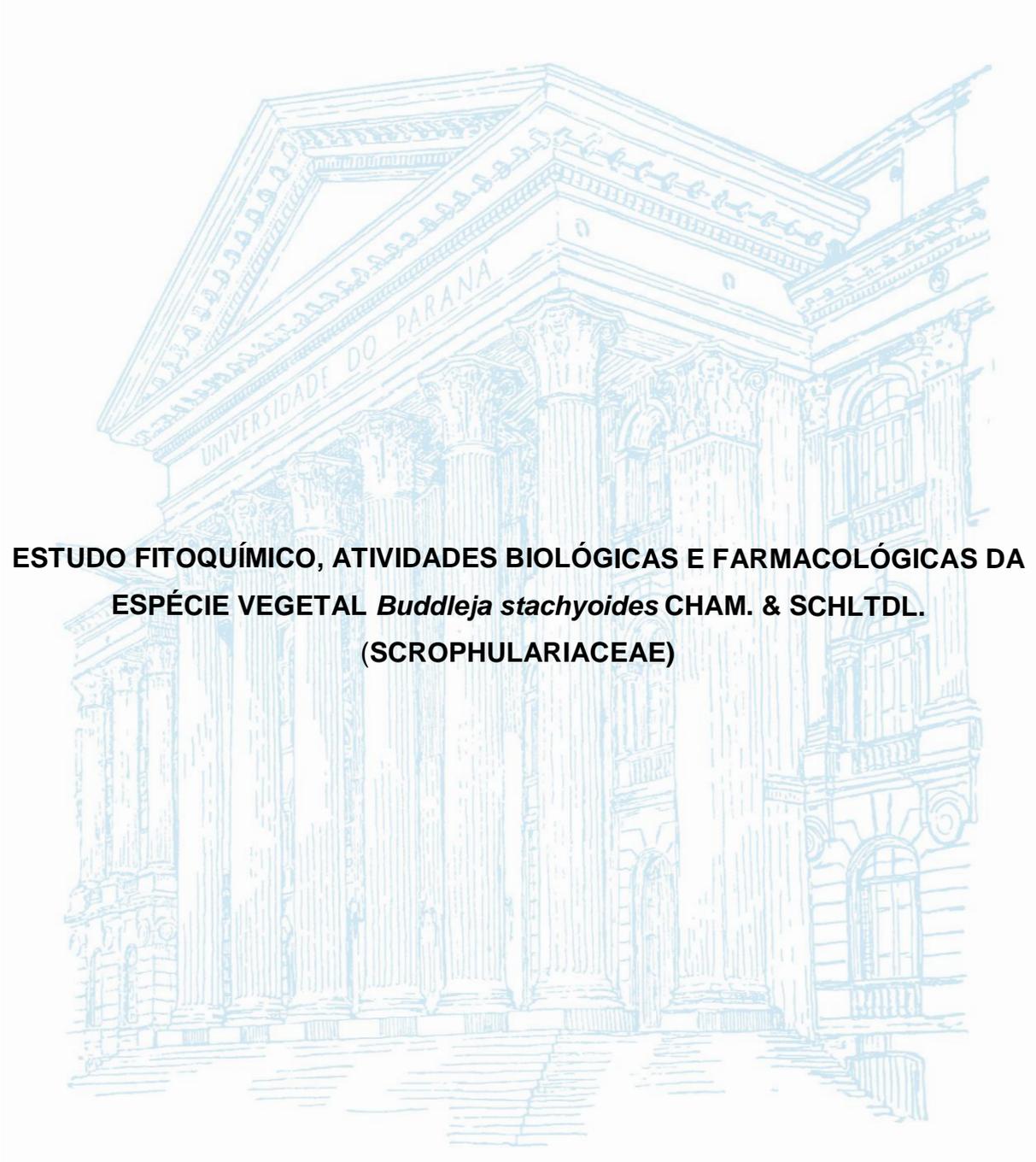


UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

DANIELLA MARIA SOARES DE OLIVEIRA



**ESTUDO FITOQUÍMICO, ATIVIDADES BIOLÓGICAS E FARMACOLÓGICAS DA
ESPÉCIE VEGETAL *Buddleja stachyoides* CHAM. & SCHLTDL.
(SCROPHULARIACEAE)**

CURITIBA

2017

DANIELLA MARIA SOARES DE OLIVEIRA

**ESTUDO FITOQUÍMICO, ATIVIDADES BIOLÓGICAS E FARMACOLÓGICAS DA
ESPÉCIE VEGETAL *Buddleja stachyoides* CHAM. & SCHLTDL.
(SCROPHULARIACEAE)**

Tese apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Doutora em Ciências Farmacêuticas, no Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Setor de Ciências da Saúde, da Universidade Federal do Paraná.

Orientador(a): Prof(a). Dr(a). Marilis Dallarmi Miguel
Coorientadores: Prof. Dr. Obdulio Gomes Miguel e
Prof(a). Dr(a). Deise Prehs Montrucchio

CURITIBA

2017

Oliveira, Daniella Maria Soares de
Estudo fitoquímico, atividades biológicas e farmacológicas da espécie vegetal
Buddleja stachyoides Cham. & Schldl. (Scrophulariaceae) / Daniella Maria Soares de
Oliveira – Curitiba, 2017.
144 f. : il. (algumas color.) ; 30 cm

Orientadora: Professora Dra. Marilis Dallarmi Miguel
Coorientador: Professor Dr. Obdulio Gomes Miguel
Coorientadora: Professora Dra. Deise Prehs Montrucchio
Tese (doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Setor de
Ciências da Saúde. Universidade Federal do Paraná.

Inclui bibliografia

1. *Buddleja*. 2. *Aedes aegypti*. 3. Antioxidante. 4. Anti-inflamatório. 5. Motilidade
gastrointestinal. I. Miguel, Marilis Dallarmi. II. Miguel, Obdulio Gomes. III. Montrucchio,
Deise Prehs. IV. Universidade Federal do Paraná. V. Título.

CDD 615.321



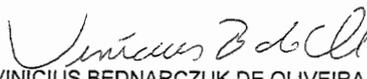
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
Setor CIÊNCIAS DA SAÚDE
Programa de Pós-Graduação CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

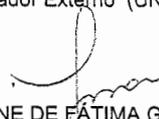
TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da tese de Doutorado de **DANIELLA MARIA SOARES DE OLIVEIRA** intitulada: **ESTUDO FITOQUÍMICO, ATIVIDADES BIOLÓGICAS E FARMACOLÓGICAS DA ESPÉCIE VEGETAL *Buddleja stachyoides* CHAM. & SCHLTDL. (SCROPHULARIACEAE)**, após terem inquirido a aluna e realizado a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua aprovação.

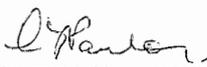
Curitiba, 09 de Junho de 2017.


MARILIS DALLARMI MIGUEL
Presidente da Banca Examinadora (UFPR)


VINICIUS BEDNARCZUK DE OLIVEIRA
Avaliador Externo (UNIANDRADE)


JOSIANE DE FÁTIMA GASPARI DIAS
Avaliador Externo (UFPR)


YANNA DANTAS RATTMANN
Avaliador Externo (UFPR)


CRISTIANE DA SILVA PAULA
Avaliador Externo (UFPR)

AGRADECIMENTOS

À **Deus**, pela vida, bênção e proteção.

À minha mãe **Maria Dulce Soares de Oliveira**, à minha irmã **Dircélia**, aos meus sobrinhos **Otávio Filipe** e **Luiz Gustavo**, **toda minha família** pelo apoio, incentivo, dedicação, compreensão, carinho e amor.

À **Universidade Federal do Paraná** e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas pela oportunidade.

À minha orientadora **Prof^a Dra. Marilis Dallarmi Miguel** pelos ensinamentos, confiança e amizade.

Aos meus coorientadores **Prof. Dr. Obdulio Gomes Miguel** e **Deise Prehs Montrucchio** pela dedicação, confiança, paciência, ensinamentos em fitoquímica e em farmacologia, coleta da planta e principalmente pela amizade.

Ao Doutor **João Luiz Souza Carvalho** pelo incentivo, colaboração, sugestões, ensinamentos e amizade.

Ao Laboratório do **Institut de Chimie de Substances Naturelles**, em Gif-sur-Yvette, França e aos Laboratórios de RMN dos departamentos de química e bioquímica da UFPR pela disponibilização dos equipamentos de ressonância magnética nuclear e HPLC.

À doutora **Milena Kalegari** e aos doutorandos **Francis José Z. Merino** e **Fernanda M^a Marins Ocampos** pela realização das análises e identificação dos espectros de RMN, pelos ensinamentos e pela amizade.

À empresa **As Ervas Curam** e ao presidente **Aldo C. Dadalt** por disponibilizar o equipamento de HPLC e fornecer material para as análises.

Aos colegas **Robson Dadalt**, **Marineli A. Gelinsk**, **Tatiana G. G. Heuko**, **Vanessa dos Santos** pela ajuda, sugestões e amizade.

Às colegas de doutorado **Thais Fernanda Moreira**, **Fernanda M^a Marins Ocampos**, **Mariana Saragioto Krause**, **Ana Flávia Duarte**, **Luciane Dalarmi**, **Cristiane Bezerra**, **Lígia Moura Burci** pela ajuda nas análises, ensinamentos, amizade e companheirismo.

A todos os colegas de doutorado pelas contribuições e amizade.

À Capes, pelo auxílio financeiro.

"Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser, mas graças a Deus, não sou o que era antes".

MARTHIN LUTHER KING

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi realizar isolamento de compostos e avaliação do potencial biológico e farmacológico da espécie *Buddleja stachyoides* Cham. & Schltl. (Scrophulariaceae), conhecida popularmente como verbasco ou barbasco, encontrada, principalmente, na região sul do Brasil, é usada na medicina tradicional como anti-hemorroidal, antitussígena, analgésica, sudorífera, emoliente e antireumática. Foram isolados compostos das frações hexânica das raízes e acetato de etila das partes aéreas. O método analítico de quantificação do marcador verbascosídeo foi validado, utilizando-se o extrato bruto das partes aéreas. As atividades larvicida sobre *Aedes aegypti* e alelopática sobre a germinação e crescimento de *Lactuca sativa* L. e *Allium cepa* L. foram avaliadas com extratos brutos e frações das partes aéreas e raízes. O potencial antioxidante dos extratos brutos foi avaliado através dos ensaios de captura dos ânions superóxido e óxido nítrico. As atividades farmacológicas antinociceptiva, anti-inflamatória, gastroprotetora, motilidade gastrointestinal e a toxicidade subcrônica foram avaliadas com o extrato bruto das partes aéreas em camundongos Swiss. O composto isolado da fração hexânica das raízes foi identificado como ácido triacontanoico e a mistura de isômeros isolada da fração acetato de etila das partes aéreas foi identificado como martinósídeo (*trans* e *cis*). Os extratos brutos das partes aéreas e raízes foram capazes de capturar o ânion superóxido e mais eficazes na inibição do radical óxido nítrico do que o padrão ácido gálico. Algumas frações e extratos brutos apresentaram efeitos inibitórios e estimulantes na germinação e crescimento de *Lactuca sativa* L. e *Allium cepa* L. e toxicidade sobre as larvas de *Aedes aegypti*. O extrato bruto das partes aéreas, nas doses de 600 e 900 mg/kg, apresentou efeito anti-inflamatório em 3 e 4 horas no teste de edema de pata induzido por carragenina e diminuição da migração de leucócitos na cavidade peritoneal no teste de peritonite induzida por carragenina. Nos testes antinociceptivos, formalina e ácido acético, o extrato bruto apresentou potencial analgésico nas doses de 600 e 900 mg/kg e demonstrou significativo efeito protetor sobre a úlcera gástrica induzida por etanol acidificado. Não teve ação sobre a motilidade gastrointestinal. O extrato na dose de 900 mg/kg apresentou baixa toxicidade no teste subcrônico avaliado em camundongos fêmeas. Estes efeitos podem estar relacionados aos compostos fenilpropanoídeos, que possuem propriedades antioxidantes e são capazes de inibir enzimas e mediadores inflamatórios. Devido ao potencial farmacológico e antioxidante observado para a espécie *Buddleja stachyoides* Cham. & Schltl, torna-se interessante a realização de testes para comprovar sua segurança e eficácia, para futuro desenvolvimento de um fitoterápico.

Palavras-chave: *Aedes aegypti*. Antioxidante. Anti-inflamatório. Antinociceptivo. Gastroprotetor. Motilidade gastrointestinal.

ABSTRACT

The objective of this work was to isolate compounds and evaluate the biological and pharmacological potential of *Buddleja stachyoides* Cham. & Schltdl. (Scrophulariaceae), popularly known as mullein or barbasco, found mainly in southern Brazil, is used in traditional medicine as anti-hemorrhoidal, antitussive, analgesic, sudorific, emollient and antirheumatic. Compounds of the hexane fractions of the roots and ethyl acetate of the aerial parts were isolated. The analytical method of quantification of the verbascoside marker was validated, using the crude extract of the aerial parts. The larvicidal activities against *Aedes aegypti* and allelopathic on the germination and growth of *Lactuca sativa* L. and *Allium cepa* L. were evaluated with crude extracts and fractions of the aerial parts and roots. The antioxidant potential of the crude extracts was evaluated through the superoxide anion and nitric oxide capture assays. The antinociceptive, anti-inflammatory, gastroprotective, gastrointestinal motile and subchronic toxicity activities were evaluated with the crude extract of the aerial parts in Swiss mice. The compound isolated from the hexane fraction of the roots was identified as triacontanoic acid and the mixture of isomers isolated from the ethyl acetate fraction of the aerial parts was identified as martynoside (*trans* and *cis*). The crude extracts of the aerial parts and roots were able to capture the superoxide anion and more effective in inhibiting the nitric oxide radical than the standard gallic acid. Some crude fractions and extracts had inhibitory and stimulating effects on the germination and growth of *Lactuca sativa* L. and *Allium cepa* L. and toxicity against *Aedes aegypti* larvae. The crude extract of the aerial parts, at doses of 600 and 900 mg/kg, showed anti-inflammatory effect in 3 and 4 hours in the paw edema test induced by carrageenan and decreased leukocyte migration in the peritoneal cavity in the induced peritonitis test by carrageenan. In the antinociceptive, formalin and acetic acid tests, crude extract showed analgesic potential at doses of 600 and 900 mg/kg and showed a significant protective effect on gastric ulcers induced by acidified ethanol. It had no action on gastrointestinal motility. The extract at the dose of 900 mg/kg showed low toxicity in the subchronic test evaluated in female mice. These effects may be related to phenylpropanoid compounds, which have antioxidant properties and are capable of inhibiting inflammatory enzymes and mediators. Due to the pharmacological and antioxidant potential observed for the species *Buddleja stachyoides* Cham. & Schltdl, it is interesting to carry out tests to prove its safety and efficacy, for the future development of a herbal medicine.

Key-words: *Aedes aegypti*. Antioxidant. Anti-inflammatory. Antinociceptive. Gastroprotective. Gastrointestinal motility.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – ESTRUTURA DO FENILPROPANOIDE VERBASCOSÍDEO.....	17
FIGURA 2 – DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA DA ESPÉCIE <i>Buddleja stachyoides</i> NO MUNDO.....	21
FIGURA 3 – DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA DA ESPÉCIE <i>Buddleja stachyoides</i> NO BRASIL	21
FIGURA 4 – FLUXOGRAMA DAS METODOLOGIAS REALIZADAS COM <i>B. stachyoides</i>	39
FIGURA 5 – FOTOGRAFIA DA EXSICATA DE <i>Buddleja stachyoides</i> ACERVO N° 339899	40
FIGURA 6 – FOTOGRAFIA DE EXEMPLOS DA ESPÉCIE VEGETAL <i>Buddleja stachyoides</i>	41
FIGURA 7 – ESTRUTURA QUÍMICA DO COMPOSTO FHR1 IDENTIFICADO COMO ÁCIDO TRIACONTANOICO	59
FIGURA 8 – ESPECTRO DE RMN DE ¹ H DO COMPOSTO FHR1 (600 MHZ, CDCl ₃ , 20° C).....	59
FIGURA 9 – ESPECTRO DE RMN DE ¹³ C DO COMPOSTO FHR1 (150,90 MHZ, CDCl ₃ , 20° C)	60
FIGURA 10 – ESTRUTURA QUÍMICA DO COMPOSTO FAEPA2 IDENTIFICADO COMO <i>TRANS</i> -MARTINOSÍDEO E <i>CIS</i> -MARTINOSÍDEO	62
FIGURA 11 – ESPECTRO DE RMN DE ¹ H DO COMPOSTO FAEPA2 IDENTIFICADO COMO ISÔMEROS <i>TRANS</i> -MARTINOSÍDEO E <i>CIS</i> -MARTINOSÍDEO (600 MHZ, CD ₃ OD, 20° C).....	64
FIGURA 12 – MAPA DE CORRELAÇÃO HSQC DOS ISÔMEROS <i>TRANS</i> -MARTINOSÍDEO E <i>CIS</i> -MARTINOSÍDEO (600 MHZ, CD ₃ OD, 20° C).....	67
FIGURA 13 – MAPA DE CORRELAÇÃO HMBC DOS ISÔMEROS <i>TRANS</i> -MARTINOSÍDEO E <i>CIS</i> -MARTINOSÍDEO (600 MHZ, CD ₃ OD, 20° C).....	67
FIGURA 14 – CURVA DE LINEARIDADE COM O PADRÃO VERBASCOSÍDEO ...	69
FIGURA 15 – CONCENTRAÇÃO DE VERBASCOSÍDEO PRESENTE NO EXTRATO ALCOÓLICO BRUTO DAS PARTES AÉREAS DE <i>B. stachyoides</i>	69

FIGURA 16 – ESPECTRO DE UV, PUREZA E CORRELAÇÃO ESPECTRAL DO PICO DO VERBASCOSÍDEO PRESENTE NO EXTRATO ALCOÓLICO BRUTO DAS PARTES AÉREAS DE <i>B. stachyoides</i>	70
FIGURA 17 – PERFIL CROMATOGRÁFICO (<i>FINGERPRINT</i>) DO EXTRATO ALCOÓLICO BRUTO DAS PARTES AÉREAS DE <i>B. stachyoides</i> E PADRÃO DE TRABALHO VERBASCOSÍDEO	71
FIGURA 18 – EFEITO DO EXTRATO BRUTO DE <i>B. stachyoides</i> SOBRE LESÃO GÁSTRICA INDUZIDA POR HCL/ ETANOL EM ESTÔMAGO DE CAMUNDONGO	101

LISTA DE GRÁFICOS

GRÁFICO 1 – ÍNDICE DE VELOCIDADE DE GERMINAÇÃO (IVG) DE <i>Lactuca sativa</i> L. TRATADAS COM AMOSTRAS DAS PARTES AÉREAS DE <i>B. stachyoides</i>	76
GRÁFICO 2 – ÍNDICE DE VELOCIDADE DE GERMINAÇÃO (IVG) DE <i>Lactuca sativa</i> L. NAS AMOSTRAS DAS RAÍZES DE <i>B. stachyoides</i>	76
GRÁFICO 3 – ÍNDICE DE VELOCIDADE DE GERMINAÇÃO (IVG) DE <i>Allium cepa</i> L. NAS AMOSTRAS DAS PARTES AÉREAS DE <i>B. stachyoides</i>	77
GRÁFICO 4 – ÍNDICE DE VELOCIDADE DE GERMINAÇÃO (IVG) DE <i>Allium cepa</i> L. NAS AMOSTRAS DAS RAÍZES DE <i>B. stachyoides</i>	78
GRÁFICO 5 – CRESCIMENTO DAS RADÍCULAS E HIPOCÓTILOS DE <i>Lactuca sativa</i> L. TRATADA COM EXTRATO BRUTO E FRAÇÕES DAS PARTES AÉREAS DE <i>B. stachyoides</i>	79
GRÁFICO 6 – CRESCIMENTO DAS RADÍCULAS E HIPOCÓTILOS DE <i>Lactuca sativa</i> L. TRATADA COM EXTRATO BRUTO E FRAÇÕES DAS RAÍZES DE <i>B. stachyoides</i>	80
GRÁFICO 7 – CRESCIMENTO DAS RADÍCULAS E COLEÓPTILOS DE <i>Allium cepa</i> L. TRATADA COM EXTRATO BRUTO E FRAÇÕES DAS PARTES AÉREAS DE <i>B. stachyoides</i>	82
GRÁFICO 8 – CRESCIMENTO DAS RADÍCULAS E COLEÓPTILOS DE <i>Allium cepa</i> L. TRATADA COM EXTRATO BRUTO E FRAÇÕES DAS RAÍZES DE <i>B. stachyoides</i>	83
GRÁFICO 9 – COMPARAÇÃO DOS VALORES DE IC ₅₀ DAS AMOSTRAS DE <i>B. stachyoides</i> COM OS PADRÕES NO ENSAIO DE INIBIÇÃO DO ÂNION SUPERÓXIDO	86
GRÁFICO 10 – COMPARAÇÃO DOS VALORES DE IC ₅₀ DAS AMOSTRAS DE <i>B. stachyoides</i> COM OS PADRÕES NO ENSAIO DE CAPTURA DO RADICAL ÔXIDO NÍTRICO	87
GRÁFICO 11 – EFEITO DO EXTRATO BRUTO DAS PARTES AÉREAS DE <i>B. stachyoides</i> NA NOCICEPÇÃO INDUZIDA POR FORMALINA	91
GRÁFICO 12 – EFEITO DO EXTRATO BRUTO DAS PARTES AÉREAS DE <i>B. stachyoides</i> NA NOCICEPÇÃO INDUZIDA POR ÁCIDO ACÉTICO	92

GRÁFICO 13 – EFEITO DO EXTRATO BRUTO DE <i>Buddleja stachyoides</i> NO TESTE DE CAMPO ABERTO	94
GRÁFICO 14 – EFEITO DO EXTRATO BRUTO DAS PARTES AÉREAS DE <i>B.</i> <i>stachyoides</i> NA AVALIAÇÃO DO EDEMA DE PATA INDUZIDO POR CARRAGENINA	95
GRÁFICO 15 – CONTAGEM DE LEUCÓCITOS TOTAIS NO LÍQUIDO PERITONIAL DO TESTE DE PERITONITE INDUZIDA POR CARRAGENINA.....	97
GRÁFICO 16 – CONTAGEM DIFERENCIAL DE LEUCÓCITOS NO LÍQUIDO PERITONIAL DO TESTE DE PERITONITE INDUZIDA POR CARRAGENINA	98
GRÁFICO 17 – EFEITO DO EXTRATO BRUTO DE <i>B. stachyoides</i> SOBRE AS LESÕES GÁSTRICAS INDUZIDAS POR HCL/ETANOL	101
GRÁFICO 18 – EFEITO DO EXTRATO BRUTO DE <i>B. stachyoides</i> SOBRE A MOTILIDADE GASTROINTESTINAL	106
GRÁFICO 19 – GANHO/PERDA DE PESO DOS ANIMAIS DURANTE O ENSAIO DE TOXICIDADE SUBCRÔNICA	107
GRÁFICO 20 – EFEITO DO EXTRATO BRUTO DAS PARTES AÉREAS DE <i>Buddleja stachyoides</i> NO TESTE DE CAMPO ABERTO EM CAMUNDONGOS FÊMEAS.....	108
GRÁFICO 21 – EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO DO EXTRATO BRUTO DAS PARTES AÉREAS DE <i>B. stachyoides</i> NO PESO RELATIVO DOS ÓRGÃOS VITAIS.....	109
GRÁFICO 22 – PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS OBTIDOS APÓS ADMINISTRAÇÃO DIÁRIA (21 DIAS) DO EXTRATO BRUTO DE <i>B.</i> <i>stachyoides</i>	111
GRÁFICO 23 – PARÂMETROS BIOQUÍMICOS AVALIADOS COM O SORO DOS ANIMAIS TRATADOS DIARIAMENTE (21 DIAS) COM EXTRATO BRUTO DE <i>B. stachyoides</i>	112

LISTA DE QUADROS

QUADRO 1 – CLASSIFICAÇÃO TAXONÔMICA DE <i>Buddleja stachyoides</i> CHAM. & SCHLTDL	20
--	----

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – GRADIENTE DE ELUIÇÃO DO MÉTODO DA SEGUNDA PURIFICAÇÃO DO COMPOSTO FAEPA2.....	44
TABELA 2 – GRADIENTE DE ELUIÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO DESENVOLVIDO EM HPLC PARA ANÁLISE DO EXTRATO BRUTO DAS PARTES AÉREAS DE <i>Buddleja stachyoides</i>	45
TABELA 3 – RENDIMENTO DAS FRAÇÕES E EXTRATOS ALCOÓLICOS BRUTO	58
TABELA 4 – COMPARAÇÃO DOS SINAIS DE RMN- ¹ H E RMN- ¹³ C DO COMPOSTO FHR1 COM A LITERATURA.....	61
TABELA 5 – COMPARAÇÃO DOS DADOS DE RMN DO COMPOSTO FAEPA2 COM DADOS DA LITERATURA PARA O ISÔMERO TRANS- MARTINOSÍDEO.....	65
TABELA 6 – COMPARAÇÃO DOS DADOS DE RMN DO COMPOSTO FAEPA2 COM DADOS DA LITERATURA PARA O ISÔMERO CIS- MARTINOSÍDEO.....	66
TABELA 7 – RESULTADOS DA VALIDAÇÃO DE MÉTODO ANALÍTICO PARA QUANTIFICAÇÃO DE VERBASCOSÍDEO DO EXTRATO BRUTO DAS PARTES AÉREAS DE <i>Buddleja stachyoides</i>	73
TABELA 8 – RESULTADOS OBTIDOS DOS EXTRATOS E FRAÇÕES NA AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE LARVICIDA SOBRE <i>Aedes aegypti</i> ATRAVÉS DA CONCENTRAÇÃO LETAL (CL ₅₀).....	75
TABELA 9 – RESULTADOS DAS ALTERAÇÕES HISTOLÓGICAS DO FÍGADO EM CAMUNDONGOS FÊMEAS APÓS TOXICIDADE SUBCRÔNICA....	113
TABELA 10 – RESULTADOS DAS ALTERAÇÕES HISTOLÓGICAS DOS RINS EM CAMUNDONGOS FÊMEAS APÓS TOXICIDADE SUBCRÔNICA....	114

LISTA DE SIGLAS

ACHÉ	- Acetilcolinesterase
AINES	- Anti-inflamatórios não-esteroides
ALT	- Alanina aminotransferase
ANOVA	- Análise de variância
ANVISA	- Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AP-1	- Prolina ativadora 1
ASICs	- Canais iônicos sensíveis a ácido
ATP	- Adenosina trifosfato
AST	- Aspartato aminotransferase
A δ	- Fibras mielinizadas
BHT	- Butilhidroxitolueno
CEUA	- Comitê de ética para uso em animais
CGEN	- Conselho de Gestão do Patrimônio Genético
cNOS	- Óxido nítrico sintase constitutiva
CLAE	- Cromatografia Líquida de alta eficiência
COX-1	- Cicloxigenase-1
COX-2	- Cicloxigenase-2
DAD	- Detector de arranjo de diodos
DhL	- Dehidroleucodina
d	- Dupleto
dd	- Duplo dupleto
DNA	- Ácido desoxirribonucleico
DPPH	- 2,2-difenil-1-picril-hidrazil
DPP-IV	- Dipeptidil-peptidase IV
DPR	- Desvio padrão
EDTA	- Ácido etilenodiamino tetra-acético
EG	- Esvaziamento gástrico
ELSD	- Detector de luz por evaporação e dispersão
EMA	- European Medicines Agency
eNOS	- Óxido nítrico sintase endotelial
ERN	- Espécie reativa do nitrogênio

ERO	- Espécie reativa do oxigênio
GABA	- Ácido gama-aminobutírico
GPCRs	- Receptores acoplados a proteína G
GRP	- Peptídeo liberador de gastrina
GST	- Glutathione transferase
HC	- Heath Canada
HMBC	- Correlação heteronuclear de múltiplas ligações
HPLC	- High performance liquid chromatography
HSQC	- Correlação heteronuclear de quantum-simples
HTM	- Mecanoreceptores de alto limiar
5-HT	- Serotonina (5-hidroxitriptamina)
5-HETE	- ácido 5-hidroxi-eicosatetranoico
IASP	- Associação Internacional para Estudo de Dor
IL1- β	- Interleucina-1 beta
IL-6	- Interleucina-6
IL-8	- Interleucina-8
iNOS	- Óxido nítrico sintase induzida
IVG	- Índice de velocidade de germinação
IBAMA	- Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e Recursos Naturais Renováveis
INPI	- Instituto Nacional da Propriedade Industrial
<i>J</i>	- Constante de acoplamento
<i>m</i>	- Singleto largo
mAU	- Um milésimo da unidade de absorbância
LTB ₄	- Leucotrienos
5-LO	- Lipoxigenase-5
LPS	- Lipopolissacarídeo
MES	- ácido 2-morfolinoetanosulfônico
MCH	- Hemoglobina globular
MCHC	- Concentração de hemoglobina globular
MS	- Ministério da Saúde
NADH	- Nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzida
NBT	- Azul de nitrotetrazólio
NF- κ B	- Factor de transcrição nuclear kappa B

NOS	- Óxido nítrico sintase
nNOS	- Óxido nítrico sintase neuronal
OMS	- Organização Mundial de Saúde
PDA	- Detector de arranjo de fotodiodos
PECAM-1	- Molécula de adesão das células endoteliais plaquetárias 1
PNPIC	- Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares
PC	- Fosfatidil colina
PG	- Fosfatidil glicerol
PGE ₂	- Prostaglandina E ₂
PGI ₂	- Prostaglandina I ₂
PMN	- Nociceptores polimodais
PMS	- Metassulfato de fenazina
POP	- Prolil oligopeptidase
RDC	- Resolução da Diretoria Colegiada
RMN- ¹³ C	- Ressonância magnética nuclear de carbono
RMN- ¹ H	- Ressonância magnética nuclear de hidrogênio
SOD	- Superóxido dismutase
SUS	- Sistema Único de Saúde
<i>t</i>	- Tripleto
TBARS	- Teste com espécies reativas do ácido tiobarbitúico
TGA	- Therapeutic Goods Administration
TI	- Trânsito intestinal
TMS	- Tetrametilsilano
TNF- α	- Fator de necrose tumoral alfa
TrK	- Receptores de tirosina quinase
TRPs	- Canais iônicos de potencial transitório
TXA ₂	- Tromboxano A ₂
UV	- Ultravioleta
VIP	- Polipeptídeo vasoativo intestinal

LISTA DE ABREVIATURAS

CL ₅₀	- Concentração letal média
CCl ₄	- Tetracloreto de carbono
CDCl ₃	- Clorofórmio deuterado
C ₅ D ₅ N	- Piridina deuterada
CD ₃ OD	- Metanol deuterado
DMSO	- Dimetilsulfóxido
ED ₅₀	- Dose efetiva média
IC ₅₀	- Concentração inibitória média
i.p.	- Intraperitoneal
μM	- Micromassa
P.A.	- Padrão analítico
s.c.	- Subcutânea
v.o.	- Via oral

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
1.1	OBJETIVOS.....	15
1.1.1	Objetivo Geral.....	15
1.1.2	Objetivos Específicos	15
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	16
2.1	FAMÍLIA SCROPHULARIACEAE E GÊNERO <i>Buddleja</i>	16
2.1.1	Constituição química das espécies do gênero <i>Buddleja</i>	16
2.1.2	Atividades biológicas e farmacológicas das espécies do gênero <i>Buddleja</i> ..	17
2.2	ESPÉCIE VEGETAL <i>Buddleja stachyoides</i> CHAM. & SCHLTDL.....	20
2.2.1	Classificação taxonômica	20
2.2.2	Sinônimos e nomes populares.....	20
2.2.3	Distribuição geográfica	21
2.2.4	Habitat	22
2.2.5	Uso Popular	22
2.2.6	Resultados prévios de <i>Buddleja stachyoides</i>	22
2.3	<i>Aedes aegypti</i>	23
2.4	ALELOPATIA.....	26
2.5	PROCESSO INFLAMATÓRIO.....	28
2.6	NOCICEPÇÃO.....	32
2.7	ÓXIDO NÍTRICO	33
2.8	PROTEÇÃO GÁSTRICA E MOTILIDADE GASTROINTESTINAL	35
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	39
3.1	MATERIAL VEGETAL	40
3.2	EXTRATOS E FRAÇÕES.....	41
3.2.1	Obtenção dos extratos alcoólicos brutos	41
3.2.2	Obtenção das frações.....	42
3.2.3	Rendimento dos extratos e frações	42
3.3	ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE COMPOSTOS	43
3.3.1	Purificação das frações	43
3.3.2	Purificação dos isolados	43
3.3.3	Identificação dos compostos.....	44

3.4	VALIDAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO PARA QUANTIFICAÇÃO DO MARCADOR VERBASCOSÍDEO	45
3.5	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE LARVICIDA DOS EXTRATOS E FRAÇÕES DAS PARTES AÉREAS E RAÍZES DE <i>Buddleja stachyoides</i> SOBRE <i>Aedes aegypti</i>	47
3.6	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ALELOPÁTICA	48
3.6.1	Preparo do teste	48
3.6.2	Teste de Germinação	48
3.6.3	Teste de Crescimento.....	49
3.7	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE	49
3.7.1	Ensaio de captura do ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$).....	49
3.7.2	Ensaio de captura do radical óxido nítrico (NO^{\cdot}).....	50
3.8	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE FARMACOLÓGICA	50
3.8.1	Animais	50
3.8.2	Nocicepção induzida por formalina	51
3.8.3	Nocicepção induzida por ácido acético.....	51
3.8.4	Avaliação da atividade locomotora	52
3.8.5	Edema de pata induzido por carragenina	52
3.8.6	Peritonite induzida por carragenina	53
3.8.6.1	Contagem dos leucócitos peritoneais	53
3.8.7	Avaliação da atividade gastroprotetora.....	53
3.8.8	Avaliação da motilidade gastrointestinal	54
3.8.9	Avaliação da toxicidade subcrônica.....	55
3.8.9.1	Análise histológica dos rins e fígado.....	55
3.9	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	56
4	RESULTADOS	58
4.1	RENDIMENTO DOS EXTRATOS E FRAÇÕES	58
4.2	ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE COMPOSTOS	58
4.3	VALIDAÇÃO DE MÉTODO ANALÍTICO PARA QUANTIFICAÇÃO DO MARCADOR VERBASCOSÍDEO	68
4.4	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE LARVICIDA DOS EXTRATOS E FRAÇÕES DAS PARTES AÉREAS E RAÍZES DE <i>Buddleja stachyoides</i> SOBRE <i>Aedes aegypti</i>	73

4.5	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ALELOPÁTICA	75
4.5.1	Teste de Germinação	75
4.5.2	Teste de Crescimento.....	79
4.6	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE	86
4.6.1	Ensaio de captura do ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$).....	86
4.6.2	Ensaio de captura do radical óxido nítrico (NO^{\cdot}).....	87
4.7	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE FARMACOLÓGICA	90
4.7.1	Nocicepção induzida por formalina.....	90
4.7.2	Nocicepção induzida por ácido acético.....	92
4.7.3	Avaliação da atividade locomotora	94
4.7.4	Edema da pata induzido por carragenina	95
4.7.5	Peritonite induzida por carragenina	96
4.7.6	Avaliação da atividade gastroprotetora.....	100
4.7.7	Avaliação da motilidade gastrointestinal	104
4.7.8	Avaliação da toxicidade subcrônica.....	106
4.7.8.1	Análise histológica dos rins e fígado.....	113
5	CONCLUSÃO.....	115
5.1	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	117
	REFERÊNCIAS.....	118
	ANEXO I - AUTORIZAÇÃO DE ACESSO AO PATRIMÔNIO GENÉTICO	135
	ANEXO II - CERTIFICADO DO COMITÊ DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS	136

1 INTRODUÇÃO

O Brasil é responsável pela gestão do maior patrimônio de biodiversidade do mundo, com cerca de 46 mil espécies catalogadas e conta com ampla tradição do uso das plantas medicinais, sendo transmitida através de gerações. (FLORA DO BRASIL, 2016). Apesar da riqueza da flora brasileira, nos últimos vinte anos o número de pesquisas sobre plantas medicinais tem crescido apenas 8% anualmente. (FONSECA, 2012).

No ano de 2006, foram criadas a Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares (PNPIC) no Sistema Único de Saúde (SUS), aprovada pela Portaria nº 971 do Ministério da Saúde (MS) de 3 de maio, e a Política Nacional de Plantas Mediciniais e Fitoterápicos (PNPMF), através do Decreto nº 5.813, de 22 de junho. (FIGUEREDO et al., 2014). Essas políticas têm o intuito de ampliar as opções terapêuticas oferecidas aos usuários do SUS e garantir o acesso às plantas medicinais, fitoterápicos e outros serviços relacionados, tais como a homeopatia, a medicina tradicional chinesa/acupuntura, o termalismo/crenoterapia e a medicina antroposófica, com segurança, eficácia e qualidade. (BALBINO, 2010).

As políticas instituídas são importantes para possibilitar o acesso de toda população brasileira às práticas fitoterápicas e a padronização da mesma. (OSHIRO et al., 2016). Uma das diretrizes PNPMF é incentivar a formação e a capacitação de recursos humanos para o desenvolvimento de pesquisas, tecnologias e inovação em plantas medicinais e fitoterápicos. (OLIVEIRA; ROPKE, 2016). Ainda assim, algumas espécies vegetais não possuem estudos clínicos para comprovação da segurança e eficácia. (OSHIRO et al., 2016).

A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) que regulamenta o registro e venda dos medicamentos fitoterápicos no Brasil, tem sido cada vez mais exigente com as indústrias farmacêuticas. A obtenção de registro torna-se possível a partir da comprovação de segurança e eficácia de fitoterápicos por meio de estudos pré-clínicos e clínicos, por dados de literatura, por registro simplificado ou por tradicionalidade. A resolução RDC nº 26, de 13 de maio de 2014, dividiu os fitoterápicos em duas classes: medicamento fitoterápico e produto tradicional fitoterápico. Esta última classe de medicamentos foi criada pela ANVISA com o intuito de deixar claro à população se o produto utilizado passou por testes clínicos

de segurança e eficácia ou se foi aprovado por tempo de uso tradicional seguro e efetivo. (BRASIL, 2014).

As legislações específicas para fitoterápicos estão constantemente sendo atualizadas, justamente, com o intuito de padronizar os diversos produtos a base de plantas disponíveis no mercado. A ANVISA elaborou um Guia de orientação para registro e notificação de medicamentos fitoterápicos, a Instrução Normativa nº 4, de 18 de junho de 2014, a partir dos guias orientativos sobre fitoterápicos publicados pela Organização Mundial de Saúde (OMS) e pelos órgãos reguladores da Austrália (Therapeutic Goods Administration - TGA), do Canadá (Health Canada - HC) e da Comunidade Europeia (European Medicines Agency - EMA). (BRASIL, 2014).

Os riscos de uso e toxicidade de medicamentos obtidos com plantas parecem ser insignificantes, entretanto são preocupantes à saúde pública. Portanto, faz-se necessário o emprego correto das plantas com fins terapêuticos pela população em geral, o que requer estudos químicos e/ou farmacológicos, oferecendo suporte para a sua utilização segura. (BALBINO, 2010).

O gênero *Buddleja* já foi amplamente estudado e possui algumas atividades farmacológicas importantes. (MAHLKE, 2007). Porém, até o momento, a espécie *Buddleja stachyoides* possui escassos estudos e compostos isolados. O fenilpropanoide glicosilado verbascosídeo [2 - (3,4-dihidroxifeniletíl)-1-O- α -l-ramnopiranosil-(1 \rightarrow 3)- β -d-(4-O-cafeil)-glucopiranosídeo] isolado por Oliveira (2012), é o composto majoritário da espécie e possui propriedades biológicas incluindo antioxidante, anti-inflamatória, antinociceptiva, fotoprotetora e quelante, além de inibir a enzima prolil oligopeptidase (POP) e interagir com membranas fosfolipídicas. (GITZEL FILHO et al., 2012). Estudos anteriores com a espécie *Buddleja stachyoides* (OLIVEIRA, 2012) demonstraram potencial antioxidante das frações acetato de etila e hexânica das partes aéreas, quando avaliadas através dos métodos formação do complexo fosfomolibdênio, redução do radical DPPH e teste com espécies reativas do ácido tiobarbitúrio. Os extratos e frações das partes aéreas e raízes não apresentaram toxicidade frente ao microcrustáceo *Artemia salina* e nem atividade hemolítica significativa. Devido ao interesse quimiotaxonômico da família e aos resultados promissores, torna interessante a realização de isolamento de novas substâncias e avaliação das atividades biológicas e, principalmente, farmacológicas.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo Geral

Realizar o estudo fitoquímico, das atividades biológicas e farmacológicas das partes aéreas da espécie vegetal *Buddleja stachyoides* Cham. & Schltdl. (Scrophulariaceae).

