólico bruto de *S. larvata* sobre o edema induzido por carragenina

Observando os resultados apresentados na figura 36 (painel A), constata-se que nos animais tratados com veículo, as patas nas quais administrou-se carragenina observou-se um edema máximo três horas após sua administração. O edema desenvolvido foi significativamente maior do que o observado nas patas que receberam a injeção de salina, indicando que a carragenina atuou como um agente flogístico (painel B). O extrato bruto de *S. larvata* (100 mg/Kg, *p.o.*) diminuiu o edema da pata em $(32 \pm 5)\%$ em relação ao veículo. As doses de 200 e 400 mg/Kg não exerceram efeito sobre a formação de edema (painel B).

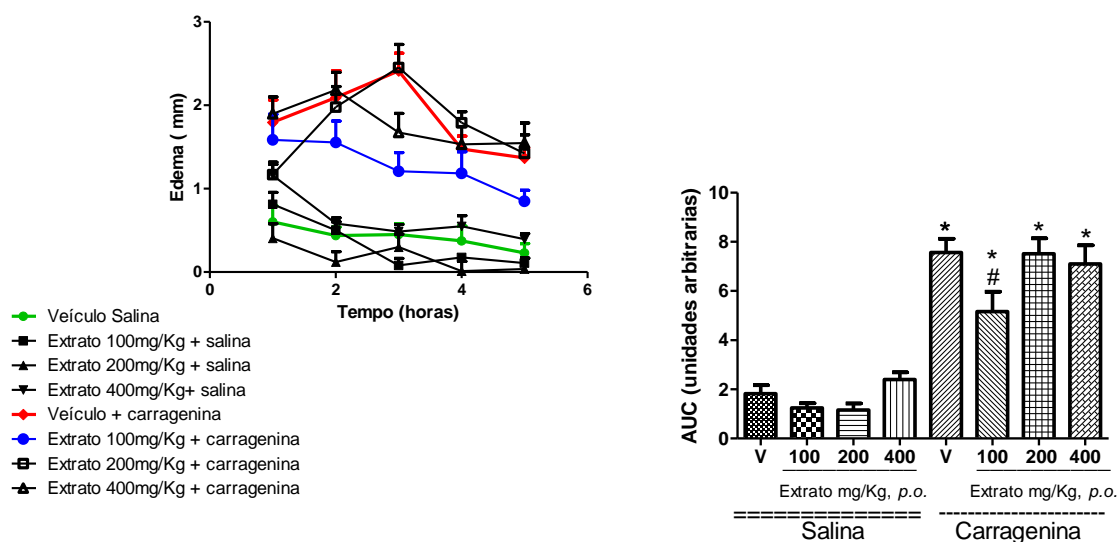


FIGURA 34 – EFEITO DO EXTRATO BRUTO DE *S. larvata* SOBRE O EDEMA DE PATA EM RATOS INDUZIDO POR CARRAGENINA.

Resultados expressos em média \pm erro padrão das médias ($n = 8$). A comparação entre os grupos foi realizada empregando-se análise de variância (ANOVA One way) seguida de teste Newman-Keuls. Diferente do grupo veículo+salina para * $p < 0,05$ e do grupo veículo+carragenina para # $p < 0,01$.

4.7.2 Nocicepção induzida pela injeção intraperitoneal de ácido acético

As doses utilizadas para os camundongos foram calculadas por extrapolação alométrica através dos cálculos das taxas e doses metabólicas (PACHALY e BRITO, 2001). O extrato bruto de *S. larvata* inibiu as contorções abdominais induzidas por ácido acético em camundongos nas doses de 164 e 327 mg/Kg em $(32,7 \pm 5) \%$ e $(32 \pm 5) \%$ respectivamente (Figura 37, painéis A e B).

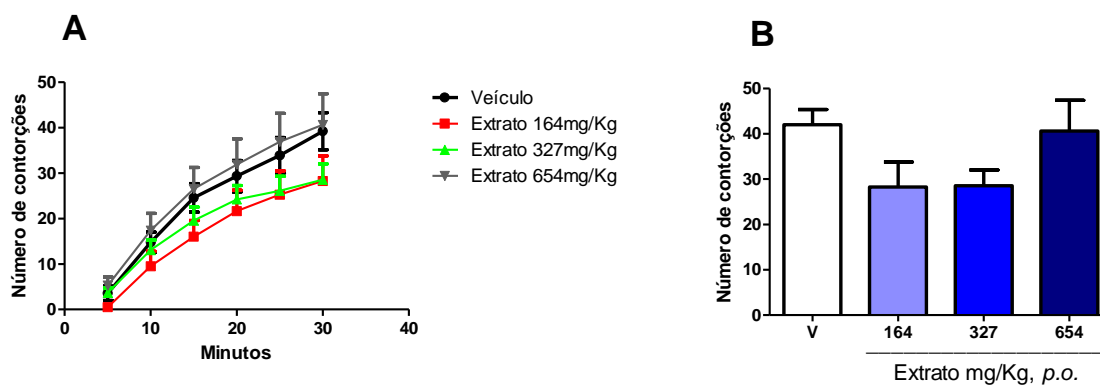


FIGURA 35 – EFEITO DO EXTRATO BRUTO DE *S. larvata* SOBRE AS CONTORÇÕES ABDOMINAIS INDUZIDAS POR ÁCIDO ACÉTICO EM CAMUNDONGOS.

Painel A: os resultados estão expressos em média \pm erro padrão das médias ($n=8$) em relação ao tempo em minutos. Painel B: Os resultados estão expressos em média \pm erro padrão das médias ($n=8$). A comparação entre os grupos foi realizada empregando-se análise de variância (ANOVA One way) seguida de teste Newman-Keuls.

4.7.3 Efeito do extrato bruto de sobre a atividade locomotora espontânea

O grupo de animais tratados com o extrato etanólico bruto de *S. larvata* na dose de 100 mg/Kg *p.o.* aumentou o número de cruzamentos realizados no campo aberto em $(35,6 \pm 5)$ %. Os grupos tratados com as doses de 200 e 400 mg/Kg não apresentaram alterações na atividade locomotora (Figura 38).

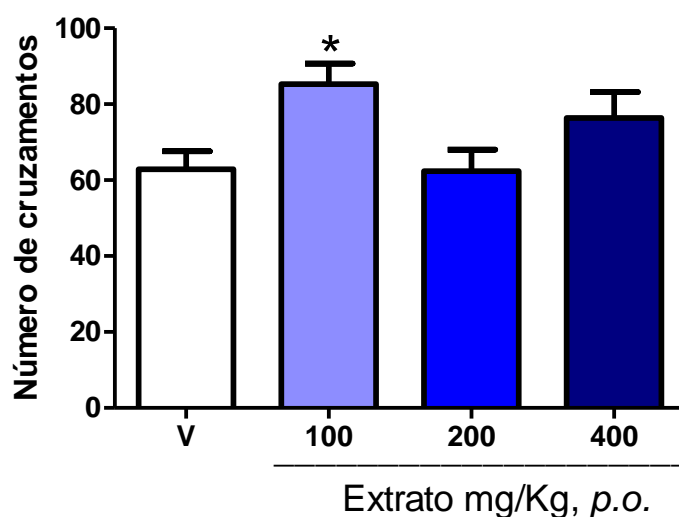


FIGURA 36 – EFEITO DO EXTRATO BRUTO DE *S. larvata* SOBRE A ATIVIDADE LOCOMOTORA ESPONTÂNEA EM RATOS.

Os resultados estão expressos em média \pm erro padrão das médias ($n = 8$). A comparação entre os grupos foi realizada empregando-se análise de variância (ANOVA One way) seguida de teste Newman-Keuls. Diferente do grupo veículo para * $p < 0,05$

4.7.4 Efeito do extrato bruto de *S. larvata* sobre a nocicepção induzida por estímulo térmico (placa quente)

Os grupos tratados com o extrato bruto de *S. larvata* nas doses de 200 e 400mg/kg apresentaram aumento no tempo de latência de resposta ao calor em $(71.7 \pm 5) \%$ e $(78.3 \pm 5) \%$ respectivamente (Figura 39).

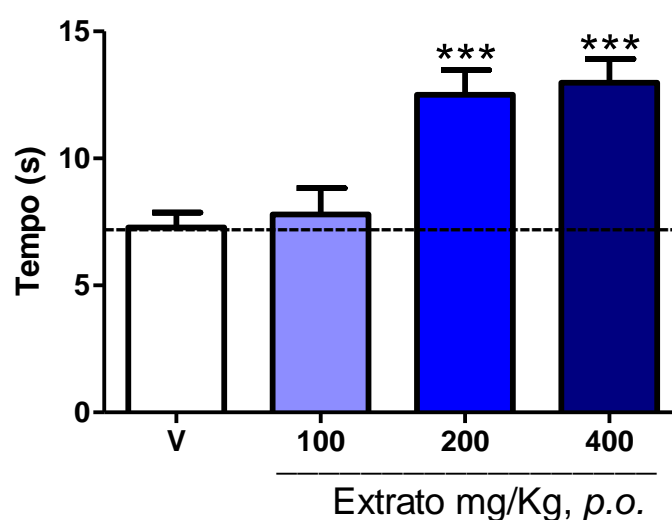


FIGURA 37 – EFEITO DO EXTRATO DE *S. larvata* SOBRE A NOCICEPÇÃO INDUZIDA POR ESTÍMULO TÉRMICO (PLACA QUENTE).

Os resultados estão expressos em média \pm erro padrão das médias ($n = 8$). A comparação entre os grupos foi realizada empregando-se análise de variância (ANOVA One way) seguida de teste Newman-Keuls. Diferente do grupo veículo para *** $p < 0,001$.

4.7.5 Efeito do extrato bruto de *S. larvata* sobre a nocicepção induzida pela injeção intraplantar de formalina em ratos.