1.1.2 Objetivos Específicos

- a) Isolar e identificar por RMN os compostos das frações das partes aéreas e raízes de *B. stachyoides*.
- b) Validar o método analítico para quantificação do marcador verbascosídeo presente no extrato bruto das partes aéreas de *B. stachyoides* por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC ou CLAE).
- c) Avaliar a atividade larvicida dos extratos brutos e frações das partes aéreas e raízes de *B. stachyoides* sobre *Aedes aegypti*.
- d) Avaliar o potencial alelopático dos extratos brutos e frações das partes aéreas e raízes de *B. stachyoides* sobre as sementes de alface (*Lactuca sativa* L.) e cebola (*Allium cepa* L.).
- e) Avaliar o potencial antioxidante dos extratos brutos das partes aéreas e raízes de *B. stachyoides* em inibir os ânions superóxido e óxido nítrico.
- f) Avaliar o potencial farmacológico do extrato bruto das partes aéreas de *B. stachyoides* através dos testes: nocicepção induzida por formalina e por ácido acético, edema de pata induzido por carragenina, peritonite induzida por carragenina, avaliação do efeito sobre a atividade locomotora através do teste de campo aberto, avaliação da atividade gastroprotetora e ação sobre a motilidade gastrointestinal em camundongos Swiss.
- g) Avaliar a toxicidade subcrônica do extrato bruto das partes aéreas de *B. stachyoides* e analisar os parâmetros hematológicos, bioquímicos, perda/ganho de peso, peso relativo dos órgãos vitais e histologia dos rins e fígado.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 FAMÍLIA SCROPHULARIACEAE E GÊNERO *Buddleja*

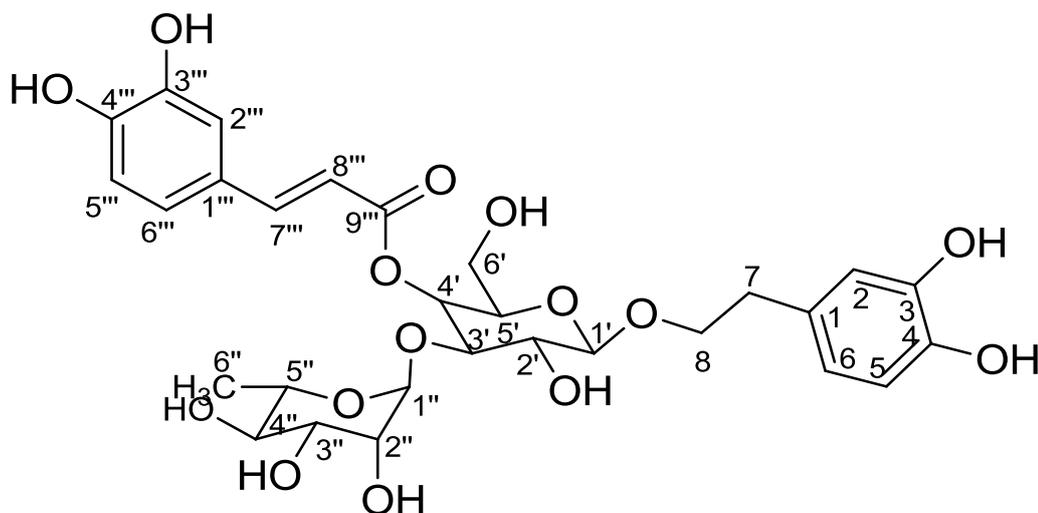
A família Scrophulariaceae possui uma distribuição cosmopolita, sendo composta por cerca de 25 gêneros e 1200 espécies. No Brasil, apenas quatro gêneros a representam, sendo três deles encontrados nas regiões nordeste e central e um na região sul. (MAHLKE, 2007). O nome do gênero *Buddleja* foi dado em homenagem ao botânico inglês Adam Buddle, sendo chamada normalmente de *Buddleia*. É um gênero de distribuição pantropical, presente no sul da Ásia, África e América. (MAHLKE, 2007). Segundo Houghton (1984), as espécies foram divididas em dois grupos de acordo com os tipos florais que apresentam, são chamadas de dióicas as da América e as da África e Ásia são chamadas de monóicas.

2.1.1 Constituição química das espécies do gênero *Buddleja*

As espécies de *Buddleja* apresentam substâncias isoladas como flavonoides (luteolina-7-O-glucosídeo), iridoides (acumbina, p-metoxicinamoil, buddlejosida A₂, catalpol, metilcatalpol, vanililajugol, feruloilajugol, buddjelosida A₁), feniletanoides, fenilpropanoides (verbascosídeo, isoverbascosídeo, leucosceptosídeo A e martinósídeo), sesquiterpenos (buddledinas A-E, dihidrobuddledina A, zerumbona, buddledona A-B, cicloclorenona, hidroxicicloclorenona), diterpenos (buddlejona, deoxibuddlejona, 11,14-dihidroxi-8,11,13-abietatrien-7-ona, maitenona, crocetina monogentiobiose éster) triterpenos (saikosaponina A; 45-48: buddlejasaponina 1-4; 49: mimengosida A; 50: mimengosida B, mistura de α -amyrin e β -amyrin). (MAHLKE, 2007; HOUGHTON, 2003; VERTUANI et al., 2011; BACKHOUSE et al., 2008a).

O fenilpropanoide glicosídeo verbascosídeo [2 - (3,4 dihidroxifeniletíl) - 1 - O - α - l - ramnopiranosil - (1 \rightarrow 3) - β - d - (4-O-cafeil) -glucopiranosídeo], também conhecido como acteosídeo, é o principal constituinte do extrato alcoólico bruto de *Buddleja brasiliensis* Jacq. ex Spreng do Sul do Brasil e sua estrutura química está apresentada na FIGURA 1. (GITZEL FILHO et al., 2012; OLIVEIRA, 2012).

FIGURA 1 – ESTRUTURA DO FENILPROPANOIDE VERBASCOSÍDEO



FONTE: OLIVEIRA (2012)

2.1.2 Atividades biológicas e farmacológicas das espécies do gênero *Buddleja*

Os compostos presentes no gênero *Buddleja* como flavonoides, triterpenoides e carotenoides apresentam atividade anti-inflamatória, além da atividade antioxidante. (HOUGHTON, 2005). Alguns dos compostos isolados têm demonstrado efeito inibidor sobre a geração de eicosanóides, atividades anti-hepatotóxica, antifúngica, antibacteriana e antiprotozoária. (MAHLKE, 2007).

A partir da fração acetato de etila das flores de *B. officinalis*, foram isolados os compostos luteolina e verbascosídeo que apresentaram uma potente atividade antioxidante. (PIAO, 2003). Lee, Woo, e Kang (2005) também avaliaram o composto verbascosídeo isolado de *B. officinalis* que demonstrou uma inibição na atividade enzimática da enzima conversora da angiotensina, podendo ser benéfico em casos de hipertensão arterial. Uma série de estudos *in vitro* indicam claramente que ele tem atividade imunomoduladora, anti-viral e anti-metástase. O verbascosídeo teve efeito protetor contra toxicidade hepática induzida por CCl_4 em fígado de camundongo e diminuiu os níveis de nitrito gerado na decomposição do óxido nítrico (NO). Também foi relatado que este composto inibiu a formação de prostaglandina E_2 , o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e óxido nítrico, além de, suprimir a atividade enzimática da cicloxigenase (COX-2). No estudo de Backhouse et al. (2008a) os compostos luteolina e luteolina-7-O-glucosídeo, isolados de *B. globosa*,

suprimiram a óxido nítrico sintase induzível (iNOS) e COX-2, enzimas responsáveis pela produção de óxido nítrico e liberação de PGE₂, respectivamente, apresentam sua expressão aumentada em tumores de tecidos humanos. (HU; KITTS, 2004). A luteolina demonstrou redução dos níveis de lipopolissacarídeo (LPS) e suprimiu completamente a formação de PGE₂. (HARRIS et al., 2006). Luteolina-7-O-glucosídeo apresentou uma inibição moderada na síntese de tromboxano e leucotrieno, resultando em atividade anti-inflamatória, além de demonstrar atividade antioxidante. (ODONTUYA et al., 2005).

O efeito analgésico de *B. globosa* foi avaliado por Backhouse et al. (2008a) através do teste de contorção abdominal com injeção intraperitoneal de ácido acético. Os animais foram tratados com os diferentes extratos (nas doses de 200, 100, 50 e 25 mg/kg), verbascosídeo (0,05 mmol/kg) e Ibuprofeno (0,07 mmol/kg) e calculadas as doses efetivas média, ou seja, que produziram 50% de antinocicepção (ED50) para cada extrato e droga de referência. Os resultados obtidos foram: extrato etanólico (efeito: 79,8 ± 14%) e (ED50: 53,5 ± 6,0 mg/kg); metanólico (efeito: 85,5 ± 4,2%) e (ED50: n.d); Ibuprofeno (efeito: 50 ± 4,1%) e (ED50: 14,4 ± 4,3 mg/kg) e verbascosídeo (efeito: 67,6 ± 2,3%) e (ED50: n.d); luteolina-7-o-glicosídeo (efeito: 27,0 ± 9,1%) e (ED50: n.d) e, demonstraram que o verbascosídeo foi mais ativo que o ibuprofeno e quase o dobro da luteolina no teste de contorção.

Backhouse et al. (2008b) também avaliou o extrato metanólico de *B. globosa*, na dose de 600 mg/kg, que apresentou atividade anti-inflamatória por via oral (61,4%) e via tópica (56,7%) e ação analgésica por via oral (38,5%), relacionando estes efeitos aos compostos isolados verbascosídeo (1,8%) e luteína 7-o-glicosídeo (1,1%). A interação do verbascosídeo com membranas fosfolipídicas foi avaliada por Funes (2010), o qual observou significativa afinidade desta substância às membranas carregadas negativamente dos compostos de fosfatidil glicerol (PG), promovendo a separação de fase dos domínios lipídicos em membranas de fosfatidilcolina (PC), formando um complexo estável com o lipídio (fosfolipídio/verbascosídeo). Apesar do seu caráter hidrofílico, a porção cafeoil do verbascosídeo foi localizada profundamente no núcleo hidrofóbico da membrana de PC. Também alterou o comportamento de ionização do grupo fosfato PG e interagiu com a superfície das vesículas. A presença do verbascosídeo diminuiu o tamanho da partícula em vesículas unilamelares de PG, através do aumento da área do grupo

da cabeça do fosfolípido. Foi proposta uma localização do verbascosídeo enchendo a região superior do PG nas bicamadas próximas à interface do fosfolípido/água. Os efeitos do verbascosídeo sobre as propriedades físicas das membranas podem contribuir para explicar algumas das suas atividades biológicas como antimicrobiana e antioxidante. (FUNES, 2010).

O extrato metanólico de *B. crispera* mostrou significativa atividade antioxidante e inibitória sobre a enzima 5-lipoxigenase. (AHMAD, 2008).

Vertuani et al. (2011) observou o efeito antioxidante, bastante significativo, do verbascosídeo utilizando vários métodos de determinação. Além disso, a atividade anti-inflamatória do verbascosídeo foi confirmada por um ensaio *in vitro* realizado em culturas de células primárias de queratinócitos humano, em que o verbascosídeo foi capaz de reduzir significativamente, em concentração-dependente, a liberação de quimiocinas pró-inflamatórias. Este estudo também demonstrou que ele promove a melhora e reparação de inflamações na pele, devido à sua atividade seqüestradora das espécies reativas do oxigênio (EROs), antioxidante, quelante de ferro, e propriedade indutora da glutathione transferase (GST). O estudo *in vivo*, conduzido em inflamação da mucosa intestinal, demonstrou que o verbascosídeo é capaz de inibir a ativação de proteínas pró-inflamatórias e, conseqüentemente, a atividade enzimática da matriz metaloproteinase, este último também envolvido nos fenômenos de envelhecimento da pele. Os resultados deste estudo sugeriram que o verbascosídeo tem a função de eliminar os radicais intracelulares, reduzindo os sinais microscópicos e macroscópicos de colite em rato, sendo sua administração benéfica no tratamento de doença inflamatória do intestino. (VERTUANI et al., 2011).

O extrato bruto de *B. brasiliensis* Jacq. ex Spreng, frações e o composto verbascosídeo foram avaliados quanto à inibição das enzimas: acetilcolinesterase (AChE), dipeptidil-peptidase IV (DPP-IV) e prolil oligopeptidase (POP). O composto mostrou uma inibição significativa da POP de uma forma dose-dependente com um valor de IC₅₀ de (1,3 ± 0,2) µM, semelhante ao do controle positivo, baicalin, com uma IC₅₀ de (1,2 ± 3) µM. (GITZEL FILHO et al., 2012). A enzima prolil oligopeptidase (POP) é uma protease que hidrolisa pequenos peptídeos com prolina. A utilização de inibidores da POP aumenta os efeitos neuroprotetores e propicia a melhora cognitiva. (BORGES et al., 2010). Estes compostos são importantes para o

tratamento de condições clínicas, tais como perturbações neuropsiquiátricas e doenças neurodegenerativas. (GITZEL FILHO et al., 2012).

2.2 ESPÉCIE VEGETAL *Buddleja stachyoides* CHAM. & SCHLTDL.

2.2.1 Classificação taxonômica

A espécie vegetal *Buddleja stachyoides* CHAM. & SCHLTDL. pertence à família Scrophulariaceae conforme os sistemas de classificação taxonômica descritos no QUADRO 1.

QUADRO 1 – CLASSIFICAÇÃO TAXONÔMICA DE *Buddleja stachyoides* CHAM. & SCHLTDL

FONTE	CRONQUIST (1981)	APG III (2009)
Reino	Plantae	Plantae
Divisão	Magnoliophytae	Magnoliophytae
Classe	Magnoliopsida	Magnoliopsida
Ordem	Scrophulariales	Lamiales
Família	Scrophulariaceae	Scrophulariaceae
Gênero	<i>Buddleja</i>	<i>Buddleja</i>
Espécie	<i>Buddleja stachyoides</i>	<i>Buddleja stachyoides</i>

FONTE: LOHMUELLER (2012)

2.2.2 Sinônimos e nomes populares

As sinônimas da espécie são *Buddleja brasiliensis* Jacq ex Spreng. *Buddleja australis* Vell., *Buddleja albotomentosa* R. E. Fr., *Buddleja otophylla* Hassk. (LORENZI, 2008). Popularmente é conhecida como barbasco ou verbasco em quase todo o Brasil, tingui-da-praia no Ceará, cezarina em Minas Gerais, carro-santo em Mato - Grosso, calção-de-velho e verbasco-do-brasil na Bahia, de acordo com Ferreira (1988) e, ainda barbasco-do-brasil, barrasco, barasco, barbaço, calça-de-velha, flor-de-verbasco, oassoma, vassoura, vassourinha, verbasci, verbasso, segundo Lorenzi (2008).

2.2.3 Distribuição geográfica

A espécie *Buddleja stachyoides* concentra-se na América do Sul, principalmente nos países: Brasil, Argentina, Bolívia e Paraguai, conforme ilustrado na FIGURA 2. (GWANNON, 2011).

FIGURA 2 – DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA DA ESPÉCIE *Buddleja stachyoides* NO MUNDO



FONTE: GWANNON (2011)

Esta espécie tem origem nativa, não é endêmica do Brasil, e tem como domínios fitogeográficos: Cerrado, Floresta Atlântica, Pampa. No Brasil, sua distribuição geográfica contempla as regiões Nordeste (Bahia, Alagoas), Centro-Oeste (Distrito Federal), Sudeste (Minas Gerais, Espírito Santo, São Paulo, Rio de Janeiro), Sul (Paraná, Santa Catarina, Rio Grande do Sul), conforme apresentado no mapa de distribuição geográfica visualizado na FIGURA 3. (SOUZA, 2010).

FIGURA 3 – DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA DA ESPÉCIE *Buddleja stachyoides* NO BRASIL



FONTE: SOUZA (2010)

2.2.4 Habitat

Cresce espontaneamente em pastagens e terrenos baldios, onde é considerada planta daninha. (LORENZI, 2008). Segundo Ferreira (1988), a espécie *Buddleja stachyoides* apresenta ocorrência em campos sujos, matas ciliares, cultivados, orlas de matas, beira de córregos, de estradas, de brejos, lugares abertos, terrenos baldios, campo seco, pastos, restinga e lugares rochosos.

2.2.5 Uso Popular

As propriedades atribuídas para a espécie *Buddleja stachyoides* são: emoliente, anti-helmíntica, sudorífera, anti-hemorroidal, antiartrítica, expectorante, calmante, béquica (acalma a tosse) e analgésica. Em animais é utilizada para lavar os olhos e tratar pisaduras (feridas) de eqüinos. (MAHLKE, 2007; LORENZI, 2008). A etnofarmacologia registra que o chá feito com as cascas é empregado para tratar males dos pulmões, enquanto que suas raízes são usadas contra envenenamento por picadas de cobras. O decocto de pedaços da planta toda em um litro de água é usado em forma de banhos, indicado em casos de contusões, machucaduras e dores em geral. A infusão desta planta na dose de 3 a 4 xícaras por dia é utilizada contra afecções catarrais, gripe forte, bronquites e tosses. Esta planta é considerada tóxica para peixes, e talvez para o ser humano, caso seja usada excessivamente. (LORENZI, 2008).

2.2.6 Resultados prévios de *Buddleja stachyoides*

Oliveira (2012) avaliou a atividade antioxidante dos extratos e frações das partes aéreas e raízes de *B. stachyoides*. Na atividade antioxidante por formação do complexo fosfomolibdênio, pode-se concluir que a fração acetato de etila das partes aéreas e a fração hexano das raízes apresentaram maior atividade antioxidante, sendo cerca de 40% em relação à vitamina C, e em relação à rutina apresentaram atividade muito superior cerca de 80%. No teste de redução do radical DPPH [2,2-difenil-1-picril-hidrazil], a fração acetato de etila das partes aéreas apresentou significativa atividade antioxidante, sendo estatisticamente igual ao padrão de rutina.

Quanto à capacidade de inibição da peroxidação lipídica (teste com espécies reativas do ácido tiobarbitúico [TBARS]) as amostras do extrato alcoólico bruto e frações (acetato de etila e hexano) das partes aéreas de *B. stachyoides* foram semelhantes ao padrão BHT (Butilhidroxitolueno). O verbascosídeo presente em maior concentração na fração acetato de etila pode ser o principal responsável pela atividade antioxidante em potencial, já na fração hexano essa atividade pode estar relacionada à presença de carotenoides.

A atividade antimicrobiana foi observada através do método de microdiluição. A fração acetato de etila na concentração de 400 µg/mL das partes aéreas inibiu em 24 horas o crescimento do microrganismo *Staphylococcus aureus* e a fração remanescente na concentração de 400 µg/mL das partes aéreas inibiu o crescimento do microrganismo *Escherichia coli*. (OLIVEIRA, 2012).

Os extratos brutos e frações não apresentam toxicidade frente ao microcrustáceo *Artemia salina*, pois todas as amostras apresentaram um valor de CL₅₀ superior a 1000 µg/mL, evidenciando baixa toxicidade das amostras.

Na atividade hemolítica testada com suspensão de sangue de carneiro 2% e difusão em ágar pelo método antibiograma, as frações clorofórmio das partes aéreas e hexânica das raízes apresentaram atividade hemolítica a partir das concentrações 0,05 mg/mL e 0,1 mg/mL, respectivamente. Essa atividade deve-se provavelmente à presença de saponinas descrita na literatura e evidenciada no ensaio sistemático fitoquímico. (OLIVEIRA, 2012).

Algumas das atividades biológicas estudadas e o processo de extração de *B. stachyoides* foram patenteados no Instituto Nacional de Propriedade Industrial (INPI), depósito de patente nº BR10 2012 030720-0 A2.

2.3 *Aedes aegypti*

A dengue é considerada uma das principais arboviroses do mundo. A patologia caracteriza-se por febre aguda, com amplo espectro de manifestações clínicas, que podem ser graves e letais. Estima-se que 50 a 100 milhões de pessoas, sejam infectadas anualmente, o que reflete em um grave problema de Saúde Pública, em nível mundial. (WAHID et al., 2000, WHO, 2012). A principal forma de transmissão dos vírus da dengue é através da picada da fêmea do *A.*

aegypti infectada. A transmissão da dengue no Brasil vem ocorrendo de forma continuada desde 1986, intercalando-se com a ocorrência de epidemias, normalmente associadas com a introdução de novos sorotipos em áreas anteriormente indenes (áreas reconhecidamente sem transmissão, mas com condições ambientais favoráveis para a transmissão) ou alteração do sorotipo predominante. Em 2013, ocorreu o maior surto, com cerca de 2 milhões de casos notificados. Atualmente, estão circulando no país quatro sorotipos da doença (DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4). (BRASIL, 2016). Considerando a situação epidêmica da dengue no Brasil e as informações já existentes sobre resistência dos vetores a inseticidas, fica evidente a necessidade de se avançar rapidamente na implementação de medidas para retardar os processos de resistência. (SILVA et al., 2015).

O laboratório Sanofi-Aventis Farmacêutica Ltda, até o momento, é a única empresa no país com registro de uma vacina contra a dengue, chamada de Dengvaxia[®]. O tratamento com a vacina inclui três doses, com seis meses de intervalo entre elas e por enquanto, não é distribuída pelo Sistema Único de Saúde (SUS), com exceção do estado do Paraná. (BRASIL, 2016).

A febre amarela (YFV), endêmica nas regiões tropicais da África e da América do Sul, é causada por vírus do gênero *Flavivirus*, pertencente à família Flaviviridae composta por 53 espécies e, transmitida por vetores (mosquitos). (SIMMONDS et al., 2012). O vírus possui um intervalo relativamente curto no hospedeiro para produzir a infecção e é mantido na natureza por meio da transmissão entre primatas (macacos) e mosquitos, principalmente dos gêneros *Haemagogus* e *Aedes*. Os seres humanos são infectados esporadicamente quando picados por mosquitos silvestres que anteriormente se alimentavam de um macaco virêmico (febre amarela silvestre), mas também podem servir de hospedeiro para a transmissão inter-humana, principalmente por *Aedes aegypti* (febre amarela urbana). (MONATH; VASCONCELOS, 2015). As primeiras manifestações da doença são repentinas: febre alta, calafrios, cansaço, dor de cabeça, dor muscular, náuseas e vômitos por cerca de três dias. A forma mais grave da doença é rara e costuma aparecer após um breve período de bem-estar (até dois dias), quando pode ocorrer insuficiência hepática e renal, icterícia (olhos e pele amarelados), manifestações

hemorrágicas e cansaço intenso. A maioria dos infectados se recupera bem e adquire imunização permanente contra a febre amarela. (FIOCRUZ, 2014).

O vírus Zika (ZIKV), também pertence ao gênero *Flavivirus*, é transmitido por mosquitos que estão filogeneticamente relacionados aos outros flavivírus que transmitem: a encefalite japonesa (JEV), Nilo Ocidental (WNV), vírus da dengue (DENV) e da febre amarela (YFV). No ciclo urbano, acredita-se que a transmissão de ZIKV seja mediada predominantemente por dois mosquitos das espécies *Aedes*: *A. aegypti* e *A. albopictus*. No início de 2015, a primeira transmissão autóctone de ZIKV foi detectada no nordeste do Brasil. (CAMPOS et al., 2015; ZAMMARCHI et al., 2015; ZANLUCA et al., 2015). No final do mesmo ano, a atividade da ZIKV expandiu-se para pelo menos 14 estados brasileiros de acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), com estimativa de 440000 - 1300000 casos suspeitos. o número de recém-nascidos com microcefalia aumentou nas áreas afetadas pelo ZIKV até setembro de 2015 e, mais de 4000 casos de microcefalia suspeita foram relatados até fevereiro 2016, embora esses casos possam ter sido mal diagnosticados em alguns casos ou superados. (SONG et al., 2017).

A febre de chikungunya é uma arbovirose causada pelo vírus Chikungunya (CHIKV), da família *Togaviridae* e do gênero *Alphavirus*. A viremia persiste por até dez dias após o surgimento das manifestações clínicas. A transmissão ocorre pela picada de fêmeas dos mosquitos *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus* infectadas pelo CHIKV. Casos de transmissão vertical podem ocorrer quase que, exclusivamente, durante o período de intraparto em gestantes virêmicas e, muitas vezes, provoca infecção neonatal grave e pode, raramente, ocorrer transmissão por via transfusional. Os sinais e os sintomas são clinicamente parecidos com os da dengue, porém o que a difere são as fortes dores nas articulações. (BRASIL, 2015).

O *A. aegypti* é considerado uma espécie cosmopolita, dada a sua ampla dispersão, sobretudo nas regiões tropicais e subtropicais do globo. No Brasil, a alta incidência desse transmissor deve-se ao acelerado e desordenado processo de urbanização, bem como às condições climáticas e sociais, que favorecem a sua rápida proliferação. (SANTOS et al., 2015).

O controle desse vetor baseia-se, principalmente, no uso de inseticidas sintéticos. Porém, o uso contínuo e indiscriminado desses produtos, pode levar ao desequilíbrio ambiental e toxicidade em mamíferos. Além disso, ações de vigilância

desenvolvidas no Brasil mostram um quadro bastante preocupante de resistência do *A. aegypti* ao larvicida organofosforado Temephos[®], que é o principal meio de destruição das larvas no Brasil. (GARCEZ et al., 2013).

Portanto, o uso de inseticidas para o controle das larvas de *A. aegypti* representa uma possibilidade no combate à essas doenças. As plantas são fontes importantes de substâncias bioativas com estruturas químicas diferentes e com diversas atividades contra insetos. (GARCEZ et al., 2013). Por isso, diversos estudos têm focado em inseticidas de origem botânica como método alternativo por serem biodegradáveis e apresentarem maior seletividade quando comparados aos sintéticos. (SILVA et al., 2015).

2.4 ALELOPATIA

A alelopatia é o efeito direto e/ou indireto de determinada planta sobre outras ao seu redor, via produção e liberação de substâncias químicas para o ambiente. (SOUZA FILHO et al. 1997). Os compostos químicos que possuem atividade alelopática são produzidos pelas plantas e são chamados de aleloquímicos, substâncias alelopáticas, fitotoxinas ou apenas produtos ou metabólitos secundários e, estão presentes nas folhas, flores, frutos, raízes, rizomas, caules e sementes. (GATTI, 2004). De acordo com Harbone (1991; 1997) os metabólitos secundários possuem função defensiva, protegem a planta contra herbívoros, auxiliam no crescimento da planta, atuam como atrativos para polinizadores, feromônio e, além disso, são alelopáticos.

A alelopatia é um mecanismo importante que influencia na dinâmica da população das plantas, sendo responsável por alterações expressivas na densidade, na diversidade e no desempenho das espécies, resultando em alterações na sustentabilidade dos agrossistemas. (KHANH et al., 2005).

Os aleloquímicos, ao serem liberados no ambiente, podem causar diversos efeitos diretos e indiretos sobre as plantas. Os efeitos indiretos causam alterações nas propriedades e características nutricionais do solo como também, nas populações e/ ou atividades de microrganismos, nematoides e insetos. Já os efeitos diretos causam alterações no crescimento e metabolismo dos vegetais. (RIZVI et al.,

1992), incluindo alterações no funcionamento das membranas, na absorção de nutrientes e nas relações hídricas. (RICE, 1984; RIZVI et al., 1992).

As fitotoxinas naturais constituem uma grande reserva de compostos com alto potencial na agricultura, podendo utilizar sítios receptores ainda não explorados por herbicidas sintéticos, servindo, portanto, como modelo na produção de novos herbicidas. (MACIAS et al., 2000).

Além disso, a alelopatia possibilita não só a seleção de plantas que possam exercer certo nível de controle sobre outras espécies indesejáveis, mas também, o estabelecimento de espécies que não sejam fortemente alelopáticas, porém que componham plantações mais equilibradas, com reflexos favoráveis à produtividade e longevidade das mesmas. (SOUZA FILHO et al. 1997).

Muitos estudos relatam que os efeitos dos compostos alelopáticos relacionam-se aos processos fisiológicos da planta receptora e normalmente, agem como inibidores da germinação e do crescimento. (RAWAT et al., 1998; VACCARINI et al., 1999). Nota-se ainda, que a maior parte dos compostos orgânicos que são inibitórios em alguma concentração, tornam-se estimulantes em concentrações menores. (RICE, 1984).

Alelopatia torna-se uma opção atraente e natural para diminuir a nitrificação e melhorar a eficiência do uso de nitrogênio em sistemas agrícolas. Ao incorporar o resíduo de várias culturas no solo os aleloquímicos liberados das raízes das plantas podem ajudar a suprimir o processo de nitrificação, inibindo a atividade das enzimas vitais, tais como amônio monoxigenase e oxidoreductase hidroxilamina e o fenômeno conhecido como inibição biológica da nitrificação. (AMB et al., 2016; SUBBARAO et al., 2006).

Compostos fenólicos e terpenoides podem desempenhar um papel importante na inibição do processo de nitrificação. (WHITE, 1994). Os compostos fenólicos, tais como ácidos cafeico e ferúlico, miricetina, taninos e derivados de taninos, inibem a oxidação de cátion amônio (NH_4^+) para nitrito (NO_2^-) por nitrossomonas. (RICE, 1984). Já os terpenoides melhoraram a imobilização de amônio por organismos do solo, em vez da inibição do processo de nitrificação. (AMB et al., 2016).

As espécies *Lactuca sativa* L. (alface) e *Allium cepa* L. (cebola) são amplamente citadas na literatura como organismos-teste em bioensaios vegetais,

apresentando características vantajosas como germinação rápida e uniforme, crescimento linear em ampla faixa de variação de pH, baixa sensibilidade aos potenciais osmóticos, facilidade de manuseio e acesso, zona meristemática radicular com grande número de células em divisão, número e tamanho cromossômico que facilitam análises citogenéticas, além de alto grau de sensibilidade aos toxicantes. (SANTOS, 2016).

Portanto, a identificação da atividade alelopática em espécies de plantas, cultivadas ou nativas, assume um importante papel ecológico, principalmente, em relação ao seu potencial herbicida, a fim de controlar espécies de plantas daninhas, como alternativa ao uso excessivo de agrotóxicos na agricultura, altamente prejudiciais à saúde humana.

2.5 PROCESSO INFLAMATÓRIO

A inflamação ocorre como resposta do tecido à uma injúria celular, causada por um agente lesivo (físico, biológico ou químico). Uma complexa cascata de eventos bioquímicos e celulares está envolvida no processo inflamatório, como por exemplo, extravasamento de fluídos, ativação enzimática, migração celular, liberação de mediadores, sensibilização e ativação de receptores, lise tecidual e de reparo. (CARVALHO; LEMÔNICA, 1998). Tais eventos levam ao aparecimento dos sinais: inchaço, vermelhidão, calor, dor e perda de função. (WHITE, 1999).

A resposta inflamatória é dividida, normalmente, em três fases: a inflamação aguda, a resposta imune e a inflamação crônica. (KATSUNG, 1998). A inflamação aguda está relacionada à resposta inicial à lesão tecidual, sendo mediada pela liberação de autacóides e, geralmente, precede o desenvolvimento da resposta imune. (WANMACHER; FERREIRA, 1995). Segundo Alle e Alle-Filho (1992), a resposta imune ocorre quando as células imunologicamente competentes são ativadas, como uma forma de defesa contra organismos estranhos ou substâncias antigênicas, liberadas durante a resposta inflamatória aguda ou crônica.

Como a resposta inflamatória aguda protege o hospedeiro ao conter organismos estranhos, grande parte dos fármacos podem causar sérios efeitos colaterais indesejados, como a supressão imune. A inflamação descontrolada é considerada fisiopatológica e está associada a muitas doenças. A resposta

inflamatória, quando auto limitada, produz uma superfamília de mediadores químicos que estimulam a resolução da resposta. (SERHAN, 2017). Durante a fase de resolução da inflamação são biossintetizados mediadores lipídicos, tais como resolvinas, protectinas, lipoxinas e maresinas que estimulam e aceleram a resolução através de diferentes mecanismos no tecido lesionado, evitando assim a evolução do processo inflamatório agudo para crônico. As lipoxinas (A4 e B4) são derivados de ácidos graxos endógenos como, por exemplo, o ácido araquidônico, e são responsáveis por inibir a infiltração de neutrófilos polimorfonucleares além de estimular o recrutamento de macrófagos para o tecido lesado. (FREIRE; DYKE, 2013). Esses mediadores promovem a resolução da inflamação, depuração de microrganismos, redução da dor e promoção da regeneração tecidual através de novos mecanismos. Portanto, é hora de desafiar as práticas atuais de tratamento, usando inibidores, antagonistas e agonistas para testar a farmacologia de resolução. (SERHAN, 2017).

A inflamação crônica surge a partir da desregulação dos mecanismos de restauração dos tecidos e estímulos inflamatórios persistentes, tornando-se fatores importantes na progressão de doenças crônicas de origem inflamatória, como por exemplo, artrite e aterosclerose. (SILVA, 2015). A dor crônica, em algumas situações, pode estar associada à inflamação crônica na qual o tecido é lesionado e ocorre uma estimulação constante dos nociceptores. (DRAY, 1995).

Os macrófagos e os leucócitos polimorfonucleares recrutados pelos sítios das células lesionadas possuem um papel importante no desenvolvimento do processo inflamatório mediante a liberação de fatores solúveis de regulação, durante a fase aguda, conhecidos como citocinas, destacando-se a liberação de interleucina-1 (IL1- β), interleucina-6 (IL-6) e fator de necrose tumoral alfa (TNF- α). (AKIRA, 1990).

Katsung (1998) relata que a estimulação das membranas dos neutrófilos produz radicais livres derivados do oxigênio. O ânion superóxido é formado pela redução do oxigênio molecular, podendo estimular a produção de outras moléculas reativas, como peróxido de hidrogênio e radicais hidroxilas. A interação destas substâncias com o ácido araquidônico resulta na formação de substâncias quimiotáticas, perpetuando, assim, o processo inflamatório.

As espécies reativas de oxigênio (EROs) que incluem peróxido de hidrogênio, superóxido e hidroxilas são produtos de reações celulares com transferência de elétrons e são importantes na regulação do número de genes nas atividades de transcrição. Normalmente as EROs são reguladas pela atividade antioxidante da superóxido dismutase e catalase. Durante uma isquemia, na qual ocorre uma rápida vasoconstrição em resposta à injúria tecidual, as concentrações de EROs diminuem a níveis fisiologicamente baixos e ocorre uma diminuição da atividade antioxidante. Então a reperfusão tecidual cria um estresse oxidativo no qual espécies reativas de oxigênio e nitrogênio são produzidas em abundância, promovendo a indução de um grande número de fatores transcricionais, como NF- κ B, dímero fos/jun e prolina ativadora 1 (AP-1), bem como perda dos estoques energéticos celulares, rompimento de mitocôndrias com liberação de enzimas líticas, peroxidação, destruição de membranas e dano em DNA. (DRAY, 1995).

Estes fatores de transcrição estimulam produção de uma segunda onda de produtos gênicos que codificam enzimas com capacidade de eliminar radicais livres (catalase), com atividade de reparo tecidual (colagenase, estromelina), bem como a produção de citocinas, receptores de superfície celular, moléculas de adesão, fatores de crescimento e de outros mediadores inflamatórios. (DRAY, 1995).

Estes mediadores químicos liberados por células não-neuronais, como fibroblastos, mastócitos, neutrófilos e plaquetas, são capazes de alterar o mecanismo de transdução periférica do estímulo nociceptivo, causando uma excitabilidade neuronal, e conseqüentemente, uma hiperalgesia. Isto ocorre através da interação com canais iônicos presentes nos terminais nociceptivos, ou por ligação a receptores específicos, ativando cascatas de sinalização intracelular mediadas por segundos mensageiros. (JULIUS; BASBAUM, 2001). Alguns exemplos de receptores, presentes nas fibras sensoriais primárias, capazes de interagir com os mediadores inflamatórios incluem receptores acoplados a proteína G (GPCRs), canais iônicos de potencial transitório (TRPs), canais iônicos sensíveis a ácido (ASICs) e receptores de tirosina quinase (TrK). (BASBAUM *et al.*, 2009).

A etapa inicial da cascata do ácido araquidônico, da qual originam-se as prostaglandinas, é catalisada por cicloxigenases e existem duas formas distintas (COX-1 e COX-2). A COX-1 está presente nas células em condições fisiológicas e está relacionada com funções fisiológicas nos vasos sanguíneos, estômago e rins.

A COX-2 é induzida por células expostas aos agentes pro-inflamatórios. (CARVALHO; LEMÔNICA, 1998).

Os anti-inflamatórios não-esteroides (AINES) são drogas que inibem as enzimas COX-1 e COX-2. A administração oral destes anti-inflamatórios causa lesões ulcerativas na mucosa gástrica, devido a sua ação inibitória sobre a COX-1, a qual é responsável pela produção de prostaglandinas e estas possuem um papel protetor da mucosa do estômago. Já seu efeito anti-inflamatório está relacionado à inibição da COX-2 que está envolvida nos processos inflamatórios e dor. (KIM et al., 2004).

Diversas drogas têm sido desenvolvidas como inibidores da 5-lipoxigenase (5-LO), resultando no bloqueio da formação dos leucotrienos ou como antagonistas do receptor dos leucotrienos. As prostaglandinas e os leucotrienos quando liberados exercem papel fundamental na gênese dos sinais e sintomas do processo inflamatório. As prostaglandinas (PG) são produzidas em neurônios e vasos do sistema nervoso central (SNC) possuem funções centrais, incluindo o controle do ciclo do sono e despertar, geração de febre e transmissão de dor. As prostaglandinas e citocinas (interleucina-6) estão envolvidas na fisiopatologia de algumas doenças degenerativas cerebrais, tais como, esclerose múltipla e doença de Alzheimer. (FIEBICH et al., 1997; CARVALHO; LEMÔNICA, 1998).

Os leucotrienos (LTB₄) e seus metabólitos são responsáveis por uma variedade de efeitos, entre eles a contração da musculatura lisa, aumento da permeabilidade vascular, atividade sobre linfócitos e hiperalgesia. (RANG et al., 1994).

A bradicinina está relacionada com a liberação de prostaglandinas, citocinas (interleucina-1 β e TNF- α) e radicais livres. As cininas também liberam histamina e outros mediadores inflamatórios que induzem a dor pela estimulação direta dos nociceptores sensibilizados pelas prostaglandinas e citocinas. A hiperalgesia produzida pela bradicinina é mediada pelo TNF- α que estimula a liberação das citocinas IL-1 β e IL-8. Além disso, ativam fibras sensoriais, liberando neuropeptídeos como a substância P que causam sensibilização do nociceptor e hiperalgesia. (DRAY; PERKINS, 1993).

De acordo com Carvalho e Lemônica (1998), existem diversos analgésicos e anti-inflamatórios disponíveis para uso clínico, porém a procura por drogas vegetais

como recurso terapêutico vêm aumentando cada vez mais. Isso se deve à insatisfação com os resultados obtidos em tratamentos convencionais, aos efeitos indesejáveis e prejuízos causados pelo uso abusivo e/ou incorreto dos medicamentos sintéticos, muitas vezes a dificuldade de acesso a estes medicamentos, a consciência ecológica crescente e a crença popular de que os produtos naturais são inofensivos. (HEINZMANN e BARROS, 2007).

Portanto, torna-se interessante a busca por anti-inflamatórios e analgésicos de origem vegetal e, de preferência que inibam simultaneamente a cicloxigenase e lipoxigenase ou, que sejam mais seletivos para a COX-2.

2.6 NOCICEPÇÃO

A Associação Internacional para Estudo de Dor (IASP) define dor como "uma experiência sensorial e emocional desagradável associada ao dano tecidual real ou potencial". (MERSKEY; BOGDUK, 1994). Esta afirmação sugere que a dor é uma experiência subjetiva, que não pode ser facilmente mensurada e requer consciência, separando-a da dor proveniente da nocicepção. A nocicepção é um processo neural que envolve a transdução e transmissão de estímulos nocivos para o cérebro através da via da dor. A dor resultante é uma complexa interação entre sistemas de sinalização, modulação dos centros superiores e percepção única de cada indivíduo. Os nociceptores são receptores dos tecidos que são ativados especificamente por estímulos dolorosos. Esta informação nociva é transduzida pelos receptores por sinal elétrico e transmitido a partir da periferia para o sistema nervoso central ao longo dos axônios. Há dois tipos de nociceptores: a) Mecanoreceptores de alto limiar (HTM), os quais respondem à estimulação mecânica (corte, compressão, alongamento), aquecimento intenso da pele ou exposição à substâncias químicas nocivas; b) Nociceptores polimodais (PMN), os quais respondem a uma variedade de mediadores prejudiciais aos tecidos: íons de hidrogênio, 5-hidroxitriptamina (5-HT), citocina, bradicinina, histamina, prostaglandinas, leucotrienos. (STEEDS, 2013).

Os nociceptores estão ligados às fibras finas mielinizadas (A δ) e não mielinizadas (C) que terminam no corno dorsal da coluna vertebral. A nocicepção pode ocorrer na ausência de consciência de dor e dor pode ocorrer na ausência de

estímulos nocivos mensuráveis. A percepção da dor ocorre quando a estimulação dos nociceptores é suficientemente intensa para ativar as fibras de A δ , resultando em uma experiência subjetiva de dor aguda. À medida que a força do estímulo aumenta, as fibras C são recrutadas e o indivíduo experimenta uma dor intensa e ardente que continua após término do estímulo. Estes tipos de experiências ocorrem durante as duas fases da percepção da dor que ocorrem após uma lesão aguda. A primeira fase, que não é particularmente intensa, vem imediatamente após o estímulo doloroso e é conhecida como dor rápida. A segunda fase, conhecida como dor lenta, é mais desagradável, e ocorre com maior atraso. (GARLAND, 2012).

Os mediadores inflamatórios banham os nociceptores, ativando-os e sensibilizando-os. As prostaglandinas e a bradicinina sensibilizam e ativam os nociceptores por estímulos de baixa intensidade. Histamina e serotonina (5-HT) causam dor quando aplicados diretamente às terminações nervosas. Os íons de hidrogênio e 5-HT atuam diretamente sobre os canais iônicos nas membranas celulares, mas a maioria se liga a receptores de membrana e ativam segundos mensageiros via proteína G. (STEEDS, 2013).

A ação dessas moléculas sobre os nociceptores resulta na transmissão de sinais aferentes para o corno dorsal da medula espinhal, iniciando a inflamação neurogênica. (LOESER; MELZACK, 1999). A inflamação neurogênica é o processo pelo qual os nociceptores ativos liberam neurotransmissores como a substância P do terminal periférico para induzir vasodilatação, vazamento de proteínas e fluidos no espaço extracelular próximo à extremidade terminal do nociceptor e estimulam células imunes que contribuem para a sopa inflamatória. Como resultado dessas alterações neuroquímicas no ambiente local dos nociceptores, aumenta a ativação das fibras (A δ e C) e, ocorre a sensibilidade periférica. (BESSON, 1999).

2.7 ÓXIDO NÍTRICO

O óxido nítrico (NO) resulta da oxidação de um dos dois nitrogênios guanidino da L-arginina, que é convertida em L-citrulina. (MONCADA, 1991). Esta reação é catalisada pela enzima óxido nítrico sintase (NOS) que possui duas isoformas: a NOS constitutiva (cNOS), dependente de íons cálcio (Ca⁺⁺) e de calmodulina, que está envolvida na sinalização celular; e a isoforma II ou óxido

nítrico sintase induzida (iNOS) que é induzida por citocinas e lipopolissacarídeos, no endotélio e musculatura lisa vascular, e não é regulada por cálcio. (FÖRSTERMANN et al., 1994). Existem dois tipos de isoforma constitutiva: a NOS neuronal (nNOS, tipo I), presente normalmente nos neurônios, e a NOS endotelial (eNOS, tipo III), presente normalmente nas células endoteliais vasculares e nas plaquetas. (TRACEY et al., 1993; MONCADA, 1991; RADOMSKI et al., 1990).

O óxido nítrico sintetizado pela eNOS é importante no processo de relaxamento do vaso sanguíneo. Em condições fisiológicas, o relaxamento vascular ocorre quando receptores da membrana das células endoteliais são ativados por estímulos solúveis (acetilcolina, bradicinina, adenosina difosfato, substância P, serotonina e outros) ou quando há um aumento do atrito exercido pelas células circulantes sobre a camada endotelial, levando à ativação da eNOS presente nestas células e, conseqüentemente, à produção de NO. (BUSCONI; MICHEL, 1993).

Um mecanismo provável de regulação da produção de NO *in situ* e da sua atividade biológica é a ação do agonista bradicinina que faz com que ocorra a fosforilação da eNOS, levando à sua translocação para o citosol. (MICHEL et al., 1993).

O óxido nítrico produzido pela ativação da iNOS possui ação citotóxica e citostática, promovendo a destruição de microrganismos, parasitas e células tumorais. A citotoxicidade do NO é resultado de sua ação direta, quando o mesmo reage com metais, principalmente o ferro, presentes nas enzimas alvo. (JAMES, 1995; MONCADA, 1991), ocorrendo inativação de enzimas cruciais do ciclo de Krebs, da cadeia de transporte de elétrons, da síntese de DNA e do mecanismo de proliferação celular. A ação citotóxica indireta do NO consiste, principalmente, na sua reação com os intermediários do oxigênio, secretados em processos inflamatórios por macrófagos, neutrófilos e células endoteliais. Essa ação tóxica entre o NO e ânion superóxido (O_2^-) resulta na formação de peroxinitrito ($ONOO^-$), um poderoso oxidante de proteínas. O $ONOO^-$ pode, posteriormente, protonar-se na presença de íon hidrogênio (H^+), originando o radical hidroxila ($HO\cdot$) altamente reativo e tóxico. (BECKMAN; KOPPENOL, 1996). A célula produtora de NO e as células ao redor também são afetadas pela toxicidade dessa molécula, podendo ser destruídas. Portanto, o NO contribui para algumas condições patológicas, tais como:

asma, artrite reumatóide, lesões ateroscleróticas, esclerose múltipla, Alzheimer e gastrite induzida por *Helicobacter pylori*. (HAMID et al., 1993; DUSSE et al., 2003).

A enzima superóxido dismutase (SOD) é induzida pelo NO produzido pela isoforma eNOS, na camada muscular do vaso e extracelular, diminuindo o O_2^- disponível e, conseqüentemente, a produção de $ONOO^-$. A síntese de ferritina também é induzida pelo NO, que se liga a íons ferro livres e previne a geração de O_2^- . Porém, na presença da placa aterosclerótica, os macrófagos ativados produzem O_2^- , expressam iNOS e produzem NO. Portanto, são produzidos $ONOO^-$ e OH^\cdot , comprometendo, ainda mais, a integridade tissular, levando à ativação da coagulação e contribuindo para a obstrução da luz vascular. (WOLIN, 2000).

O óxido nítrico está relacionado com diversas funções, como por exemplo, no cérebro participa do aprendizado e da memória; no trato gastrointestinal medeia o relaxamento não adrenérgico e não colinérgico da musculatura longitudinal e circular do esfíncter esofágico, estômago, duodeno, intestino delgado e esfíncter anal interno; no sistema respiratório, é liberado pelos nervos da musculatura lisa bronquiolar para mediar o controle neurogênico da broncodilatação; no sistema circulatório, especificamente na coagulação sanguínea, possui propriedades antitrombóticas resultantes em parte da inibição da adesão e agregação plaquetária; nos vasos sanguíneos, exerce função na modulação do diâmetro e resistência vascular pela sua habilidade em relaxar o músculo liso vascular. (CERQUEIRA et al., 2002).

2.8 PROTEÇÃO GÁSTRICA E MOTILIDADE GASTROINTESTINAL

Nas últimas décadas, distúrbios gastrointestinais tais como úlceras pépticas, refluxo gastroesofágico, gastrite, doenças inflamatórias intestinais (doença de Crohn e colite ulcerativa) e constipação intestinal têm assumido altas proporções na população, tornando-se importantes focos de investigação experimental e clínica na procura por novos tratamentos. (POTRICH et al., 2014). A úlcera gastrointestinal é uma doença bastante comum e, se não tratada pode levar ao câncer. Uma variedade de fatores endógenos e exógenos podem ser causadores da úlcera gástrica, que incluem condições de ácido, pepsina e estresse e, agentes nocivos, tais como, anti-inflamatórios não-esteroides (AINES), bactéria *Helicobacter pylori*, o

tabagismo e o consumo de álcool. (SYAM et al., 2009). Esses fatores podem promover a geração de radicais livres que estão relacionados a inúmeras doenças, citadas anteriormente. Estudos científicos têm demonstrado que muitas plantas medicinais com propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias, não só possuem efeito gastroprotetor como também aceleram a cicatrização de úlceras gástricas.

O processo de peroxidação lipídica é mediado por interação de radicais hidroxila com as membranas celulares, conseqüentemente, são produzidos radicais livres derivados de lipídeos, tais como: dienos conjugados e hidroperóxidos lipídicos. Estes radicais são produtos extremamente reativos que causam o dano oxidativo. O etanol aumenta a produção do ânion superóxido, radical hidroxila e peroxidação lipídica na mucosa gástrica. (BAGCHI et al., 1998).

A exposição ao etanol parece induzir o estresse oxidativo, explicando a diminuição da liberação de óxido nítrico, pois o mesmo pode estar sendo desviado para a eliminação de radicais livres. O aumento da expressão da proteína óxido nítrico sintase endotelial pode ser uma resposta ao aumento da demanda de óxido nítrico. (KAY et al., 2000). O óxido nítrico (NO) é um mediador fundamental ao mecanismo de defesa gástrico. (VIANA et al., 2013). Vários estudos têm demonstrado que as lesões induzidas por agentes químicos são diminuídas pela administração ou aumentada pela supressão da via NO. (LOPEZ-BELMONTE et al., 1993). O NO produzido através da eNOS parece ser um dos principais fatores envolvidos na secreção alcalina, secreção de muco, regulação do fluxo sanguíneo gástrico e microcirculação gástrica. (CHANDRANATH et al., 2002; WALLACE, 2006). Do mesmo modo, foi relatado que a eNOS tem participação no efeito gastroprotetor induzido por vários derivados de plantas. (FERREIRA et al., 2008; GOMES et al., 2009).

Antioxidantes intracelulares tais como glutatona e α -tocoferol possuem uma ação protetora das células da mucosa gástrica contra o dano causado pelo etanol, assim como, a superóxido dismutase (SOD), alopurinol (ALP; inibidor da xantina oxidase) e dimetil sulfoxido (DMSO). Sugerindo que radicais livres derivados do oxigênio, superóxido e hidroxila, podem estar envolvidos nesta patogênese. (HIROKAWA et al., 1998; TERANO et al., 1989).

As prostaglandinas são mediadores produzidos por COX-1 e COX-2 e os fármacos clássicos usados no tratamento de úlcera péptica aumentam a produção

de prostaglandinas gastrocitoprotetoras. (WALLACE, 2008; BOTTING, 2006). Acredita-se que as prostaglandinas desempenham um papel central no processo de cicatrização de úlcera, por estarem envolvidas na melhoria da síntese da mucina gástrica, desencadeando a proliferação das células da mucosa, promovendo a angiogênese e induzindo várias outras funções que modulam e regulam a integridade da mucosa gástrica e a secreção de ácido gástrico. (BRZOZOWSKI et al., 2005).

Os fármacos que impedem a progressão da úlcera, agindo como antioxidantes, aumentam a síntese e a secreção do muco gástrico e promovem a síntese de prostaglandinas, acelerando, desta forma, a cicatrização das úlceras. (ADHIKARY et al., 2011).

Vários estudos *in vitro* demonstraram que os flavonoides eliminam radicais hidroxila e peroxila, afetando várias etapas da cascata araquidônica via COX-2 ou 5-lipoxigenase. Em adição a estes efeitos, possuem propriedades de estabilizar membranas, afetam alguns processos do metabolismo e inibem a peroxidação lipídica em diferentes sistemas. Além disso, alguns aumentam a concentração de prostaglandinas e muco na mucosa gástrica, demonstrando efeito citoprotetor. (ALANKO et. al; 1999).

Outra hipótese que explica o dano oxidativo na mucosa gástrica induzido pelo etanol é o efeito constritor em veias e artérias da mucosa gástrica, produzindo congestão, inflamação e lesão tecidual. Essas lesões dependem da dose de etanol e podem ser prevenidas por prostaglandinas (PGI₂), que inibem a motilidade gástrica e aumentam a secreção de muco, protegendo o estômago das espécies reativas de oxigênio. (ARAKI et al., 2000; REPETTO; LLESUY, 2002).

O estudo de Díaz-Rivas et al. (2015) avaliou o efeito gastroprotetor dos extratos de *B. scordioides* Kunth, induzindo a úlcera gástrica com dose única de indometacina (30 mg/kg, v.o.), no qual os resultados apresentaram inibição de COX-2, IL-8 e TNF α , estimulação de COX-1 e moderada inibição de NF κ B.

De acordo com o estudo de Repetto and Llesuy (2002), o efeito gastroprotetor do extrato de *Artemisia douglasiana* e seu isolado dehidroleucodina (DhL) sobre o dano na mucosa gástrica pode ser mediado por liberação local de neuropeptídeos, óxido nítrico e prostaglandinas. Portanto, a inibição da peroxidação lipídica e da COX-2 é um alvo importante na prevenção de úlcera gástrica.

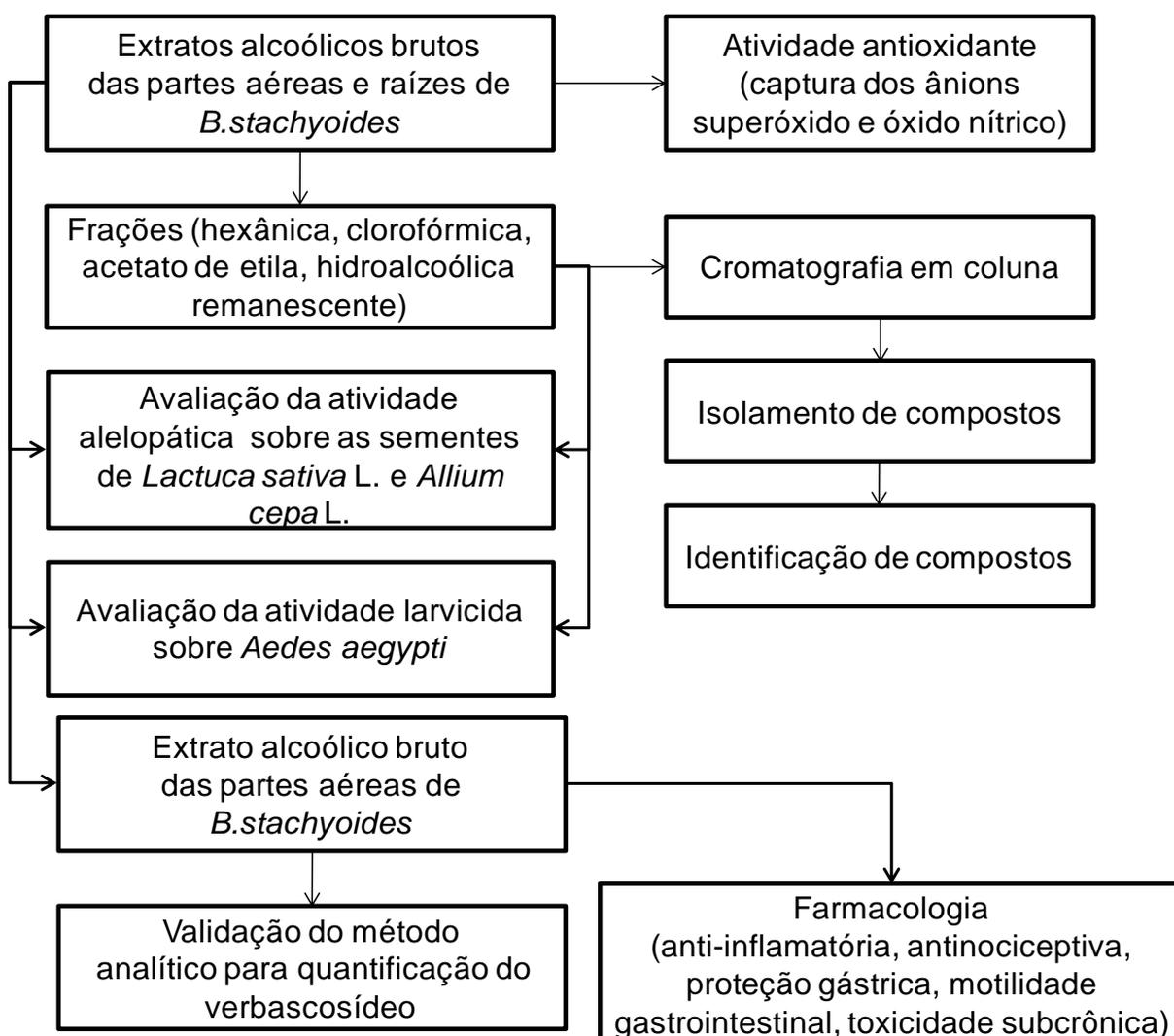
No modelo de motilidade gastrointestinal, o esvaziamento gástrico depende essencialmente do nervo vago, que controla as contrações tônicas, o relaxamento do fundo do estômago e a amplitude das contrações antrais geradas pelo marcapasso gástrico. (JABRI et al., 2017). Os neurotransmissores são os principais moduladores que controlam a motilidade gastrointestinal, tais como taquiquininas (substância P, neuroquinina A), acetilcolina, serotonina (5-HT) e peptídeo liberador de gastrina (GRP) / bombesina. Estes têm efeitos excitatórios sobre a motilidade gastrointestinal, enquanto que os membros do polipeptídeo vasoativo intestinal (VIP), óxido nítrico, GABA e ATP, atuam como neurotransmissores inibitórios. (SHUTTLEWORTH; KEEF, 1995; KUNZE; FURNESS, 1999).

O estudo de Jabri et al. (2017) sugere que o extrato aquoso de *Malva sylvestris* atua sobre a motilidade gastrointestinal estimulando sua função contrátil. Esse efeito estimulador pode ser atribuído aos compostos fenólicos, como o ácido ferúlico que estimulou a produção de prostaglandinas e aumentou a motilidade gastrointestinal.

3 MATERIAL E MÉTODOS

A coleta do material vegetal (item 3.1), extração dos extratos alcoólicos brutos (item 3.2.1), obtenção das frações (item 3.2.2) e rendimentos dos extratos e frações (item 3.2.3) das partes aéreas e raízes de *B. stachyoides* foram obtidos no mestrado de Oliveira (2012) e estão descritos, resumidamente, neste trabalho. Os ensaios apresentados no fluxograma (FIGURA 4) foram realizados com estas amostras.

FIGURA 4 – FLUXOGRAMA DAS METODOLOGIAS REALIZADAS COM *B. stachyoides*



FONTE: O autor (2017)

A espécie *B. stachyoides* possui autorização do Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA) para sua avaliação sob o aspecto morfoanatômico, químico e biológico constante no ANEXO I, realizada de acordo com a resolução do Conselho de Gestão do Patrimônio Genético (CGEN) nº 35, de 27 de abril de 2011.

3.1 MATERIAL VEGETAL

O material vegetal (partes aéreas e raízes) foi coletado no Capão do Cifloma, da Universidade Federal do Paraná, campus Jardim Botânico (25°26'53.7"S 49°14'15.8"W) nos meses de maio e junho de 2011, quando a pesquisa foi iniciada.

A identificação botânica da espécie foi realizada no Herbário do Museu Botânico Municipal da cidade de Curitiba, Estado do Paraná, comparada com a exsicata apresentada na FIGURA 5 e registrada sob o número 339899 *Buddleja stachyoides* CHAM. & SCHLTDL pelo curador Osmar do Santos Ribas. As partes aéreas e raízes coletadas podem ser visualizadas na FIGURA 6.

FIGURA 5 – FOTOGRAFIA DA EXSICATA DE *Buddleja stachyoides* ACERVO Nº 339899



FONTE: OLIVEIRA (2011)

FIGURA 6 – FOTOGRAFIA DE EXEMPLOS DA ESPÉCIE VEGETAL *Buddleja stachyoides*

FONTE: OLIVEIRA (2012)

LEGENDA: A: raízes; B: partes aéreas

3.2 EXTRATOS E FRAÇÕES

3.2.1 Obtenção dos extratos alcoólicos brutos

Da planta seca, estabilizada e triturada, foram pesados 5,97 e 2,39 kg das partes aéreas e raízes, respectivamente. Posteriormente foram extraídos, separadamente, em aparelho de Soxhlet de acordo com Carvalho (2001), patente (PI 0601703-7A).

Foi pesado e introduzido cerca de 2 kg do material vegetal seco no suporte de vidro do aparelho de Soxhlet (contendo uma placa porosa e uma camada de algodão). Sobre este sistema adicionou-se cerca de 8000 mL de etanol 96 °GL para extração. Ao aparelho de Soxhlet modificado (com torneira) foi conectado um

condensador de bolas e um balão de fundo redondo, contendo pérolas de vidro. Este sistema foi levado ao aquecimento em manta aquecedora. Após início do aquecimento, o líquido extrator contido no balão evaporava e condensava a 60°C no condensador de bolas, percorrendo novamente o material vegetal. Quando o menisco do extrato no canal lateral do Soxhlet atingia o ponto de refluxo, o extrato era descarregado no balão por sifonamento e o processo era repetido aproximadamente 10 vezes até o clareamento do líquido contido no canal lateral do Soxhlet. Este procedimento evita a degradação térmica das substâncias contidas no balão, pois a quantidade de líquido extrator é constante no sistema, sendo capaz de solvatar os compostos. (CARVALHO, 2001). Devido a grande quantidade das partes aéreas, o procedimento de extração foi realizado 3 vezes e em seguida foram misturados.

Após o término da extração, foram obtidos os extratos alcoólicos brutos (partes aéreas e raízes), utilizados, posteriormente, para obtenção das frações e realização dos testes. (OLIVEIRA, 2012).

3.2.2 Obtenção das frações

As frações foram obtidas através do método de partição líquido-líquido com solventes (P.A.) de diferentes polaridades: n-hexano, clorofórmio, acetato de etila, utilizando-se aparelho soxhlet conectado ao condensador de bolas e a um balão de fundo chato com pérolas de vidro. O sistema foi levado ao aquecimento em manta aquecedora e deixado sob refluxo por cerca de 12 horas. Durante a partição foi acrescentado ao extrato alcoólico bruto uma quantidade de água destilada para facilitar a separação dos solventes, obtendo-se no final uma fração remanescente. (OLIVEIRA, 2012).

3.2.3 Rendimento dos extratos e frações

Após extração e partição líquido-líquido, os extratos e frações foram concentrados em rotaevaporador e posteriormente, evaporados até a secura em banho-maria à 60°C. Os rendimentos dos extratos brutos e frações foram calculados

em porcentagem, em relação à quantidade de material vegetal seco de partida utilizado na extração e o peso das amostras após a secura. (OLIVEIRA, 2012).

3.3 ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE COMPOSTOS

3.3.1 Purificação das frações

A purificação das frações foi realizada por cromatografia em coluna com fase estacionária sílica gel 60 Merck® (0,063 - 0,200 mm). Cerca de 10 g de cada fração (hexânica, acetato de etila) foi incorporada à sílica gel para a formação da pastilha. Esta pastilha foi submetida à cromatografia em coluna, onde foi feita a eluição da amostra através do sistema de passagem de solventes com gradientes de polaridades crescentes, iniciando-se com 100% de n-hexano P.A., depois uma mistura de hexano e acetato de etila P.A. na proporção 70:30, utilizando acetato de etila como gradiente de polaridade e aumentando o intervalo de 5 em 5% até 100% do mesmo. Em seguida, utilizou-se a mistura acetato de etila e metanol P.A. na proporção 90:10, utilizando metanol como gradiente de polaridade e aumentando o intervalo de 5 em 5% até 100% do mesmo.

3.3.2 Purificação dos isolados

Durante a purificação da fração hexânica das raízes foram coletados 144 alíquotas. Os frascos que apresentaram início de precipitação foram lavados com éter de petróleo, deixados em geladeira por 5 minutos e em seguida, foram centrifugados para separação do precipitado. Dos frascos 49 a 59, obteve-se 8,5 mg de precipitado que foi denominado FHR1.

Na purificação da fração acetato de etila das partes aéreas de *B. stachyoides* foram coletadas 107 alíquotas e durante o processo de secagem, 3 frascos apresentaram sinais de cristalização, que foram centrifugados e reunidos, obtendo-se um precipitado. Este precipitado foi ressuspenso em metanol e cromatografado em cromatoplaça de sílica, utilizando como fase móvel acetato de etila, ácido fórmico e água (90:0,5:0,5) e como revelador ácido difenilbórico 2-aminoetilester em etanol. As bandas separadas foram raspadas e colocadas em

frascos, dissolvidas em metanol e centrifugadas para retirada da sílica. A amostra foi dissolvida em metanol, concentrada e pesada, obtendo-se 4,3 mg do composto denominado FAEPA2.

Uma segunda purificação do composto FAEPA2 foi realizada em HPLC (marca Waters® PDA 996, ELSD 2420; coluna analítica Luna® C18 5 µm 4,6 x 250 mm), sendo 4 mg dissolvidos em 300 µL de metanol e realizadas 4 injeções de 80 µL, com coleta manual do pico, não foi possível pesar a quantidade obtida. Os solventes utilizados no método foram fase A (água destilada + 0,1% ácido fórmico) e fase B (acetonitrila + 0,1% ácido fórmico), de acordo com o gradiente descrito na TABELA 1.

TABELA 1 – GRADIENTE DE ELUIÇÃO DO MÉTODO DA SEGUNDA PURIFICAÇÃO DO COMPOSTO FAEPA2

TEMPO (min)	FASE A (%)	FASE B (%)	FLUXO (mL/min)
0,0	75	25	1,0
20	75	25	1,0
21	0	100	1,0
26	0	100	1,0
27	75	25	1,0

FONTE: O autor (2017)

3.3.3 Identificação dos compostos

Os experimentos de Ressonância magnética nuclear (RMN) foram realizados em um espectrômetro AVANCE III HD 600, operando a 14.1 T, observando os núcleos de ^1H e ^{13}C a 600,13 e 150,90 MHz respectivamente, equipado com uma sonda inversa quadrinuclear de 5 mm com gradiente z. Todos os deslocamentos químicos foram observados em relação ao sinal do TMS, em 0,00 ppm, como referência interna ou em relação ao sinal do solvente. Os espectros de ^1H e ^{13}C $\{^1\text{H}\}$ foram adquiridos com uma janela espectral de ~11 ppm e ~240 ppm, respectivamente. Os espectros de RMN de correlação ^1H - ^{13}C a uma ligação (HSQC) e a longa distância (HMBC) foram otimizados para uma média de constantes de acoplamento $^1J_{(\text{H,C})}$ e $^{\text{LR}}J_{(\text{H,C})}$ de 140 e 8 Hz, respectivamente.

3.4 VALIDAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO PARA QUANTIFICAÇÃO DO MARCADOR VERBASCOSÍDEO

O método analítico para quantificação do marcador verbascosídeo presente no extrato bruto das partes aéreas de *B. stachyoides* foi desenvolvido e validado, utilizando-se o equipamento de HPLC (Merck-Hitashi composto de bomba L7100, degaseificador de solventes L7812, injetor automático L-7200, detector DAD L7455, interface L7000 conectada ao sistema operacional Windows Professional; coluna Phenomenex Gemini-NX 5 μ C-18 110 A, tamanho 250 x 4,6 mm); fase móvel: bomba A – solução aquosa constituída de H₂SO₄ (0,01 M), H₃PO₄ (0,4%) e (C₂H₅)₂NH (0,4%); bomba B - metanol: solução aquosa constituída de H₂SO₄ (0,05 M), H₃PO₄ (2%) e (C₂H₅)₂NH (0,2%); na proporção de 90:10, respectivamente; bomba C - acetonitrila: solução aquosa constituída de H₂SO₄ (0,05 M) e H₃PO₄ (2%), na proporção de 90:10, respectivamente; diluição das amostras: metanol e fase diluente (H₂O + 2% de H₃PO₄). Nas seguintes condições de análise: comprimento de onda 325 nm; temperatura do forno de 35 °C; volume de injeção de 40 μ L; gradiente de fase móvel conforme TABELA 2.

TABELA 2 – GRADIENTE DE ELUIÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO DESENVOLVIDO EM HPLC PARA ANÁLISE DO EXTRATO BRUTO DAS PARTES AÉREAS DE *Buddleja stachyoides*

TEMPO (min)	FASE A (%)	FASE B (%)	FASE C (%)	FLUXO (mL/min)
0,0	100	0	0	1,1
3,0	100	0	0	1,2
5,0	90	7	3	1,2
15,0	81	16	3	1,2
28,0	70	21	9	1,2
36,0	70	21	9	1,2
40,0	59	26	15	1,2
45,0	59	26	15	1,2
47,0	20	65	15	1,2
53,0	20	65	15	1,2
54,0	100	0	0	1,1
60,0	100	0	0	1,1

FONTE: O autor (2013)

A concentração de verbascosídeo nas amostras foi calculada através do sistema interface L7000 conectado ao Windows Professional (equipamento Merck-

Hitashi), considerando a área do pico encontrada, a equação da reta e fatores reais de diluição [Concentração (mg/g) = Área x Fator de diluição x Equação da reta (escalar)].

Os parâmetros avaliados na validação analítica do método para doseamento de verbascosídeo foram: especificidade, linearidade, precisão por repetibilidade, precisão intermediária, exatidão e robustez, de acordo com a Resolução (RE) nº 899, de 29 de maio de 2003, elaborada pela ANVISA.

A curva analítica foi preparada com a solução padrão de trabalho verbascosídeo, isolado da fração acetato de etila das folhas de *Duranta vestita* Cham. (Verbenaceae), na concentração de 0,30 mg/mL em metanol. A partir desta solução foram preparadas cinco concentrações dissolvidas em fase diluente (0,08 mg/mL; 0,09 mg/ml; 0,10 mg/mL; 0,11 mg/mL; 0,12 mg/mL) e injetadas em triplicata.

A precisão por repetibilidade foi realizada com 6 determinações a 100% da concentração do teste para verificar a concordância entre os resultados dentro de um curto período de tempo com o mesmo analista e mesma instrumentação. A precisão intermediária foi também realizada com 6 determinações a 100% da concentração do teste e serviu para verificar a concordância entre os resultados dos dois analistas, no mesmo laboratório, mas obtidos em dias diferentes. Neste ensaio as amostras sofreram uma diluição de 1:250 para permanecerem dentro da curva analítica.

No parâmetro exatidão foi utilizado o método de adição de padrão, no qual adicionou-se quantidades conhecidas do padrão de trabalho (verbascosídeo) ao extrato alcoólico bruto. O estudo foi realizado em 3 concentrações, baixa, média e alta no intervalo da curva analítica, em triplicata, perfazendo um total de 9 ensaios. Para obter a concentração baixa próxima à teórica (0,083 mg/mL) foram adicionados 125 µL da amostra extrato alcoólico bruto 1:50, 100 µL do padrão 0,30 mg/mL de verbascosídeo e 775 µL de fase diluente. Para obter a concentração média próxima à teórica (0,107 mg/mL) foram adicionados 125 µL da amostra extrato alcoólico bruto 1:50, 180 µL do padrão 0,30 mg/mL de verbascosídeo e 695 µL de fase diluente. Para obter a concentração alta próxima à teórica (0,119 mg/mL) foram adicionados 125 µL da amostra extrato alcoólico bruto 1:50, 220 µL do padrão 0,30 mg/mL de verbascosídeo e 655 µL de fase diluente. A exatidão foi calculada como

porcentagem de recuperação da quantidade conhecida do analito adicionada à amostra e o critério de aceitação é de 95 a 105%. (BRASIL, 2003).

No parâmetro robustez realizou-se a análise de estabilidade da solução, a mesma amostra utilizada no parâmetro de precisão por repetibilidade foi injetada após 24 h do seu preparo. Outras formas de avaliar a robustez do método foi diluir a fase móvel A (1:2), com conseqüente alteração do pH de 2,0 para 3,0 e também a modificação da temperatura do forno para 40°C.

3.5 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE LARVICIDA DOS EXTRATOS E FRAÇÕES DAS PARTES AÉREAS E RAÍZES DE *Buddleja stachyoides* SOBRE *Aedes aegypti*

A atividade larvicida sobre *Aedes aegypti* dos extratos e frações obtidos das partes aéreas e raízes de *Buddleja stachyoides* foi realizada segundo metodologia do WHO (1981) com algumas modificações.

Os ovos de *Aedes aegypti* da linhagem Rockfeller® foram fornecidos pela Fundação Oswaldo Cruz - RJ. Para a eclosão dos ovos, os mesmos foram colocados em bandeja de plástico e adicionou-se 500 mL de água sem cloro, e em seguida levou-se para estufa BOD (marca Novatecnica modelo NT 704) com temperatura a $(27 \pm 2)^\circ\text{C}$ e umidade relativa de $(80 \pm 5)\%$. (HARTBERG; CRAIG, 1970).

A dieta das larvas consistiu de ração de peixe (aldon basic, MEP 200 complex) do período de eclosão até o 3º estágio larval.

As amostras testes foram preparadas solubilizando-as com 0,5% de dimetilsulfóxido (DMSO) e diluídas com água sem cloro, para obter as concentrações de 250, 500, 1000 µg/mL.

Foram colocadas 15 larvas do 3º estágio em copo de plástico contendo as amostras (1 mL) e o volume foi completado para 5 mL. Para cada concentração foram usadas 45 larvas (15 larvas em triplicata). Solução aquosa de DMSO 0,5% foi utilizada em triplicata como controle negativo.

A atividade larvicida foi avaliada após 24 horas por meio da contagem do número de larvas mortas em cada amostra. Larvas moribundas, incapazes de atingir a superfície da água quando tocadas, foram consideradas como mortas. (WHO, 1981). Os valores da concentração letal (CL_{50}) em µg/mL foram determinados utilizando o método de análise Probit. (FINNEY, 1974).

3.6 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ALELOPÁTICA

3.6.1 Preparo do teste

As placas de Petri (9,0 cm de diâmetro) contendo papel filtro Whatman nº. 6,0, previamente autoclavadas a 120°C por 20 minutos, receberam 5,0 mL da solução das amostras (extratos e frações), preparadas nas concentrações de 250, 500 e 1000 µg/mL. Pesou-se 50 mg das amostras, adicionou-se 200 µL de DMSO e 500 µL de água e foram sonicadas. Em seguida, foi adicionado 1 mL de MES (ácido 2-morfolinoetanosulfônico) e q.s.p. para 50 mL de água em balão volumétrico (1000 µg/mL). A partir dessa solução preparou-se as demais concentrações (250 e 500 µg/mL). (MACIAS et al., 2000). Foram semeadas, aleatoriamente, sobre cada disco de papel filtro, 30 diásporos das espécies alvo *Lactuca sativa* L. (alface, eudicotiledônea) e *Allium cepa* L. (monocotiledônea cebola), distribuídos aleatoriamente, com quatro repetições para cada concentração, conforme Brasil (2009). Como controle, procedimento similar foi utilizado, porém com ausência dos extratos e frações.

As placas de Petri contendo os diásporos foram levadas a uma câmara de germinação (BOD), umidade relativa ($\pm 80\%$) e temperatura constante, adequadas a cada espécie alvo, conforme Brasil (2009), alface, (20 ± 2)°C no escuro; e cebola (15 ± 2)°C, com foto período de 12h.

3.6.2 Teste de Germinação

Para os bioensaios de germinação, foi aplicada a metodologia de Macias et al., (2000). A contagem para avaliação da germinação foi realizada diariamente, por 7 dias, tendo como critério a protrusão radicular com no mínimo 2,0 mm de comprimento. O experimento foi considerado concluído quando a germinação foi nula por três dias consecutivos.

O índice de velocidade de germinação (IVG) foi calculado segundo Maguire (1962) para cada amostra, utilizando-se a seguinte fórmula:

$$IVG = X1/a + X2/b + X3/c + \dots$$

Onde:

IVG = Índice de Velocidade de Germinação

X1, X2, X3, ... = Corresponde ao número de sementes germinadas

a, b, c,... = Corresponde ao dia em que ocorreu a germinação

3.6.3 Teste de Crescimento

Para os bioensaios de crescimento utilizou-se a metodologia descrita por Barnes et al., (1987) e Macias et al., (2000). Após sete dias da protrusão radicular, mediu-se o alongamento da radícula e do hipocótilo/coleóptilo (dez plântulas por placa) utilizando papel milimetrado.

3.7 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

3.7.1 Ensaio de captura do ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$)

O radical ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$) em meio aquoso, sofre dismutação, produzindo peróxido de hidrogênio e oxigênio, reação catalisada pela superóxido dismutase (SOD), *in vivo*. (BARREIROS et al., 2006). Essa espécie reativa do oxigênio (ERO) também pode ser gerada, *in vitro*, pela reação não enzimática entre nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzida (NADH) e metassulfato de fenazina (PMS), sendo sua formação quantificada por espectrofotometria, com a redução de azul de nitrotetrazólio (NBT), que adquire coloração púrpura. (HAZRA et al., 2008).

O ensaio foi realizado em tampão pirofosfato de sódio (pH 8,3 – 25 mM), contendo PMS (372 μ M), NBT (600 μ M), NADH (1560 μ M). Foram testadas várias concentrações das amostras e padrões, sendo selecionadas aquelas que apresentaram porcentagem de inibição: extrato bruto das partes aéreas de *B. stachyoides* (100; 200; 300; 400 e 500 μ g/mL), extrato bruto das raízes de *B. stachyoides* (50; 200; 300 e 400 μ g/mL), padrão de ácido gálico (1,70; 8,50; 17,0; 25,5 e 34,0 μ g/mL) e padrão de quercetina (6,045; 12,09; 18,135; 24,180 e 30,225 μ g/mL), com volume final da reação de 300 μ L. Após incubação de 7 minutos à temperatura ambiente, a absorbância foi monitorada a 560 nm, para determinação da quantidade de formazana gerada. A partir das concentrações selecionadas foram

calculados os logarítimos para construção da reta e cálculo da concentração inibitória média (IC₅₀) de 3 determinações. Os resultados foram comparados com os padrões de quercetina e ácido gálico. (HAZRA et al., 2008).

3.7.2 Ensaio de captura do radical óxido nítrico (NO[•])

Este ensaio avalia a capacidade dos compostos antioxidantes em capturar o radical óxido nítrico (NO[•]), gerado a partir da dissolução de nitroprussiato de sódio, em solução aquosa com pH 7,4. O óxido nítrico reage com o oxigênio do meio formando nitrato (NO₃⁻) e nitrito (NO₂⁻). O nitrito formado é determinado, espectrofotometricamente, pela adição do reagente de Griess, produzindo um composto colorido, monitorado a 540 nm. (YEN et al., 2001).

Foram testadas diferentes concentrações das amostras e padrões, sendo selecionadas aquelas que apresentaram porcentagem de inibição: extrato bruto das partes aéreas de *B. stachyoides* (70, 130, 190, 250 e 310 µg/mL) extrato bruto das raízes de *B. stachyoides* (130, 190, 250, 310 e 370 µg/mL), padrão de ácido gálico (400, 1000, 1300, 1600 e 2200 µg/mL) e padrão de quercetina (10, 30, 50, 70, 90, 110 e 130 µg/mL). As amostras foram incubadas com nitroprussiato de sódio (4 mM) em tampão fosfato de sódio (20 mM, pH 7,4), por 150 minutos, a temperatura ambiente. E após o tempo de reação, foi adicionado o reagente de Griess (ácido sulfanílico 1,0 % - p/v; o N-(1-naftalenodiamina) 0,1% - p/v e ácido fosfórico 2,5% - v/v), e a leitura de absorbância realizada a 540 nm. (YEN et al., 2001). A partir das concentrações selecionadas foram calculados os logarítimos para construção da reta e cálculo da concentração inibitória média (IC₅₀) de 3 determinações. Os resultados foram comparados com os padrões de quercetina e ácido gálico.

3.8 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE FARMACOLÓGICA

3.8.1 Animais

As abordagens farmacológicas foram realizadas em modelos animais, utilizando camundongos Swiss, machos ou fêmeas dependendo do teste, mantidos em temperatura controlada de (22 ± 2)°C, em ciclo de 12h claro e 12h escuro e com

água e ração à vontade. Os animais foram distribuídos homoganeamente entre os grupos experimentais (n=6 ou n=7), mantidos no laboratório para aclimação por pelo menos 1 hora antes da realização dos experimentos e foram tratados com extrato bruto das partes aéreas por via oral (v.o.). Os procedimentos experimentais foram realizados de acordo com as normas éticas para o estudo de dor com animais de laboratório. (ZIMMERMANN, 1983). Os protocolos foram aprovados pelo Comitê de Ética para uso de animais (CEUA) da Universidade Federal do Paraná em 22/05/2014, certificado número 794 (ANEXO II).

Os modelos experimentais utilizados visam a identificação de potencial atividade antinociceptiva, anti-inflamatória, gastroprotetora, efeito sobre a motilidade gastrointestinal e possível toxicidade do extrato alcoólico bruto das partes aéreas de da *B. stachyoides*.

3.8.2 Nocicepção induzida por formalina

O teste de nocicepção induzida por formalina foi executado conforme metodologia descrita por Hunskaar et al. (1985), a qual consiste na injeção de 20 µL de uma solução de formalina a 2,5% (0,92% de formaldeído) na superfície ventral da pata posterior direita. O indicativo de nocicepção é o tempo que o animal permanece lambendo ou mordendo a pata injetada, durante os primeiros cinco minutos após a injeção (primeira fase ou fase neurogênica), e durante o intervalo de 15 a 30 minutos após a injeção (segunda fase ou fase inflamatória). Os animais foram pré-tratados com salina (10 mL/kg, v.o.) ou extrato bruto de *B. stachyoides* nas doses de 10, 30, 100, 300, 600 e 900 mg/kg, por via oral, 60 minutos antes da injeção intraplantar de formalina, e observados com relação ao tempo de resposta nociceptiva durante as duas fases do modelo.

3.8.3 Nocicepção induzida por ácido acético

O teste de nocicepção induzida por ácido acético foi executado conforme metodologia adaptada de Koster et al. (1959), a qual consiste na injeção intraperitoneal de 450 µL de uma solução de ácido acético a 0,6%. O indicativo de nocicepção é o número de contorções da musculatura abdominal, associadas ao

alongamento dos membros posteriores, durante o período de 20 minutos. Os animais foram pré-tratados com salina (10 mL/kg, v.o.) ou extrato bruto de *B. stachyoides* nas doses de 300, 600 e 900 mg/kg, por via oral, 60 minutos antes da injeção intraperitoneal de ácido acético, e observados com relação ao número de contorções abdominais durante o período de avaliação.