O extrato bruto de *S. larvata* foi administrado por gavagem nas doses de 100, 200 e 400 mg/Kg. A dose de 200 mg/Kg inibiu a primeira fase (neurogênica) da nocicepção induzida pela formalina, em $(41 \pm 5) \%$ em relação ao grupo veículo (Figura 40, painel A). O extrato não mostrou efeito significativo sobre a segunda fase (inflamatória) (painel B).

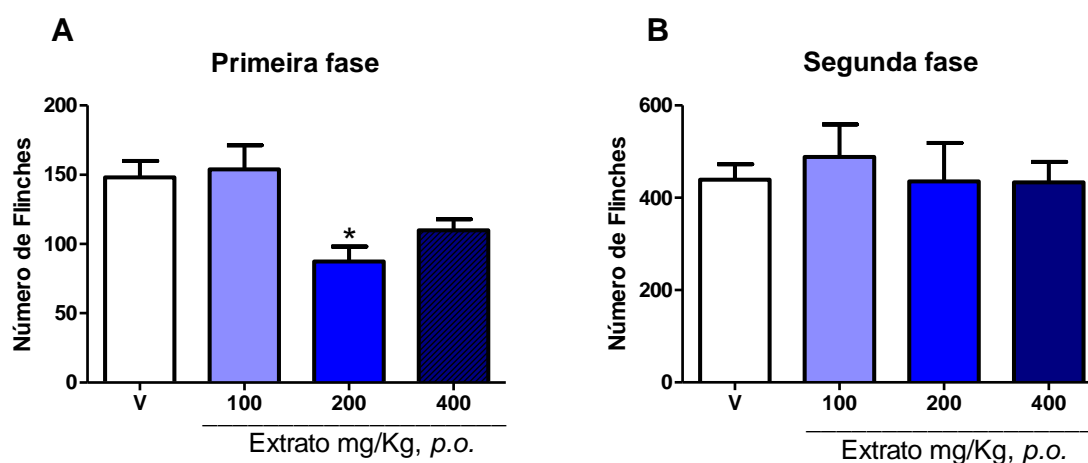


FIGURA 38 – EFEITO DO EXTRATO BRUTO DE *S. larvata* SOBRE A NOCICEPÇÃO INDUZIDA POR FORMALINA 2,5% EM RATOS.

A nocicepção foi avaliada na primeira fase (0-5 min) e na segunda fase (15-60 min). Os resultados estão expressos como médias \pm erro padrão das médias ($n = 8$). A comparação entre os grupos foi realizada empregando-se análise de variância (ANOVA One way) seguida de teste Newman-Keuls. Diferente do grupo veículo para * $p < 0,05$.

4.7.6 Avaliação da participação do sistema opioide no efeito antinociceptivo do extrato bruto de *S. larvata* em ratos

A administração de naloxona 1 mg/Kg *i.p.* previniu a ação antinociceptiva do extrato bruto de *S.larvata* na dose de 200 mg/Kg *p.o.*, o qual inibiu a fase neurogênica em $(34,8 \pm 5) \%$ (Figura 41, painel A). Novamente a o efeito do extrato na fase inflamatória (segunda fase) não foi significativo (painel B).

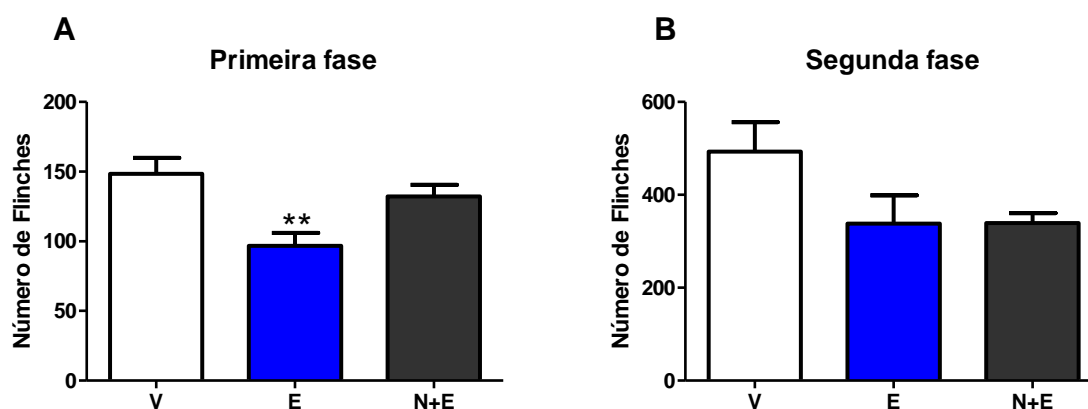


FIGURA 39 – EFEITO DO PRÉ-TRATAMENTO DOS ANIMAIS COM NALOXONA (1 mg/Kg, *i.p.*) SOBRE O EFEITO ANTINOCICEPTIVO DO EXTRATO BRUTO DE *S. larvata* NO MODELO DE NOCICEPÇÃO INDUZIDA POR FORMALINA EM RATOS.

Os resultados estão expressos em média \pm erro padrão das médias ($n = 8$). A comparação entre os grupos foi realizada empregando-se análise de variância (ANOVA One way) seguida de teste Newman-Keuls. Diferente do grupo veículo para ** $p < 0,01$.

4.7.7 Efeito do extrato bruto de *S.larvata* sobre a motilidade intestinal

Os tratamentos com o extrato bruto de *S. larvata* nas doses de 200 e 400 mg/Kg *p.o.*, assim como a morfina, inibiram o trânsito intestinal dos animais de maneira significativa (Figura 42). Comparando com o grupo veículo, as doses de 200 e 400 mg/Kg reduziram a motilidade intestinal dos ratos em 45% e 46% respectivamente, e o controle positivo (morfina) em 80%.

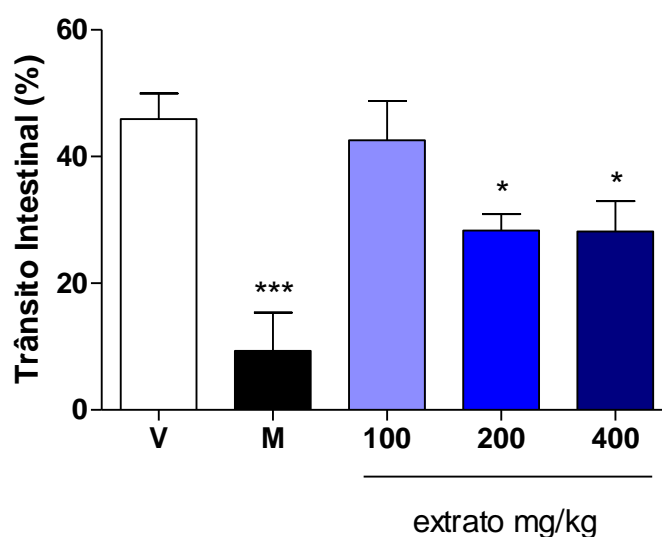


FIGURA 40 – EFEITO DO EXTRATO BRUTO DE *S. larvata* SOBRE A MOTILIDADE INTESTINAL DE RATOS.

Os resultados estão expressos em média \pm erro padrão das médias ($n = 8$). A comparação entre os grupos foi realizada empregando-se análise de variância (ANOVA One way) seguida de teste Newman-Keuls. Diferente do grupo veículo para * $p < 0,05$ e *** $p < 0,001$.

4.7.8 Investigação do envolvimento de receptores TRPA1 no efeito antinociceptivo do extrato bruto de *S. larvata*

Observando os resultados apresentados na figura 43, constata-se o aumento significativo do comportamento nociceptivo por parte dos grupos que receberam a injeção intraplantar de óleo de mostarda, comparando-se com os grupos que receberam óleo de milho. O tratamento com o extrato bruto de *S. larvata* (200 mg/Kg p.o.) não inibiu o comportamento nociceptivo dos animais em comparação com o veículo

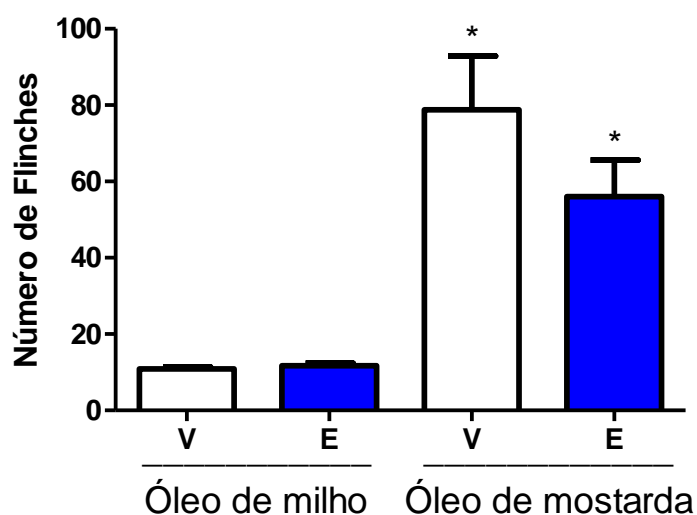


FIGURA 41 – EFEITO DO EXTRATO BRUTO DE *S. larvata* SOBRE A NOCICEPÇÃO INDUZIDA POR ÓLEO DE MOSTARDA.

Os resultados estão expressos em média \pm erro padrão das médias ($n = 8$). A comparação entre os grupos foi realizada empregando-se análise de variância (ANOVA One way) seguida de teste Newman-Keuls. Diferente do grupo veículo – óleo de milho para $*p < 0,05$.

4.7.9 Discussão

A investigação das atividades anti-inflamatória e antinociceptiva do extrato etanólico bruto de *S. larvata* foram iniciadas pelos de nocicepção induzida por de carragenina e nocicepção induzida por injeção intraperitoneal de ácido acético.

O teste de edema de pata induzido por carragenina é um modelo experimental amplamente utilizado na investigação do efeito de drogas na fase aguda da inflamação (POZHARITSKAYA *et al.*, 2010). Este modelo é sensível a inibidores da ciclo-oxigenase, mas não a inibidores da lipoxigenase, sendo empregado na avaliação do efeito de anti-inflamatórios não-esteroidais, os quais inibem primeiramente a ciclo-oxigenase envolvida na síntese das prostaglandinas (MASRESHA, MAKONNEN, e DEBELLA, 2012).

Observou-se que o extrato na dose de 100 mg/Kg diminuiu o edema em 32% comparando-se com o grupo veículo (Figura 36, painel B) indicando uma moderada atividade anti-inflamatória. Este efeito deve-se provavelmente a presença de substâncias com esta propriedade, como o canferol, flavonoides e cumarinas (POZHARITSKAYA *et al.*, 2010). Outras espécies de *Smilax* também demonstraram atividade anti-inflamatória, como a *S. glabra* e *S. china* (SHU, GAO, e YANG, 2006; JIEYUN *et al.*, 1997).

Dando continuidade à investigação da possível atividade antinociceptiva do extrato, procedeu-se o ensaio de nocicepção induzida por injeção intraperitoneal de ácido acético. Este modelo experimental é utilizado para investigar a atividade anti-inflamatória e analgésica de novos produtos. Possui pouca especificidade mas boa sensibilidade, sendo possível observar o efeito de substâncias sobre a dor visceral de origem inflamatória (LE BARS, GOZARIU e CADDEN, 2001). As contrações induzidas por substâncias químicas são decorrentes da ação de prostaglandinas nos nociceptores (PERIANAYAGAM *et al.*, 2004).

O extrato nas doses equivalentes a 100 e 200 mg/Kg diminuiu o número de contorções em 33 e 32% respectivamente (Figura 37, painéis A e B) indicando uma tendência para ação antinociceptiva.

Uma vez constatada esta tendência, procedeu-se o teste do campo aberto, com o objetivo de descartar a possibilidade do comportamento antinociceptivo ser devido a uma alteração na atividade locomotora dos animais. O efeito de diferentes

drogas tem sido investigado no teste do campo aberto, incluindo compostos com efetivo ou potencial efeito ansiolítico (benzodiazepínicos, ligantes de serotonina, neuropeptídios), compostos com atividade estimulante (anfetamina, cocaína), sedativa (neurolépticos) ou com atividade indutora de prostração (PRUT e BELZUNG, 2003). Substâncias que causam a diminuição da locomoção podem apresentar efeito sedativo e relaxante muscular, os quais são característicos dos depressores do SNC (PARVATHI e RAVISHANKAR, 2013). O aumento da locomoção, por sua vez, caracteriza um efeito estimulante (PRUT e BELZUNG, 2003).

Os resultados observados no referido ensaio indicam que a o extrato na dose de 100 mg/Kg exerceu um efeito estimulante (Figura 38). Prut e Belzung (2003) observam que há um aumento na exploração do ambiente quando os animais passam por privação de alimento. Entretanto, todos os grupos avaliados estavam em jejum, sendo este argumento descartado para justificar o resultado observado. Observando-se que a dose de 100 mg/Kg afetou a atividade locomotora *in vivo*, esta dose não foi considerada uma opção viável para a determinação da dose efetiva.

Tendo sido confirmado que a ação do extrato não deve-se a um efeito no sistema locomotor, foi dada continuidade a investigação de atividade antinociceptiva. O modelo de nocicepção induzida pelo ácido acético não é específico o bastante para diferenciar se a atividade analgésica detectada é decorrente da ação de um anti-inflamatório não-esteroidal, de um narcótico ou de drogas de ação central (SÁNCHEZ-MATEO *et al.*, 2006). Buscou-se então investigar o efeito do extrato em modelos experimentais de avaliação de atividade antinociceptiva mais específicos.

O teste de nocicepção induzida por calor nocivo (placa quente) foi realizado para verificar uma possível atividade antinociceptiva de ação central (NA *et al.*, 2012). Este ensaio é um empregado na investigação de drogas com efeito analgésico, geralmente por alterarem o limiar nociceptivo (ESPEJO e MIR, 1993). O extrato de *S.larvata* aumentou o tempo de latência em resposta ao calor nas doses de 200 mg/Kg e 400 mg/Kg em 72% e 78% (Figura 39), caracterizando um significativo efeito antinociceptivo de ação central.

No sentido de dar continuidade a investigação farmacológica e propor um possível mecanismo de ação, foi realizado o teste de nocicepção induzida por injeção intraplantar de formalina.

Uma característica importante do teste da formalina em roedores é o fato dos animais mostrarem duas fases de comportamento nociceptivo. A primeira fase começa imediatamente após a injeção da formalina e segue até 3 – 5 minutos, sendo esta decorrente do estímulo químico direto dos nociceptores. A ação de analgésicos é detectada pela inibição ou diminuição dos efeitos da formalina na primeira fase. Após este período (10 – 15 min) o comportamento nociceptivo diminui drasticamente. A segunda fase inicia-se entre 15 – 20 min e segue até 30 - 60 min. Na segunda fase, a nocicepção ocorre com o envolvimento de inflamação periférica. Esta característica é confirmada pelo fato de que os AINEs, como a indometacina, reduzem o comportamento nociceptivo nesta fase, não influenciando na primeira (Tjølsen, *et al.*, 1992).

O extrato bruto de *S. larvata* na dose de 200 mg/Kg diminuiu significativamente o comportamento nociceptivo na primeira fase em 41% (Figura 40, painel A). As doses de 100 e 400 mg/Kg não influenciaram o comportamento dos animais. Na segunda fase, o extrato não apresentou efeito nas três doses ensaiadas (Figura 40, painel B). Estes resultados indicam que o extrato possui ação predominantemente antinociceptiva na dose de 200 mg/Kg. Esta dose demonstrou efeito antinociceptivo no teste da placa quente e não alterou a locomoção dos animais no campo aberto. Aliando-se estes resultados ao do teste de formalina determinou-se a dose de 200 mg/Kg como a dose efetiva.

Os resultados da marcha sistemática fitoquímica constataram a presença de alcaloides no extrato bruto, gerando a hipótese da ação antinociceptiva ser do tipo opioide. Para confirmar tal hipótese, investigou-se a participação do sistema opioide por meio do teste da formalina, no qual um grupo de animais recebeu previamente um injeção *i.p.* de naloxona, um antagonista opioide. Posteriormente, os grupos receberam o extrato na concentração efetiva (200 mg/Kg) ou veículo.

A naloxona apresenta afinidade por todos os três receptores opioides, μ , κ e δ . Isoladamente a naloxona produz pouco efeito em indivíduos normais, mas reverte rapidamente os efeitos da morfina e de outros opiáceos, incluindo os agonistas parciais (RANG e DALE, 2007, p. 605). A administração prévia de naloxona previniu o efeito do extrato na dose efetiva (Figura 41, painel A), indicando que o sistema opioide tem participação no seu mecanismo de ação. Novamente o extrato não apresentou efeito na segunda fase do teste da formalina (Figura 41, painel B).

Buscando a confirmação deste mecanismo de ação, avaliou-se o efeito do extrato sobre a motilidade intestinal. É relatado que a inibição da motilidade gastrointestinal é um dos principais efeitos colaterais dos opioides, sendo esta mediada principalmente pela ação sobre os receptores μ (SOBCZAK *et al.*, 2014). O extrato de *S. larvata* reduziu a motilidade intestinal dos animais de forma significativa, em 45% e 46% nas doses de 200 e 400 mg/Kg respectivamente (Figura 42). A morfina, utilizada como controle positivo, reduziu a motilidade em 80%. Estes dados corroboram os resultados dos testes de formalina e da investigação com o uso de naloxona, confirmando que o extrato possui ação opioide.

Verificou-se também o possível envolvimento dos receptores TRPA1 na atividade antinociceptiva do extrato por meio do teste do óleo de mostarda. Estudos relatam que os receptores TRPA1 são um dos principais responsáveis pela resposta nociceptiva induzida pela formalina, e são ativados por substâncias pungentes como extratos de alho e mostarda (McNAMARA *et al.*, 2007). O extrato na dose de 200 mg/Kg não apresentou efeito antinociceptivo no teste do óleo de mostarda (Figura 43), atestando que provavelmente não há envolvimento dos receptores TRPA1 no efeito do extrato de *S. larvata*.

Avaliando-se o conjunto de resultados obtidos nos ensaios farmacológicos, constata-se que o extrato bruto de *S. larvata* possui ação antinociceptiva, sendo o mecanismo de ação mediado pelo sistema opioide com provável atuação sobre os receptores μ , e evidências de ausência do envolvimento de receptores TRPA1.

Os alcaloides são reconhecidos por sua atividade analgésica (O'BRIEN, CARRASCO-POZO, e SPEISKY, 2006; SCHÄFER, 2010) sendo estes provavelmente os responsáveis pela ação farmacológica de *S. larvata*. Outras espécies de *Smilax* também mostraram atividade antinociceptiva, como *S. zeylanica* (JENAI *et al.*, 2011) e *S. china* (SHU, GAO, e YANG, 2006), corroborando os resultados obtidos no presente estudo.

5 CONCLUSÃO

Através do levantamento bibliográfico constatou-se que o nome tradicional mais empregado para espécies do gênero *Smilax* é “salsaparrilha”. Pelo estudo morfoanatômico determinou-se os caracteres anatômicos chave para a diferenciação da *S. larvata* de outras espécies do mesmo gênero os quais são: folha simples, hipostomática, apresentando margem espinulosa. A cutícula é escamiforme na face adaxial e em forma de cumes arredondados na face abaxial. O mesofilo tende a dorsiventral, com 1-3 camadas de células em forma de “M” próximas a face adaxial e células braciiformes. Apresenta cristais prismáticos e ráfides, sendo desprovida de esclereides. A nervura central apresenta espinhos na face abaxial, é levemente côncavo-convexa e possui 3-5 feixes vasculares colaterais. O caule possui casca lisa e espinhos por toda a extensão. Em secção transversal, é observada a presença de um anel esclerenquimático contínuo envolvendo o cilindro vascular. Este consiste de feixes vasculares colaterais distribuídos aleatoriamente. Além das informações anatômicas, os parâmetros de pureza como teor de umidade e cinzas gerados por este estudo constituem ferramentas importantes no controle de qualidade de *S.larvata*.