3.8.4 Avaliação da atividade locomotora

Para avaliar se o extrato testado pode interferir na atividade locomotora, os animais foram submetidos ao teste de campo aberto. (RODRIGUES et al., 2002). Os animais foram pré-tratados com salina (10 mL/kg, v.o.) ou com o extrato bruto de *B. stachyoides* (900 mg/kg, v.o.), e após 60 minutos foram colocados no interior de uma caixa de madeira (51x50x50 cm) com o assoalho dividido em 16 quadrados de tamanhos iguais. Imediatamente após a colocação do animal na caixa, foi contabilizado o número de quadrados cruzados com as quatro patas, durante o período de seis minutos.

3.8.5 Edema de pata induzido por carragenina

Para avaliação da atividade anti-inflamatória, foi utilizado o teste edema de pata induzido por carragenina, metodologia descrita por Di Rosa e Willoughby (1971), com modificações. Inicialmente foram realizadas medições basais das patas direita e esquerda dos camundongos, em seguida, os animais foram pré-tratados com salina (10 mL/kg, v.o.) ou extrato bruto das partes aéreas de *B. stachyoides* (900 mg/kg, v.o.). Após 1 h do tratamento os animais receberam injeção intraplantar de 20 µL de carragenina (solução de 1%) na pata direita e 20 µL de salina na pata esquerda, sendo avaliados nos tempos de 0,5; 1; 2; 3; 4 e 24 horas após a injeção intraplantar de carragenina. Foi utilizado um paquímetro digital para medir a altura e espessura (largura) imediatamente proximal aos dedos do animal e o cálculo da área do edema de pata foi expresso pela fórmula: [(área pata direita - área da pata esquerda)/ área da pata esquerda], sendo que a área de cada pata foi calculada por: (altura x largura).

3.8.6 Peritonite induzida por carragenina

A carragenina foi utilizada como estímulo para produzir uma resposta inflamatória aguda na cavidade peritoneal em camundongos, aumentando o número de leucócitos no exsudato. Os animais foram pré-tratados com dexametasona (anti-inflamatório esteroidal, glicocorticóide, 0,5 mg/kg, i.p.) ou extrato bruto das partes aéreas de *B. stachyoides* (600 e 900 mg/kg, v. o.) 30 e 60 minutos, respectivamente antes da injeção de carragenina (750 µg/sítio, i.p.) na cavidade peritoneal. O grupo salina recebeu somente uma injeção de salina (750 µg/sítio, i.p.) no peritônio. Quatro horas após a indução da peritonite, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical e a cavidade peritoneal foi lavada com 1,5 mL de solução salina heparinizada (10 UI/mL). Em seguida, o líquido peritoneal foi coletado e processado para contagem total e diferencial de leucócitos. (PAGANO et al., 2002).

3.8.6.1 Contagem dos leucócitos peritoneais

A contagem de leucócitos totais foi realizada utilizando-se uma câmara de Neubauer após a diluição do fluido peritoneal com líquido de Türk (1:20). Uma alíquota do exsudato foi citocentrifugado utilizando uma citocentrífuga e corado com May-Grünwald-Giemsa para a contagem diferencial dos leucócitos. (MONTANHER et al., 2007).

3.8.7 Avaliação da atividade gastroprotetora

A avaliação do efeito do extrato alcoólico bruto das partes aéreas de *B. stachyoides* sobre úlcera gástrica induzida por HCl/ etanol foi realizado de acordo com o método descrito por Andreo et al. (2006). Os camundongos Swiss fêmeas foram divididos em 5 grupos e pré-tratados por via oral, com salina (10 mL/kg, grupo controle negativo), omeprazol (20 mg/kg, grupo controle positivo) ou extrato alcoólico bruto das partes aéreas de *B. stachyoides* (300, 600 e 900 mg/kg) uma vez ao dia, durante 7 dias consecutivos. No 7º dia todos os grupos foram deixados em jejum, com água à vontade por 24 horas. No 8º dia, após 1h de tratamento com salina, omeprazol ou extrato, os animais receberam oralmente 0,2 mL de uma solução de

0,3 M de HCl/ etanol 60% (50:50). O grupo naive não recebeu nada para comparação do estômago normal com o estômago dos animais tratados. Os animais foram sacrificados por deslocamento cervical após 1 h da indução da úlcera. Os estômagos foram removidos e abertos ao longo da maior curvatura e estendidos para a análise das lesões gástricas. A avaliação dessas lesões foi realizada através do programa Image Tool[®] Versão 3.0 e os resultados foram expressos em mm² de área lesionada para cada estômago.

3.8.8 Avaliação da motilidade gastrointestinal

No modelo de motilidade gastrointestinal foi avaliado o efeito do extrato bruto das partes aéreas de *B. stachyoides* sobre o esvaziamento gástrico dos animais, utilizando-se o método descrito por Potrich et al. (2014). Os camundongos fêmeas, deixados em jejum por 24 horas e com livre acesso de água, foram divididos em oito grupos e tratados com salina (10 mL/kg, v.o.), atropina (3 mg/Kg, s.c.), metoclopramida (30 mg/Kg, v.o.), neostigmina (20 mg/Kg, s.c.) ou extrato bruto (300, 600 e 900 mg/Kg, v.o.). Após 1 h, foi administrada por via oral, uma solução semi-sólida de vermelho de fenol 0,05% em carboximetilcelulose 1,5% (volume de acordo com o peso de cada animal) e depois de 15 min foram sacrificados por deslocamento cervical para a retirada do estômago e intestino delgado. As determinações foram baseadas no modelo de Suchitra et al. (2003), com algumas modificações. Na avaliação do esvaziamento gástrico, o estômago foi triturado com 7 mL de água destilada e o homogenato foi centrifugado a 1500 rpm por 15 min. Após a centrifugação, 600 µL do sobrenadante foi misturado com 600 µL de NaOH 0,025 N e a leitura foi realizada em espectrofotômetro a 560 nm. O esvaziamento gástrico foi calculado de acordo com a fórmula $EG\% = 100 - [(Absorbância \times 100) / Absorbância T_0]$, onde o T_0 representa a absorbância do vermelho de fenol recuperado de estômagos de animais eutanasiados 0 minutos após a administração do marcador.

Para a avaliação do trânsito intestinal foi utilizado o método descrito por Suchitra et al., 2003. O intestino delgado foi esticado e determinado o comprimento total do intestino e a distância percorrida pelo marcador (a última porção com no

mínimo 1 cm). O trânsito intestinal foi calculado de acordo com a fórmula [TI% = distância percorrida pelo marcador x 100/ comprimento total do intestino].

3.8.9 Avaliação da toxicidade subcrônica

Para avaliar um possível efeito tóxico do extrato bruto das partes aéreas de *B. stachyoides* foi realizado o teste de toxicidade subcrônica (curto período). Os animais fêmeas (n=7) foram tratados com salina (10 mL/kg, v.o.) ou extrato (dose 900 mg/kg; v.o.) uma vez ao dia, durante 21 dias e pesados no 1º, 7º, 14º e 21º dia para avaliação de perda ou ganho de peso. Após a última administração os animais foram deixados em jejum, com água à vontade, durante 12 horas, em seguida foram anestesiados com ketamina (50 mg/kg, i.p.) e xilazina (10 mg/kg, i.p.) para a coleta de 1 mL de sangue e sacrificados para retirada dos órgãos vitais – coração, pulmões, fígado, cérebro, estômago, baço e rins – os quais foram pesados e avaliados em relação ao peso corporal do animal. (MONTRUCCHIO, 2012). O sangue coletado foi dividido em alíquotas, um pequeno volume foi transferido para um tubo com EDTA para as análises hematológicas e o restante da amostra foi transferido para um tubo sem anticoagulante e centrifugado a 3.500 rpm por 10 minutos a 4°C para separação do soro, o qual foi utilizado para a dosagem de enzimas hepáticas: aspartato aminotransferase (AST) e alanina aminotransferase (ALT); uréia; creatinina K e ácido úrico com kits bioquímicos (Labtest®) e equipamento Labtest® (Laboratório escola da Universidade Federal do Paraná), de acordo com as instruções do fabricante.

3.8.9.1 Análise histológica dos rins e fígado

O lóbulo direito do fígado e rins foram cortados transversalmente e fixados no líquido metacan, composto por 60 mL de metanol, 30 mL de clorofórmio e 10 mL de ácido acético glacial por três horas. Em seguida, o material foi submetido a banhos consecutivos de etanol absoluto por três vezes durante 30 minutos e deixados em repouso por 16 horas, em temperatura ambiente, no etanol absoluto contendo xilol na mesma proporção. Após este período, o material foi diafanizado com xilol por três vezes consecutivas durante 30 minutos cada. Posteriormente, foi

impregnado em parafina líquida por duas horas em estufa, sob temperatura de 58 °C. Os blocos histológicos foram submetidos à microtomia, obtendo-se cortes com três micrômetros de espessura. As lâminas contendo os cortes histológicos foram desparafinizadas, hidratadas e coradas com hematoxilina de Harris (Merck®), por 60 segundos. Em seguida, foram lavadas em água corrente e água destilada para posterior coloração com eosina (Merck®) durante 1 minuto, segundo Beautler et al. (1995) e Culling et al. (1985). Após a coloração, as lâminas foram lavadas com água destilada, desidratadas em solução crescente de etanol (70 a 100%, durante cinco minutos em cada etapa), diafanizadas primeiramente em álcool e xilol (etapa única de cinco minutos) e depois somente em xilol (duas etapas a 100%, durante cinco minutos cada). Ao final da preparação, as lâminas foram avaliadas em microscopia óptica.

3.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram avaliados estatisticamente por modelo estatístico apropriado para cada tipo de ensaio, utilizando-se o software GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Prism Software, San Diego, CA, USA), e valores de p menores que 0,05 foram considerados significativos.

Na avaliação da atividade alelopática, os índices de velocidade de germinação e os resultados das leituras de crescimento foram submetidos à análise estatística, realizando-se a comparação das médias \pm desvio padrão (quadruplicata) com o controle água destilada, através da análise de variância (ANOVA) de 1 via, seguida do teste Tukey.

Na avaliação da atividade antioxidante a comparação das médias \pm desvio padrão (triplicata) da concentração inibitória média (IC₅₀) entre as amostras e os padrões foi realizada por análise de variância (ANOVA) de uma via seguida do teste de Tukey.

Nos ensaios farmacológicos os resultados das médias \pm desvio padrão (n=6) foram avaliados por: análise de variância (ANOVA) de uma via seguida do teste de Tukey para nocicepção induzida por formalina, nocicepção induzida por ácido acético, avaliação da atividade gastroprotetora, avaliação da motilidade gastrointestinal; teste t de Student para edema de pata induzido por carragenina e

avaliação da atividade locomotora; análise de variância (ANOVA) de uma via seguido de comparação múltipla de Newman-Keuls para peritonite induzida por carragenina.

No ensaio de toxicidade subcrônica, os resultados das médias \pm desvio padrão (n=7) dos parâmetros hematológicos, bioquímicos, ganho/perda de peso, peso relativo dos órgãos, avaliação da atividade locomotora foram avaliados por teste t de Student.

4 RESULTADOS

4.1 RENDIMENTO DOS EXTRATOS E FRAÇÕES

O peso do material vegetal seco de partida das partes aéreas foi de 5970 g, após extração e concentração (em rotaevaporador e banho-maria à 60°C, até a secura) obteve-se 797,64 g de extrato alcoólico bruto, com rendimento de (13,36 ± 2,34)% em relação ao material seco de partida. Para obtenção do extrato bruto das raízes, foram pesados 2385 g do material vegetal de partida seco, após extração e concentração (em rotaevaporador e banho-maria à 60°C, até a secura) obteve-se 62,48 g de extrato alcoólico bruto, com rendimento de (2,62 ± 0,056)% em relação ao material seco de partida. Destes extratos, foram retirados 40,57g do extrato alcoólico bruto das partes aéreas e 3,68 g do extrato alcoólico bruto das raízes para realização das atividades biológicas, o restante foi utilizado no fracionamento. A TABELA 3 demonstra o rendimento das frações em relação à quantidade de extrato alcoólico bruto utilizado.

TABELA 3 – RENDIMENTO DAS FRAÇÕES E EXTRATOS ALCOÓLICOS BRUTO

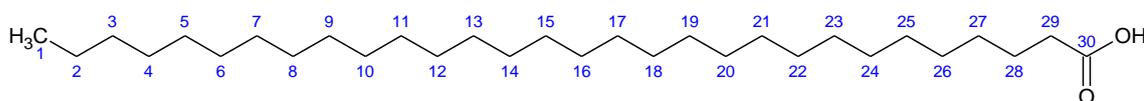
AMOSTRA	PARTES AÉREAS		RAÍZES	
	MASSA (g)	RENDIMENTO (%)	MASSA (g)	RENDIMENTO (%)
Extrato Alcoólico Bruto	757,07	—	58,80	—
Fração Hexano	102,20	13,50	10,52	17,89
Fração Clorofórmio	54,77	7,23	11,97	20,36
Fração Acetato de Etila	82,05	10,84	2,05	3,49
Fração Hidroalcoólica Remanescente	518,05	68,43	34,26	58,26

FONTE: OLIVEIRA (2012)

4.2 ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE COMPOSTOS

O composto FHR1 isolado da fração hexânica das raízes de *B. stachyoides* apresentou-se como cristais amorfos brancos solúveis em clorofórmio. Após análise por RMN de ¹H e ¹³C, foi identificado como um ácido graxo de cadeia longa, apresentando uma estrutura semelhante à substância ácido triacontanóico (C₃₀H₆₀O₂, FIGURA 7), também conhecido como ácido melíssico.

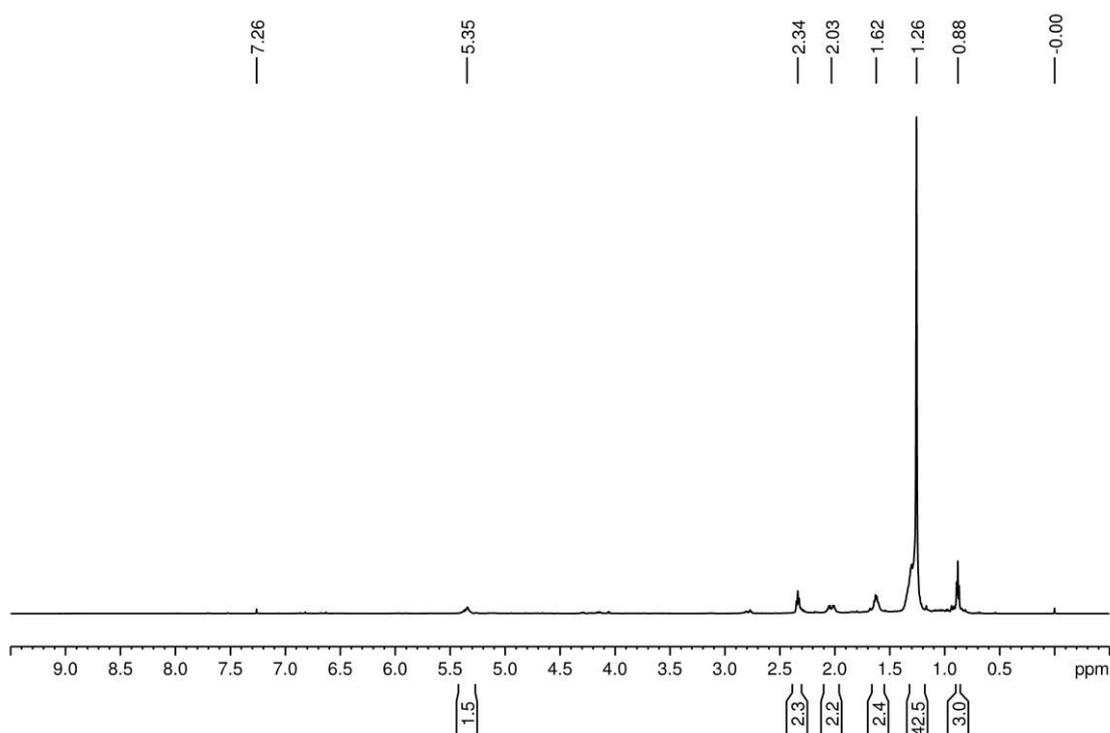
FIGURA 7 – ESTRUTURA QUÍMICA DO COMPOSTO FHR1 IDENTIFICADO COMO ÁCIDO TRIACONTANOICO



FONTE: O autor (2017)

O espectro de RMN de ¹H, visualizado na FIGURA 8, apresenta um tripleto na região de 0,88 ppm, com constante de acoplamento de $J = 6,9$ Hz, indicando a presença de uma cadeia de carbonos longa com um CH₃ terminal. Além disso, observa-se a presença de um multipletto em 1,26 ppm. Considerando que o sinal em 0,88 ppm equivale a três hidrogênios, os sinais foram integrados e o sinal em 1,26 ppm resultou em 42 hidrogênios, ou seja, 21 CH₂ que se encontram em ambiente químico semelhante. Observa-se, ainda, a presença de mais dois multipletos, em 1,62, 2,03 ppm e um tripleto em 2,34 ppm ($J = 7,4$ Hz), que representam mais três CH₂, informação esta que confere com as integrais e com a região do espectro em que os sinais aparecem. O sinal em 5,35 ppm indica a presença de OH do ácido carboxílico.

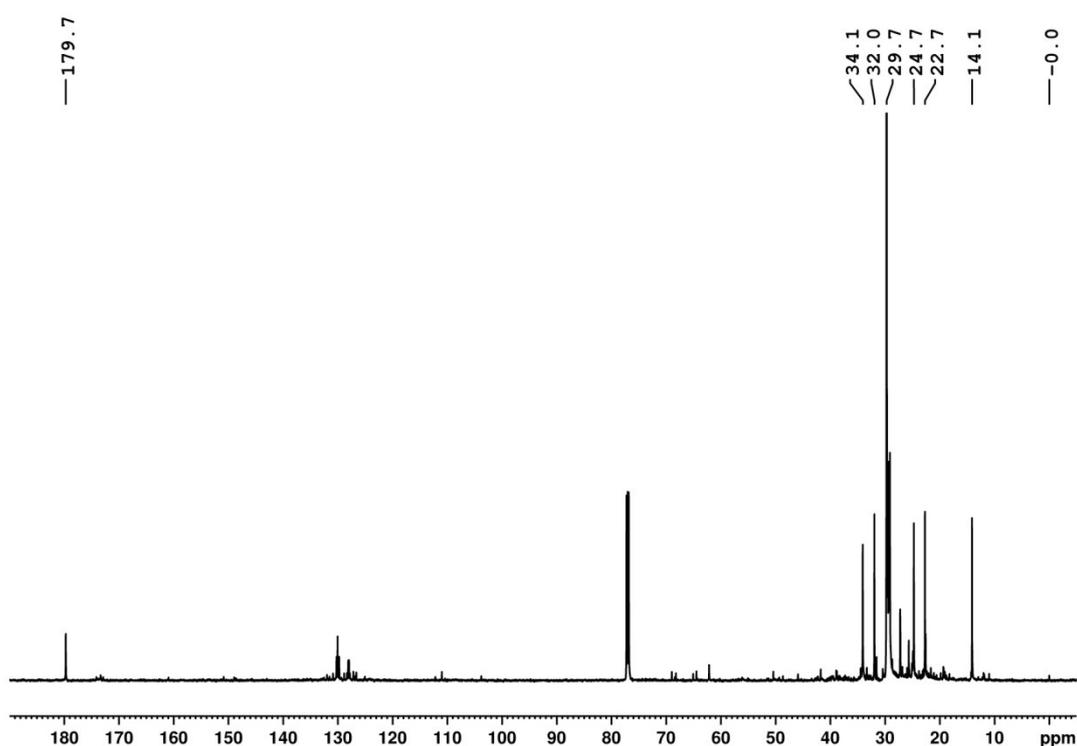
FIGURA 8 – ESPECTRO DE RMN DE ¹H DO COMPOSTO FHR1 (600 MHz, CDCl₃, 20° C)



FONTE: O autor (2017)

No espectro de RMN de ^{13}C , apresentado na FIGURA 9, observa-se a presença de seis sinais. O primeiro, em 14,1 ppm, corresponde ao carbono do CH_3 terminal. Os sinais entre 22,7 e 34,1 ppm correspondem aos carbonos dos CH_2 da cadeia longa. O sinal em 179,7 ppm indica a presença de uma carbonila ácida, o que sugere que em uma das extremidades da cadeia carbônica há a função de ácido carboxílico.

FIGURA 9 – ESPECTRO DE RMN DE ^{13}C DO COMPOSTO FHR1 (150,90 MHz, CDCl_3 , 20° C)



FONTE: O autor (2017)

Os sinais dos deslocamentos químicos e as constantes de acoplamento (J) obtidos dos espectros RMN de ^1H e RMN de ^{13}C do composto FHR1 foram confrontados com a literatura descrita na TABELA 4, mesmo sendo solventes diferentes os sinais são muito semelhantes, indicando que trata-se do mesmo composto.

TABELA 4 – COMPARAÇÃO DOS SINAIS DE RMN-¹H E RMN-¹³C DO COMPOSTO FHR1 COM A LITERATURA

POSIÇÃO	TIPO DE C	COMPOSTO FHR1			(MACEDO, 2011)		
		RMN- ¹ H (600 MHz, CDCl ₃)		RMN- ¹³ C (150,90 MHz, CDCl ₃)	RMN- ¹ H (300 MHz, C ₅ D ₅ N)		RMN- ¹³ C (75 MHz, C ₅ D ₅ N)
		δ (ppm)	TIPO, J (Hz)	δ (ppm)	δ (ppm)	J (Hz)	TIPO, J (Hz)
1	CH ₃	0,88	<i>t</i> , J=6,9	14,1	0,89	<i>t</i> , J=6,0	14,2
2	CH ₂	1,62	<i>m</i>	22,7	1,41	<i>m</i>	22,9
3	CH ₂	1,26	<i>m</i>	24,7	1,29	<i>m</i>	25,6
4-27	CH ₂	1,26	<i>m</i>	29,7	1,29	<i>m</i>	29,6
28	CH ₂	2,03	<i>m</i>	32,0	1,82	<i>m</i>	29,8
29	CH ₂	2,34	<i>t</i> , J=7,4	34,1	2,54	<i>t</i> , J=7,4	34,9
30	COOH	-	-	179,7	-	-	175,9

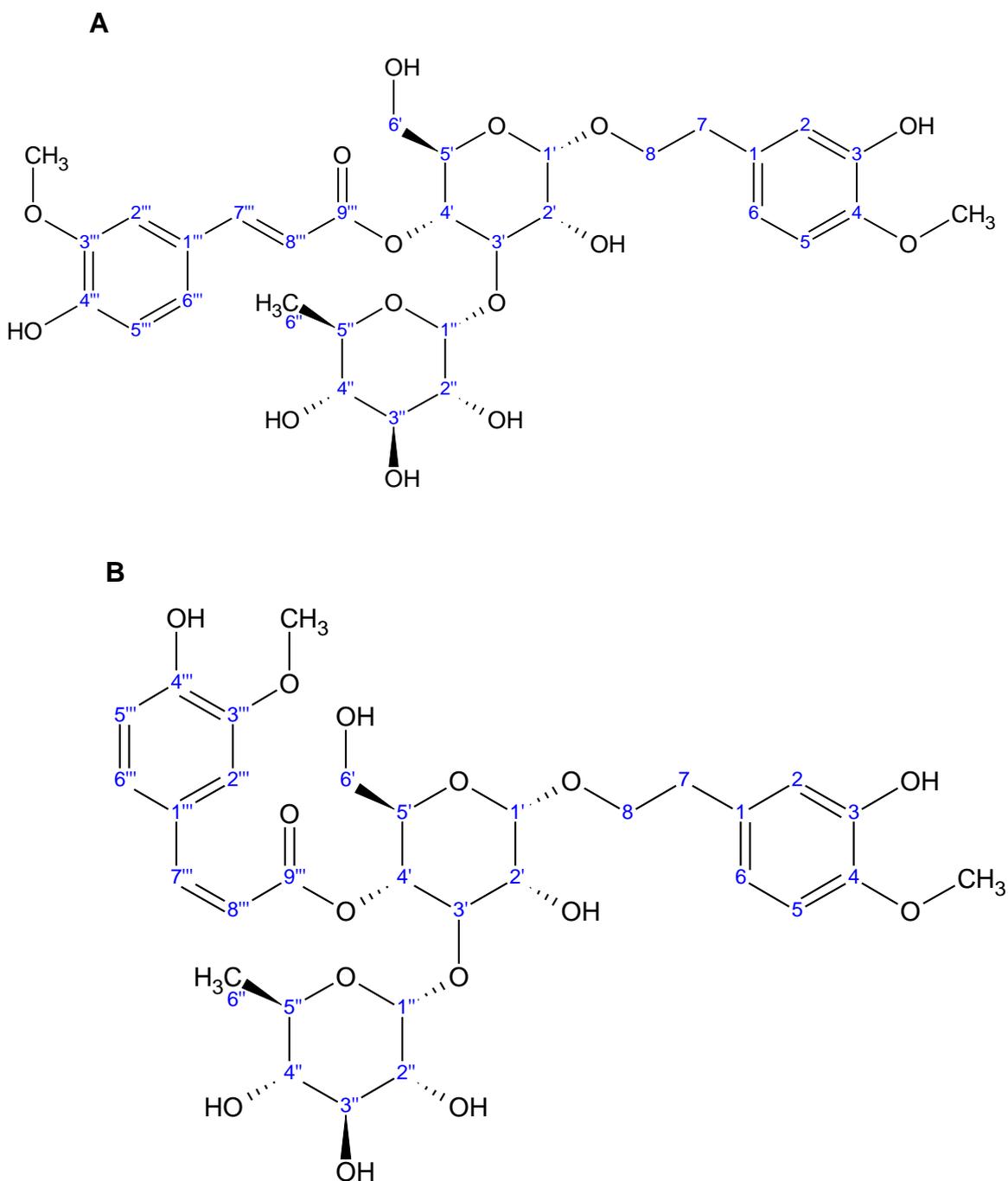
FONTE: O autor (2017)

O isolado ácido triacontanóico já foi isolado de outras plantas como, por exemplo, *Hibiscus tiliaceus* L., *Eucalyptus globulus*, *Senna cearensis* e *Senna martiana*. (MELECCHI, 2005; FREIRE, 2005; FERREIRA et al., 2009; MACEDO, 2011). Ferreira et al. (2009) isolou e identificou um grande teor de ácido triacontanóico do extrato hexânico do caule de *Senna cearensis* que apresenta, além de outras propriedades, atividade antitrombótica e antiplaquetária. De acordo com o estudo de Pan et al. (2012) *Vitis thunbergii* demonstrou vários efeitos cardioprotetores que podem ser modulados através dos seus compostos identificados, tais como: β-sitosterol, β-sitosterol-3-O-β-D-glucósido, ampelopsina C, ácido betulínico, botulina, ácido cafeico, friedelina, heyneanol A, 1-dotriacontanol, lupeol, luteolina-7-O-glucósido, miyabenol A, narcissina, oligostilbenos, piceatanol, quercetina-3-O-galactósido, quercitrina, rutina, estigmasterol, ácido triacontanóico, ácido vanílico, viniferina, viniferal, vitisina A, vitisina C e vitisinóis AD. Portanto, o ácido triacontanóico pode ser importante no tratamento e prevenção de doenças cardiovasculares, particularmente aterosclerose, devido à sua atividade antiplaquetária.

O composto FAEPA2, isolado da fração acetato de etila das partes aéreas de *B. stachyoides*, apresentou-se como cristais amorfos de coloração branca e solubilidade em metanol. Após análise por RMN de ¹H e ¹³C, foi identificado como sendo uma mistura dos isômeros *trans*-martinosídeo e *cis*-martinosídeo (C₃₁H₄₀O₁₅, FIGURA 10), na proporção de 2:1, respectivamente. A proporção foi calculada por

meio da comparação entre os valores das integrais entre um sinal de cada uma das duas moléculas.

FIGURA 10 – ESTRUTURA QUÍMICA DO COMPOSTO FAEPA2 IDENTIFICADO COMO *TRANS*-MARTINOSÍDEO E *CIS*-MARTINOSÍDEO



FONTE: O autor (2017)

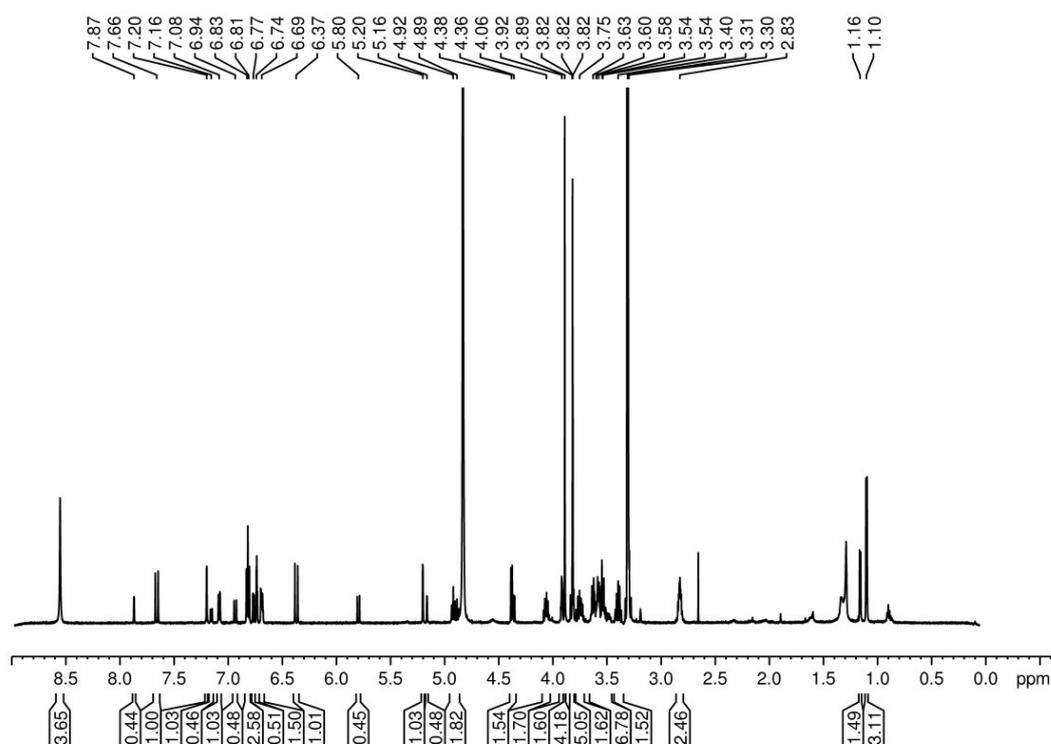
LEGENDA: A: *trans*-martinosídeo; B: *cis*-martinosídeo

O *trans*-martinosídeo, composto em maior quantidade na amostra, caracteriza-se pelos conjuntos de sinais descritos a seguir. Observa-se no espectro RMN de ^1H , visualizado na FIGURA 11, a presença de um conjunto de sinais em 7,20 ppm (1H, d, $J = 1,8$ Hz, H-2'''), 6,81 ppm (1H, d, $J = 8,2$ Hz, H-5''') e 7,08 ppm (1H, dd, $J = 8,2$ Hz, $J = 1,8$ Hz, H-6'''), e outro conjunto em 6,74 ppm (1H, d, $J = 1,9$ Hz, H-2), 6,83 ppm (1H, d, $J = 8,2$ Hz, H-5) e 6,69 ppm (1H, dd, $J = 8,2$ Hz, $J = 1,9$ Hz, H-6). Estas ressonâncias são características da presença de dois sistemas aromáticos 1,3,4-trissubstituídos. Um destes sistemas aromáticos é parte do ácido ferúlico (porção ácida), cujos dois prótons olefínicos encontram-se em 7,66 ppm (1H, d, $J = 15,9$ Hz, H-7''') e 6,37 ppm (1H, d, $J = 15,9$ Hz, H-8'''), e a geometria *trans* é indicada pelos valores da constante de acoplamento entre estes dois átomos. Sinais de prótons em 2,83 ppm (2H, m, H-7), 3,75 ppm (1H, m, H-8a) e δ 4,06 (1H, m, H-8b), completam o segundo sistema aromático, o qual caracteriza a classe dos feniletanoides (porção aglicona). Além disso, duas metoxilas estão ligadas a esses sistemas aromáticos, uma em 3,82 ppm (3H, s, H₃CO-4) e outra em 3,89 ppm (3H, s, H₃CO-3'''). Na região dos açúcares entre 3,00 e 5,2 ppm, observam-se sinais de dois açúcares, o primeiro, que conecta os dois sistemas aromáticos, é uma glicose (β -hexopirranose). Essa conexão se dá através do carbono anomérico da glicose com o oxigênio da porção feniletanoide, enquanto que a conexão com a porção do ácido ferúlico se dá por meio do oxigênio ácido com o carbono 4' da glicose. O segundo açúcar é uma α -L-ramnose, cujo carbono anomérico, por meio de uma ligação O-glicosídica liga-se ao carbono 3' da glicose.

O espectro RMN de ^1H , demonstrado na FIGURA 12, indica a presença do isômero *cis*-martinosídeo, composto em menor quantidade na amostra, observa-se um conjunto de sinais em 7,87 ppm (1H, d, $J = 1,7$ Hz, H-2'''), 6,77 ppm (1H, d, $J = 8,1$ Hz, H-5''') e 7,16 ppm (1H, dd, $J = 8,1$ Hz, $J = 1,7$ Hz, H-6'''). O outro conjunto, referente à porção feniletanoide da molécula, possui os deslocamentos químicos e constantes de acoplamento similares aos do seu isômero, e os sinais estão sobrepostos. Os valores das integrais destes sinais comprovam a sobreposição. A porção do ácido ferúlico, possui sinais de dois prótons olefínicos em 6,94 ppm (1H, d, $J = 13,0$ Hz, H-7''') e 5,80 ppm (1H, d, $J = 13,0$ Hz, H-8'''), e, neste caso a constante de acoplamento indica geometria *cis*. Do mesmo modo, as duas metoxilas estão ligadas a esses sistemas aromáticos, uma em 3,89 ppm (3H, s, H₃CO-4) e

3,82 ppm (3H, s, H₃CO-3''). A região dos açúcares é composta por formação similar à do isômero, entretanto pode-se observar ligeiras diferenças nos deslocamentos químicos dos dois carbonos anoméricos, bem como dos carbonos 6' e 6''. Os deslocamentos químicos obtidos da amostra, referentes aos dois isômeros acima descritos, bem como os dados encontrados na literatura, estão dispostos nas TABELAS 5 e 6.

FIGURA 11 – ESPECTRO DE RMN DE ¹H DO COMPOSTO FAEPA2 IDENTIFICADO COMO ISÔMEROS *TRANS*-MARTINOSÍDEO E *CIS*-MARTINOSÍDEO (600 MHz, CD₃OD, 20° C)



FONTE: O autor (2017)

TABELA 5 – COMPARAÇÃO DOS DADOS DE RMN DO COMPOSTO FAEPA2 COM DADOS DA LITERATURA PARA O ISÔMERO *TRANS*-MARTINOSÍDEO

POSIÇÃO	TIPO DE C	<i>TRANS</i> -MARTINOSÍDEO					
		COMPOSTO FAEPA2			(FROELICH et al., 2008) (400 MHz, CD ₃ OD)	(YALÇIN, et al., 2003) (75,5 MHz, CD ₃ OD)	
		(600 MHz, CD ₃ OD, 20° C)		HSQC E HMBC			
		RMN- ¹ H		RMN- ¹³ C	RMN- ¹ H		RMN- ¹³ C
		δ (ppm)	J (Hz)	δ (ppm)	δ (ppm)	J (Hz)	δ (ppm)
Porção ácida							
1''	C			127,7			127,6
2''	CH	7,20	1H, d (1,8)	111,7	7,19	1H, d (1,8)	111,7
3''	C			149,3			149,4
4''	C			150,9			150,8
5''	CH	6,81	1H, d (8,2)	116,2	6,82	1H, d (8,1)	116,5
6''	CH	7,08	1H, dd (1,8; 8,2)	124,1	7,08	1H, dd (1,8; 8,1)	124,4
7''	CH	7,66	1H, d (15,9)	147,8	7,66	1H, d (15,9)	147,9
8''	CH	6,37	1H, d (15,9)	115,0	6,36	1H, d (15,9)	115,1
9''	C=O			168,3			168,3
OCH ₃ -3''	CH ₃	3,89	3H, s	56,3	3,89	3H, s	56,4
Aglicona							
1	C			132,8			132,9
2	CH	6,74	1H, d (1,9)	112,5	6,73	1H, d (1,9)	112,8
3	C			147,9			147,9
4	C			147,5			147,6
5	CH	6,83	1H, d (8,2)	117,0	6,80	1H, d (8,2)	117,1
6	CH	6,69	1H, dd (1,9; 8,2)	121,2	6,68	1H, dd (2,0; 8,1)	121,2
7 β	CH ₂	2,83	2H, t (7,5)	36,5	2,82	2H, t (7,5)	36,6
8-a/ 8-b α	CH ₂	3,75/ 4,06	1H, m/ 1H, m	72,1	3,75/4,07	1H, m/ 1H, m	72,4
OCH ₃ -4	CH ₃	3,82	3H, s	56,5	3,81	3H, s	56,5
Glucose							
1'	CH	4,38	1H, d (7,9)	104,2	4,37	1H, d (8,0)	104,2
2'	CH	3,40	1H, m	75,9	3,37 - 4,03	7H, m	76,2
3'	CH	3,82	1H, m	81,5	3,37 - 4,03	7H, m	81,5
4'	CH	4,92	1H, dd (9,4; 9,3)	70,5	4,92	1H, t (9,4)	70,6
5'	CH	3,50	1H, m	76,1	3,37 - 4,03	7H, m	76,1
6'-a/ 6'-b	CH ₂	3,54/ 3,63	1H, m/ 1H, m	62,4	3,37 - 4,03	7H, m	62,4
Ramnose							
1''	CH	5,20	1H, d (1,6)	102,9	5,19	1H, d (1,7)	103,0
2''	CH	3,92	1H, m	72,3	3,37 - 4,03	7H, m	72,1
3''	CH	3,58	1H, m	71,9			72,0
4''	CH	3,30	1H, m	73,8			73,8
5''	CH	3,60	1H, m	70,2	3,37 - 4,03	7H, m	70,4
6''	CH ₃	1,10	3H, d (6,2)	18,1	1,1	3H, d (6,2)	18,4

FONTE: O autor (2017)

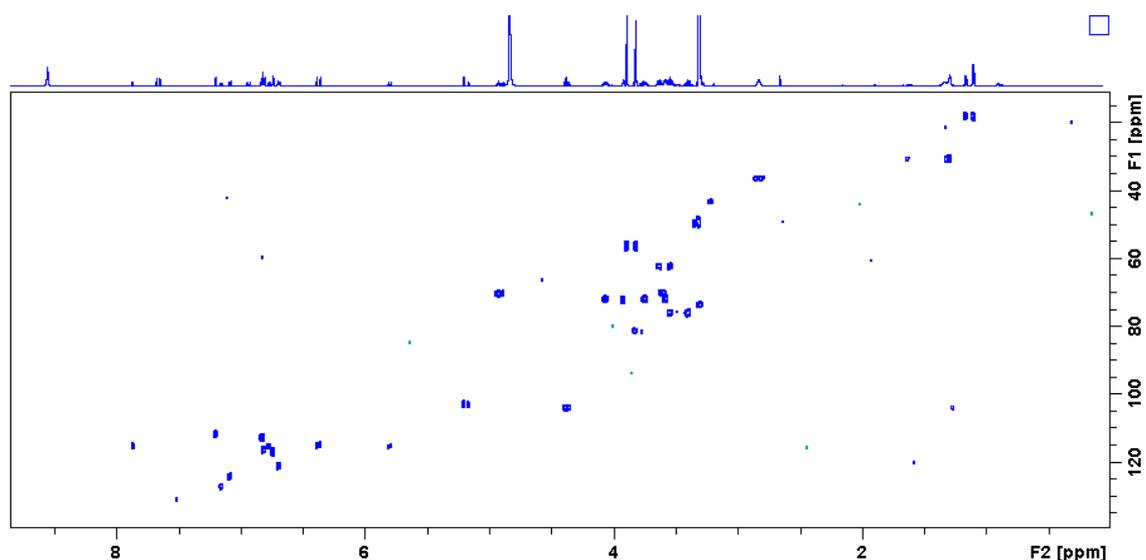
TABELA 6 – COMPARAÇÃO DOS DADOS DE RMN DO COMPOSTO FAEPA2 COM DADOS DA LITERATURA PARA O ISÔMERO *CIS*-MARTINOSÍDEO

Posição	TIPO DE C	<i>CIS</i> -MARTINOSÍDEO					
		COMPOSTO FAEPA2			(SKRZYPEK et al., 1999) (500 MHz, CD ₃ OD)	ONO et al., 2008) (125 MHz, CD ₃ OD)	
		(600 MHz, CD ₃ OD, 20° C)		HSQC E HMBC		RMN- ¹³ C	
		RMN- ¹ H		RMN- ¹³ C	RMN- ¹ H		RMN- ¹³ C
		δ (ppm)	J (Hz)	δ (ppm)	δ (ppm)	J (Hz)	δ (ppm)
Porção ácida							
1''	C			128,0			128,0
2''	CH	7,87	1H, d (1,7)	115,3	7,87	1H, d (2,0)	115,6
3''	C			149,3			149,9
4''	C			149,9			147,6
5''	CH	6,77	1H, d (8,1)	115,5	6,77	1H, d (8,4)	115,8
6''	CH	7,16	1H, dd (8,1;1,7)	127,3	7,16	1H, dd (8,5;2,0)	127,4
7''	CH	6,94	1H, d (13,0)	148,0	6,94	1H, d (13,0)	147,6
8''	CH	5,80	1H, d (13,0)	115,8	5,79	1H, d (13,0)	115,4
9''	C=O			168,3			167,0
OCH ₃ -3''	CH ₃	3,89	3H, s	56,3	3,81	3H, s	56,5
Aglicona							
1	C			132,8			133,0
2	CH	6,74	1H, d (1,9)	112,5	6,73	1H, d (3,0)	113,0
3	C			147,6			147,6
4	C			147,5			147,4
5	CH	6,83	1H, d (8,2)	117,0	6,82	1H, d (8,2)	117,1
6	CH	6,69	1H, dd (8,2;1,9)	121,2	6,68	1H, dd (8,2;3,0)	121,2
7 β	CH ₂	2,83	2H, t (7,5)	36,5	2,86-2,80	2H, m	36,6
8-a/ 8-b α	CH ₂	3,75/ 4,06	1H, m/ 1H, m	72,1	40,3-4,09/ 3,75-3,70	2H, m	72,1
OCH ₃ -4	CH ₃	3,82	3H, s	56,5	3,82	3H, s	56,6
Glucose							
1'	CH	4,36	1H, d (7,9)	104,1	4,36	1H, d (7,9)	104,3
2'	CH	3,40	1H, m	75,9	3,40	1H, dd (9,1;8,0)	76,1
3'	CH	3,82	1H, m	81,7			82,0
4'	CH	4,89	1H, dd (9,4; 9,3)	70,4	4,89/3,76	1H, t (9,6)/ 1H, t (9,1)	70,5
5'	CH	3,54	1H, m	76,1			76,1
6'-a/ 6'-b	CH ₂	3,54/3,63	1H, m/ 1H, m	62,4			62,5
Ramnose							
1''	CH	5,16	1H, d (1,7)	103,0	5,16	1H, d (1,8)	103,2
2''	CH	3,92	1H, m	72,1	3,92	1Hdd (3,4; 1,8)	72,2
3''	CH	3,58	1H, m	71,9	3,71-3,52	2H, m	72,4
4''	CH	3,30	1H, m	73,8	3,31-3,28	1H, m	73,8
5''	CH	3,60	1H, m	70,6	3,71-3,52	2H, m	70,5
6''	CH ₃	1,16	3H, d (6,2)	18,1	1,16	3H, d (6,2)	18,2

FONTE: O autor (2017)

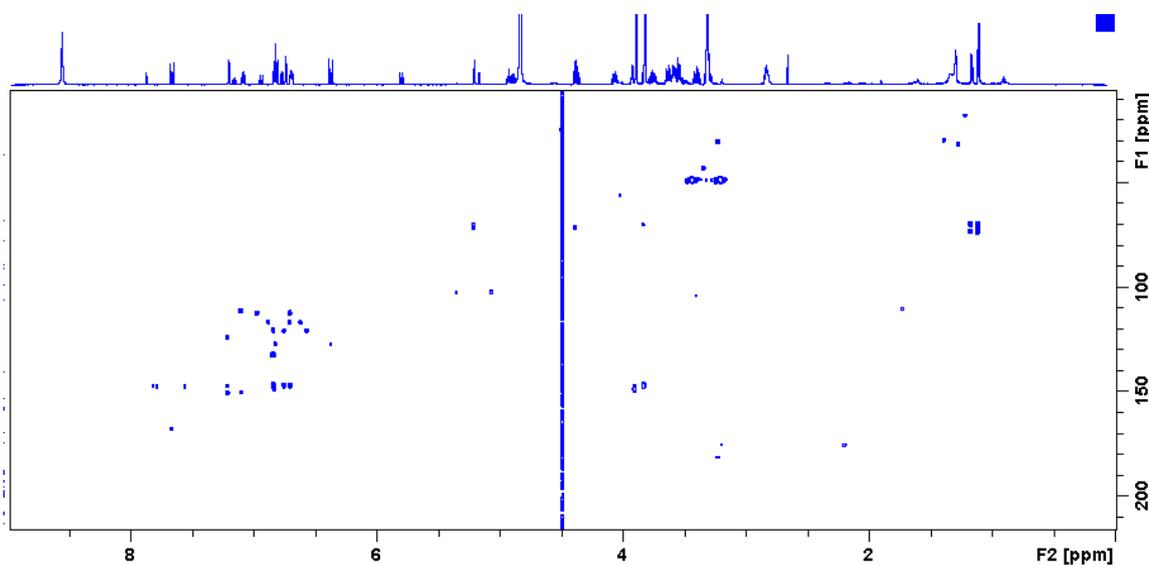
Os valores referentes aos deslocamentos químicos do ^{13}C foram extraídos dos mapas de correlação HSQC, apresentado na FIGURA 12, que detecta correlações entre ^1H e ^{13}C a uma ligação e HMBC, apresentado na FIGURA 13, que é utilizado para detectar correlações entre ^1H e ^{13}C a três ligações, ou seja, a longa distância.

FIGURA 12 – MAPA DE CORRELAÇÃO HSQC DOS ISÔMEROS *TRANS*-MARTINOSÍDEO E *CIS*-MARTINOSÍDEO (600 MHz, CD_3OD , 20°C)



FONTE: O autor (2017)

FIGURA 13 – MAPA DE CORRELAÇÃO HMBC DOS ISÔMEROS *TRANS*-MARTINOSÍDEO E *CIS*-MARTINOSÍDEO (600 MHz, CD_3OD , 20°C)



FONTE: O autor (2017)

O isolado martinósídeo (*trans* e *cis*) é um fenilpropanoide glicosídico e possui atividade antioxidante. (WANG et al., 1996). Esse composto, assim como o verbascosídeo (verbascosídeo), também isolado da espécie *B. stachyoides*, é amplamente distribuído no reino vegetal e é componente da fração fenólica de vários extratos vegetais. (OWEN et al., 2003). Os resultados do estudo de Papoutsi et al. (2006) indicaram que os fenilpropanoides glicosídicos, verbascosídeo e martinósídeo, podem atuar como antagonistas do estrogênio, em baixas concentrações (10^{-7} - 10^{-9} M) principalmente na via ER α . Além disso, sugerem que estes dois compostos, podem ser efetivos na prevenção do câncer de mama, com atividade antiestrogênica, similar ao antiestrogênio puro ICI 182780. Nos osteoblastos, o martinósídeo induziu a mineralização e formação de nódulos, enquanto o verbascosídeo inibiu a formação de nódulos, assim como ICI182780. As diferentes ações do verbascosídeo e martinósídeo no processo de mineralização podem ser atribuídas as diferenças em suas estruturas, resultando em diferentes afinidades com os subtipos de receptores estrogênicos, induzindo conformações diferentes nos receptores e conseqüentemente, variações nas atividades agonista/antagonistas.

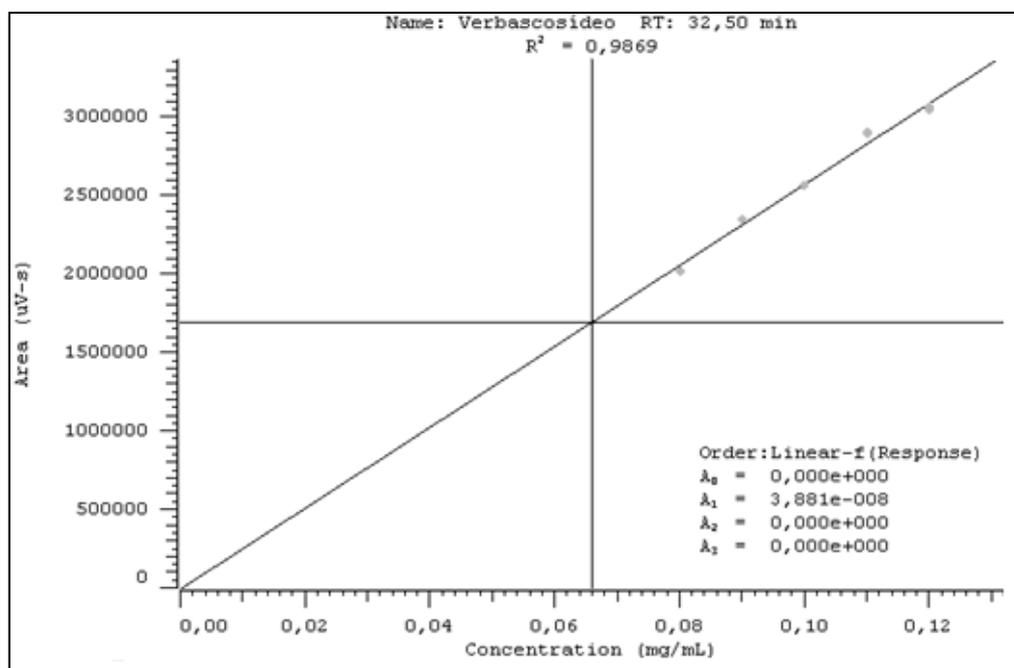
4.3 VALIDAÇÃO DE MÉTODO ANALÍTICO PARA QUANTIFICAÇÃO DO MARCADOR VERBASCOSÍDEO

A curva analítica do padrão de verbascosídeo apresentou-se linear na faixa de trabalho pretendida com um coeficiente de determinação (r^2) de 0,9869, sendo maior que a especificação para fitoterápicos que é de 0,98, como demonstra a FIGURA 14.

Após obtenção da curva analítica foi possível calcular a concentração de verbascosídeo presente na amostra de extrato alcoólico bruto das partes aéreas. Foram pesados 134 mg da amostra extrato alcoólico bruto (equivalente a 1 g de droga vegetal seca, pois de 5970 g do material vegetal seco de partida, obteve-se 797,64 g de extrato alcoólico bruto seco) e diluídos para balão volumétrico de 50 mL com metanol, depois essa solução foi diluída 1:5 em fase diluente obtendo-se uma diluição final de 1:250. A concentração encontrada foi de 21,47 mg/g de verbascosídeo em relação a droga vegetal seca, como mostra a FIGURA 15. A

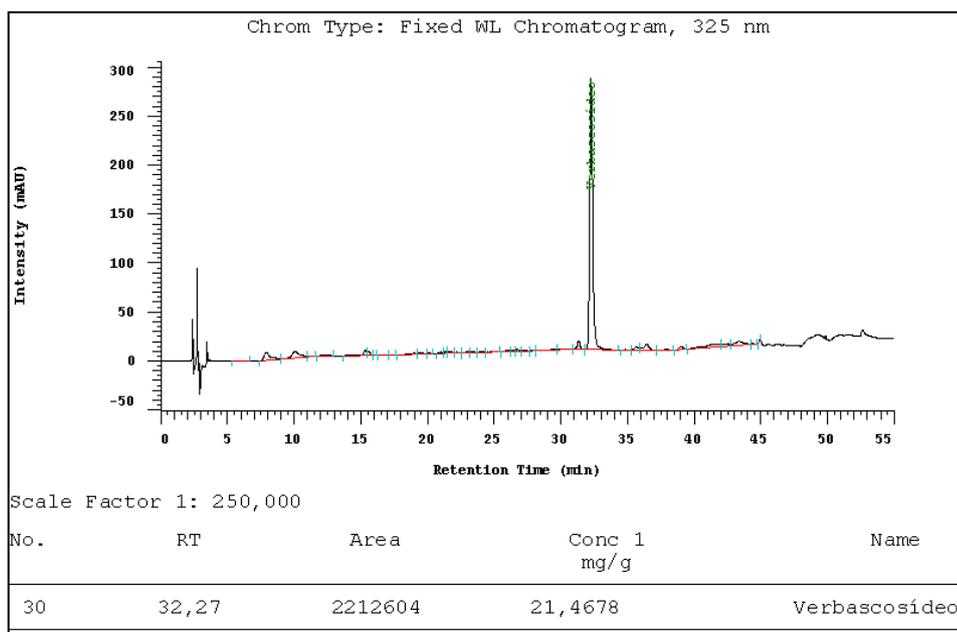
amostra foi diluída para ficar dentro da curva analítica conforme o cálculo: $21,47 \text{ mg} / 250 \text{ mL} = 0,085 \text{ mg/mL}$ de concentração final de verbascosídeo.

FIGURA 14 – CURVA DE LINEARIDADE COM O PADRÃO VERBASCOSÍDEO



FONTE: O autor (2013)

FIGURA 15 – CONCENTRAÇÃO DE VERBASCOSÍDEO PRESENTE NO EXTRATO ALCOÓLICO BRUTO DAS PARTES AÉREAS DE *B. stachyoides*



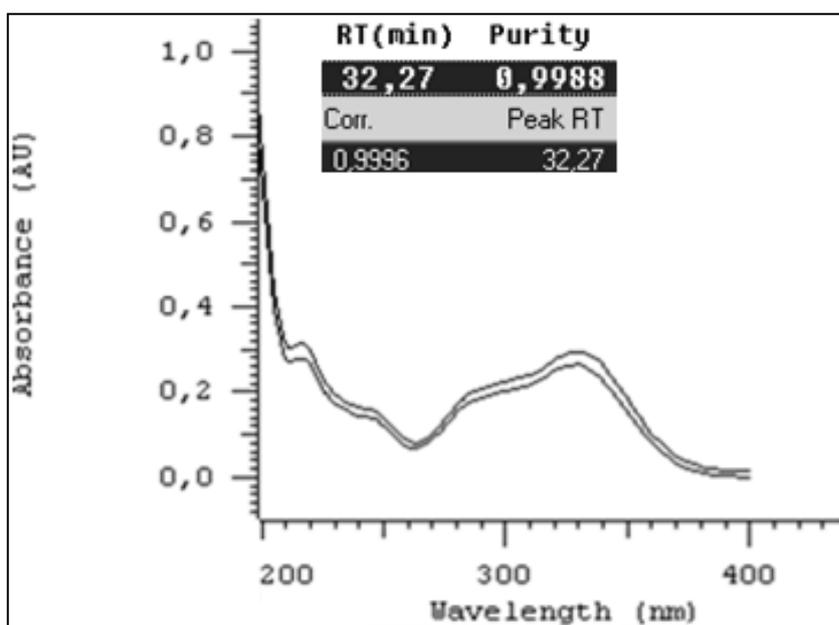
FONTE: O autor (2013)

O verbascosídeo quantificado no extrato alcoólico bruto das partes aéreas foi escolhido como marcador devido ao teor elevado. Portanto, foi realizada a validação analítica do método que poderá ser utilizado para a padronização no controle de qualidade de um possível medicamento fitoterápico desenvolvido com as partes aéreas de *Buddleja stachyoides*.

A influência do solvente álcool etílico hidratado de cereais 96 °GL foi avaliada através do ensaio de especificidade, o qual não apresentou nenhum pico com o mesmo tempo de retenção que o verbascosídeo ou alguma semelhança espectral com o padrão. Dessa forma, comprovou-se que o solvente utilizado na extração não possui nenhum componente que possa promover interferência na detecção de verbascosídeo.

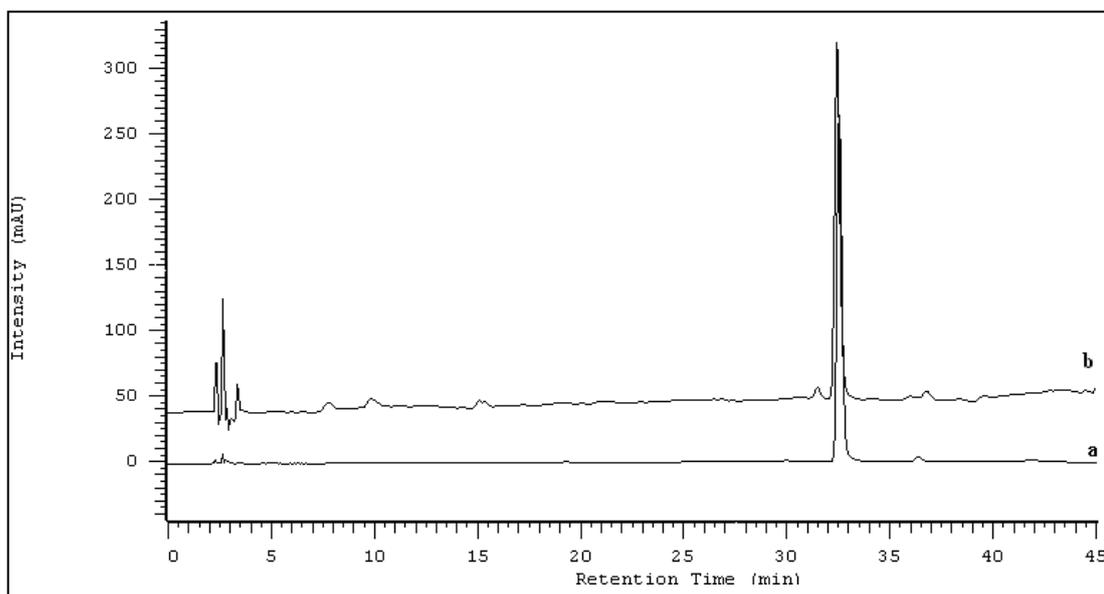
A FIGURA 16 apresenta o espectro de UV com absorção em 329,1 nm, podendo ser visualizada a pureza do pico do verbascosídeo (99,88%), presente no extrato alcoólico bruto das partes aéreas, sendo maior que a especificação de 99%. A comparação espectral entre o pico do verbascosídeo da amostra e o padrão de verbascosídeo demonstrou uma correlação espectral de 99,96%, indicando a existência de similaridade entre os espectros de UV e mesmo perfil cromatográfico, conforme FIGURA 17.

FIGURA 16 – ESPECTRO DE UV, PUREZA E CORRELAÇÃO ESPECTRAL DO PICO DO VERBASCOSÍDEO PRESENTE NO EXTRATO ALCOÓLICO BRUTO DAS PARTES AÉREAS DE *B. stachyoides*



FONTE: O autor (2013)

FIGURA 17 – PERFIL CROMATOGRÁFICO (*FINGERPRINT*) DO EXTRATO ALCOÓLICO BRUTO DAS PARTES AÉREAS DE *B. stachyoides* E PADRÃO DE TRABALHO VERBASCOSÍDEO



FONTE: O autor (2013)

LEGENDA: a: Padrão de referência verbascosídeo; b: extrato alcoólico bruto

A precisão por repetibilidade para o analista 1 apresentou desvio padrão relativo (DPR%) entre as 6 injeções de 0,87% e concentração média de 21,44 mg/g. O analista 2 apresentou concentração média de 20,57 mg/g e desvio padrão relativo de 0,41%, estes resultados estão dentro dos limites especificados ($DPR \leq 5\%$). Na precisão intermediária a concentração média entre os dois analistas foi de 21,01 mg/g com desvio padrão relativo de 2,26%, valor dentro dos limites de especificação ($DPR \leq 5\%$). Através destes resultados pode-se confirmar que o método proposto é reprodutível.

No ensaio de exatidão foram encontradas concentrações práticas de 0,083, 0,105 e 0,116 mg/mL, e comparando-se com as concentrações teóricas obteve-se índices de recuperação de 100,72%, 98,32% e 97,81% para as concentrações baixa, média e alta, respectivamente. Portanto, o método proposto apresentou exatidão, pois os índices de recuperação do padrão adicionado permaneceram dentro da faixa de 95% a 105%. (BRASIL, 2003).

No ensaio de robustez, o parâmetro estabilidade da solução apresentou teor de verbascosídeo de 20,92 mg/g com desvio padrão relativo de 0,28%, comparando-se com média da precisão intermediária, indicando que a amostra permanece estável, alterando pouco o teor após 24 horas do seu preparo. No parâmetro pH e

composição da fase móvel, ao diluir a fase móvel A 1:2, além da alteração da composição da fase móvel, houve também modificação do pH (que possuía um valor aproximado de 2,0 e nesta análise ficou em torno de 3,0). Obteve-se uma concentração de verbascosídeo de 20,45 mg/g e desvio padrão relativo de 1,81%. No parâmetro temperatura do forno, a concentração encontrada foi de 20,59 mg/g com desvio padrão relativo de 1,41%. Os três parâmetros apresentaram-se robustos para o método proposto, pois todos os desvios padrão relativo foram inferiores ao limite especificado ($DPR \leq 5\%$). A TABELA 7 apresenta os resultados obtidos na validação analítica do método de quantificação de verbascosídeo.

Validação é um processo dinâmico e constante que deve ser iniciado com o planejamento da estratégia analítica e continuado ao longo de todo o seu desenvolvimento e transferência. (BARROS, 2002). O método analítico deve ser revalidado sempre que ocorrerem modificações no processo, equipamento, padronização da amostra, procedimento ou quando o mesmo for usado novamente após certo período de tempo. As normas internacionais, nacionais e sistemas da qualidade destacam a importância da validação de métodos analíticos e a documentação do trabalho de validação para a obtenção de resultados confiáveis e adequados ao uso pretendido. (RIBANI et al., 2004).

O método analítico desenvolvido para determinação do marcador verbascosídeo, composto majoritário, presente no extrato bruto das partes aéreas de *B. stachyoides*, demonstrou ser confiável e adequado, pois atendeu todos os parâmetros requeridos pela Resolução - RE nº 899, de 29 de maio de 2003. Este método pode auxiliar na padronização do marcador no controle de qualidade, se futuramente, for desenvolvido um medicamento a partir das partes aéreas de *B. stachyoides*.

A partir da quantificação do teor de verbascosídeo presente no extrato bruto das partes aéreas de *B. stachyoides* (21,47 mg/g), foi possível determinar a quantidade do marcador nas doses de 300, 600 e 900 mg/kg utilizadas nos testes farmacológicos, (6,44; 12,88 e 19,32 mg/kg) ou (0,01, 0,02 e 0,03 mmol/kg) de verbascosídeo, respectivamente.

TABELA 7 – RESULTADOS DA VALIDAÇÃO DE MÉTODO ANALÍTICO PARA QUANTIFICAÇÃO DE VERBASCOSÍDEO DO EXTRATO BRUTO DAS PARTES AÉREAS DE *Buddleja stachyoides*

PARÂMETRO ANALISADO		ESPECIFICAÇÃO	RESULTADO
Especificidade	Influência do excipiente	Não podem interferir no doseamento do analito	Não houve interferência do álcool etílico
	Pureza do pico	Mín.99%	99,88%
	Correlação com pico padrão	Mín.95%	99,96%
	<i>Fingerprint</i>	Amostras com mesmo perfil cromatográfico	Amostras com mesmo perfil cromatográfico
Linearidade	Curva analítica	$r^2 \geq 0,98$	$r^2 = 0,9869$
Precisão	Repetibilidade	Analista 1: DPR $\leq 5\%$ Analista 2: DPR $\leq 5\%$	0,87% 0,41%
	Intermediária	DPR $\leq 5\%$	2,26%
Exatidão	Adição de Padrão	Recuperação 95 a 105%	100,72%
			98,32%
			97,80%
Robustez	Estabilidade da solução pH e composição FM Temperatura do forno	DPR $\leq 5\%$	0,28%
			1,81%
			1,41%

FONTE: O autor (2017)

LEGENDA: DPR: Desvio Padrão Relativo; r^2 = coeficiente de determinação; FM: fase móvel

4.4 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE LARVICIDA DOS EXTRATOS E FRAÇÕES DAS PARTES AÉREAS E RAÍZES DE *Buddleja stachyoides* SOBRE *Aedes aegypti*

Os extratos brutos e frações de *B. stachyoides* foram avaliados quanto à possível toxicidade sobre as larvas de *Aedes aegypti* e os resultados obtidos estão demonstrados na TABELA 8. As amostras que apresentaram atividade larvicida foram a fração hexânica das partes aéreas (CL₅₀: 379,58 µg/mL), o extrato bruto das raízes (CL₅₀: 547,01 µg/mL) e a fração hexânica das raízes (CL₅₀: 584,51 µg/mL).

O uso de inseticidas no controle de vetores desempenha um papel importante na prevenção da transmissão de doenças, principalmente aquelas transmitidas por *Aedes aegypti*, tais como: dengue, febre amarela, Zika e Chikungunya. No entanto, o controle químico muitas vezes resulta em resistência dos insetos aos inseticidas sintéticos. (HEMINGWAY; RANSON, 2000). Por isso, diversos estudos têm focado em inseticidas ou larvicidas de origem natural como método alternativo, por serem biodegradáveis, apresentarem baixa toxicidade em

humanos e maior seletividade quando comparados aos sintéticos. (GOVINDARAJAN et al., 2013; SILVA et al., 2015).

A revisão de Garcez (2013) constatou que os metabólitos secundários, obtidos de várias espécies de plantas com atividades larvicidas frente a larvas de *A. aegypti*, são compostos oriundos, predominantemente, da investigação de extratos de raízes. As amidas que têm parte da molécula originada diretamente de ácidos graxos apresentam boa atividade larvicida, isto pode explicar o motivo das frações hexânicas (partes aéreas e raízes) e o extrato bruto das raízes terem sido mais ativas.

Outras classes de compostos também apresentaram atividade larvicida, tais como, cumarinas, saponinas, sesquiterpenos, fenilpropanoides, terpenoides entre outros. (GARCEZ, 2013). Foram encontrados na literatura relatos de compostos bioativos pertencentes às classes dos mono-, sesqui-, di-, tri- e tetranortriterpenos, como por exemplo o hinokitiol que é um monoterpene, tipo tropolona, com propriedades antimicrobiana e fitoalexínica (composto que repele; tóxico para plantas e animais), que foi caracterizada como o constituinte larvicida de *Chamaecyparis obtusa*. (JANG et al., 2005). Os fenilpropanoides são compostos tipo C6-C3 (relacionados biossinteticamente com a fenilalanina e a tirosina), originados nas etapas iniciais da via do ácido chiquímico, a maioria das substâncias desta classe com propriedade larvicida são comumente encontrados em óleos essenciais. Dentre eles, a elemicina é considerada um inseticida natural que, além de sua atividade larvicida contra *A. aegypti*, possui atividade *anti-feedant* (inibe o comportamento alimentar normal) contra os coleópteros *Tribolium confusum*, *Sitophilus granarius* e *Trogoderma granarium*. (IOSET et al., 2001; POPLAWSKI et al., 2000; GARCEZ, 2013). Apesar de ter sido identificado na espécie apenas compostos representantes das classes de ácidos graxos e fenilpropanoides, no ensaio fitoquímico realizado por Oliveira (2012) foi observado que estão presentes os compostos iridoides, triterpenos, saponinas, flavonoides, cumarinas e fenois, mencionados por Mahlke (2007) para as diversas espécies do gênero *Buddleja*.

Os resultados promissores indicam a possibilidade de se obter um larvicida proveniente da espécie *B. stachyoides*. Porém, seria interessante realizar testes mais específicos para avaliar quais compostos e mecanismos de ação estão relacionados aos efeitos tóxicos.

TABELA 8 – RESULTADOS OBTIDOS DOS EXTRATOS E FRAÇÕES NA AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE LARVICIDA SOBRE *Aedes aegypti* ATRAVÉS DA CONCENTRAÇÃO LETAL (CL₅₀)

AMOSTRAS DE <i>B. stachyoides</i>	Nº DE LARVAS MORTAS APOS 24 HORAS/ CONCENTRAÇÃO			CL ₅₀ µg/mL	INTERVALO DE CONFIANÇA DE 95% (µg/mL)
	250 µg/mL	500 µg/mL	1000 µg/mL		
EB-PA	1	1	3	>1000	-
FH-PA	5	37	40	379,58	337,58 - 426,81
FC-PA	2	2	13	>1000	-
FAE-PA	1	4	4	>1000	-
FRE-PA	1	1	12	>1000	-
EB-R	12	17	44	547,01	445,16 - 672,16
FH-R	11	15	42	584,51	483,41 - 706,77
FC-R	5	6	1	>1000	-
FAE-R	1	9	16	>1000	-
FRE-R	1	5	18	>1000	-
C	0	1	0	>1000	-

FONTE: O autor (2017)

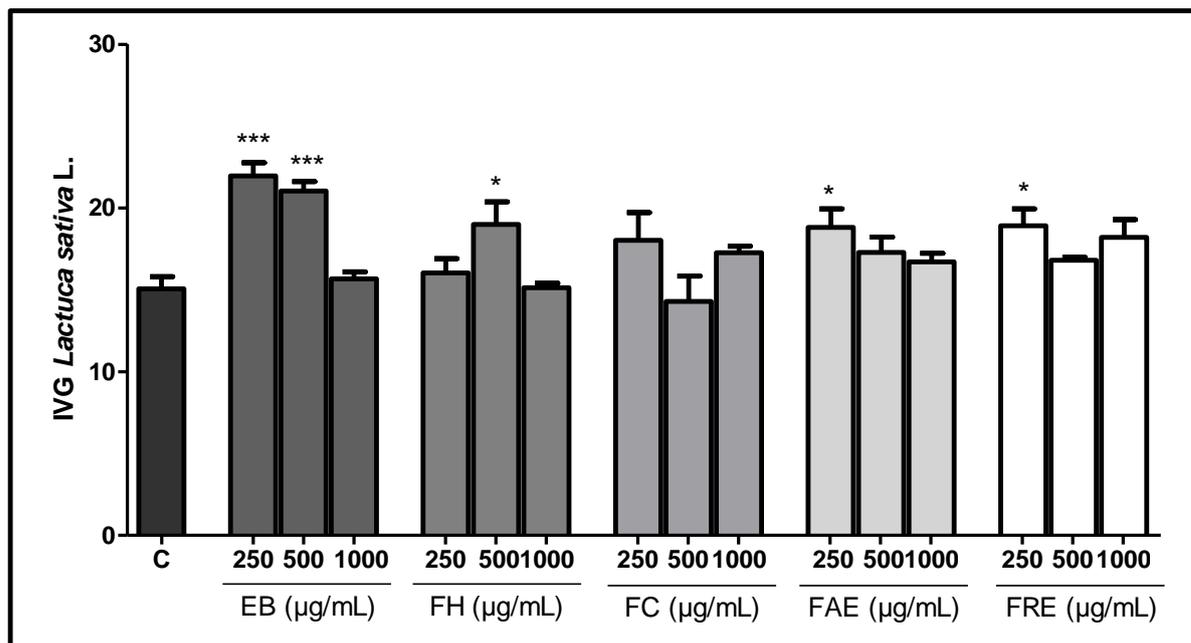
LEGENDA: EB-PA: extrato bruto das partes aéreas; FH-PA: fração hexano das partes aéreas; FC-PA: fração clorofórmio das partes aéreas; FAE-PA: fração acetato de etila das partes aéreas; FRE-PA: fração remanescente das partes aéreas; EB-R: extrato bruto das raízes; FH-R: fração hexano das raízes; FC-R: fração clorofórmio das raízes; FAE-R: fração acetato de etila das raízes; FRE-R: fração remanescente das raízes; C: Controle água destilada

4.5 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ALELOPÁTICA

4.5.1 Teste de Germinação

No teste de germinação para *Lactuca sativa* L. foi determinado o índice de velocidade de germinação (IVG) e os resultados obtidos para as amostras das partes aéreas e raízes de *B. stachyoides* podem ser visualizados nos GRÁFICOS 1 e 2.

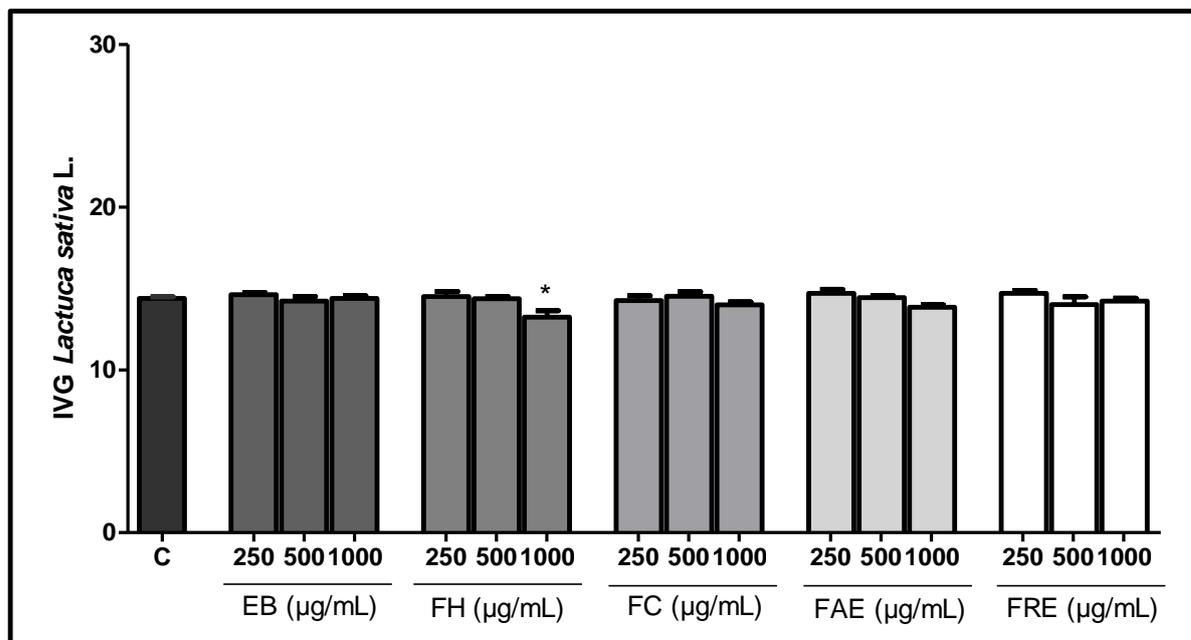
GRÁFICO 1 – ÍNDICE DE VELOCIDADE DE GERMINAÇÃO (IVG) DE *Lactuca sativa* L. TRATADAS COM AMOSTRAS DAS PARTES AÉREAS DE *B. stachyoides*



FONTE: O autor (2017)

LEGENDA: EB: extrato bruto; FH: fração hexano; FC: fração clorofórmio; FAE: fração acetato de etila; FRE: fração remanescente; C: controle água destilada. Cada coluna representa a média \pm desvio padrão de 4 placas. Os níveis de significância são indicados por * $p < 0,05$ e *** $p < 0,001$ quando comparados com o controle (ANOVA de uma via seguida do teste de Tukey).

GRÁFICO 2 – ÍNDICE DE VELOCIDADE DE GERMINAÇÃO (IVG) DE *Lactuca sativa* L. NAS AMOSTRAS DAS RAÍZES DE *B. stachyoides*



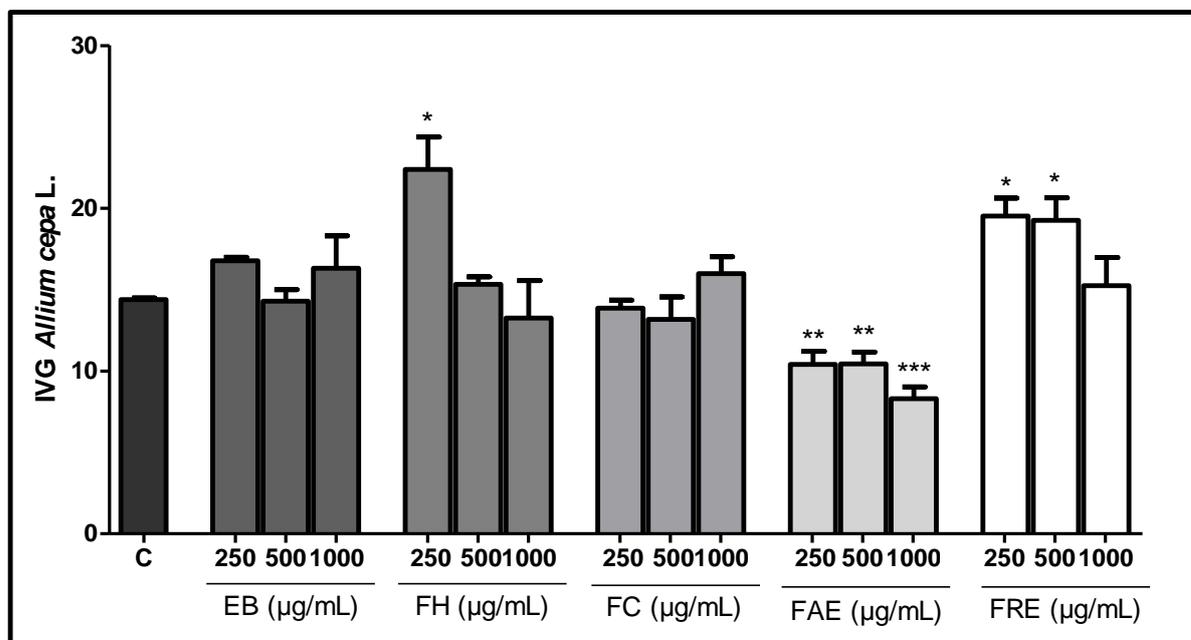
FONTE: O autor (2017)

LEGENDA: EB: extrato bruto; FH: fração hexano; FC: fração clorofórmio; FAE: fração acetato de etila; FRE: fração remanescente; C: controle água destilada. Cada coluna representa a média \pm desvio padrão de 4 placas. Os níveis de significância são indicados por * $p < 0,05$ quando comparados com o controle (ANOVA de uma via seguida do teste de Tukey)

Analisando-se os valores de IVG obtidos para as sementes de *Lactuca sativa* L. tratadas com as amostras das partes aéreas de *B. stachyoides*, verificou-se que as concentrações 250 e 500 µg/mL do extrato bruto apresentaram diferença significativa ($p < 0,001$) em relação ao controle, as concentrações de 500 µg/mL da fração hexânica, 250 µg/mL da frações acetato de etila e 250 µg/mL da fração remanescente apresentaram diferença significativa ($p < 0,05$), quando comparadas ao controle água destilada, indicando que essas concentrações aumentaram a velocidade de germinação das sementes, conforme GRÁFICO 1. A concentração de 1000 µg/mL da fração hexânica das raízes de *B. stachyoides*, foi a única amostra que apresentou diferença significativa ($p < 0,05$) quando comparada ao controle, indicando uma redução na velocidade de germinação das sementes de *Lactuca sativa* L., conforme GRÁFICO 2.

No teste de germinação para *Allium cepa* L. foi determinado o índice de velocidade de germinação (IVG) e os resultados obtidos para as amostras das partes aéreas e raízes de *B. stachyoides* podem ser visualizadas nos GRÁFICOS 3 e 4.