O estudo fitoquímico revelou a presença de flavonoides, cumarinas, esteroides, triterpenos, alcaloides, taninos e aminogrupos. Foram isolados e identificados dois flavonoides glicosídeos pela primeira vez no gênero *Smilax*: o drabanemoroside e o canferol-3-O- α -L-ramnopiranosil(1 \rightarrow 2)- α -L-ramnopiranoside. Identificou-se outras três substâncias, sendo estas o canferol, ácido *p*-cumárico e ácido *p*-hidroxibenzóico.

Pelos estudos de toxicidade, os extratos de *S. larvata* não possuem substâncias tóxicas hidrossolúveis, uma vez que não tiveram efeito sobre a *Artemia salina*. Entretanto, o extrato etanólico bruto, fração hexano e clorofórmio mostraram significativa atividade hemolítica em altas concentrações. Quanto a atividade larvicida, o extrato bruto apresentou efeito tóxico contra larvas de *Aedes aegypti*. Associado aos resultados de letalidade frente a *Artemia salina*, o extrato bruto de *S. larvata* apresenta-se como uma potencial fonte de substâncias larvicidas seguras do ponto

de vista ecotoxicológico. O estudo da atividade antimicrobiana revelou a atividade antifúngica do extrato etanólico bruto contra *C. albicans*.

Com relação ao estudo da atividade antioxidante, constatou-se que os extratos de *S. larvata* atuam inibindo a peroxidação lipídica devido provavelmente a presença de flavonoides, cumarinas e alcaloides.

Pelos estudos de atividade farmacológica, constatou-se que o extrato etanólico bruto de *S. larvata* possui significativa atividade antinociceptiva. O mecanismo de ação consiste na participação do sistema opioide, sendo os receptores μ um dos alvos de atuação. Os receptores TRPA1 provavelmente não estão envolvidos no efeito antinociceptivo do extrato. De acordo com as avaliações fitoquímica, antioxidante e farmacológica, conclui-se que os alcaloides presentes na espécie são os prováveis responsáveis pela atividade antinociceptiva.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A busca por substâncias inéditas para uso humano e ambiental incentiva a inovação, gerando produtos mais eficazes resultando em melhora do bem estar da população. Atualmente, a preocupação com as consequências ambientais da produção e utilização de medicamentos, herbicidas, larvicidas e demais produtos faz com que a pesquisa destas áreas volte-se para as fontes naturais.

Os resultados demonstrados no presente estudo sugerem que a espécie *Smilax larvata* pode ser utilizada futuramente no desenvolvimento de larvicidas ecológicos e fitoterápicos destinados ao tratamento da dor. Os parâmetros de pureza gerados neste trabalho aliados as análises fitoquímica e morfoanatômica constituem referências para o controle de qualidade desta possível droga vegetal.

A continuidade da pesquisa desta espécie é seriamente recomendada, tanto do ponto de vista químico e de atividades biológicas, quanto do ponto de vista de desenvolvimento de um fitoterápico.

REFERÊNCIAS

ABDALA, S.; DÉVORA, S.; MARTÍN-HERRERA, D.; PÉREZ-PAZ, P. Antinociceptive and anti-inflammatory activity of *Sambucus palmensis* link, an endemic Canary Island species. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 155, p. 626–632, 2014.

ABDALA, S.; MARTÍN-HERRERA, D.; BENJUMEA, D.; PÉREZ-PAZ, P. Diuretic activity of *Smilax canariensis*, an endemic Canary Island species. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 119, p. 12–16, 2008.

ANDREATA, R. H. P. Smilacaceae na reserva biológica de Poço das Antas, Silva Jardim, Rio de Janeiro, Brasil. **Rodriguésia**, v. 57, n. 3, p. 647-657, 2006.

ANDREATA, R. H. P. Smilacaceae. In: **Lista de espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico, Rio de Janeiro., disponível em <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/2012/index?tid=14560&mode=dp>. Acesso em 30 Maio de 2012.

AO, C.; HIGA, T.; KHANH, T. D.; UPADHYAY, A.; TAWATA, S. Antioxidant phenolic compounds from *Smilax sebeana* Miq. **LWT - Food Science and Technology**, v. 44, p. 1681-1686, 2011.

APPEZZATO-DA-GLÓRIA, B.; GUERREIRO, S. M. **Anatomia Vegetal**. 2 ed., Viçosa: UFV, 2006.

ASGARY, S.; NADERI, G.H.; ASKARI, N. Protective effect of flavonoids against red blood cell hemolysis by free radical. **Experimental & Clinical Cardiology**, v. 10, n. 2, p.88-90.

BANERJEE, A.; KUNWAR, A.; MISHRA, B.; PRIYADARSINI, K. I. Concentration dependent antioxidant/pro-oxidant activity of curcumin studies from AAPH induced

hemolysis of red blood cells. **Chemico-Biological Interactions**, v. 172. n. 2, p. 134-139, 2008.

BARRY, A. L.; THORNSBERRY, C. Susceptibility tests: Diffusion Test Procedures. In: BALOWS, A.; HAUSER, W. J., HERMANN K. L.; ISENBERG, H. D.; SHAMODY, H. J. **Manual of clinical microbiology**. Washington: American Society for Microbiology, 1991, p. 1117-1125.

BASBAUM, A. I.; BAUTISTA, D.; SCHERRER, G.; JULIUS, D. Cellular and Molecular Mechanisms of Pain. **Cell**, v. 139, n. 2, p. 267-284, 2009.

BECAK, W.; PAULETE, J.. **Técnicas de citologia e histologia**. Rio de Janeiro: Livros Tecnicos e Cientificos 1976.

BELHOUCHE, Z.; SAUTOUR, M.; MIYAMOTO, T.; LACAILLE-DUBOIS, M. Steroidal Saponins from the Roots of *Smilax aspera* subsp. *mauritanica*. **Chemical and Pharmaceutica Bulletin**, v.56, n. 9, p. 1324 - 1327, 2008.

BERGMAN, M.; VARSHAVSKY, L.; GOTTLIEB, H. E.; GROSSMAN, S. The Antioxidant activity of aqueous spinach extract: chemical identification of active fractions. **Phytochemistry**, v. 58, p. 143 - 152, 2001.

BERLYN, G. P.; MIKSCHE, J. P. **Botanical microtechnique and cytochemistry**. Ames: Iowa State University 1976.

BOTSOGLOU, N. A.; FLETOURIS, D. J.; PAPAGEORGIOU, G. E.; VASSILOPOULUS, V. N.; MANTIS, A. J.; TRAKATELLIS, A. G.. Rapid, sensitive, and specific thiobarbituric acid method for measuring lipid peroxidation in animal tissue, food, and feedstuff samples. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 42, p. 1931-1937, 1994.

BUBOLS, G. B.; VIANNA, D.; MEDINA-REMÓN, A.; POSER, G.; LAMUELA-RAVENTOS, R.; EIFLER-LIMA, V.; GARCIA, S. C.. The Antioxidant Activity of Coumarins and Flavonoids. **Mini-Reviews in Medicinal Chemistry**, v. 13, p. 000-000, 2013.

CÁCERES, A.; CRUZ, S. M.; MARTÍNEZ, V.; GAITÁN, I.; GATTUSO, S.; GATTUSO, M. Ethnobotanical, pharmacognostical, pharmacological and phytochemical studies on *Smilax domingensis* in Guatemala. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 22, n. 2, p. 239-248., 2012.

CALDERÓN-MONTAÑO, J. M.; BURGOS-MORÓN, E.; PÉREZ GUERRERO, C.; LÓPEZ-LÁZARO, M. A review on the dietary flavonoid Kaempferol. **Mini-reviews in medicinal chemistry**, v. 11, p. 298-344, 2011.

CARBONERO, E. R.; GRACHER, A. H.; KOMURA, D.; MARCON, R.; FREITAS, C. S.; BAGGIO, C. H.; SANTOS, A. R.S.; TORRI, G.; GORIN, P. A.J.; IACOMINI, M. *Lentinus edodes* heterogalactan: Antinociceptive and anti-inflammatory effects. **Food Chemistry**, v. 111, p. 531-537, 2008.

CARVALHO, W. A. (2006). Antiinflamatórios não-esteroides, Analgésicos, Antipiréticos e Drogas utilizadas no tratamento da Gota. Em P. SILVA, **Farmacologia**. (pp. 441-467). Rio de Janeiro: Guanabara Koogan.

CHALLINOR, V. L.; PARSONS, P. G.; CHAP, S.; WHITE, E. F.; BLANCHFIELD, J. T.; LEHMANN, R. P.; DE VOSS, J. J. Steroidal saponins from the roots of *Smilax* sp.: Structure and bioactivity. **Steroids**, xxx, p. xxx–xxx, 2012.

CHAUDHURI, S.; BANERJEE, A.; BASU, K.; SENGUPTA, B.; SENGUPTA, P. K.. Interaction of flavonoids with red blood cell membrane lipids and proteins: antioxidant and antihemolytic effects. **International Journal of Biological Macromolecules** , v. 41, p. 42 – 48, 2007.

CHEN, J.; HACKOS, D. H. TRPA1 as a drug target - promise and challenges. **Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol**, 2015.

CHEN, C.; HSIEH, S.; HSIEH, M.; HSIEH, S.-F.; HSIEH, T. Substituent chemical shift of rhamnosides from stems of *Cinnamomum osmophleum*. **The Chinese Pharmaceutical Journal**, v. 56, p. 141-146, 2004.

CHEN, L.; YIN, H.; LAN, Z.; MA, S.; ZHANG, C. Anti-hyperuricemic and nephroprotective effects of *Smilax china* L. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 135, p. 399–405, 2011.