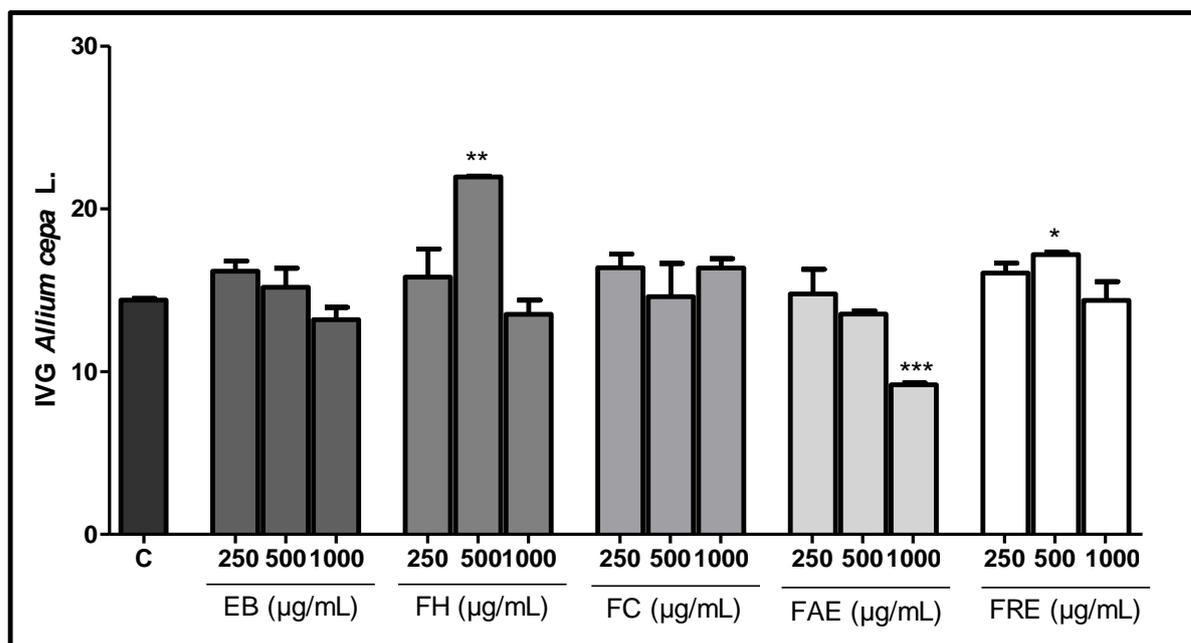
GRÁFICO 3 – ÍNDICE DE VELOCIDADE DE GERMINAÇÃO (IVG) DE *Allium cepa* L. NAS AMOSTRAS DAS PARTES AÉREAS DE *B. stachyoides*



FONTE: O autor (2017)

LEGENDA: EB: extrato bruto; FH: fração hexano; FC: fração clorofórmio; FAE: fração acetato de etila; FRE: fração remanescente; C: controle água destilada. Cada coluna representa a média ± desvio padrão de 4 placas. Os níveis de significância são indicados por * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ quando comparados com o controle (ANOVA de uma via seguida do teste de Tukey)

GRÁFICO 4 – ÍNDICE DE VELOCIDADE DE GERMINAÇÃO (IVG) DE *Allium cepa* L. NAS AMOSTRAS DAS RAÍZES DE *B. stachyoides*



FONTE: O autor (2017)

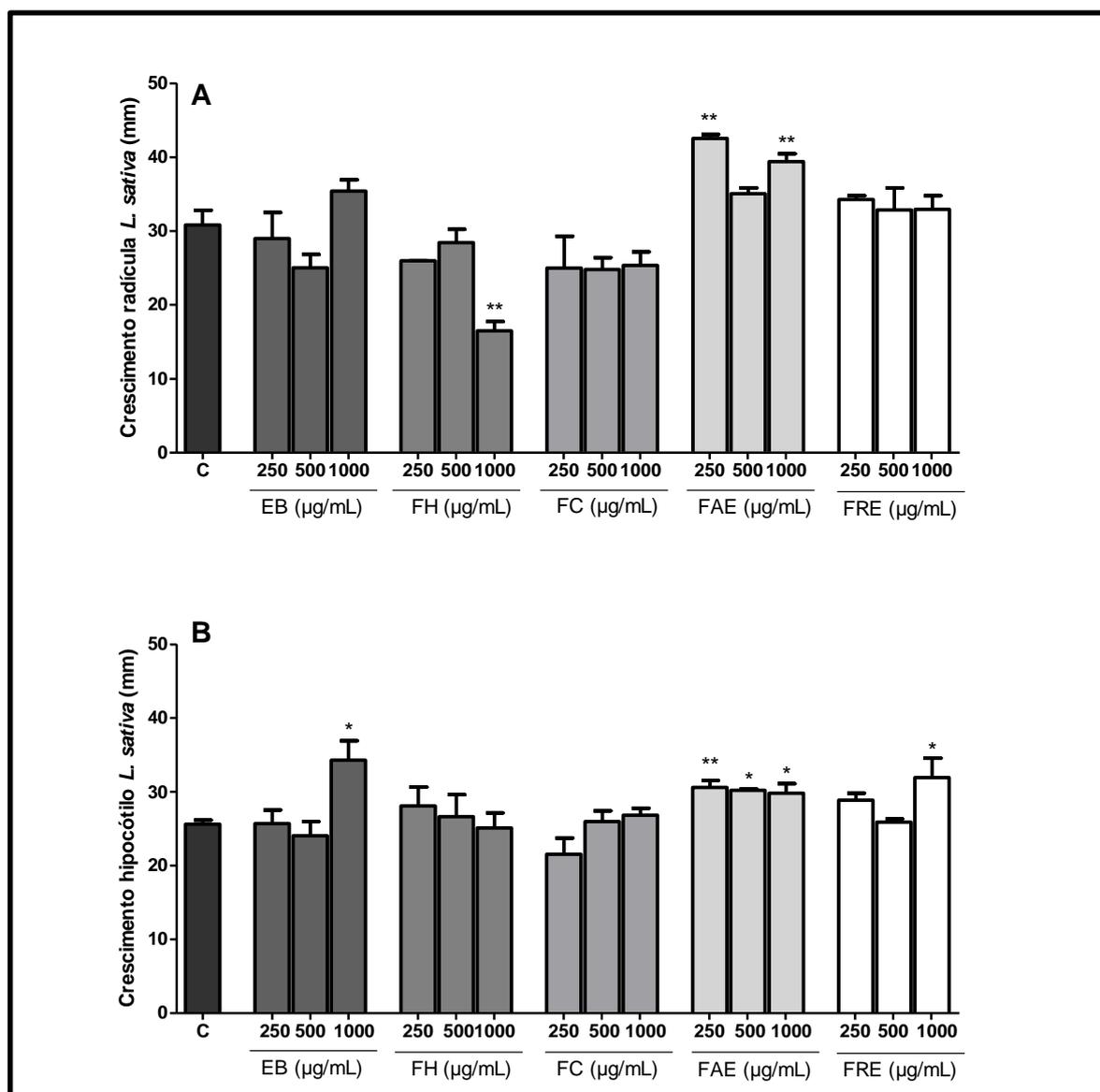
LEGENDA: EB: extrato bruto; FH: fração hexano; FC: fração clorofórmio; FAE: fração acetato de etila; FRE: fração remanescente; C: controle água destilada. Cada coluna representa a média ± desvio padrão de 4 placas. Os níveis de significância são indicados por * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ quando comparados com o controle (ANOVA de uma via seguida do teste de Tukey)

Analisando-se os valores de IVG obtidos para as sementes de *Allium cepa* L. tratadas com as amostras das partes aéreas, verificou-se que as concentrações de 250 µg/mL da fração hexânica, 250 e 500 µg/mL da fração remanescente apresentaram diferença significativa ($p < 0,05$) quando comparadas ao controle água destilada, indicando que houve aumento da velocidade de germinação das sementes, já as concentrações de 250, 500 e 1000 µg/mL da fração acetato de etila, diminuiram a velocidade de germinação das sementes, com diferença significativa ($p < 0,01$ e $p < 0,001$), conforme GRÁFICO 3. Para as amostras das raízes de *B. stachyoides*, verificou-se que as concentrações de 500 µg/mL das frações hexânica e remanescente, aumentaram a velocidade de germinação das sementes, com diferença significativa ($p < 0,01$ e $p < 0,05$), respectivamente, e a concentração de 1000 µg/mL da fração acetato de etila diminuiu a velocidade de germinação das sementes de *Allium cepa* L., com diferença significativa ($p < 0,001$) em relação ao controle, demonstrado no GRÁFICO 4.

4.5.2 Teste de Crescimento

No teste de crescimento de *Lactuca sativa* L. tratada com as amostras das partes aéreas e raízes de *B. stachyoides*, foram realizadas medições das radículas e hipocótilos e os valores em milímetros estão plotados nos GRÁFICOS 5 e 6.

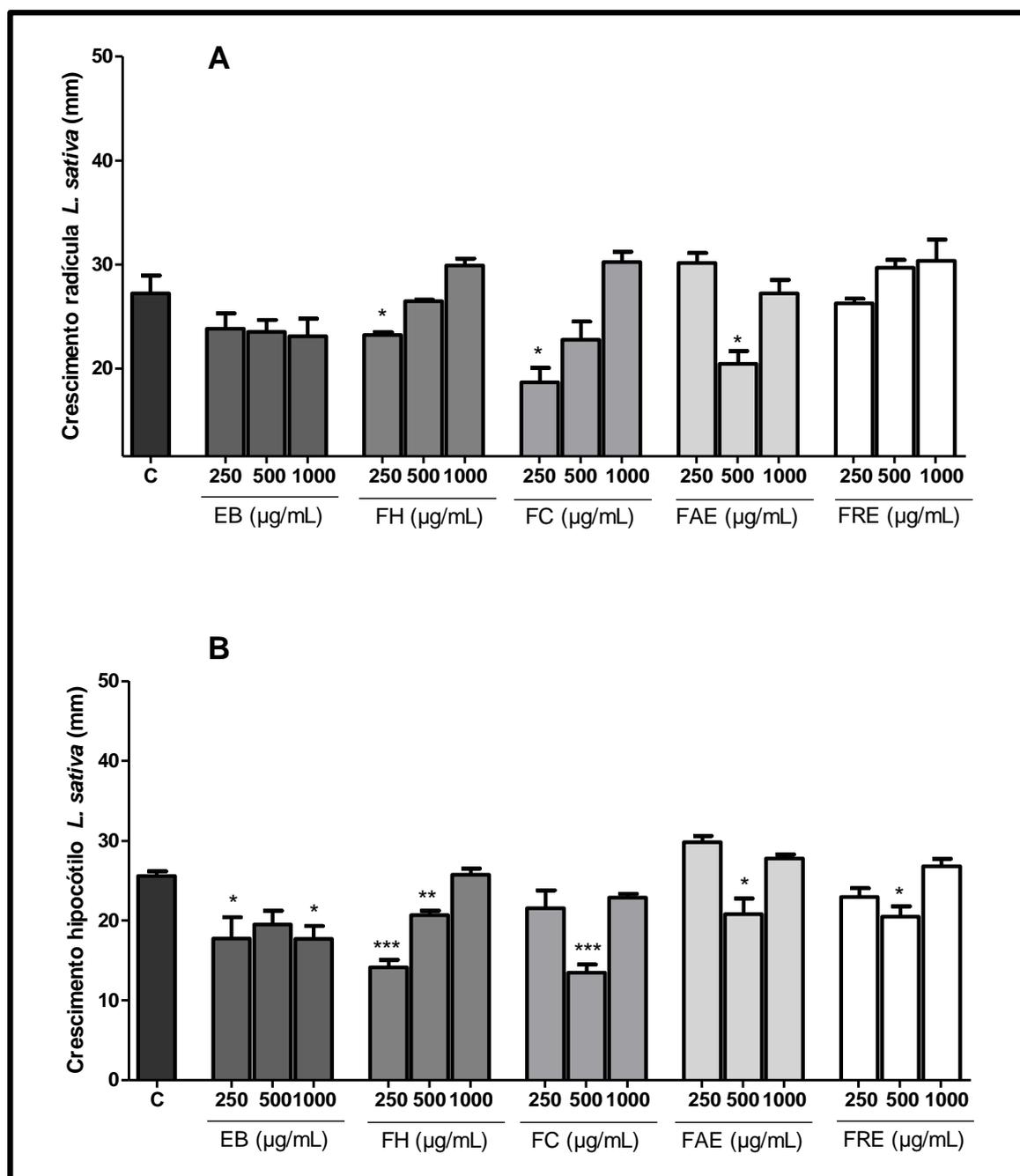
GRÁFICO 5 – CRESCIMENTO DAS RADÍCULAS E HIPOCÓTILOS DE *Lactuca sativa* L. TRATADA COM EXTRATO BRUTO E FRAÇÕES DAS PARTES AÉREAS DE *B. stachyoides*



FONTE: O autor (2017)

LEGENDA: EB: extrato bruto; FH: fração hexano; FC: fração clorofórmio; FAE: fração acetato de etila; FRE: fração remanescente; C: controle água destilada; A: Crescimento das radículas de *Lactuca sativa* L.; B: Crescimento dos hipocótilos de *Lactuca sativa* L. Cada coluna representa a média \pm desvio padrão de 10 radículas ou hipocótilos, sendo que a coluna C representa os valores do controle água destilada. Os níveis de significância são indicados por *p < 0,05 e **p < 0,01 quando comparados com o controle (ANOVA de uma via seguida do teste de Tukey)

GRÁFICO 6 – CRESCIMENTO DAS RADÍCULAS E HIPOCÓTILOS DE *Lactuca sativa* L. TRATADA COM EXTRATO BRUTO E FRAÇÕES DAS RAÍZES DE *B. stachyoides*



FONTE: O autor (2017)

LEGENDA: EB: extrato bruto; FH: fração hexano; FC: fração clorofórmio; FAE: fração acetato de etila; FRE: fração remanescente; C: controle água destilada; A: Crescimento das radículas de *Lactuca sativa* L.; B: Crescimento dos hipocótilos de *Lactuca sativa* L.. Cada coluna representa a média \pm desvio padrão de 10 radículas ou hipocótilos, sendo que a coluna C representa os valores do controle água destilada. Os níveis de significância são indicados por * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ quando comparados com o controle (ANOVA de uma via seguida do teste de Tukey)

Os resultados demonstraram inibição do crescimento das radículas de *Lactuca sativa* L. na concentração de 1000 $\mu\text{g/mL}$ da fração hexânica ($p < 0,01$) e um estímulo nas concentrações de 250 e 1000 $\mu\text{g/mL}$ da fração acetato de etila das

partes aéreas de *B. stachyoides*, com diferença significativa ($p < 0,01$) quando comparadas ao controle água destilada, conforme GRÁFICO 5A. Quanto ao crescimento dos hipocótilos, estes foram estimulados nas concentrações de 1000 $\mu\text{g/mL}$ do extrato bruto, 250, 500 e 1000 $\mu\text{g/mL}$ da fração acetato de etila e 1000 $\mu\text{g/mL}$ da fração remanescente, apresentando diferença significativa ($p < 0,05$ e $p < 0,01$), conforme GRÁFICO 5B.

Observando-se os resultados do crescimento das radículas de *Lactuca sativa* L., tratadas com as raízes de *B. stachyoides*, as concentrações de 250 $\mu\text{g/mL}$ das frações hexânica e clorofórmica e 500 $\mu\text{g/mL}$ da fração acetato de etila inibiram o crescimento, todas com diferença significativa ($p < 0,05$), em relação ao controle, conforme GRÁFICO 6A. Nos resultados do crescimento dos hipocótilos, verificou-se que as concentrações de 250 e 1000 $\mu\text{g/mL}$ do extrato bruto, 250 e 500 $\mu\text{g/mL}$ da fração hexânica, 500 $\mu\text{g/mL}$ das frações clorofórmio, acetato de etila e remanescente inibiram o crescimento, com diferença significativa ($p < 0,05$, $p < 0,01$ e $p < 0,001$) quando comparadas com o controle água destilada, conforme GRÁFICO 6B.

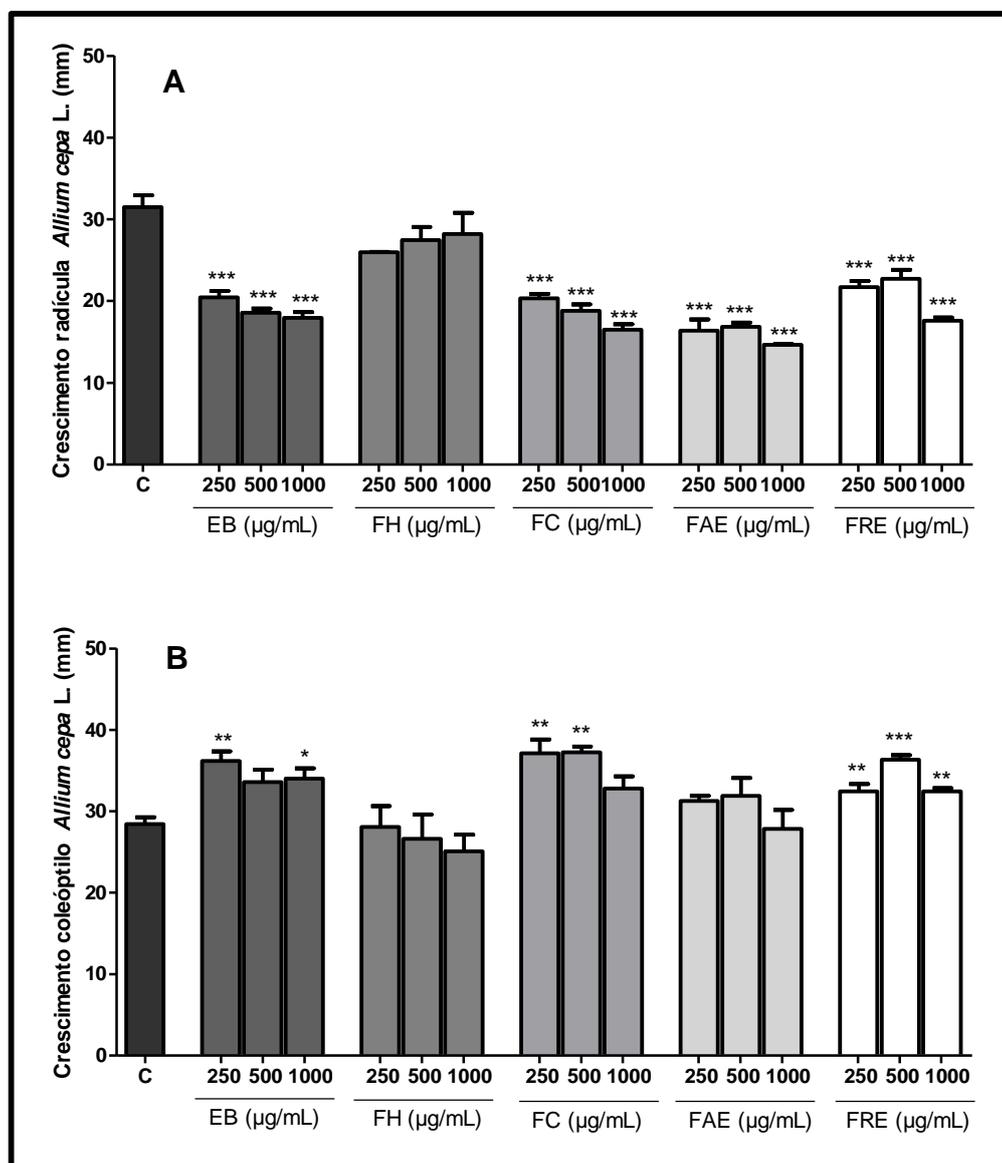
No teste de crescimento de *Allium cepa* L. tratada com as amostras das partes aéreas e raízes de *B. stachyoides*, foram realizadas medições das radículas e coleótilos e os valores em milímetros estão plotados nos GRÁFICOS 7 e 8.

Os resultados do crescimento das radículas de *Allium cepa* L., tratadas com as partes aéreas de *B. stachyoides*, nas concentrações 250, 500, 1000 $\mu\text{g/mL}$ do extrato bruto e das frações clorofórmica, acetato de etila e remanescente, inibiram o crescimento, com diferença significativa ($p < 0,001$) quando comparadas com o controle água destilada, conforme GRÁFICO 7A. Nos resultados do crescimento dos coleótilos, observou-se que as concentrações de 250 e 1000 $\mu\text{g/mL}$ do extrato bruto, 250 e 500 $\mu\text{g/mL}$ da fração clorofórmica e 250, 500 e 1000 $\mu\text{g/mL}$ da fração remanescente estimularam o crescimento, com diferença significativa ($p < 0,05$, $p < 0,01$ e $p < 0,001$), conforme GRÁFICO 7B.

O crescimento das radículas de *Allium cepa* L. tratadas com as raízes de *B. stachyoides*, apresentou inibição nas concentrações de 1000 $\mu\text{g/mL}$ das frações acetato de etila e remanescente, com diferença significativa ($p < 0,05$ e $p < 0,01$), respectivamente, conforme GRÁFICO 8A. Quanto ao crescimento dos coleótilos,

nenhuma amostra demonstrou interferência, pois não houve diferença significativa em relação ao controle, conforme GRÁFICO 8B.

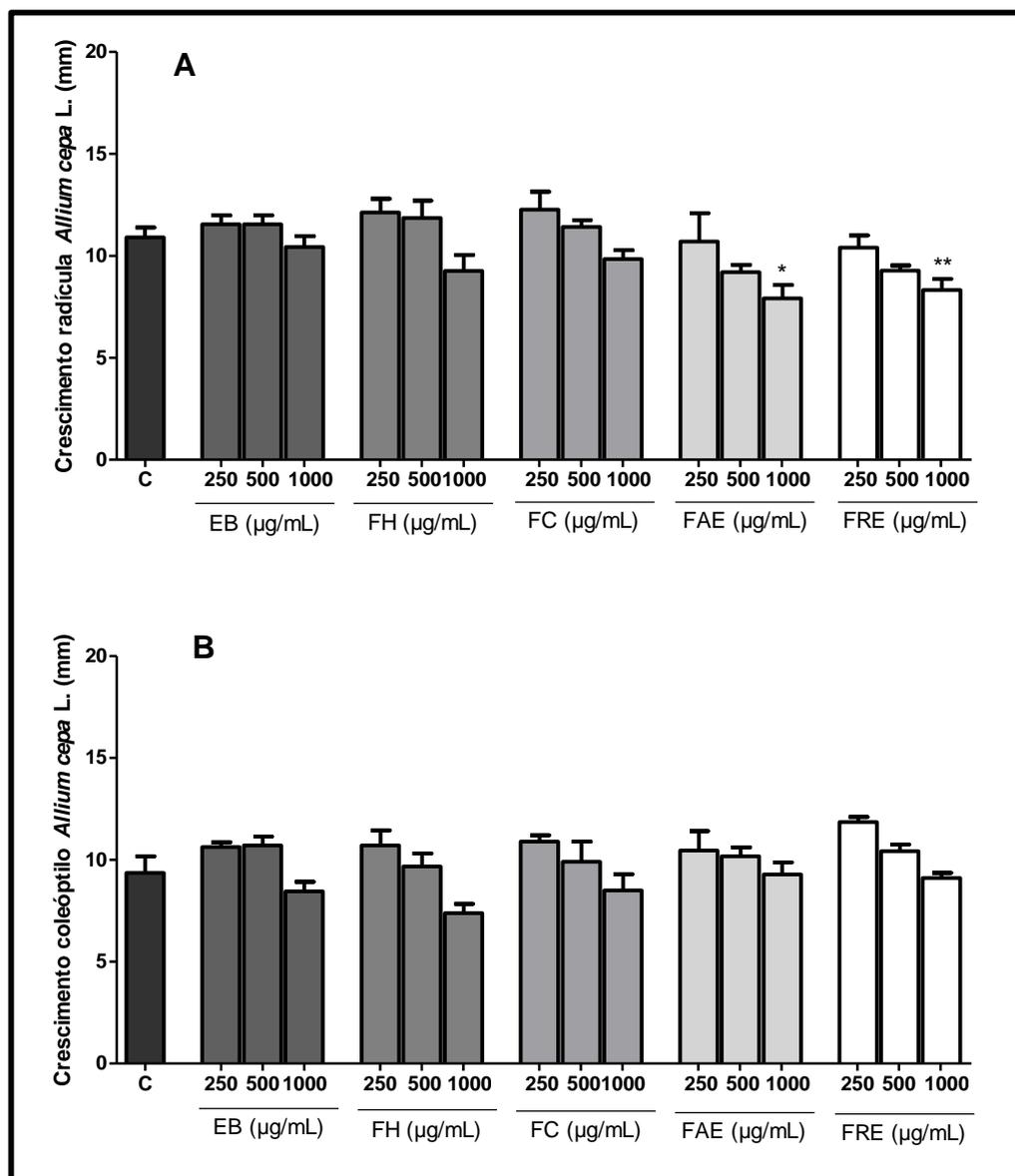
GRÁFICO 7 – CRESCIMENTO DAS RADÍCULAS E COLEÓPTILOS DE *Allium cepa* L. TRATADA COM EXTRATO BRUTO E FRAÇÕES DAS PARTES AÉREAS DE *B. stachyoides*



FONTE: O autor (2017)

LEGENDA: EB: extrato bruto; FH: fração hexano; FC: fração clorofórmio; FAE: fração acetato de etila; FRE: fração remanescente; C: controle água destilada; A: Crescimento das radículas de *Allium cepa* L.; B: Crescimento dos coleóptilos de *Allium cepa* L. Cada coluna representa a média \pm desvio padrão de 10 radículas ou coleóptilos, sendo que a coluna C representa os valores do controle água destilada. Os níveis de significância são indicados por * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ quando comparados com o controle (ANOVA de uma via seguida do teste de Tukey)

GRÁFICO 8 – CRESCIMENTO DAS RADÍCULAS E COLEÓTILOS DE *Allium cepa* L. TRATADA COM EXTRATO BRUTO E FRAÇÕES DAS RAÍZES DE *B. stachyoides*



FONTE: O autor (2017)

LEGENDA: EB: extrato bruto; FH: fração hexano; FC: fração clorofórmio; FAE: fração acetato de etila; FRE: fração remanescente; C: controle água destilada; A: Crescimento das radículas de *Allium cepa*; B: Crescimento dos coleótilos de *Allium cepa*. Cada coluna representa a média \pm desvio padrão de 10 radículas ou 10 coleótilos, sendo que a coluna C representa os valores do controle água destilada. Os níveis de significância são indicados por * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$ quando comparados com o controle (ANOVA de uma via seguida do teste de Tukey)

Os aleloquímicos possuem atividade similar aos herbicidas sintéticos podendo inibir a germinação e o crescimento de plantas, sendo que em alguns casos a dose utilizada é mais baixa que para os herbicidas sintéticos. (MACIAS et al., 1999). Portanto, herbicidas naturais podem apresentar vantagens, como novos

mecanismos de ação, alta biodegradabilidade e baixo impacto sobre ambiente. (MACIAS et al., 2006b).

Segundo Rizvi et al. (1992) ácidos fenólicos, cumarinas, polifenóis e flavonoides são os principais aleloquímicos responsáveis pela inibição da fotossíntese, por alterarem o transporte de elétrons e a fosforilação nos fotossistemas. A interação entre plantas é um sistema muito complexo e estudos indicam que há uma correlação entre a indução de EROs e a atividade alelopática e, os compostos fenólicos parecem desempenhar um papel nesta atividade.

No solo, os compostos fenólicos e terpenoides estão envolvidos com a inibição do processo de nitrificação. (WHITE, 1994). Os compostos fenólicos, tais como ácidos cafeico e ferúlico, miricetina, taninos e derivados de taninos, inibem a oxidação de NH_4^+ para NO_2^- por nitrossomonas. (RICE, 1984, GATTI et al., 2004). Já os terpenoides melhoraram a imobilização de amônio por organismos do solo, em vez da inibição do processo de nitrificação. (AMB et al., 2016).

O IVG é usado para avaliar o vigor das sementes, se este reduzir haverá uma perda progressiva na capacidade produtiva da semente e na uniformidade da germinação. (MAGUIRE, 1962).

As amostras das partes aéreas de *B. stachyoides*, de modo geral, demonstraram um efeito estimulador sobre a germinação das sementes e no crescimento das radículas e hipocótilos de *Lactuca sativa* L., é possível observar nos GRÁFICOS 1 e 5 que o extrato bruto, frações hexano, acetato de etila e remanescente apresentaram valores de IVG altos e conseqüentemente, maior estímulo no crescimento das radículas e hipocótilos. Apenas a concentração de 1000 $\mu\text{g/mL}$ da fração hexano apresentou inibição no crescimento das radículas, mas também seu IVG foi menor comparado as outras amostras. Esse efeito deve-se a sensibilidade do sistema radicular das plantas à ação dos aleloquímicos, de acordo com Hoffmann et al. (2007) o alongamento depende de divisões celulares e quando inibido seu desenvolvimento é comprometido. Assim, quanto menor o IVG, maior a dificuldade da planta se alongar. (OLIVEIRA et al., 2013).

No teste de germinação das sementes de *Allium cepa* L., as amostras das partes aéreas de *B. stachyoides*, tiveram um comportamento diferente, apresentando um estímulo na germinação das sementes tratadas com a fração hexano e fração remanescente, enquanto que a fração acetato de etila reduziu a

germinação. No teste de crescimento quase todas as amostras, exceto a fração hexânica, inibiram as radículas e estimularam os coleótilos, podendo ser visualizados nos GRÁFICOS 3 e 7. Presupõe-se que as estruturas das radículas foram afetadas por fitoconstituintes presentes no extrato bruto e frações. Esse efeito fitotóxico (inibição) sobre as radículas de *Allium cepa* L. pode ter ocorrido devido à absorção de compostos fenólicos, presentes nas amostras, nos tecidos radiculares, favorecida pelo contato físico da radícula com o papel filtro, o qual continha os extratos e frações. O efeito estimulador causado nos coleótilos de *Allium cepa* L. indica que nem todas as substâncias liberadas pelas plantas são inibidoras, podendo, ao contrário, ser estimulantes como exemplo os nutrientes minerais, aminoácidos e ácidos orgânicos, carboidratos e reguladores de crescimento. (TUKEY JÚNIOR, 1969). Portanto, os açúcares presentes nas amostras de partes aéreas de *B. stachyoides*, podem ter apresentado este efeito estimulante.

De modo geral, os extratos e frações das partes aéreas de *B. stachyoides* estimularam o crescimento radicular das sementes de eudicotiledôneas (alface), indicando que pode possuir aleloquímicos que ajudam a proporcionar o crescimento de outras plantas. Entretanto, esses mesmos extratos promoveram um efeito inibidor sobre as sementes de monocotiledôneas (cebola). Marian et al. (2011) que constataram que as sementes de monocotiledôneas são menos sensíveis aos efeitos dos aleloquímicos do que as sementes de eudicotiledôneas.

As amostras das raízes de *B. stachyoides* demonstraram que possuem compostos aleloquímicos que estão envolvidos na inibição e na modificação dos padrões de crescimento ou desenvolvimento, podendo ser observado nos GRÁFICOS 2 e 6, nos quais a germinação das sementes de *Lactuca sativa* L. foram reduzidas pela fração hexânica e, o extrato bruto e frações apresentaram efeito fitotóxico sobre o crescimento das radículas e hipocótilos de *Lactuca sativa* L. A germinação das sementes de *Allium cepa* L. e o crescimento das radículas também sofreram inibição pelas frações acetato de etila e remanescente, enquanto que não houve interferência sobre o crescimento dos coleótilos, conforme GRÁFICOS 4 e 8. Como as ações destes aleloquímicos sobre as plantas são bastante seletivas em suas respostas, torna-se difícil sintetizar o mecanismo de ação destes compostos. (SEIGLER, 1996).

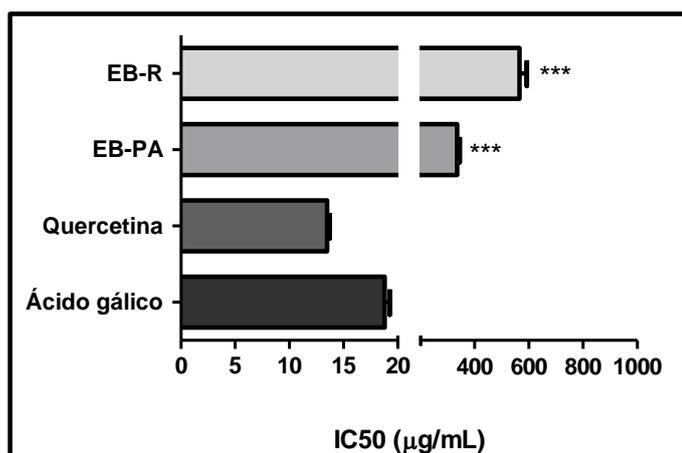
Esta avaliação alelopática das partes aéreas e raízes de *B. stachyoides* colaboram com as pesquisas sobre plantas medicinais com potencial alelopático, a fim de, abrir possibilidades de produção de hebicidas naturais.

4.6 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

4.6.1 Ensaio de captura do ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$)

No ensaio de captura do ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$), os extratos brutos de *B. stachyoides* apresentaram valores de IC_{50} de ($335,7 \pm 15,1 \mu\text{g/mL}$) para as partes aéreas e ($565,1 \pm 46,6 \mu\text{g/mL}$) para as raízes, ambas com diferença estatística ($p < 0,001$) em relação aos padrões. Estas concentrações foram maiores que as obtidas para os padrões de ácido gálico ($18,8 \pm 0,8 \mu\text{g/mL}$) e quercetina ($13,5 \pm 0,4 \mu\text{g/mL}$), conforme GRÁFICO 9. Esta discrepância entre os valores de inibição deve-se aos padrões serem substâncias puras e as amostras representarem extratos brutos complexos. Porém, mesmo em concentrações altas as amostras de *B. stachyoides* foram capazes de deter $O_2^{\cdot-}$, e o extrato bruto das partes aéreas apresentou maior capacidade de inibição do que o extrato bruto das raízes.

GRÁFICO 9 – COMPARAÇÃO DOS VALORES DE IC_{50} DAS AMOSTRAS DE *B. stachyoides* COM OS PADRÕES NO ENSAIO DE INIBIÇÃO DO ÂNION SUPERÓXIDO



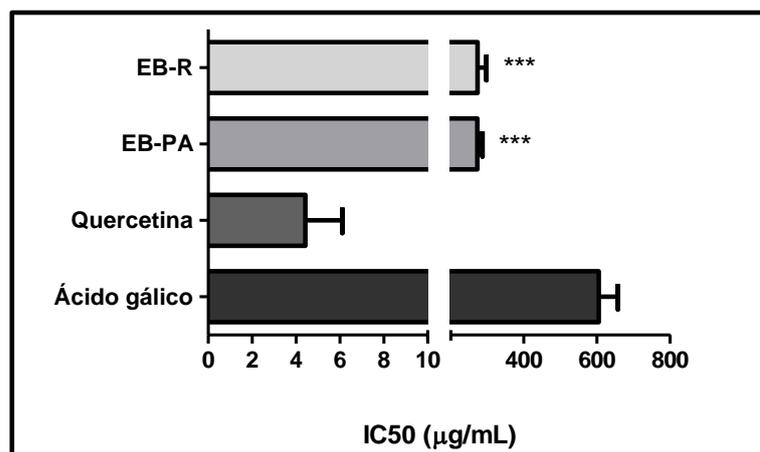
FONTE: O autor (2017)

LEGENDA: EB-PA: extrato bruto das partes aéreas de *B. stachyoides*; EB-R: extrato bruto das raízes de *B. stachyoides*. Cada coluna representa a média ± desvio padrão dos valores de IC_{50} . O nível de significância é indicado por *** $p < 0,001$ quando comparado aos padrões quercetina e ácido gálico (ANOVA de uma via seguida do teste de Tukey)

4.6.2 Ensaio de captura do radical óxido nítrico (NO[•])

No ensaio de inibição (captura) do radical óxido nítrico (NO[•]), os extratos brutos de *B. stachyoides* apresentaram valores de IC₅₀ de (272,7 ± 23,8) µg/mL para as partes aéreas e (273,1 ± 41,3) µg/mL para as raízes, ambas com diferença estatística (p<0,001) em relação aos padrões. Estas concentrações foram maiores do que a obtida para a quercetina (4,4 ± 41,3) µg/mL e menores do que a concentração de ácido gálico (604,5 ± 90,9 µg/mL), conforme GRÁFICO 10. Portanto, as amostras de *B. stachyoides* apresentaram capacidade de inibição do radical óxido nítrico superior ao padrão de ácido gálico e inferior à quercetina.

GRÁFICO 10 – COMPARAÇÃO DOS VALORES DE IC₅₀ DAS AMOSTRAS DE *B. stachyoides* COM OS PADRÕES NO ENSAIO DE CAPTURA DO RADICAL ÓXIDO NÍTRICO



FONTE: O autor (2017)

LEGENDA: EB- PA: extrato bruto das partes aéreas de *B. stachyoides*; EB-R: extrato bruto das raízes de *B. stachyoides*. Cada coluna representa a média ± desvio padrão dos valores de IC₅₀ (µg/mL). O nível de significância é indicado por *** p<0,001 quando comparado aos padrões quercetina e ácido gálico (ANOVA de uma via seguida do teste de Tukey)

O anion superóxido é a primeira espécie reativa do oxigênio (ERO) formada *in vivo*, sendo o primeiro intermediário da redução univalente do oxigênio, dando origem a todas as outras espécies reativas. (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1999). Sendo gerado fisiologicamente nas mitocôndrias, microsomas e peroxomas, apresenta meia vida longa, podendo reagir com outras moléculas por maior tempo. (ANDRADE JR et al., 2005). Um aumento na concentração intracelular de íons cálcio, num processo de estresse oxidativo, pode induzir uma conversão irreversível de xantina desidrogenase para xantina oxidase, levando a geração de O₂^{•-}. (MUTHUSWAMY et al, 2006). Os efeitos deletérios desta espécie reativa estão

envolvidos com a habilidade de gerar radicais secundários como H_2O_2 , por dismutação espontânea e $\cdot\text{OH}$, radical bastante tóxico, através da redução de quelatos de Fe (III) formando Fe^{2+} . O radical $\text{O}_2\cdot^-$ também tem a capacidade de liberar Fe^{2+} das proteínas de armazenamento e de ferro-sulfoproteínas, e ainda, pode reagir com óxido nítrico para formar peroxinitrito (ONOO^-) e com o radical $\cdot\text{OH}$ para produzir $^1\text{O}_2$. (ANDRADE JR et al., 2005; BARREIROS et al., 2006).

O nitrogênio também é capaz de gerar radicais livres, principalmente o óxido nítrico, cujo precursor é a L-arginina. (LEITE; SARNI, 2003). O radical óxido nítrico ($\text{NO}\cdot$) representa a classe de espécies reativas do nitrogênio (ERN) e, mesmo não sendo suficientemente reativo para atacar DNA diretamente, ele pode reagir com o radical $\text{O}_2\cdot^-$ e gerar peroxinitritos, podendo sofrer reações secundárias e formando agentes capazes de nitrar aminoácidos aromáticos e as bases de DNA, como por exemplo, a guanina. (BARREIROS, 2006).

Os radicais livres, como espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, estão relacionadas a algumas doenças, tais como câncer, doença de Alzheimer, diabetes, artrite, hepatite, aterosclerose, acidente vascular cerebral, catarata, autoimunidade, e até mesmo processos de envelhecimento. O radical hidroxila é a substância, atualmente conhecida, com estrutura mais simples e mais forte agente cancerígeno, podendo atacar as bases do DNA, a porção de açúcar de nucleotídeos, ácidos graxos e outros alvos biológicos. Portanto, os sequestradores de radicais livres e antioxidantes tornam-se importantes no possível tratamento ou prevenção de doenças induzidas por eles. Os fenilpropanoides, pertencentes a uma classe de polifenóis naturais, têm sido amplamente estudados devido suas atividades antioxidante e sequestradora de radicais livres. (PAN et al., 2003).

O potencial antioxidante da espécie *B. stachyoides* já havia sido avaliado, anteriormente, através dos testes de formação do complexo fosfomolibdênico, redução do radical DPPH e espécies reativas do ácido tiobarbitúico. As amostras apresentaram um significativo potencial antioxidante quando comparadas aos padrões rutina e BHT, sendo essa atividade atribuída aos fenilpropanoides, como o verbascosídeo isolado da fração acetato de etila das partes aéreas, que possuem habilidade em capturar espécies reativas e aos carotenoides e triterpenoides, presentes na fração hexânica. (OLIVEIRA, 2012). Como complemento a avaliação

antioxidante da espécie em estudo, foram realizados os ensaios de captura dos ânions superóxido e óxido nítrico.

O estudo realizado por Backhouse et al. (2008), com extrato metanólico (600 mg/kg) de *Buddlja globosa*, também apresentou uma importante inibição da peroxidação lipídica (60%), assim como atividade sequestradora do ânion superóxido (51%) e redução do radical DPPH (IC₅₀: 8,4 µg/mL). Este extrato complexo possui compostos como triterpenoides, esteróis, feniletanoides e flavonoides. (BACKHOUSE et al., 2008). Na espécie *B. stachyoides* também estão presentes os compostos fenilpropanoides, verbascosídeo e martinósídeo (isolados da fração acetato de etila das partes aéreas) e, ácidos graxos, como o ácido triancotanoico (isolado da fração hexânica das raízes), esteroides, triterpenoides e carotenoides. (OLIVEIRA, 2012).

A capacidade antioxidante dos extratos e frações de *B. stachyoides* pode estar relacionada principalmente aos fenilpropanoides, baseado em estudos sobre a estrutura-atividade destes compostos que demonstram que o efeito está relacionado com o número de grupos metoxi aromático e hidroxila e, a estrutura da porção acila (C6-C1 ou C6-C3). (HEILMANN et al., 2000).

Wang et al. (1996) e Shi et al. (1999) avaliaram a reação entre o radical hidroxila e sete fenilpropanoides: equinacosídeo, verbascosídeo, leucosceptosídeo A, martinósídeo, e pedicularosídeo A, M e N, através de uma técnica de radiólise pulsada. Todos reagiram com o radical hidroxila com elevada constante de velocidade na faixa de $0.97-1.91 \times 10^{10} \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$, sugerindo que são sequestradores de radicais hidroxila eficazes.

Verbascosídeo e cistanosídeo F (um não fenilpropanoide) foram avaliados quanto à inibição da peroxidação lipídica em fígado de rato e simultaneamente foram determinados: consumo de oxigênio, formação de ácido tiobarbitúrico (TBARS) e atividade sequestradora do radical DPPH. Os resultados mostraram que: o verbascosídeo e cistanosídeo F tiveram uma inibição muito semelhante na peroxidação lipídica, dependente da concentração, e foram mais eficazes do que TX-1847 (um análogo sintético do verbascosídeo); a eficácia na inibição da formação de TBARS durante a peroxidação lipídica em mitocôndrias isoladas foi: verbascosídeo = cistanosídeo F > TX-1847; quanto à habilidade em sequestrar radicais livres os compostos foram: TX-1847 > verbascosídeo > cistanosídeo F. O

grupo catecol, as porções de açúcares e a estrutura conformacional dos compostos parecem contribuir para os seus efeitos inibitórios sobre a peroxidação lipídica, enquanto que a atividade de eliminação de radicais livres depende do número de grupos fenólicos contidos nos fenilpropanoides (uma exceção é cistanosídeo F, que possui apenas um grupo catecol, mas foi tão eficaz quanto o verbascosídeo que possui dois grupos catecois). (PAN; HORI, 1996).