CHO, J. Y., MOON, J. H., SEONG, K. Y., & PARK, K. H. Antimicrobial activity of 4-hydroxybenzoic acid and trans 4-hydroxycinnamic acid isolated and identified from rice hull. **Biosci Biotechnol Biochem**, v. 62, n. 11, p. 2273-6, 1998.

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

CHU, K. T.; NG, T. B. Smilaxin, a novel protein with immunostimulatory, antiproliferative, and HIV-1-reverse transcriptase inhibitory activities from fresh *Smilax glabra* rhizomes. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 340, p. 118–124, 2006.

CICCIA, G.; COUSSIO, J.; MONGELLI, E. Insecticidal activity against *Aedes aegypti* larvae of some medicinal South American plants. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 72, p. 185-189, 2000.

COGO, L.; MONTEIRO, C. L.,B.; MIGUEL, M. D.; MIGUEL, O. G.; CUNICO, M. M.; RIBEIRO, M. L.;CAMARGO, E. R.; KUSSEN, G. M. B.; NOGUEIRA, K, S.; COSTA, L.

M. (2010). Anti- *Helicobacter pylori* activity of plants extracts traditionally used for the treatment of gastrointestinal disorders. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 41, p. 304-309.

CONFORTI, F. S.; TUNDIS, R.; MENICHINI, F.; HOUGHTON, P. Antioxidant activity of methanolic extract of *Hypericum triquetrifolium* Turra aerial part. **Fitoterapia**, v. 73, p. 749-783, 2002.

COX, S. D.; JAYASINGHE, K. C; MARKHAM, J. L. Antioxidant activity in Australian native sarsaparilla (*Smilax glycyphylla*). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 101, p. 162-168, 2005.

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

CRONQUIST, A. **The evolution and classification of flowering plants**. 2 ed. New York Botanical Garden, 1988.

CUNHA, A. P.; ROQUE, O. R. Interesse da indústria farmacêutica pelas matérias primas vegetais. In: CUNHA, A. P. **Farmacognosia e Fitoquímica**. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 2010, p. 58-63.

CUTTER, E. G. **Anatomia vegetal**. 2 ed. São Paulo: Roca, 1986.

DAVID, J. P. L.; DAVID, J. M. Plantas Medicinais. Fármacos derivados de plantas. In SILVA, P. **Farmacologia**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006, p. 148-159.

DEWICK, P. **Medicinal natural products: a biosynthetic approach**. 2nd ed. Chichester, England: John Wiley & Sons Ltda, 2002, p. 121-132.

DHAKAL, R. C.; RAJBHANDARI, M.; KALAUNI, S. K.; AWALE, S.; GEWALI, M. B. Phytochemical constituents of the bark of *Vitex negundo* L. **Journal of Nepal Chemical Society**, v. 23, p. 89-92, 2008/2009.

DUARTE, M.; SIEBENROK, M.; EMPINOTTI, C. Anatomia comparada de espécies de arnica: *Porophyllum ruderale* (Jacq.) Cass. e *Chaptalia nutans* (L.) Pohl. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicadas**, v. 28, n. 2, p. 193-201, 2007.

EGLINTON, G.; HAMILTON, R. J. Leaf epicuticular waxes. **Science**, v. 156, p. 1322 - 1335, 1967.

ESPEJO, E. F.; MIR, D. Structure of the rat's behavior in the hot plate test. **Behavioural Brain Research**, v. 56, p. 171-176, 1993.

FARMACOPÉIA BRASILEIRA 5 Ed. 2010. Acesso em 2013, disponível em http://www.anvisa.gov.br/hotsite/cd_farmacopeia/index.htm.

FERNANDES, P. D.; ZARDO, R. S.; FIGUEIREDO, G. S.; SILVA, B. V.; PINTO, A. C. Anti-inflammatory properties of convolutamydine A and two structural analogues. **Life Sciences**, v. 116, p. 16–24, 2014.

FERRUFINO-ACOSTA, L. Taxonomic revision of the genus *Smilax* (Smilacaceae) in Central America and the Caribbean Islands. **Willdenowia**, v. 40, p. 227-280, 2010.

FISHER, D. Protein staining of ribboned epon sections for light microscopy. **Histochemie**, v. 16, p. 92-96, 1968.

FLACH, J.; KARNOPP, C.; CORÇÃO, G. Biofilmes formados em matéria-prima em contato com leite: fatores de virulência envolvidos. **Acta Scientiarum Veterinariae**, v. 33, p. 291-296, 2005.

FOSTER, A. S. (1949). **Practical plant anatomy**. Princeton: D. Van Nostrand.

GATTUSO, M.; DI SAPIO, O.; GATTUSO, S.; LI PEREYRA, E. Morphoanatomical studies of *Uncaria tomentosa* and *Uncaria guianensis* bark and leaves. **Phytomedicine**, v. 11, p. 213-223, 2004.

GHOSH, A.; CHOWDHURY, N.; CHANDRA, G. Plant extracts as a potential mosquito larvicides. **Indian Journal of Medical Research**, v. 135, p. 581-598, 2012.

GUGLIELMI, F.; LUCERI, C.; GIOVANNELLI, L.; DOLARA, P.; LODOVICI, M. Effect of 4-coumaric and 3,4-dihydroxybenzoic acid on oxidative DNA damage in rat colonic mucosa. **British Journal of Nutrition**, v. 89, p. 581-587, 2003.

GUIMARÃES, A. R.; ANDREATA, R. H., P.; COSTA, C. G. Stem and leaf morphoanatomy of two Atlantic Forest species of *Smilax* Linnaeus. **Revista de Biologia Neotropical**, v. 8, n.1, p. 1-14, 2011.

HACIMUFTUOGLU, A.; HANDY, C.; GOETTL, V. M.; LIN, C. G.; DANE, S.; STEPHENS JR., R. L. Antioxidants attenuate multiple phases of formalin-induced nociceptive response in mice. **Behavioural Brain Research**, v. 173, p. 211-216, 2006.

HARTBERG W. K, CRAIG-JR. G. B. Reproductive isolation in *Stegomyia mosquitoes*. II Hybrid breakdown between *Aedes aegypti* and *A. mascarensis*. **Evolution**, v. 24, p. 692-703, 1970.

HASSAN, S. M.; HAQ, A. U.; BYRD, J. A.; BERHOW, M. A.; CARTWRIGHT, A. L.; BAILEY, C. A. Haemolytic and antimicrobial activities of saponin-rich extract from guar meal. **Food Chemistry**, v. 119, p. 600-605, 2010.

HERALD, P. J.; DAVIDSON, P. M. Antibacterial Activity of Selected Hydroxycinnamic Acids. **Journal of Food Science**, 48, n.4, p. 1378-1379, 1983.

HICKEY, L. J. Classification of the Architecture of Dicotyledonous leaves. **American Journal of Botany**, v. 60, n. 1, p. 17-33, 1973.

HUANG, H.-L.; LIU, R.-H.; SHAO, F. Structural determination of two new steroidal saponins from *Smilax china*. **Magnetic Resonance in Chemistry**, 47, p. 741–745. 2009.

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

INTURRISI, C. E. Clinical pharmacology of opioids for pain. **The clinical Journal of Pain**, v. 18, n. 4, 2002.

IVANOVA, A.; MIKHOVA, B.; BATSALOVA, T.; DZHAMBAZOV, B.; KOSTOVA, I. New furostanol saponins from *Smilax aspera* L. and their in vitro cytotoxicity. **Fitoterapia**, 82, p. 282–287, 2011.

IVANOVA, A.; MIKHOVA, B.; KLAIBER, I.; DINCHEV, D.; KOSTOVA, I. Steroidal saponins from *Smilax excelsa* rhizomes. **Natural Product Research**, v. 23 issue 10, p. 916-924, 2009.

JENAI, P. K.; NAYAK, B. S.; DINDA, S. C. Investigation on phytochemicals, Anthelmintic and analgesic activities of *Smilax zeylanica* Linn. leafy extracts. **Asian Journal of Chemistry**, 23, n. 10, p. 4307-4310, 2011.

JEON, S.-Y., KWON, S.-H., SEONG, Y.-H., BAE, K., HUR, J.-M., LEE, Y.-Y., SUH, D.-Y.; SONG, K.-S. β -secretase (BACE1)-inhibiting stilbenoids from *Smilax* Rhizoma. **Phytomedicine**, v. 14, p. 403–408, 2007.

JEONG, C.-H., JEONG, H. R., KWAK, J. H., KIM, J. H., CHOI, G. N., KIM, D.-O., LEE, U. K.; HEO, H. J. Phenolic composition and in vitro antioxidant activities of *Smilax China* Root. **Journal of Food Biochemistry**, 2011. Doi: 10.1111/j.1745-4514.2011.00610.x.

JIANG, G., LIN, S., WEN, L., JIANG, Y., ZHAO, M., CHEN, NAGENDRA PRASAD, K.; DUAN, X.; YANG, B. Identification of a novel phenolic compound in litchi (*Litchi chinensis* Sonn.) pericarp and bioactivity evaluation. **Food Chemistry**, v. 136 , p. 563-568, 2013.

JIANG, J.; XU, Q. Immunomodulatory activity of the aqueous extract from rhizome of *Smilax glabra* in the later phase of adjuvant-induced arthritis in rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 85, p. 53-59, 2003.

JIEYUN, J.; FEIHUA, W.; JINFU, L.; ZHAOHUA, L.; QIANG, X. Anti-inflammatory activity of the aqueous extract from rhizoma *Smilacis Glabrae*. **Pharmacological Research**, v. 36, n. 4, 1997.

JOHANSEN, D. A. **Plant microtechnique**. New York: Mc Graw Hill Book, 1940.

JOLY, A. B. **Botânica: Introdução a taxonomia vegetal**. Vol. 13. São Paulo, 2002.