De acordo com o estudo de Liu et al. (2003) o verbascosídeo possui efeito protetor contra o aumento dos níveis de radicais livres durante a peroxidação lipídica no plasma, e sua administração reduz os danos nas membranas dos eritrócitos, reduzindo o nível de estresse oxidativo. O alto potencial redox como doador de elétrons do verbascosídeo, protege as células contra citotoxicidade e apoptose mediada pela glicose oxidase, este potencial preventivo pode ser atribuído ao tratamento de doenças mediadas por estresse oxidativo. (CHIOU et al., 2004; KIM et al., 2005).

Quanbo et al. (1996) avaliou nove compostos fenilpropanoides, entre eles verbascosídeo e isoverbascosídeo, extraídos dos caules de *Cistanche desertic* que apresentaram atividade sequestradora de radicais livres mais potente que α -tocoferol nos testes com radical DPPH e xantina/xantina oxidase, geradora do radical ânion superóxido. (PAN et al., 2003).

Diante destes estudos, pode-se atribuir a capacidade antioxidante, principalmente, aos compostos verbascosídeo e martinósídeo isolados da espécie *B. stachyoides*. Porém, como trata-se de um fitocomplexo, outros compostos também estão relacionados a este efeito, mas ainda precisam ser elucidados para melhor compreensão das suas estruturas-atividades.

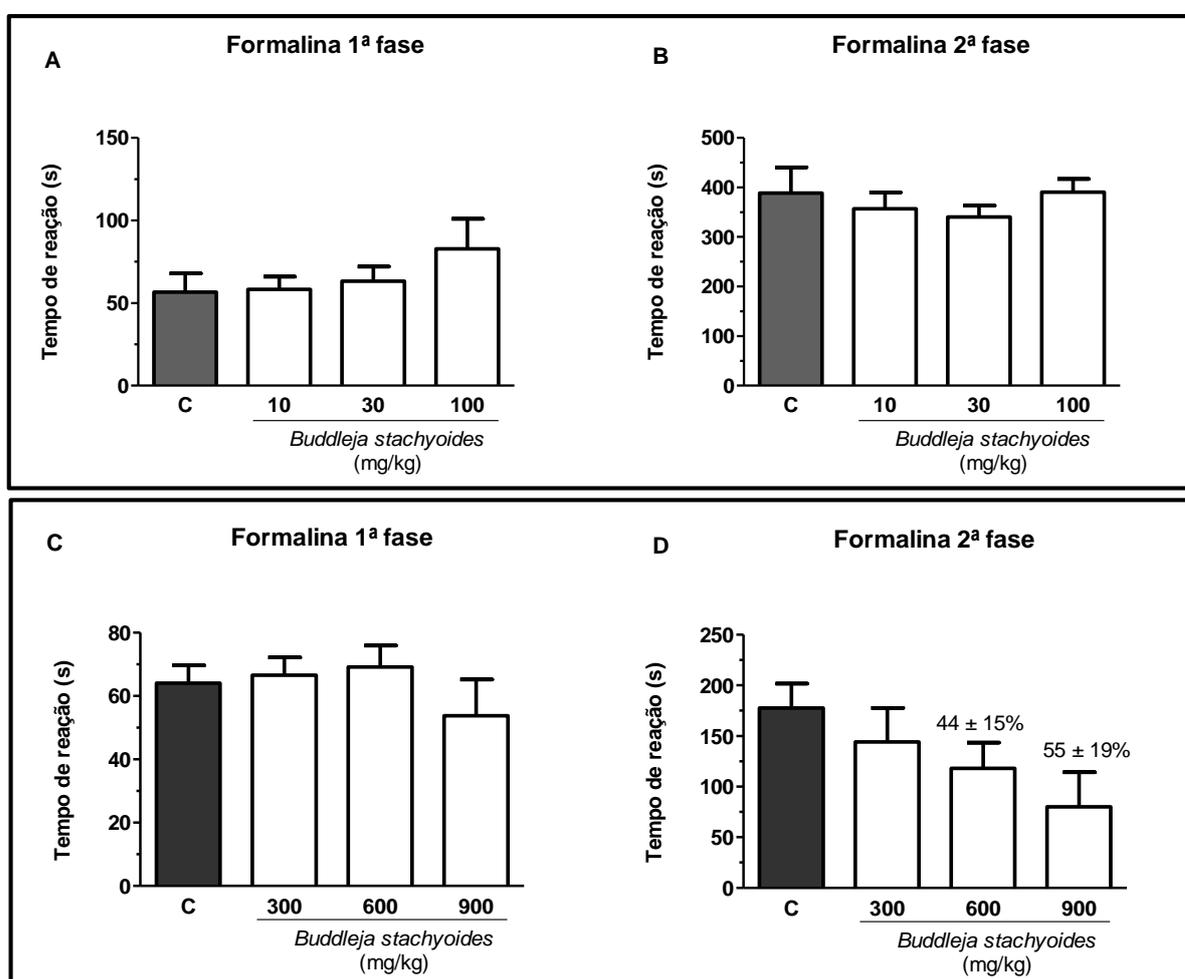
4.7 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE FARMACOLÓGICA

4.7.1 Nocicepção induzida por formalina

O teste de nocicepção induzida por formalina para o extrato bruto das partes aéreas foi realizado inicialmente com doses de 10, 30 e 100 mg/kg, porém nenhuma das três concentrações apresentou efeito, não sendo estatisticamente significativas quando comparadas com grupo controle. Decidiu-se aumentar as concentrações do

extrato bruto para 300, 600 e 900 mg/kg e o teste foi repetido para verificar se o efeito era dependente de dose. Os resultados demonstraram que não houve efeito antinociceptivo durante a fase neurogênica, porém na fase inflamatória as doses de 600 e 900 mg/kg, indicaram um possível efeito, apresentando índice de inibição de $(44 \pm 15)\%$ e $(55 \pm 19)\%$, respectivamente, porém não foram diferentes estatisticamente quando comparadas com o grupo controle salina, conforme demonstrado no GRÁFICO 11.

GRÁFICO 11 – EFEITO DO EXTRATO BRUTO DAS PARTES AÉREAS DE *B. stachyoides* NA NOCICEPÇÃO INDUZIDA POR FORMALINA



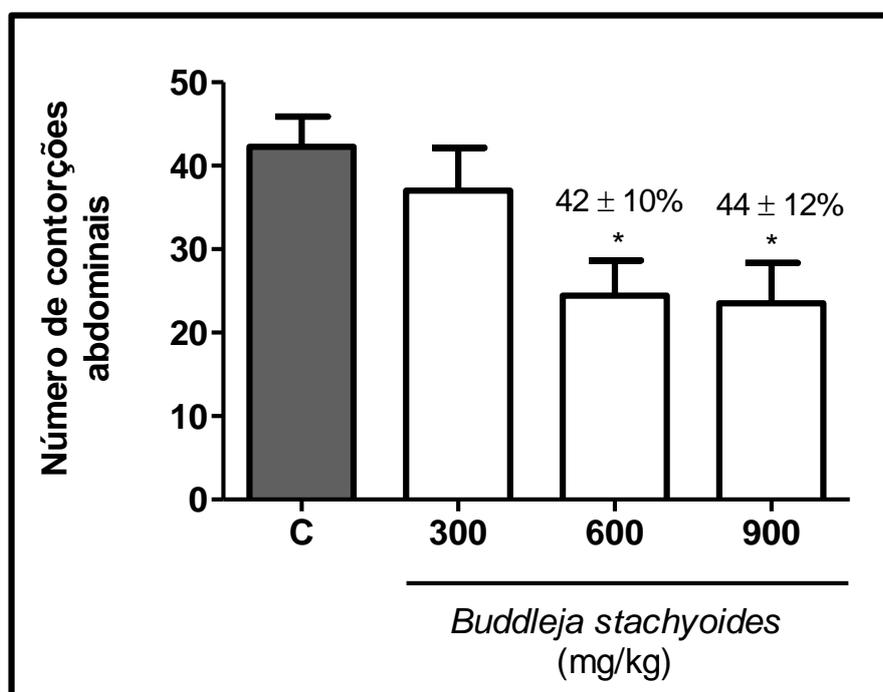
FONTE: O autor (2017)

LEGENDA: A: Fase neurogênica (10 - 100 mg/kg, v.o.); B: fase inflamatória (10 - 100 mg/kg, v.o.); C: fase neurogênica (300 - 900 mg/kg, v.o.); D: fase inflamatória (300 - 900 mg/kg, v.o.). Cada coluna representa a média \pm desvio padrão de 6 animais, sendo que a coluna C representa os valores do grupo controle. Os resultados foram avaliados pelo método estatístico ANOVA de uma via seguida do teste de Tukey e os valores acima das colunas indicam a porcentagem de inibição verificada

4.7.2 Nociceção induzida por ácido acético

O teste de nociceção induzida por ácido acético foi realizado com a finalidade de confirmar o possível efeito antinociceptivo das doses 300, 600 e 900 mg/kg, conforme visualizado no GRÁFICO 12. As doses de 600 e 900 mg/kg apresentaram diferença estatística ($p < 0,05$) quando comparadas com o grupo controle salina, e apresentaram índice de inibição de $(42 \pm 10)\%$ e $(44 \pm 12)\%$, respectivamente.

GRÁFICO 12 – EFEITO DO EXTRATO BRUTO DAS PARTES AÉREAS DE *B. stachyoides* NA NOCICEÇÃO INDUZIDA POR ÁCIDO ACÉTICO



FONTE: O autor (2017)

LEGENDA: Cada coluna representa a média \pm desvio padrão de 6 animais, sendo que a coluna C representa os valores do grupo controle. Os níveis de significância são indicados por * $p < 0,05$ quando comparados com o grupo controle (ANOVA de uma via seguida do teste de Tukey) e os valores acima das colunas indicam a porcentagem de inibição verificada

O teste de nociceção induzida por formalina demonstrou uma inibição na fase inflamatória do extrato bruto nas doses de 600 e 900 mg/kg v.o. O efeito analgésico foi confirmado para as mesmas doses do extrato no teste de nociceção induzida por ácido acético. O efeito analgésico de outra espécie do gênero *Buddleja*, *B. globosa*, foi avaliado por Backhouse et al. (2008a) através do teste de constrição abdominal com injeção intraperitoneal de ácido acético. Os animais foram tratados

com os diferentes extratos (nas doses de 200, 100, 50 e 25 mg/kg), verbascosídeo (0,05 mmol/kg) e Ibuprofeno (0,07 mmol/kg) e os resultados demonstraram que os extratos etanólicos ($79,8 \pm 14\%$) e metanólicos ($85,5 \pm 4,2\%$) e o verbascosídeo ($67,6 \pm 2,3\%$) foram mais ativos que o ibuprofeno ($50 \pm 4,1\%$). No teste de formalina com aplicação intra-dérmica na cauda dos camundongos, Backhouse et al. (2008a) observou que os extratos de metanol e etanol mostraram maior atividade analgésica (90,8% e 85,7%, respectivamente) que o ibuprofeno (76,5%). No teste de movimento súbito de cauda, os extratos e o ibuprofeno foram administrados por via oral e tópica e o verbascosídeo apresentou efeitos semelhantes ao ibuprofeno (tópico e oral) cerca de 25%, e a luteolina-7-O-glicosídeo foi ligeiramente mais ativa.

No estudo de Tomonori et al. (1997) o verbascosídeo, isolado de Cedron (*Lippia triphylla*), apresentou analgesia dose-dependente no teste de contorção induzida por ácido acético em ratos (nas doses de 100, 300 e 500 mg/kg, v.o.) e no teste de dor com pressão da cauda (nas doses de 100 e 300 mg/kg, v.o.). A investigação do efeito analgésico dos compostos relacionados com o verbascosídeo demonstrou que alterações na estrutura da molécula diminuem a potência analgésica como: se alguns grupos hidroxila forem metilados, não ocorre redução significativa da potência (ex: leucosceptosídeo A, Jionosídeo D e martinósídeo). Se a ramnose for substituída por glicose a atividade é mantida (ex: plantamajosídeo). Se houver migração ou deleção da ramnose diminuiu a potência (ex: forsítiasídeo e desramnosil verbascosídeo). Quando o composto tem um substituinte adicional de uma glicose ou galactose a potência é notavelmente reduzida (ex: echinacosídeo). Compostos com falta de grupos hidroxilas na parte aglicona perdem a atividade e a falta da porção cafeoil e feniletil diminuem muito a atividade (ex: cistanosídeo F). Sendo, portanto o verbascosídeo a estrutura mais potente, e essa dependência estrutural também foi observada na administração oral: a migração da porção cafeoil do isoverbascosídeo e salidrosídeo que perdeu a porção cafeoil, ramnose e um grupo hidroxila aromático não apresentam atividade. (TOMONORI et al., 1997).

A atividade anti-hiperalgésica do verbascosídeo foi avaliada por Isacchi et al. (2011) através do teste de pressão da pata em dois modelos animais de dor neuropática: mononeuropatia periférica produzida por lesão, a partir da constrição crônica do nervo ciático e a outra através de uma injeção intra-articular de monoiodoacetato de sódio. O verbascosídeo na dose de 100 mg/kg i.p. reverteu a

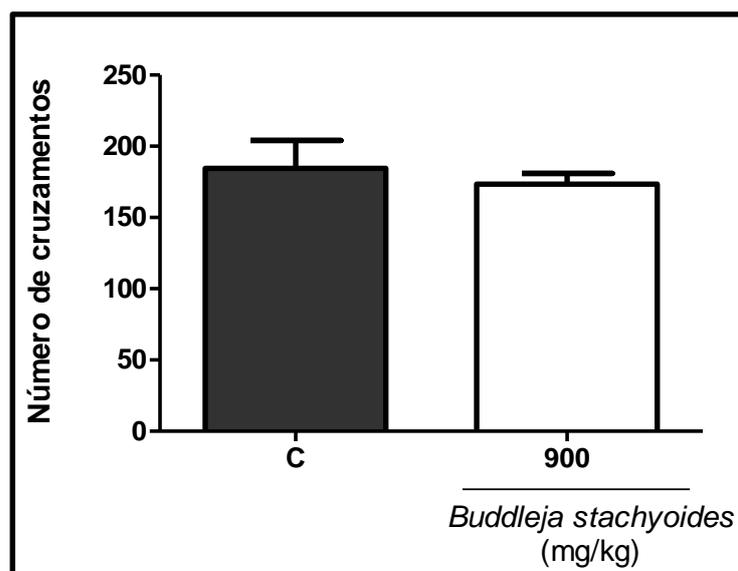
hiperalgesia mecânica nos ratos tratados em ambos os casos e, também foi eficaz contra a hiperalgesia mecânica, após administração oral nas doses de 300 e 600 mg/kg.

Esses estudos corroboram com o efeito analgésico significativo observado para o extrato bruto de *B. stachyoides* nas doses de 600 e 900 mg/kg, que apresentam quantidades de 0,02 mmol/kg e 0,03 mmol/kg de verbascosídeo, respectivamente, sendo inferiores a concentração efetiva de verbascosídeo (0,05 mmol/kg) no estudo de Backhouse et al. (2008a).

4.7.3 Avaliação da atividade locomotora

O teste de campo aberto realizado com camundongos Swiss machos demonstrou que não houve diferença estatística entre o número de cruzamentos médio do grupo controle ($184,4 \pm 19,6$) e do grupo tratado ($173,4 \pm 7,5$), conforme GRÁFICO 13. Portanto, o extrato bruto das partes aéreas de *B. stachyoides* (dose 900 mg/kg) não causou alterações na atividade locomotora dos animais. Isso indica que os resultados observados nos testes de formalina e ácido acético não são efeitos inespecíficos por diminuição da capacidade motora.

GRÁFICO 13 – EFEITO DO EXTRATO BRUTO DE *Buddleja stachyoides* NO TESTE DE CAMPO ABERTO



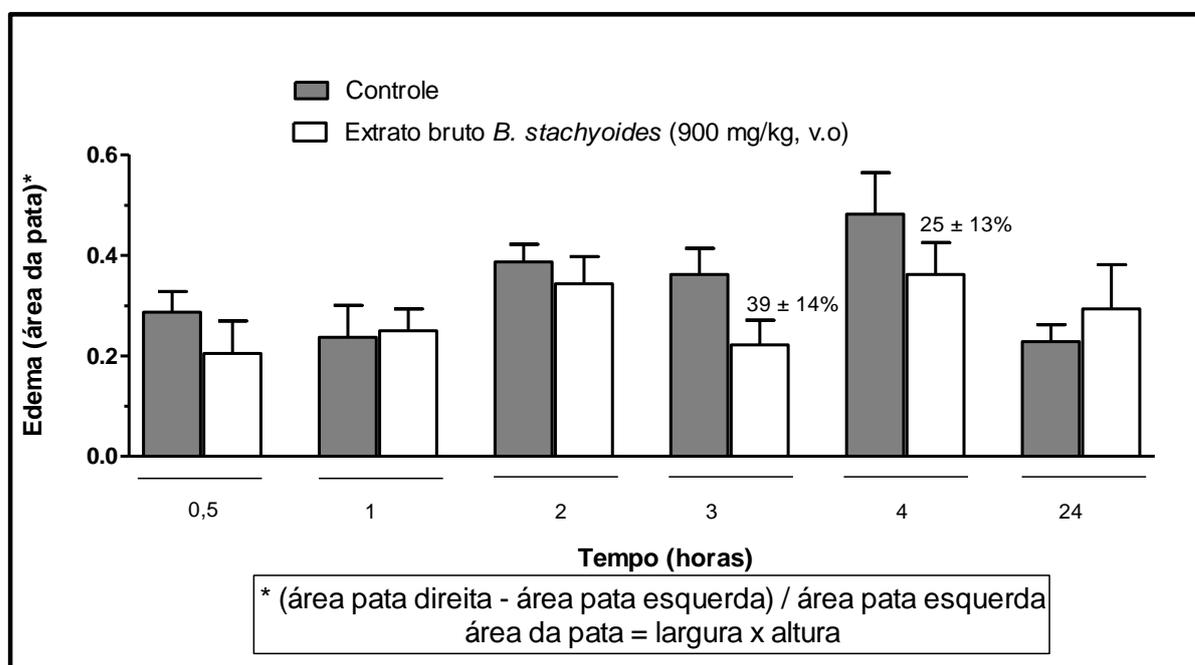
FONTE: O autor (2017)

LEGENDA: Cada coluna representa a média \pm desvio padrão de 6 animais, sendo que a coluna C representa os valores do grupo controle. Os resultados foram avaliados estatisticamente pelo teste *t* de Student

4.7.4 Edema da pata induzido por carragenina

Os resultados da avaliação da atividade anti-inflamatória do extrato bruto de *B. stachyoides*, através do teste edema de pata induzido por carragenina, demonstraram que não houve diferença significativa em nenhum tempo quando as áreas foram comparadas com o grupo controle, porém os tempos de 3 e 4 horas apresentaram uma diminuição do edema com índices de inibição de $(39 \pm 14)\%$ e $(25 \pm 13)\%$, respectivamente, podendo ser visualizados no GRÁFICO 14.

GRÁFICO 14 – EFEITO DO EXTRATO BRUTO DAS PARTES AÉREAS DE *B. stachyoides* NA AVALIAÇÃO DO EDEMA DE PATA INDUZIDO POR CARRAGENINA



FONTE: O autor (2017)

LEGENDA: Cada coluna representa a média da área do edema da pata \pm desvio padrão de 6 animais, sendo que a coluna C representa os valores do grupo controle. Os resultados foram avaliados estatisticamente pelo teste *t* de Student em cada tempo

O modelo experimental edema de pata induzido por carragenina, é amplamente utilizado para rastrear a maior parte dos agentes anti-inflamatórios no estudo da inflamação aguda. O desenvolvimento do edema da pata apresenta uma resposta bifásica, em que a fase inicial é dependente da liberação de mediadores como a histamina, bradiginina e cinina, e a última fase é atribuída à síntese de prostaglandinas. (VINEGAR et al., 1969; DI ROSA et al., 1971; SANTANU SAHA, 2013). Os anti-inflamatórios são normalmente mais eficazes na fase final da

inflamação, como no caso da indometacina que demonstrou em um estudo a inibição do edema de pata após 3 ou 4 horas. Tal como indometacina, o extrato etanólico de *Holarrhena pubescens* na dosagem de 400 mg/kg v.o. demonstrou inibição dose-dependente significativa ($p < 0,01$) no teste de edema de pata de rato durante a terceira e quarta hora, sendo mais potente em 4 h (74,07%) que as doses de 100 e 200 mg/kg. O mesmo comportamento foi observado para o extrato bruto de *B. stachyoides* no teste edema de pata induzido por carragenina com inibição da inflamação após 3 e 4 h do tratamento com a dose de 900 mg/kg v.o. Esta resposta anti-inflamatória pode estar relacionada à inibição da biossíntese de prostaglandinas, via COX-2. (MAHENDRAN; NARMATHA, 2013).

O óxido nítrico endógeno também está envolvido neste tipo de inflamação aguda desde a formação do edema, quando NO é aumentado por L-arginina e diminuído pela iNOS. (IALENTI et al., 1992). O NO possui um papel relevante na modulação da geração de prostaglandinas no local da inflamação. (MUTEBLN et al., 1995).

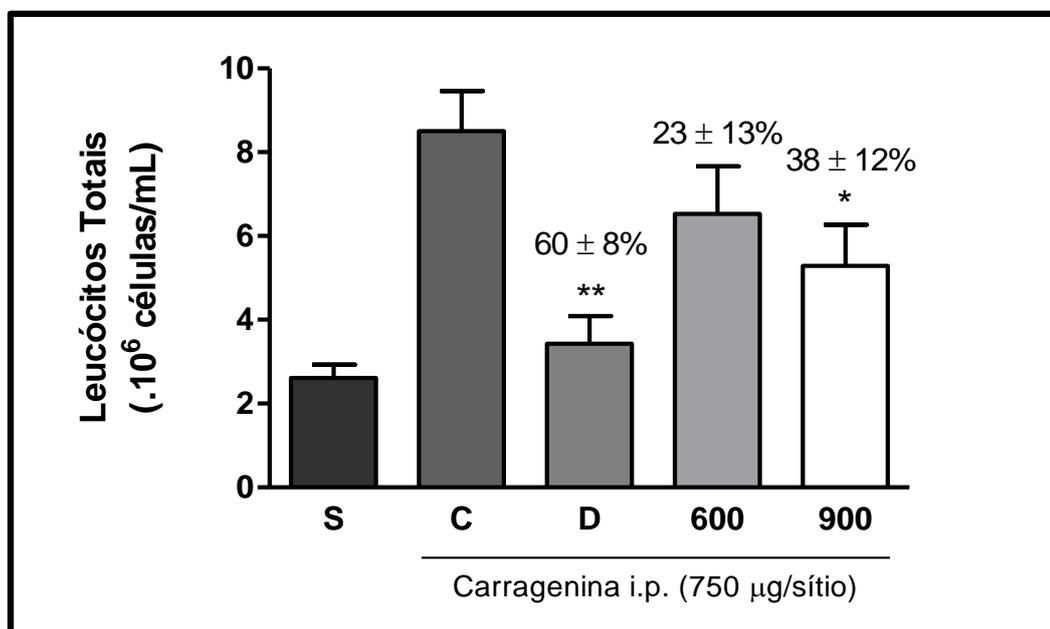
Extratos produzidos com éter de petróleo, clorofórmio e metanol das partes aéreas de *Verbena officinalis* Linn. (Verbenaceae) foram avaliados quanto sua atividade anti-inflamatória, utilizando-se modelo de edema de pata com carragenina. Todos os três extratos apresentaram atividade anti-inflamatória, sendo o extrato de clorofórmio mais ativo. O composto verbascosídeo foi identificado como um constituinte do extrato de metanol. (DEEPAK; HANDA, 2000).

4.7.5 Peritonite induzida por carragenina

O teste de peritonite induzida por carragenina foi realizado com a finalidade de complementar a investigação do possível efeito anti-inflamatório do extrato bruto das partes aéreas de *B. stachyoides*. A injeção de carragenina (750 µg/sítio, i.p) aumentou significativamente o número total de leucócitos na cavidade peritoneal no grupo controle, quando comparado com o grupo controle negativo salina. Os animais tratados com o extrato bruto antes da indução da peritonite, diminuíram a migração de leucócitos para a cavidade peritoneal em 23% e 38% nas doses de 600 e 900 mg/kg, respectivamente, mas apenas a dose de 900 mg/kg apresentou diferença estatística quando comparada ao grupo controle. Essa redução na migração de

leucócitos para o peritônio foi menos significativa do que nos animais tratados com dexametasona (60%), como demonstra o GRÁFICO 15. Analisando-se o perfil celular por contagem diferencial de leucócitos, o extrato bruto (nas doses de 600 e 900 mg/kg) não apresentou diferença estatística em relação ao grupo controle, indicando que não houve diminuição significativa no número de leucócitos polimorfonucleares, diferentemente do grupo dexametasona que apresentou diferença significativa ($p < 0,01$) em relação ao controle, conforme apresentado no GRÁFICO 16.

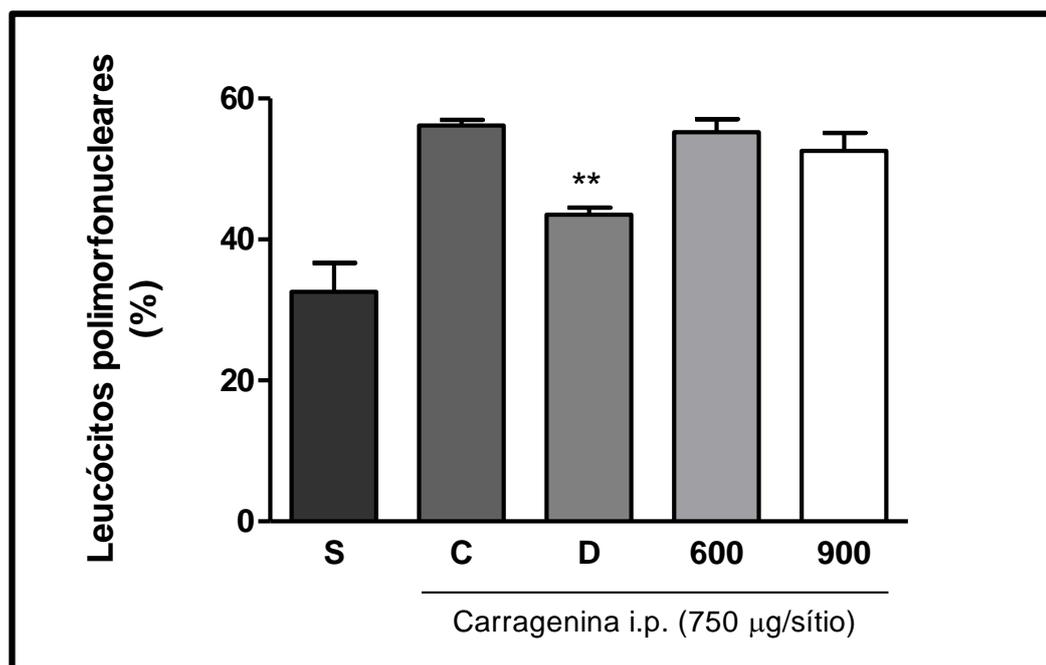
GRÁFICO 15 – CONTAGEM DE LEUCÓCITOS TOTAIS NO LÍQUIDO PERITONIAL DO TESTE DE PERITONITE INDUZIDA POR CARRAGENINA



FONTE: O autor (2017)

LEGENDA: Os animais receberam salina (S = salina 750 $\mu\text{g/sítio}$, i.p), controle (C = salina 10 mL/kg, v.o. + carragenina 750 $\mu\text{g/sítio}$, i.p.), dexametasona (D = 0,5 mg/kg, i.p. + carragenina 750 $\mu\text{g/sítio}$, i.p.), extrato bruto de *B. stachyoides* (600 e 900 mg/kg, v.o. + carragenina 750 $\mu\text{g/sítio}$, i.p.). Os resultados de leucócitos totais foram expressos como média \pm desvio padrão de 6 animais. Os níveis de significância são indicados por * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$ em relação ao grupo controle (C). ANOVA de uma via seguida do teste de comparação múltipla de Newman-Keuls

GRÁFICO 16 – CONTAGEM DIFERENCIAL DE LEUCÓCITOS NO LÍQUIDO PERITONIAL DO TESTE DE PERITONITE INDUZIDA POR CARRAGENINA



FONTE: O autor (2017)

LEGENDA: Os animais receberam salina (S = salina 750 µg/sítio, i.p), controle (C = salina 10 mL/kg, v.o. + carragenina 750 µg/sítio, i.p.), dexametasona (D = 0,5 mg/kg, i.p. + carragenina 750 µg/sítio, i.p.), extrato bruto de *B. stachyoides* (600 e 900 mg/kg, v.o. + carragenina 750 µg/sítio, i.p.). As porcentagens de leucócitos polimorfonucleares foram expressas como média ± desvio padrão de 6 animais. O nível de significância é indicado por ** $p < 0,01$ em relação ao grupo controle (C). ANOVA de uma via seguida do teste de comparação múltipla de Newman-Keuls

A carragenina tem a habilidade de aumentar a permeabilidade vascular, promovendo a migração de neutrófilos para o local de injeção. (RAUF et al., 2014). Estas células, na tentativa de restringir o agente agressor, produzem mediadores pro-inflamatórios tais como citocinas, espécies reativas de oxigênio, óxido nítrico, entre outros. (LI et al., 2015). O óxido nítrico exerce múltiplos efeitos moduladores na inflamação e papel importante em várias condições inflamatórias, quando produzido pela forma indutível de óxido nítrico sintase (iNOS). (NATHAN, 1992). Quando o NO está disponível em grandes quantidades (quando sintetizado por iNOS), pode ser tóxico e pró-inflamatório. (GUZIK et al., 2003). O estudo de Medeiros et al. (2007) demonstrou uma relação entre a indução da iNOS e sua dependência das citocinas pró-inflamatórias, como a sinalização do TNF- α . A citocina pró-inflamatória TNF- α , possui um papel chave em vários distúrbios relacionados à inflamação, pois tem a função de ativar células T e macrófagos, além de, estimular outras citocinas inflamatórias. (MEDEIROS et al., 2007). Isto sugere

um possível mecanismo de ação do extrato bruto de *B. stachyoides*, em que a diminuição dos leucócitos no local da inflamação pode estar relacionada aos compostos fenilpropanoides, presentes na espécie, que têm capacidade de alterar a atividade de algumas enzimas e o nível de algumas citocinas. (PAN et al., 2003).

Em adição, outro possível mecanismo de ação pode estar envolvido com o influxo de leucócitos polimorfonucleares através do endotélio, em que essas células se ligam aos receptores endoteliais tais como L-selectina, P-selectina e E-selectina, ocorrendo a diapedese por ativação da molécula de adesão das células endoteliais plaquetárias 1 (PECAM-1). (KUTLAR; EMBURY, 2014; BISWAS et al., 2005). Hebeda et al. (2011) demonstrou que o ácido clorogênico tem a capacidade de reduzir a migração de leucócitos, modulando a translocação de selectina do ambiente intracelular para extracelular e inibindo a expressão de PECAM-1. Apesar do extrato bruto de *B. stachyoides* não possuir, aparentemente, o ácido clorogênico em sua composição, possui compostos fenólicos que podem ter ações semelhantes.

Diversas drogas têm sido desenvolvidas como inibidores da 5-lipoxigenase, resultando no bloqueio da formação dos leucotrienos ou como antagonistas do receptor dos leucotrienos. Os leucotrienos estão envolvidos na imunorregulação e em uma variedade de doenças. Na presença de 5-lipoxigenase, o ácido araquidônico livre é sempre metabolizado, assim, os inibidores de 5-lipoxigenase específicos devem ser úteis não só na terapia da asma alérgica e doenças de origem inflamatória, mas também em estudos sobre a biossíntese de leucotrienos e suas funções. (PAN et al., 2003).

Quatro glicosídeos cafeoil: forsitiasídeo, suspensasídeo, β -hidroxiverbascosídeo e verbascosídeo isolados dos frutos de *F. suspensa* e *F. viridisscima*, apresentaram efeito inibidor sobre a 5-lipoxigenase. (YOSHIYUKI et al., 1987; PAN et al., 2003). Eles inibiram seletivamente a formação de 5-HETE (ácido 5-hidroxi-eicosatetranoico) e LTB em leucócitos polimorfonucleares periféricos de humanos e, a formação de 5-HETE em células peritoneais de rato. A análise de estrutura-atividade demonstrou que os grupos hidroxilas fenólicos adjacentes apresentaram relação com essas inibições.

O acesso aos medicamentos ainda é muito limitado em várias regiões de diferentes países e, portanto muitas pessoas recorrem ao uso de plantas, buscando o alívio da dor causada por doenças, ou até mesmo a cura. A inflamação é um

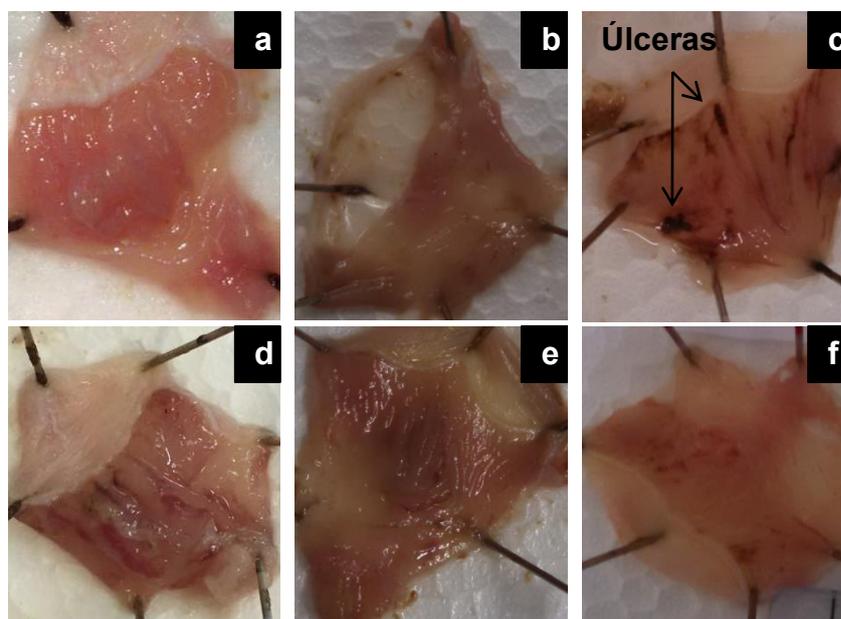
evento comum ocorrendo em vários processos patológicos e a pesquisa de extratos de plantas com potencial anti-inflamatório é considerada uma abordagem promissora neste campo. (CALIXTO, 2005; BELLIK et al., 2013). A espécie *B. stachyoides* apresentou um potencial antioxidante significativo, segundo Lorenzi (2008) é utilizado na medicina popular como analgésico e possui como composto majoritário o verbascosídeo, ao qual são atribuídas atividades importantes como anti-inflamatório, anti-hiperalgésico, antioxidante e efeitos anticâncer. (FUNES et al., 2009 ; SPERANZA et al., 2010).

Por esse motivo, foram realizados esses testes farmacológicos e os efeitos antinociceptivo e anti-inflamatório do extrato bruto das partes aéreas de *B. stachyoides* observados, podem ser explicados pelas propriedades farmacológicas descritas na literatura para o composto verbascosídeo, que apresentou capacidade de inibição da atividade enzimática da cicloxigenase (COX-2), conseqüentemente, inibição da formação de prostaglandinas (PGE₂); inibição do fator de necrose tumoral (TNF- α); inibição da liberação de óxido nítrico (NO), efeito relacionado com a expressão da óxido nítrico sintase induzível (iNOS); ação protetora endotelial contra radicais livres do oxigênio que induzem dano peroxidativo nas biomembranas; inibição da histamina e da bradicinina; e inibição da enzima 5-lipoxigenase. (KUPELI et al., 2007; LEE et al., 2005; SCHAPOVAL et al., 1998; YOSHIYUKI et al., 1987; PAN et al., 2003).

4.7.6 Avaliação da atividade gastroprotetora

No teste de proteção gástrica foram obtidas imagens dos estômagos dos camundongos Swiss fêmeas, demonstradas na FIGURA 18, para comparação entre os grupos controle negativo, controle omeprazol, controle úlcera e tratados com o extrato bruto das partes aéreas de *B. stachyoides* nas doses de 300, 600 e 900 mg/kg. As lesões gástricas induzidas por HCl/ etanol foram mensuradas e os resultados demonstraram uma prevenção na formação da úlcera, estatisticamente significativa ($p < 0,05$), para as doses de 600 e 900 mg/kg com porcentagem de proteção de $(70 \pm 16)\%$ e $(75 \pm 13)\%$, respectivamente, sendo mais efetivas que o omeprazol $(58 \pm 12)\%$, conforme GRÁFICO 17.

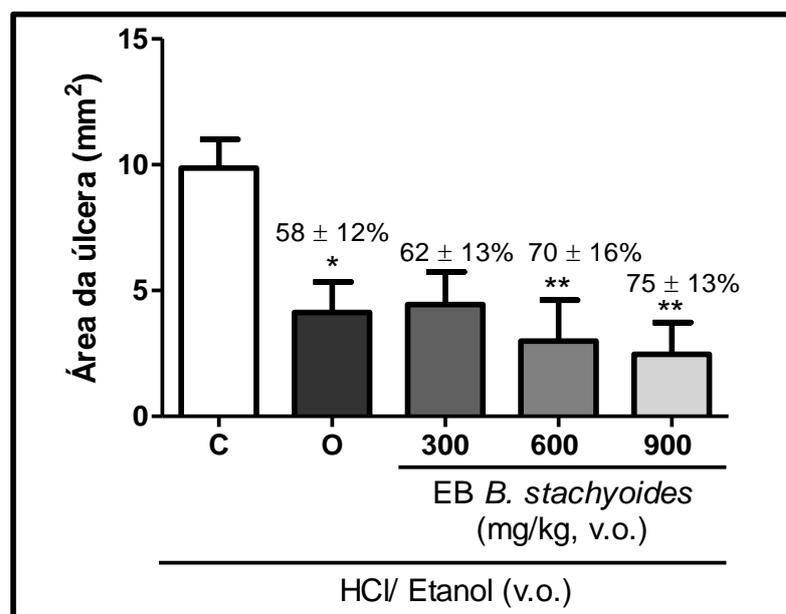
FIGURA 18 – EFEITO DO EXTRATO BRUTO DE *B. stachyoides* SOBRE LESÃO GÁSTRICA INDUZIDA POR HCL/ ETANOL EM ESTÔMAGO DE CAMUNDONGO



FONTE: O autor (2017)

LEGENDA: (a) estômago normal animal tratado apenas com veículo (10 mL/kg, v.o.); (b) omeprazol (20 mg/kg, v.o.) + HCl/EtOH; (c) controle úlcera pré-tratado com veículo (10 mL/kg, v.o.) + HCl/EtOH; (d) extrato bruto *B. stachyoides* (300 mg/kg, v.o.) + HCl/EtOH; (e) extrato bruto de *B. stachyoides* (600 mg/kg, v.o.) + HCl/EtOH; (f) extrato bruto *B. stachyoides* (900 mg/kg, v.o.) + HCl/EtOH

GRÁFICO 17 – EFEITO DO EXTRATO BRUTO DE *B. stachyoides* SOBRE AS LESÕES GÁSTRICAS INDUZIDAS POR HCL/ETANOL



FONTE: O autor (2017)

LEGENDA: O: omeprazol (20 mg/kg, v.o.); C: controle úlcera (veículo 10 mL/kg, v.o.); extrato bruto de *B. stachyoides* (300, 600 and 900 mg/kg, v.o.) antes da administração oral de 0,2 mL de HCl (0,3 M)/ etanol (60%). Cada coluna representa a média ± desvio padrão (n=6) da área ulcerada (mm²). Os níveis de significância são indicados por *p < 0,05 e **p < 0,01, quando comparado com o grupo controle (C) (ANOVA de uma via seguida do teste de Tukey)

A úlcera gastrointestinal é uma doença bastante comum e se não tratada pode levar ao câncer. Uma variedade de fatores endógenos e exógenos podem ser causadores da úlcera gástrica, que incluem condições de ácido, pepsina e estresse e, agentes nocivos, tais como, anti-inflamatórios não-esteroides (AINES), bactéria *Helicobacter pylori*, o tabagismo e o consumo de álcool. (SYAM et al., 2009). Esses fatores podem promover a geração de radicais livres que estão relacionados a inúmeras doenças, citadas anteriormente.

Segundo Arrieta-Baez et al. (2012), diversas plantas são utilizadas no tratamento de doenças gastrointestinais como *Buddleja scordioides* Kunth, *Byrsonima crossifolia*, *Geranium seemann*, *Larrea tridentata*, *Psidium guajava*. Vários compostos foram isolados da espécie *B. scordioides* Kunth, Scrophulariaceae, como o verbascosídeo com atividade antibacteriana, saponinas triterpenoides e outros glicosídeos, além de alguns flavonoides como rutina, quercetina e quercitrina também foram identificados. (HOUGHTON et al., 2005; AVILA-ACEVEDO et al., 2005; CORTES et al., 2006).