JULIUS, D.; BASBAUM, A. I. Molecular mechanisms of nociception. **Nature**, v. 413, p. 203-210, 2001.

KARAMAN, I.; SAHIN, F.; GÜLLÜCE, M.; ÖGÜTÇÜ, M.; SENGÜL, M.; ADIGÜZEL, A. Antimicrobial activity of aqueous and methanol extracts of *Juniperus oxycedrus* L. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 85, p. 231-235, 2003.

KHADEM, S.; MARLES, R. Monocyclic Phenolic Acids; Hydroxy- and polyhydroxybenzoic acids: Occurrence and recent bioactivity studies. **Molecules**, v. 15, p. 7985-8005, 2010.

KHAN, I., NISAR, M., EBAD, F., NADEEM, S., SAEED, M., KHAN, H., SAMIULLAH; KHUDA, F.; KARIM, N.; AHMAD, Z. Anti-inflammatory activities of Sieboldogenin from *Smilax china* Linn.: Experimental and computational studies. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 121, issue 1, p. 175–177, 2009.

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

KUETE, V.; MBAVENG, A. T.; TSAFFACK, M.; BENG, V. P.; ETOA, F. X.; NKENGFACK, A. E.; MEYER, M.; LALL, N. Antitumor, antioxidant and antimicrobial activities of *Bersama engleriana* (Melianthaceae). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 115, p. 494-501, 2008.

LAITONJAM, W. S.; KONGBRAILATPAM, B. D. Studies on the chemical constituents and antioxidant activities of extracts from the roots of *Smilax lanceaefolia* Roxb. **Natural Products Research**, v. 24, n. 12, p. 1168-76, 2010.

LAPA, A. J. et al. **Plantas Mediciniais. Métodos de avaliação da atividade farmacológica**. Campinas: Unifesp, 2008.

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

LEE, Y. J.; KIM, N. S.; KIM, H.; Y, J.-M.; O, S.-M; BANG, O-S; LEE, J. Cytotoxic and anti-inflammatory constituents from the seeds of *Descurainia Sophia*. **Archives of Pharmacal Research**, v. 36, p. 356-541, 2013.

LEWAN, L.; ANDERSON, M.; MORALEZ-GOMEZ, P. The use of *Artemia salina* in toxicity testing. **Alternatives of Laboratory Animals**, v. 20, p. 297-301. 1992

LI, Y. L.; GAN, G. P.; ZHANGH, Z.; WU, H. Z.; LI, C. L.; HUANG, Y. P.; LIU, Y.M.; LIU, J. W. A flavonoid glycoside isolated from *Smilax china* rhizome in vitro anticancer effects on human cancer cell lines. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 113, n. 1, p. 115-24, 2007.

LIANG, C.; LIM, J.-H.; KIM, S.-H.; KIM, D.-S. Dioscin: A synergistic tyrosinase inhibitor from the roots of *Smilax china*. **Food Chemistry**, v. 134, pp. 1146–1148, 2012.

LIST, T. P. **The plant List** (2013). Version 1.1. Acesso em 30 de Outubro de 2014, disponível em <http://www.theplantlist.org>.

LONGO, L.; VASAPOLLO, G. Extraction and identification of anthocyanins from *Smilax aspera* L. berries. **Food Chemistry**, v. 94, p. 226–231, 2006.

LUCERI, C.; GIANNINI, L.; LODOVICI, M.; ANTONUCCI, E.; ABBATE, R.; MASINI, E.; DOLARA, P. *p*-Coumaric acid, a common dietary phenol, inhibits platelet activity in vitro and in vivo. **British Journal of Nutrition**, v. 97, p. 458–463, 2007.

LUCERI, C.; GUGLIELMI, F.; LODOVICI, M.; GIANNINI, L.; MESSERINI, L.; DOLARA, P. Plant phenolic 4-coumaric acid protects against intestinal inflammation in rats. **Scand J Gastroenterol**, v. 39, p. 1128–1133, 2004.

MABRY, T. J.; MARKHAM, K. R.; THOMAS, M. B. **The systematic identification of flavonoids**. Berlin: Springer-Verlag, 1970.

MARTINS, A. R.; BOMBO, A. B.; SOARES, A. N.; APPEZZATO-DA-GLÓRIA, B. Aerial stem and leaf morphoanatomy of some species of *Smilax*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 23, n. 4, p. 576-584, 2013.

MARTINS, A.; APPEZZATO-DA-GLÓRIA, B. Morfoanatomia dos órgãos vegetativos de *Smilax polyantha* Griseb. (Smilacaceae). **Revista Brasileira de Botânica**, v. 29, p. 555-567, 2006.

MASRESHA, B.; MAKONNEN, E.; DEBELLA, A. In vivo anti-inflammatory activities of *Ocimum suave* in mice. **Journal of Ethofarmacology**, v. 142, p. 201 – 205, 2012.

MAUSETH, J. D. **Plant anatomy**. California: The Benjamin / Cummings Publishing Company, Inc., 1988.

McMANUS, J. F. Histological and histochemical uses of periodic acid. **Stain Technology**, v. 23, p. 99 - 108, 1948.

McNAMARA, C. R.; MANDEL-BREHM, J.; BAUTISTA, D. M.; SIEMENS, J.; DERANIAN, K. L.; ZHAO, M.; HAYWARD, N. J.; CHONG, J. A.; JULIUS, D.; MORAN, M. M.; FANGER, C. M. TRPA1 mediates formalin-induced pain. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 104, n. 33, p. 13525–13530, 2007.

MEOTTI, C. F.; LUIZ, A. P.; PIZZOLATTI, M. G.; KASSUYA, C. A.; CALIXTO, J. B.; SANTOS, A. R. Analysis of the Antinociceptive Effect of the Flavonoid Myricitrin: Evidence for a Role of the L-Arginine-Nitric Oxide and Protein Kinase C Pathways. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 316, n. 2, p. 789–796, 2006.

MEYER, B. N.; PUTNAM, J. E.; JACOBSEN, L. B.; NICHOLS, D. E.; MCLAUGHLIN, J. L. Brine Shrimp: A convenient general bioassay for active plant constituents. **Planta Médica**, v. 45, p. 31-34, 1982.

MOON, S.; RAHMAN, A. A.; MANIR, M.; AHAMED, J. Kaempferol glycosides and cardenolide glycosides, cytotoxic constituents from the seeds of *Draba nemorosa* (Brassicaceae). **Archives of Pharmacal Research**, v. 33, n. 8, p. 1169-1173, 2010.

MOREIRA, E. A. Marcha sistemática de análise fitoquímica. **Tribuna Farmacêutica**, v. 47, n. 1, p. 1-19, 1979.

MOREIRA, T. F.; OLIVEIRA, D. S.; ARRUDA, M. F.; HIROTA, B. C.; LORDELLO, A. L.; CAMPELO, P; MIGUEL, M. D.; MIGUEL, O. G. Lipid peroxidation inhibition by ethanolic extract and fractions from *Rhamnus sphareosperma* var. *pubescens* (Reissek) M.C. Johnst. (Rhamnaceae). **International Journal of Phytomedicine** , v. 5, p. 136-140, 2013.

NA, J., YUWEN, L., YIN, W., MIAOMIAO, X., GANGMIN, H., XINXIN, Z., JIA, C.; WENJI, S.; AIDONG, W. Comparison of the anti-inflammatory and analgesic effects of *Gentiana macrophylla* Pall. and *Gentiana satraminea* Maxim., and identification of their active constituents. **Journal of Ethnopharmacology**, v.; 144, p. 638-645, 2012.

NIERO, R.; MALHEIROS, A.; BITTENCOURT, C. M.; BIAVATTI, M. W.; LEITE, S. N.; CECHINEL FILHO, V. Aspectos químicos e biológicos de plantas medicinais e considerações sobre fitoterápicos. In: BRESOLIN, T. M. e CECHINEL FILHO, V. **Ciências Farmacêuticas. Contribuição ao desenvolvimento de novos fármacos e medicamentos**. Itajaí: UNIVALI. 2003, p. 11-56.

O'BRIEN, P.; CARRASCO-POZO, A.; e SPEISKY, H. Boldine and its antioxidant or health-promoting properties. **Chemico-Biological Interactions**, v. 159, p. 1-17, 2006.

OLIVEIRA, F.; AKISUE, G.; AKISUE, M. K.. **Farmacognosia**. Sao Paulo: Atheneu. 1991.

OMENA, M. C.; NAVARRO, D. M.; PAULA, J. E.; LUNA, S. J.; LIMA, M. R.; SANT'ANA, A. E.. Larvicidal activities against *Aedes aegypti* of some Brazilian medicinal plants. **Bioresource Technology**, v. 98, p. 2549-2556, 2007.

OSTROSKI, E. A. MIZUMOTO, M. K.; LIMA, M. E. L.; KANEKO, T. M.; NISHIKAWA, S. O.; FREITAS, B. R. Método para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração mínima inibitória (CMI) de plantas medicinais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n. 2, p. 301-307, 2008.

PACHALY, J. R.; BRITO, H. F. V. Interspecific Allometric Scaling. .In: FOWLER, M.; CUBAS, Z. S. **Biology, medicine and surgery of South American wild animals**. 2001, p. 475 - 480.

PARVATHI, M.; RAVISCHANKAR, K. Evaluation of antidepressant, motor coordination and locomotor activities of ethanolic root extract of *Clitoria ternatea*. **Journal of Natural Remedies**, v. 13, n. 1. 2013.

PATEL, N. B. Fisiologia da dor. In: KOPF, A.; PATEL, N. B. **Guia para o Tratamento da Dor em Contextos de Poucos Recursos**. Seattle, WA 98109-4955, USA: IASP Press®. 2010, p. 9.

PEARSE, A. **Histochemistry: theoretical and applied**. Vol. 2. 4Ed. Livingstone, Edinburgh, 1985.

PEREIRA, L. P.; SILVA, K. E.; SILVA, R. O.; ASSREUY, A. M.; PEREIRA, M. G. Anti-inflammatory polysaccharides of *Azadirachta indica* seed tegument. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 22, n. 3, p. 617- 622, 2012.

PERIANAYAGAM, J. B.; SHARMA, S. K.; JOSEPH, A.; CHRISTINA, A. J. (2004). Evaluation of anti-pyretic and analgesic activity of *Embllica officinalis* Gaertn. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 95, n. 1, p.83 – 85, 2004.

POZHARITSKAYA, O. N.; SHIKOV, A. N.; MAKAROVA, M. N.; KOSMAN, V. M.; FAUSTOVA, N. M.; TESAKOVA, S. V.; MARAKOV, V. G.; GALAMBOSI, B. Anti-inflammatory activity of a HPLC-fingerprint aqueous infusion of aerial part of *Bidens tripartite* L. **Phytomedicine**, v. 17, p. 463 – 468, 2010.

PRUT, L.; BELZUNG, C. The open field as a paradigm to measure the effects of drugs of anxiety-like behaviors: a review. **European Journal of Pharmacology**, v. 463, p. 3-33, 2003.

PUGAZHENDHI, D.; POPE, G. S.; DARBRE, P. D. Oestrogenic activity of *p*-hydroxybenzoic acid (common metabolite of paraben esters) and methylparaben in human breast cancer cell lines. **Journal of Applied Toxicology**, v. 25, n. 4, p. 301-9, 2005.

PYRZYNSKA, K.; PEKAL, A. Application of free radical diphenilpicrylhydrazyl (DPPH) to estimate the antioxidant capacity of food samples. **Analytical Methods**, 5, n. 17, p. 4288-4295, 2013.

RAJESH, V.; PERUMAL, P. In vivo assessment of antidiabetic and antioxidant activities of methanol extract of *Smilax zeylanica* leaves in wistar rats. **Oriental Pharmacy and Experimental Medicine**, v. 14, p. 127–144, 2014.

RAJESH, V.; PERUMAL, P.; SUNDARRAJAN, T. Antidiabetic activity of methanolic extract of *Smilax zeylanica* Linn in Streptozotocin induced diabetic rats. **The internet Journal of Endocrinology**, v. 6, n. 1. 2010.

RANG, H. P.; DALE, M. M.; RITTER, J. M.; MOORE, P. K. *Farmacologia*. Rio de Janeiro: Elsevier Editora, 2004. p. 589.

RANG, H. P.; DALE, M. M.; RITTER, J. M.; MOORE, P. K. *Farmacologia*. Rio de Janeiro: Elsevier Editora, 2007.

RAO, K. V.; DAMU, A. G.; JAYAPRAKASAM, B.; GUNASEKAR, D. Flavonol glycosides from *Cassia hirsute*. **Journal of Natural Products**, v. 62, p. 3035-306, 1999.

ROESER, K. R. Nadel der Schwarzkiefer-Massenprodukt und Kunstwerk der Natur. **Mikrokosmos**, v. 61, n. 2, p. 33-36, 1972.

SAMARAKOON, S. R.; THABREW, I.; GALHENA, P. B.; DE SILVA, D.; TENNEKOON, K. H. A comparison of the cytotoxic potential of standardized aqueous and ethanolic extracts of a polyherbal mixture comprised of *Nigella sativa* (seeds), *Hemidesmus indicus* (roots) an *Smilax glabra* (Rhizome). **Pharmacognosy Research**, v. 2, n. 6, p. 335-42, 2010.

SAN FELICIANO, A.; PÉREZ, A. L.; del OLMO, ESTHER, et al. **Manual de determinación estructural de compuestos naturales**. Bogotá: Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología CYTEC, 2007.

SÁNCHEZ-MATEO, C. C.; Bonkanka, C. X.; HERNÁNDEZ-PÉREZ, M.; Rabanal, R. M. Evaluation of the analgesic and topical anti-inflammatory effects of *Hypericum reflexum* L. fil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 107, p. 1-6, 2006.

SAUTOUR, M. M.; LACAILLE-DUBOIS, M. A. Steroidal saponins from *Smilax medica* and their antifungal activity. **Journal of Natural Products**, v. 68, p. 1489-1493, 2005.

SCHÄFER, M. Os Opioides na Medicina da Dor. In: KOPF, A.; PATEL, N. B. **Guia para o Tratamento da Dor em Contextos de Poucos Recursos**. Seattle, WA 98109-4955, USA: IASP Press®, 2010, p. 36.

SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; ATHAYDE, M. Saponinas. In: SIMÕES, ET AL. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Florianópolis: UFSC, 2007, p. 711-735.

SHAO, B.; GUO, H.; CUI, Y.; YE, M.; HAN, J.; GUO, D. Steroidal saponins from *Smilax china* and their anti-inflammatory activities. **Phytochemistry**, v. 68, issue 5, p. 623-630, 2007.

SHU, X.; GAO, Z.; YANG, X. Anti-inflammatory and anti-nociceptive activities of *Smilax china* L. aqueous extract. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 103, issue 3, p. 327-332, 2006.

SILVA, J. M. **Anatomia e perfil químicos de duas espécies do gênero Smilax L. (Smilacaceae)**. Universidade de São Paulo. Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz.: Dissertação de mestrado, 2010.

SILVA, J. M.; ANDREATA, R. H. P.; APPEZZATO-DA-GLÓRIA, B. Aerial organ anatomy of *Smilax syphilitica* (Smilacaceae). **Revista de Biologia Tropical**, v. 60 n.3, p. 1137-1148, 2012.

SILVERSTEIN, R.; WEBSTER, F. X.; KIEMLE, D. J. **Identificação espectrométrica de compostos orgânicos**. 7th ed. Rio de Janeiro: LTC, 2007.

SIMÕES, C. M.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6 ed. Florianópolis: Editora da UFSC., 2007.

SOARES, K.; MARTIN, A.; MONTANARI JUNIRO, I.; FIGUEIRA, G. M.; ZUCCHI, M. I.; BAJAY, M. M.; APPEZZATO-DA-GLÓRIA, B. The sarsaparilla market in the state of

São Paulo (Brazil) and the challenges of cultivation. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 24, p. 73-79, 2014.

SOBCZAK, M.; PILARCZYK, A.; JONAKOWSKI, M.; JARMU, A.; SAŁAGA, M.; LIPKOWSKI, A. W.; FICHNA, J. Anti-inflammatory and antinociceptive action of the dimeric enkephalin peptide biphalin in the mouse model of colitis: New potential treatment of abdominal pain associated with inflammator bowel diseases. **Peptides**, v. 60, p. 102–106, 2014.

SOUZA, W. **Técnicas básicas de microscopia eletrônica aplicadas às Ciências Biológicas**. Rio de Janeiro: Sociedade Brasileira de Microscopia Eletronica, 1998.

STEVENS, P. F. **Angiosperm Phylogeny Website**, disponível em: <http://www.mobot.org/MOBOT/research/APweb/>.2012. Acesso em 04 de nov de 2013.

STICKNEY, J. C.; NORTHUP, D. W. Effect of gastric emptying upon propulsive motility of small intestine in rat. **Experimental Biology and Medicine**, v. 101, p. 582 - 583. 1959.

STOILOVA, I., KRASTANOV, A.; STOYANOVA, A.,; DENEV, P.; GARGOVA, S. Antioxidant activity of a ginger extract (*Zingiber officinale*). **Food Chemistry**, v. 102, Issue 3, p. 764–770, 2007.

SURVAY, N. S.; UPADHYAYA, C. P.; KUMAR, B.; YOUNG, K. E.; YOON, D.-Y.; PARK, S.-W. New Genera of flavonols and flavonol Derivatives as therapeutic molecules. **Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry**, v. 54, p. 1-18, 2011.

SVENDSEN, A.; VERPOORTE, R. **Chromatography of alkaloids**. Elsevier Scientific Publishing Company.: New York, 1983.

TJØLSEN, A.; BERGE, O. G.; HUNSKAAR, S.; ROSLAND, J. H.; HOLE, K. The formalin test: an evaluation of the method. **Pain**, v. 51, p. 5-17, 1992.

USDA, A. N. National Germplasm Resources Laboratory, Beltsville, Maryland. Fonte: **Germplasm Resources Information Network - (GRIN)** [Online Database], 2014.

UTYAMA, I. K. **Avaliação da atividade antimicrobiana e citotóxica in vitro do vinagre e ácido acético: perspectiva na terapêutica de feridas**. Dissertação de Mestrado - Escola de enfermagem de Ribeirão Preto, 2003.

WANNMACHER, L.; FERREIRA, M. B. Princípios gerais no tratamento da inflamação. In: FUCHS, F. D.; WANNMACHER, J.; FERREIRA, M. B. **Farmacologia clínica: fundamentos da terapêutica racional**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006, p. 294-340.

WEN, A.; DELAQUIS, P.; STANICH, K.; TOIVONEN, P. Antilisterial activity of selected phenolic acids. **Food Microbiology**, v. 20, p. 305–311, 2003.

WHITE, W.; STEIN, C. Histórico, definições e opiniões atuais. In: KOPF, A; PATEL, N. B. **Guia para o Tratamento da Dor em Contextos de Poucos Recursos**. Seattle, WA 98109-4955, USA: IASP Press®, 2010, p. 3.

WHO. **Instructions for determining the susceptibility or resistance of mosquito larvae to insecticides**. Geneva, 1981.

WOO, M. H.; DO, J. C.; SON., K. H. Five new spirostanol glycosides from the subterranean parts of *Smilax sieboldii*. **Journal of Natural Products**, v. 55, n. 8, p. 1129-1135, 1992.

WU, L.; WANG, X.; WANG, H.; YANG, H.; JIA, A.; DING, Q. Cytotoxic polyphenols against breast tumor cell in *Smilax china* L. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 130, p. 460–464, 2010.

WUNGSINTAWEEKUL, B.; UMEHARA, K.; MIYASE, T.; NOGUCHI, H. Estrogenic and anti-estrogenic compounds from the Thai medicinal plant, *Smilax corbularia* (Smilacaceae). **Phytochemistry**, v. 72, p. 495–502, 2011.

XIA, D.; YU, X.; LIAO, Q.; MOU, H.; MA, W. Protective effect of *Smilax glabra* extract against lead-induced oxidative. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 130, p. 414–420, 2010.

XU, J.; LI, X.; ZHAO, C. C.; WANG, Y. Pregnane glycosides and steroid saponins from *Smilax bockii* Warb. and their NGF-potentiating activity. **Natural Product Research**, v. 22 issue 20, p. 884-889, 2008.

XU, J.; LI, X.; ZHANG, P.; LI, Z.; WANG, Y. Antiinflammatory constituents from the roots of *Smilax bockii* warb. **Archives of Pharmacal Research**, v. 28, p. 395-9, 2005.

YUJING, G.; YAHUI, S.; LIKE, Q.; SHUO, X.; LIN, M.; SHAOQING, C.; CHENGCHAO, S. Mitochondrial apoptosis contributes to the anticancer effect of *Smilax glabra* Roxb. **Toxicology Letters**, v. 207, issue 2, p. 112-120, 2011.

ZHANG, C.; FENG, S.; ZHANG, L.; REN, Z. A new cytotoxic steroidal saponin from the rhizomes and roots of *Smilax scobinicaulis*. **Natural Products Research**, 27, p. 1255 - 1260, 2013.

ZHANG, L.; LIAO, C.-C.; HUANG, H.-C.; SHEN, Y.-C.; YANG, L.-M.; KUO, Y.-H. Antioxidant phenylpropanoid glycosides from *Smilax bracteata*. **Phytochemistry**, v. 69, p. 1398–1404, 2008.

ANEXOS



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
 MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE
 INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE E DOS RECURSOS NATURAIS RENOVÁVEIS

**AUTORIZAÇÃO DAS ATIVIDADES DE ACESSO AO PATRIMÔNIO
 GENÉTICO REALIZADA DE ACORDO COM A RESOLUÇÃO CGEN Nº35,
 DE 27 DE ABRIL DE 2011
 Nº 03/2014**

O INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE E DOS RECURSOS NATURAIS RENOVÁVEIS, credenciado pelo Conselho de Gestão do Patrimônio Genético (CGEN/MMA), por meio da Deliberação CGEN nº 40, de 24 de setembro de 2003, para autorizar instituição nacional, pública ou privada, que exerça atividade de pesquisa e desenvolvimento nas áreas biológicas e afins, a acessar amostras de componente do patrimônio genético para fins de pesquisa científica sem potencial de uso econômico, **autoriza** com amparo na Resolução CGEN nº 35, de 27 de abril de 2011, que dispõe sobre regularização de atividades de acesso ao patrimônio genético e/ou ao conhecimento tradicional associado e sua exploração econômica realizadas em desacordo com a Medida Provisória no 2.186-16, de 23 de agosto de 2001 e demais normas, as **atividades de acesso ao patrimônio genético desenvolvidas pela:**

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ, CNPJ/MF nº. 75.095.679/0001-49, situada na Rua XV de Novembro, 1299, Curitiba-PR, CEP: 80060-000, e representada na pessoa do Reitor Zaki Akel Sobrinho, RG nº. 1.439.536-9 SSP/PR, CPF nº. 359.063.759-53, no âmbito das atividades do projeto de pesquisa "*Estudo Químico e Biológico das Espécies Vegetais*".

Objetivo da Autorização: Avaliar sob aspecto morfoanatômico, químico e biológico das espécies acessadas constantes do projeto de pesquisa.

Período das atividades: 2000 a 2019.

Validade da Autorização: Cinco anos, contados da assinatura. Em razão da continuidade do projeto de pesquisa, a instituição detentora desta autorização deverá enviar ao Ibama, a partir da emissão da licença, **relatório anual** sobre a execução das atividades de pesquisa, nos termos do Decreto nº. 4.946/2003 e Resolução CGEN nº 41/2013. Endereço para envio do relatório: IBAMA/DBFLO, SCEN L4 Norte, Bloco B, Brasília-DF, CEP: 70818-900.

Esta autorização das atividades de acesso está vinculada às informações e termos assinados pelo requerente, constantes do processo nº **02001.001165/2013-47**.

Brasília, 17 de março de 2014.

Volney Zanardi Junior
 Presidente

Autorização de acesso ao patrimônio genético.



Ministério da Educação
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
Setor de Ciências Biológicas
Comissão de Ética no Uso de Animais
(CEUA)



Nº 704

CERTIFICADO

A Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, instituído pela PORTARIA Nº 787/03-BL, de 11 de junho de 2003, com base nas normas para a constituição e funcionamento da CEUA, estabelecidas pela RESOLUÇÃO Nº 01/03-BL, de 09 de maio de 2003 e considerando o contido no Regimento Interno da CEUA, **CERTIFICA** que os procedimentos utilizando animais no projeto de pesquisa abaixo especificado, estão de acordo com os princípios éticos estabelecidos pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e exigências estabelecidas em "Guide for the Care and Use of Experimental Animals (Canadian Council on Animal Care)".

CERTIFICATION

The Ethics Animal Experiment Committee of the Setor de Ciências Biológicas of the Federal University of Paraná, established by the DECREE Nº 787/03-BL on June 11th 2003, based upon the RESOLUTION Nº 01/03-BL from May 9th 2003, and upon the CEUA internal regiment, CERTIFIES that the procedures using animals in the research project specified below are in agreement with the ethical principals established by the Experimental Animal Brazilian Council (COBEA), and with the requirements of the "Guide for the Care and Use of Experimental Animals (Canadian Council on Animal Care)".

PROCESSO: 23075.015026/2013-15

APROVADO: 20/06/2013 – R.O. 05/2013

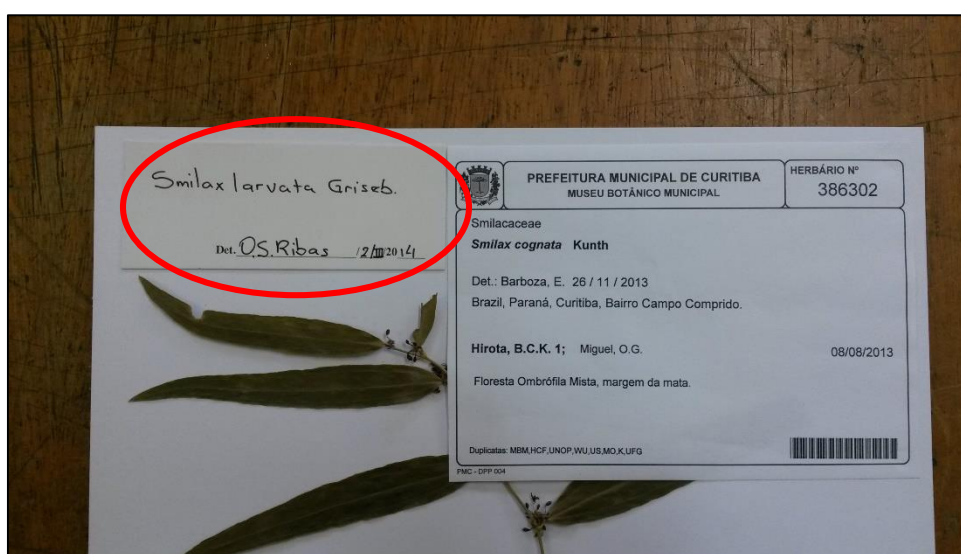
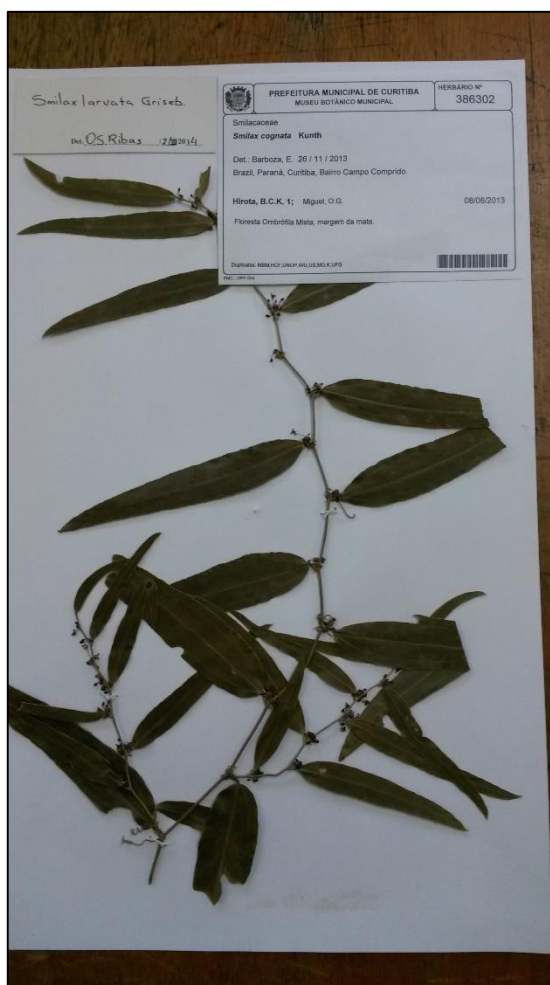
TÍTULO: Avaliação da atividade antinociceptiva e anti-inflamatória do extrato bruto das partes aéreas de *Smilax larvata* Griseb. (Smilacaceae)

AUTORES: Joice Maria da Cunha, Beatriz Cristina Konopatzki Hirota, Cristiane da Silva Paula, Anne Karoline Schreiber

DEPARTAMENTO: Farmacologia

Prof. Dr. Aleksander Roberto Zamprônio
Coordenador da CEUA

Certificado de aprovação do Comitê de Ética no Uso de Animais para os ensaios farmacológicos.



Fotografias da exsicata depositada no Museu Botânico de Curitiba.