Úlcera gástrica induzida por HCl/etanol é um modelo clássico amplamente utilizado para avaliar a atividade gastroprotetora dos fármacos e testar os agentes que possuem atividades citoprotetoras e/ou antioxidante. (ADINORTEY et al., 2013). Neste ensaio os animais pré-tratados com o extrato bruto de *B. stachyoides*, nas doses de 600 e 900 mg/Kg apresentaram uma prevenção significativa na formação da úlcera, sendo mais efetivas que o omeprazol. Também foi observado durante a lavagem dos estômagos a presença de muco, porém, para a confirmação de que houve aumento da produção de muco proveniente da administração do extrato bruto, seria interessante realizar um teste de quantificação.

Estudos demonstraram que as espécies reativas de oxigênio (ERO) estão relacionadas à lesão da mucosa gástrica induzida pelo etanol. (GOMES et al., 2009). Pois, o etanol é conhecido como agente necrotizante que destrói os fatores protetores da mucosa, diminuindo o muco gástrico, os níveis de glutathione e α -tocoferol. (WALLACE; MA, 2001). A destruição desses fatores promove hemorragia, resultando em lesão por dano oxidativo nas células epiteliais gástricas. (REPETTO; LLESUY, 2002). O etanol aumenta a produção de radicais livres e a peroxidação lipídica na mucosa gástrica, mas esse dano pode ser prevenido pela administração de prostaglandinas. (BAGCHI et al., 1998).

A capacidade dos compostos fenólicos em eliminar os radicais superóxido, hidroxila e peroxila, que afetam várias etapas da cascata do ácido araquidônico através da COX-2 ou da 5-lipoxigenase, também possuem propriedades estabilizadoras da membrana e afetam alguns processos do metabolismo intermediário e inibem a peroxidação lipídica em diferentes sistemas. Alguns deles têm efeitos citoprotetores, devido ao aumento do conteúdo de prostaglandinas (PGI₂) e muco na mucosa gástrica. (ALANKO et al., 1999). De acordo com o estudo de Repetto e Llesuy (2002), o efeito gastroprotetor dos extratos de *A. douglasiana* e seu composto ativo dehidroleucodina (DhL) na lesão da mucosa gástrica pode ser mediado pela liberação local de neuropeptídeos sensoriais, óxido nítrico e prostaglandinas (PGI₂). Assim, a inibição da peroxidação lipídica e da COX-2 é um alvo importante na prevenção de úlceras gastrointestinais.

O efeito gastroprotetor do extrato bruto de *B. stachyoides* pode ser decorrente da presença dos fenilpropanoides, principalmente o verbascosídeo, que apresenta um teor elevado nas doses testadas (600 e 900 mg/kg), devido a sua capacidade de inibir radicais livres como superóxido e óxido nítrico, observados nos ensaios antioxidantes. Além disso, o extrato bruto de *B. stachyoides* inibiu a peroxidação lipídica, no teste de TBARS, em (52,53 ± 0.64)%, sendo igual estatisticamente ao padrão BHT com (51,67 ± 2.60)% de inibição. (OLIVEIRA, 2012). O estudo de Liu et al. (2003) demonstrou que o verbascosídeo possui um efeito protetor contra o aumento dos níveis de radicais livres durante a peroxidação lipídica plasmática, sendo que sua administração protege as membranas do dano, reduzindo o nível do estresse oxidativo. O potencial redox do verbascosídeo, como doador de elétrons, protege as células contra a citotoxicidade e apoptose e é mediada pela glicose oxidase. (CHIOU et al., 2004). Esse potencial preventivo pode ser importante no tratamento de doenças causadas por estresse oxidativo, como por exemplo, na úlcera gástrica induzida por etanol acidificado. (KIM et al., 2005).

Díaz-Rivas et al. (2015) avaliou o efeito gastroprotetor dos extratos de *B. scordioides* Kunth, induzindo a úlcera gástrica com dose única de indometacina (30 mg/kg, v.o.). Os resultados apresentaram inibição de COX-2, IL-8 e TNF α , estimulação de COX-1 e moderada inibição de NF κ B. A forma constitutiva (COX-1) é conhecida por ser responsável em manter a proteção trato gastrointestinal, enquanto que a forma indutível (COX-2) está relacionada ao processo de inflamação. Neste

caso, a potencial atividade anti-inflamatória pode estar associada a presença de polifenóis. Apesar do extrato bruto de *B. stachyoides* não ter sido avaliado no teste de úlcera gástrica induzida por indometacina, provavelmente possuem compostos fenólicos semelhantes responsáveis pelo efeito gastroprotetor. Estudos futuros com o extrato bruto de *B. stachyoides* pelo método de indução de úlcera por indometacina devem ser realizados, para avaliar se também age estimulando a COX-1 e, conseqüentemente, aumentando a produção de prostaglandina (PGI₂).

Portanto, o efeito gastroprotetor do extrato bruto de *B. stachyoides* pode estar relacionado ao aumento de muco na mucosa gástrica, além de sua atividade antioxidante que protege a mucosa dos danos induzidos por HCl/ etanol.

4.7.7 Avaliação da motilidade gastrointestinal

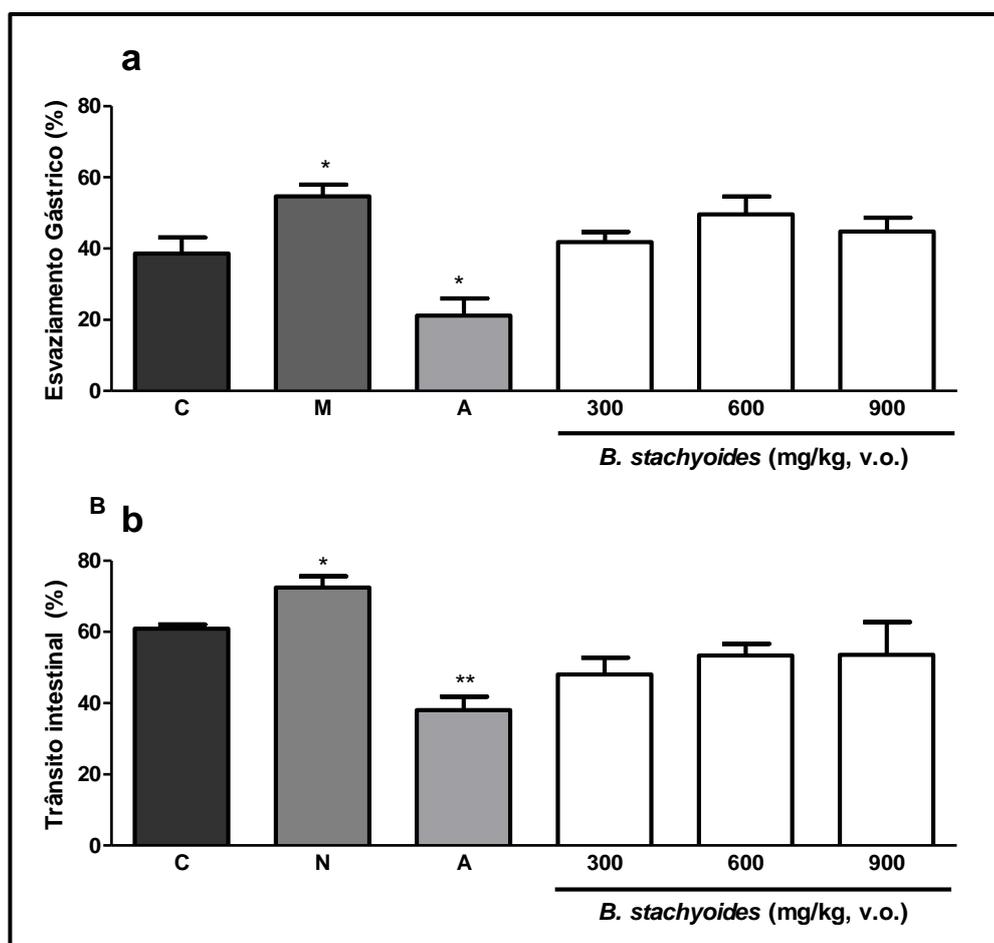
No modelo de motilidade gastrointestinal, os animais pré-tratados com o extrato bruto das partes aéreas de *B. stachyoides*, nas doses de 300, 600 e 900 mg/Kg, não apresentaram efeito no esvaziamento gástrico, pois não houve diferença estatística quando comparados com o grupo controle (38,6 ± 4,5)%. Quanto aos controles, a atropina (3 mg/kg, s.c.) reduziu o esvaziamento gástrico em 45% e a metoclopramida (30 mg/kg, v.o.) aumentou em 42%, conforme GRÁFICO 18a. No teste do trânsito intestinal, o extrato bruto também não apresentou resultados significativos quando comparados com o grupo controle (C: 60,9 ± 1,2%), apresentando leve diminuição no trânsito intestinal de 21, 12 e 12% nas doses de 300, 600 e 900 mg/kg, respectivamente. A atropina (3 mg/Kg, s.c.) reduziu o trânsito intestinal em 38%, enquanto a neostigmina (20 µg/kg, s.c.) aumentou apenas em 19%, conforme GRÁFICO 18b.

No modelo de motilidade gastrointestinal, a regulação nervosa do esvaziamento gástrico depende essencialmente do nervo vago, que controla as contrações tônicas, o relaxamento do fundo e a amplitude das contrações antrais geradas pelo marcapasso gástrico. (JABRI et al., 2017). Os neurotransmissores são os principais moduladores que controlam a motilidade do trânsito intestinal, tais como taquiquininas (por exemplo, substância P, neuroquinina A), acetilcolina, serotonina (5-HT) e peptídeo liberador de gastrina (GRP) / bombesina. Estes têm efeitos excitatórios sobre a motilidade gastrointestinal, enquanto que os membros do

polipéptido intestinal Vasoactivo (VIP), óxido nítrico, GABA e ATP, atuam como neurotransmissores inibitórios. (SHUTTLEWORTH; KEEF, 1995; KUNZE; FURNESS, 1999).

O extrato bruto administrado por via oral (doses de 300, 600 e 900 mg/Kg), 1 hora antes do marcador, não apresentou efeito significativo sobre o esvaziamento e nem no trânsito intestinal, porém apresentou uma tendência em diminuir a motilidade intestinal. No entanto, é necessário realizar testes específicos para verificar se o extrato bruto possui efeito sobre neurotransmissores moduladores sobre a motilidade do trânsito intestinal ou mesmo sobre a liberação de óxido nítrico que medeia o relaxamento não adrenérgico e não colinérgico da musculatura longitudinal e circular do esfíncter esofágico, estômago, duodeno, intestino delgado e esfíncter anal interno. (CERQUEIRA et al., 2002)

Diante dos resultados farmacológicos promissores, observados para o extrato bruto das partes aéreas de *b. stachyoides*, futuramente, pode ser utilizado na produção de medicamentos anti-inflamatórios naturais mais seletivos. Pois, de acordo com a literatura científica, seus efeitos podem estar relacionados com a inibição da cicloxigenase-2 e 5-lipoxigenase, podendo ser administrado por via oral, sem causar danos à mucosa do estômago, devido ao efeito gastroprotetor. esse efeito pode ser atribuído a sua capacidade em eliminar radicais livres, que estão aumentados no estresse oxidativo causado pela administração de etanol acidificado. além disso, o possível efeito inibidor sobre o fator de necrose tumoral (TNF- α), descrito na literatura para o verbascosídeo, pode ser importante no controle de doenças imunológicas inflamatórias, pois medicamentos com essa ação têm sido um dos maiores avanços da medicina. (MÖLLER; VILLIGER, 2006).

GRÁFICO 18 – EFEITO DO EXTRATO BRUTO DE *B. stachyoides* SOBRE A MOTILIDADE GASTROINTESTINAL

FONTE: O autor (2017)

LEGENDA: (a) Esvaziamento gástrico; (b) Trânsito intestinal. Os animais receberam veículo (C = 10 mL/kg, v.o), atropina (A = 3 mg/kg, s.c.), neostigmina (N = 20 mg/kg, s.c.), metoclopramida (M = 30 mg/kg, v.o.) e extrato bruto de *B. stachyoides* (300, 600 and 900 mg/kg, v.o.). Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão de 6 animais. Os níveis de significância são indicados por * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$ quando comparado com o grupo controle (C) (ANOVA de uma via seguida do teste de Tukey)

4.7.8 Avaliação da toxicidade subcrônica

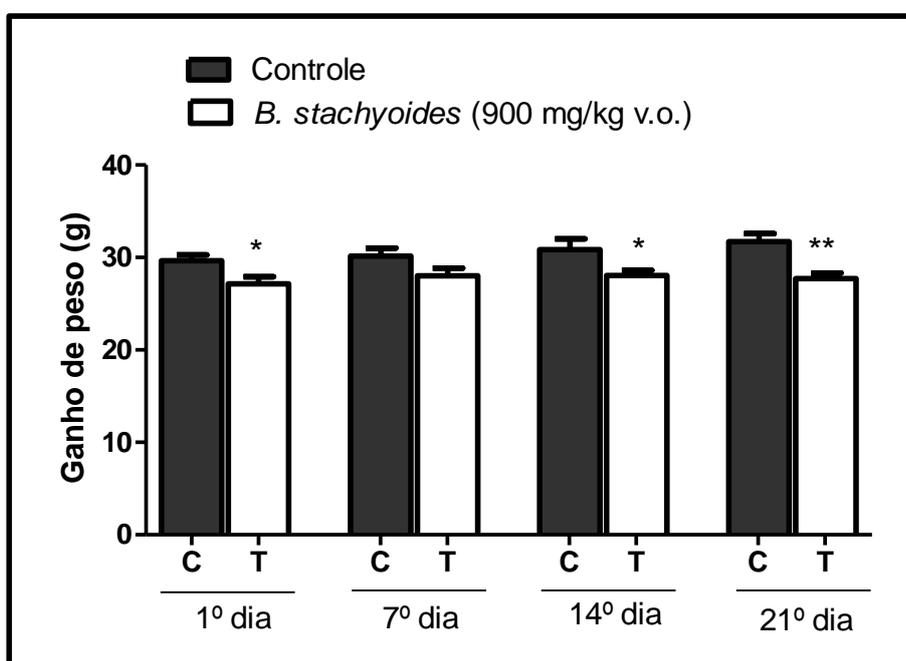
O extrato bruto das partes aéreas de *B. stachyoides* apresentou resultados biológicos promissores, portanto, é necessária a avaliação de um possível efeito tóxico proveniente do uso oral da espécie. No ensaio de toxicidade subcrônica foi realizado o tratamento diário dos animais por 21 dias, com o extrato bruto na dose de 900 mg/kg, considerada a dose mais efetiva nos testes avaliados neste trabalho.

Durante o período de tratamento com o extrato bruto de *B. stachyoides*, os animais foram pesados em dias específicos (1, 7, 14 e 21 dias) para avaliação de possível perda de peso decorrente do tratamento. Os resultados demonstraram que

houve perda de peso nos dias 1, 14 e 21 nos animais tratados com o extrato bruto quando comparado aos controles, apresentando diferença significativa, conforme demonstrado no GRÁFICO 19.

A perda de peso dos animais pode estar associada ao estresse que eles passaram durante o período do teste ou também pode ter ocorrido uma sensação de saciedade, principalmente se houve aumento da produção de muco, ao receber o extrato bruto numa concentração alta, neste caso 900 mg/kg v.o.

GRÁFICO 19 – GANHO/PERDA DE PESO DOS ANIMAIS DURANTE O ENSAIO DE TOXICIDADE SUBCRÔNICA

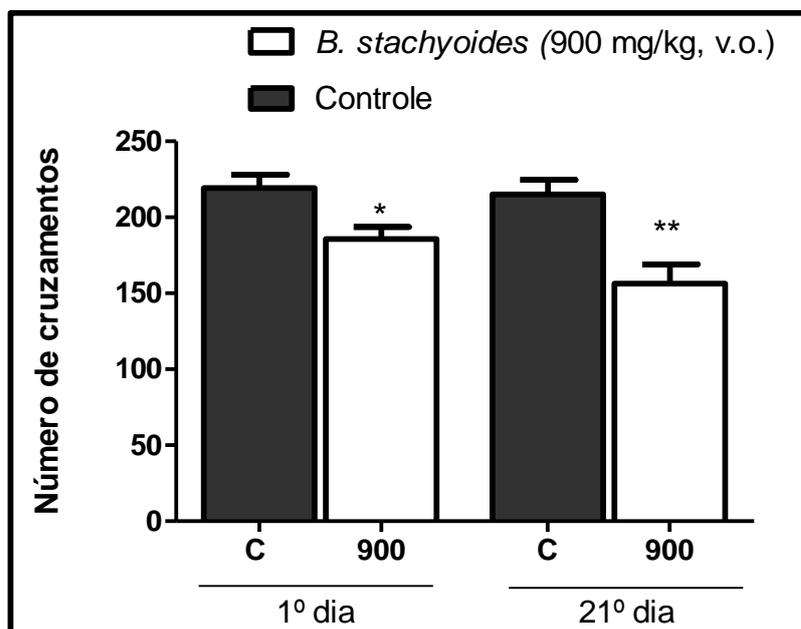


FONTE: O autor (2017)

LEGENDA: Cada coluna representa a média do peso \pm desvio padrão de 7 animais, sendo que a coluna C representa os valores do grupo controle. Os níveis de significância são indicados por * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$ quando comparados com o controle (Teste t de Student)

O teste de campo aberto, realizado no 1º e 21º dia com os camundongos fêmeas, apresentou menor número de cruzamentos para o grupo tratado quando comparado ao grupo controle, com diferença estatística de $p < 0,05$ e $p < 0,01$, conforme GRÁFICO 20.

GRÁFICO 20 – EFEITO DO EXTRATO BRUTO DAS PARTES AÉREAS DE *Buddleja stachyoides* NO TESTE DE CAMPO ABERTO EM CAMUNDONGOS FÊMEAS



FONTE: O autor (2017)

LEGENDA: Cada coluna representa a média \pm desvio padrão de 7 animais, sendo que a coluna C representa os valores do grupo controle. Os níveis de significância são indicados por * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e quando comparados com o controle (Teste t de Student)

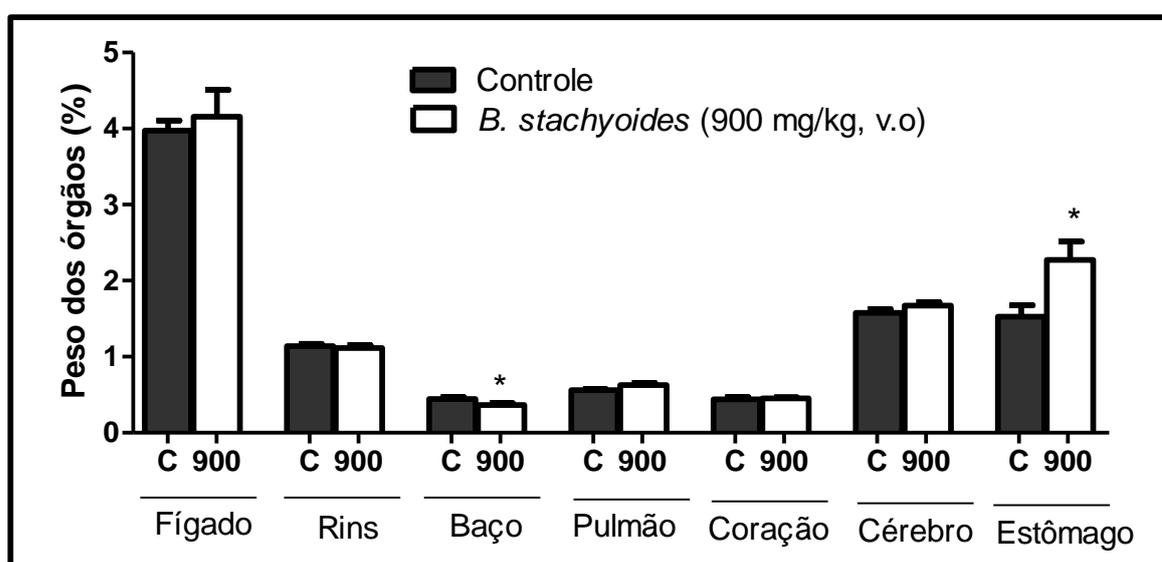
Portanto, o extrato bruto de *B. stachyoides* pode possuir uma ação sobre a atividade locomotora dos animais do sexo feminino, sendo mais significativa no 21º dia, indicando que pode ocorrer um comprometimento motor no uso prolongado. Porém, quando esse ensaio foi realizado com os machos não houve nenhuma alteração locomotora, possivelmente as fêmeas podem ser mais suscetíveis devido aos hormônios, pois os compostos verbascosídeo e martinosídeo, presentes no extrato bruto, apresentaram atividades agonistas/antagonistas sobre os receptores estrogênicos no estudo de Papoutsis et al. (2006).

Tomonori et al. (1997) isolou o verbascosídeo de Cedron (*Lippia triphylla*) e avaliou seu efeito sedativo sobre a anestesia induzida por pentobarbital e a inibição da atividade locomotora aumentada pela metanfetamina. O composto apresentou prolongamento da sedação nas doses de 100, 300 e 500 mg/kg e a inibição da atividade locomotora aumentada pela metanfetamina nas doses de 300 e 500 mg/kg. Como o efeito observado por Tomonori et al. (1997) foi realizado com o isolado verbascosídeo, e no teste de campo aberto os animais foram tratados com extrato bruto, o efeito sedativo pode estar diminuído devido ao extrato bruto ser um fitocomplexo. Estes dados demonstram a importância em realizar testes de sedação

em machos e fêmeas tratados com o extrato bruto de *B. stachyoides* para avaliar se há efeito diferente entre os sexos.

Após o período de tratamento, os animais foram sacrificados e os órgãos vitais foram retirados e pesados, para avaliação de possível alteração. Observou-se que o baço apresentou uma diminuição do peso, enquanto o estômago teve um aumento, os demais órgãos não apresentaram diferença estatística em relação ao grupo controle, conforme visualizado no GRÁFICO 21.

GRÁFICO 21 – EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO DO EXTRATO BRUTO DAS PARTES AÉREAS DE *B. stachyoides* NO PESO RELATIVO DOS ÓRGÃOS VITAIS



FONTE: O autor (2017)

LEGENDA: Cada coluna representa a média \pm desvio padrão de 7 animais, sendo que a coluna C representa os valores do grupo controle. Os níveis de significância são indicados por * $p < 0,05$ quando comparados com o controle (Teste t de Student)

Durante a pesagem dos órgãos, verificou-se que alguns estômagos estavam escuros, e quando foram abertos percebeu-se a presença de alimentos não digeridos. Isto pode explicar o aumento do peso deste órgão, portanto, não é possível afirmar que esteja relacionado a alguma alteração. Além disso, foi observado durante a lavagem dos estômagos a presença aumentada de muco, que talvez esteja relacionada com o efeito gastroprotetor, e que pode ter colaborado para o aumento do peso dos estômagos.

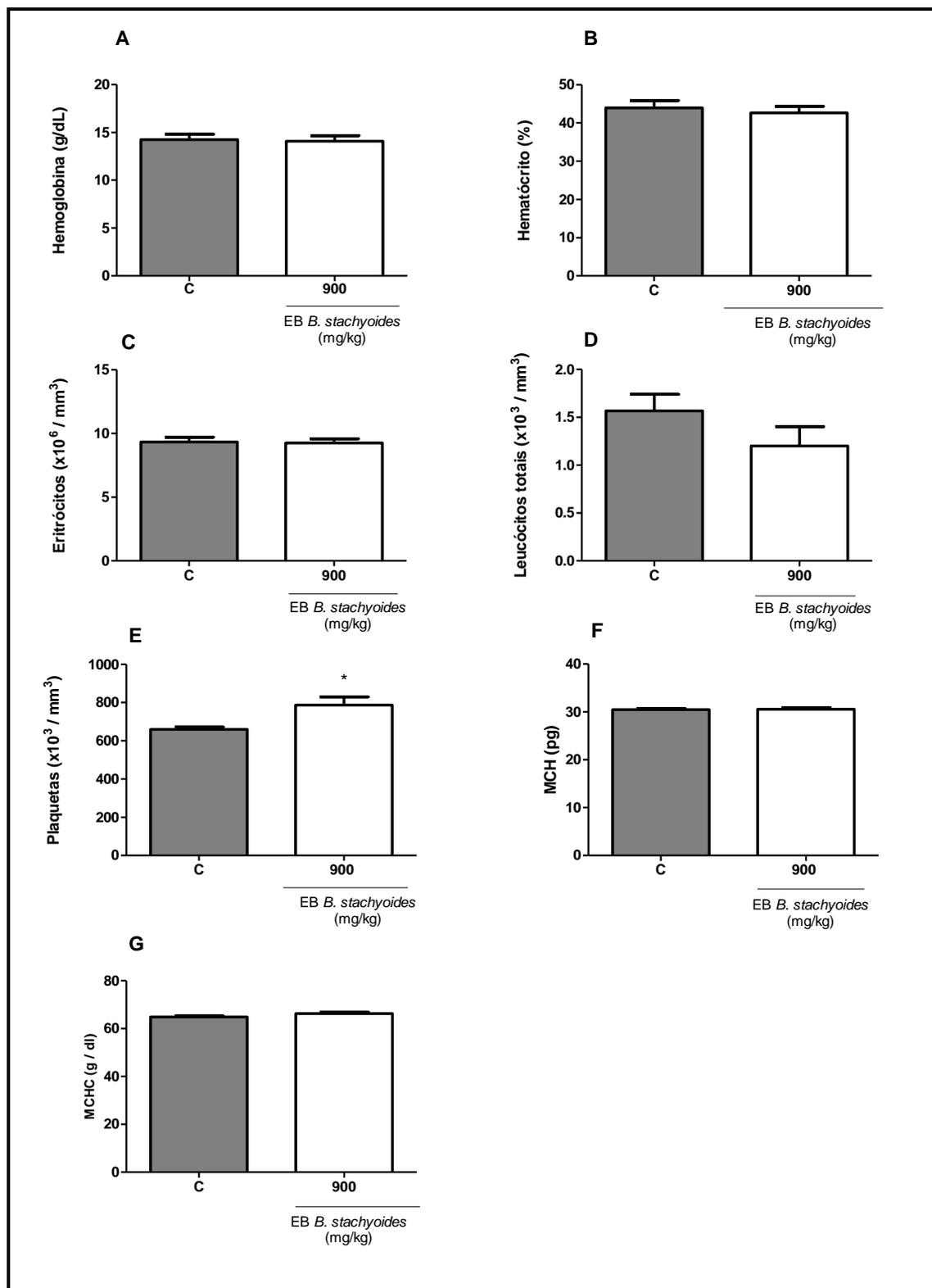
O sangue dos animais, coletado após o 21^o dia de tratamento com o extrato bruto de *B. stachyoides*, foi utilizado para análise dos parâmetros hematológicos: hemoglobina, hematócrito, eritrócitos, leucócitos totais, plaquetas, hemoglobina

globular (MCH) e concentração de hemoglobina globular (MCHC), os quais apresentaram poucas alterações nos animais tratados quando comparados com o grupo controle, conforme demonstrado no GRÁFICO 22. Verificou-se apenas um aumento no número de plaquetas, com nível de significância de $p < 0,05$ quando comparado ao grupo controle.

As plaquetas são células produzidas na medula óssea e responsáveis pelo processo de coagulação do sangue, apresentando capacidade de criar coágulos sanguíneos e impedindo a saída de sangue em vasos lesionados. O tempo médio de vida das plaquetas é de 3 a 5 dias e o baço é o responsável pela sua captação e destruição. Portanto, se o baço não estiver retirando eficazmente as plaquetas, haverá um aumento do número de plaquetas em circulação, o que leva, em alguns casos, a necessidade de uma esplenectomia, ou seja, retirada do baço. (OLIVEIRA, 2011). Nos animais tratados houve uma diminuição do peso do baço, o que pode ter influenciado no aumento do número de plaquetas observado. Segundo Petroianu (2001) o baço tem papel imunitário, de filtração e hematopoiético, e embora apresente funções importantes não é um órgão vital, sendo possível a sobrevivência sem o mesmo. Várias doenças causam aumento do baço, denominado esplenomegalia, interrompendo, assim, suas funções. (VENTURA, 2016). Porém, o que houve foi diminuição do baço, aparentemente, não causada por doenças. Outra hipótese é um eventual efeito antiplaquetário do extrato bruto, devido à possível presença do ácido triacontanoico nas partes aéreas e não apenas nas raízes, o qual possui atividade antiplaquetária. (PAN et al., 2012). Durante o tratamento subcrônico, a medula em resposta a este efeito começa a produzir maior quantidade de plaquetas e o baço pode ficar sobrecarregado e, conseqüentemente, apresentar alteração do peso.

Com o soro sanguíneo dos animais foram avaliados parâmetros bioquímicos, tais como, dosagem de enzimas hepáticas ALT e AST, uréia, creatinina K e ácido úrico. Os resultados indicaram que não houve alterações significativas, exceto na dosagem de ácido úrico, em que o grupo tratado apresentou diminuição significativa ($p < 0,05$) quando comparado ao grupo controle, conforme GRÁFICO 23.

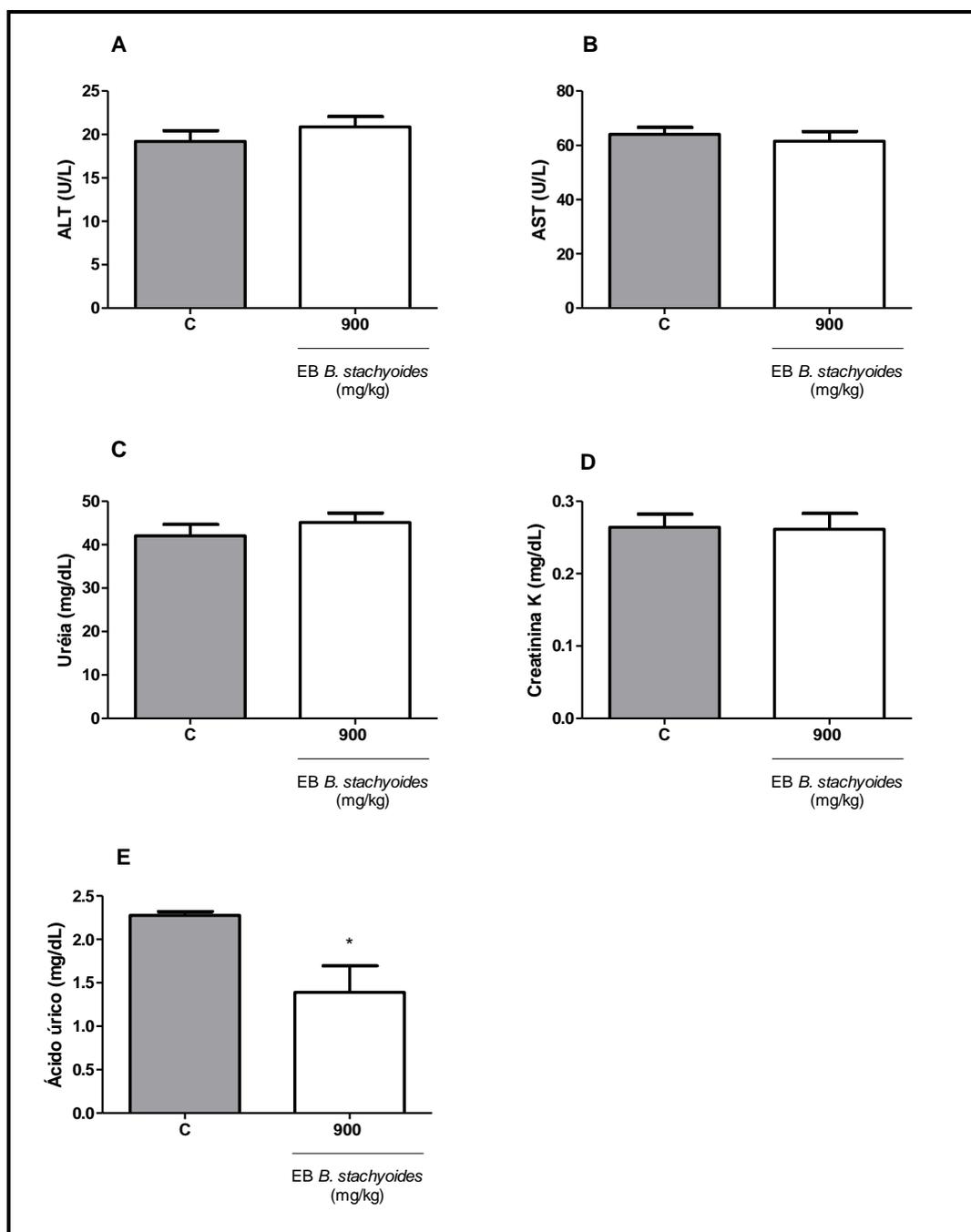
GRÁFICO 22 – PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS OBTIDOS APÓS ADMINISTRAÇÃO DIÁRIA (21 DIAS) DO EXTRATO BRUTO DE *B. stachyoides*



FONTE: O autor (2017)

LEGENDA: MCH: hemoglobina globular; MCHC: concentração de hemoglobina globular. Cada coluna representa a média \pm desvio padrão de 7 animais, sendo que a coluna C representa os valores do grupo controle. Os níveis de significância são indicados por * $p < 0,05$ quando comparados com o controle (Teste t de Student)

GRÁFICO 23 – PARÂMETROS BIOQUÍMICOS AVALIADOS COM O SORO DOS ANIMAIS TRATADOS DIARIAMENTE (21 DIAS) COM EXTRATO BRUTO DE *B. stachyoides*



FONTE: O autor (2017)

LEGENDA: Cada coluna representa a média ± desvio padrão de 7 animais, sendo que a coluna C representa os valores do grupo controle. Os níveis de significância são indicados por * $p < 0,05$ quando comparados com o controle (Teste t de Student)

A alteração nos níveis de ácido úrico pode estar relacionada com a estrutura-atividade dos fenilpropanoides. O composto isoverbascosídeo foi o primeiro fenilpropanoide que diminuiu substancialmente a formação de ácido úrico

pela inibição competitiva da xantina oxidase, sugerindo que a porção cafeoil do grupo 6'-hidroxila é essencial na ação inibidora da enzima. (KONG et al., 1999).

4.7.8.1 Análise histológica dos rins e fígado

Após a pesagem dos órgãos, foram confeccionadas lâminas com o fígado e os rins dos animais controle e tratados para avaliação histológica. Os resultados, apresentados nas TABELAS 9 e 10, demonstraram que não houve alterações no fígado ou rins dos animais após o teste de toxicidade subcrônica, corroborando com os parâmetros bioquímicos que não apresentaram alterações nas dosagens das enzimas hepáticas e renais. No controle 4, foi encontrado no fígado um unifoco de linfócitos, porém isso é comum aparecer em animais de biotério, pois provavelmente o animal já encontrava-se com alguma infecção, não sendo portanto, proveniente do experimento, principalmente por se tratar de um fato isolado.

Os resultados obtidos no ensaio de toxicidade subcrônica indicaram que o extrato bruto das partes aéreas possui baixa toxicidade, porém são testes preliminares e necessitam ser aprofundados para comprovação da segurança da sua administração, principalmente se houver interesse no desenvolvimento de um medicamento fitoterápico com as partes aéreas de *B. stachyoides*.

TABELA 9 – RESULTADOS DAS ALTERAÇÕES HISTOLÓGICAS DO FÍGADO EM CAMUNDONGOS FÊMEAS APÓS TOXICIDADE SUBCRÔNICA

Alterações do fígado	HISTOLOGIA DOS ANIMAIS APÓS TOXICIDADE SUBCRÔNICA												
	C1	C2	C3	C4	C5	C6	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7
Necrose	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
Esteatose	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
Apoptose	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
Tumefação	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
Coolestase	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
Focos de Linfócitos	N	N	N	S	N	N	N	N	N	N	N	N	N

FONTE: O autor (2017)

LEGENDA: T: Animais tratados com 900 mg/kg do extrato bruto das partes aéreas de *B. stachyoides*; C: animais controle; N: Normal, não houve alteração no órgão; S: houve alteração no órgão

TABELA 10 – RESULTADOS DAS ALTERAÇÕES HISTOLÓGICAS DOS RINS EM CAMUNDONGOS FÊMEAS APÓS TOXICIDADE SUBCRÔNICA

Alterações dos rins	HISTOLOGIA DOS ANIMAIS APÓS TOXICIDADE SUBCRÔNICA												
	C1	C2	C3	C4	C5	C6	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7
Hianização glomerular	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
Glomerulite	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
Necrose tubular	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
Túbulo estratificado inflamatório	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
Interstício virtual	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
Focos de linfócitos	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
Papila renal	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
Cálice	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
Infiltrado mononuclear	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
Pielite	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N

FONTE: O autor (2017)

LEGENDA: T: Animais tratados com 900 mg/kg do extrato bruto das partes aéreas de *B. stachyoides*;
C: animais controle; N: Normal, não houve alteração no órgão

5 CONCLUSÃO

- ✓ Foi isolado da fração hexânica das raízes o composto FHR1, um ácido graxo de cadeia longa, identificado como a possível estrutura do ácido triacontanoico. Da fração acetato de etila das partes aéreas foi isolado o composto FAEPA2, um fenilpropanoide, identificado como martinósídeo (*trans* e *cis*), com propriedades muito semelhantes ao composto verbascosídeo, isolado da espécie *B. stachyoides*.
- ✓ O método analítico desenvolvido para determinação do marcador verbascosídeo, composto majoritário, presente no extrato bruto das partes aéreas de *B. stachyoides*, demonstrou ser confiável e adequado, pois atendeu todos os parâmetros de validação requeridos pela RE nº 899, de 29 de maio de 2003.
- ✓ No teste de avaliação da toxicidade sobre as larvas no 3º estágio de *Aedes aegypti*, as amostras que apresentaram mortalidade foram a fração hexânica das partes aéreas, o extrato bruto e a fração hexânica da raiz, indicando a possibilidade de se obter um larvicida proveniente da espécie *B. stachyoides*.
- ✓ A avaliação da atividade alelopática demonstrou que a maioria das amostras das partes aéreas de *B. stachyoides* possuem compostos aleloquímicos capazes de estimular a germinação e crescimento das radículas e hipocótilos de *Lactuca sativa* L., com exceção da fração hexânica que apresentou inibição no crescimento das radículas. No teste de germinação das sementes de *Allium cepa* L., as amostras das partes aéreas estimularam a germinação das sementes tratadas com a fração hexânica e fração remanescente, enquanto que a fração acetato de etila inibiu a germinação. No teste de crescimento quase todas as amostras, exceto a fração hexânica, inibiram as radículas e estimularam os coleótilos. As amostras das raízes de *B. stachyoides* possuem compostos aleloquímicos que estão envolvidos na inibição da germinação das sementes de *Lactuca sativa* L. A germinação das sementes de *Allium cepa* L. e o crescimento das radículas também sofreram inibição pelas frações acetato de etila e remanescente, enquanto que não houve interferência sobre o crescimento dos coleótilos.
- ✓ No ensaio de captura do ânion superóxido observou-se que as concentrações de inibição das amostras das partes aéreas e raízes de *B. stachyoides* foram maiores que as concentrações de inibição dos padrões de ácido gálico e quercetina, sendo que o extrato bruto das partes aéreas apresentou maior atividade antioxidante do que as raízes. Essa diferença ocorre devido aos padrões serem substâncias

isoladas e os extratos brutos fitocomplexos. No ensaio de captura do ânion óxido nítrico, as amostras apresentaram capacidade de inibição do radical óxido nítrico superior ao ácido gálico e inferior à quercetina.

✓ No teste de nocicepção induzida por formalina para o extrato bruto das partes aéreas, não houve efeito antinociceptivo durante a fase neurogênica, porém na fase inflamatória as doses de 600 e 900 mg/kg v. o., indicaram um possível efeito analgésico, apresentando índice de inibição de $(44 \pm 15)\%$ e $(55 \pm 19)\%$, respectivamente, quando comparadas ao controle.

✓ No teste de nocicepção induzida por ácido acético para o extrato bruto das partes aéreas, as doses de 600 e 900 mg/kg v.o. apresentaram significativo efeito antinociceptivo quando comparadas com o grupo controle, com índice de inibição de $(42 \pm 10)\%$ e $(44 \pm 12)\%$, respectivamente.

✓ O edema de pata induzido por carragenina indicou uma atividade anti-inflamatória nos tempos de 3 e 4 horas, apresentando uma diminuição do edema com índices de inibição de $(39 \pm 14)\%$ e $(25 \pm 13)\%$, respectivamente.

✓ O efeito anti-inflamatório do extrato bruto de *B. stachyoides* avaliado no modelo de peritonite induzida por carragenina demonstrou diminuição significativa na migração de leucócitos para a cavidade peritoneal na dose de 900 mg/kg.

✓ O teste de campo aberto realizado com a dose de 900 mg/kg em camundongos machos, não indicou alteração na atividade locomotora dos animais. Porém, quando realizado com fêmeas durante o ensaio de toxicidade, sugeriu um efeito sedativo do extrato bruto.

✓ O extrato bruto de *B. stachyoides* nas doses (600 e 900 mg/kg) sugeriu uma atividade protetora sobre as lesões gástricas induzidas por HCl/ etanol, sendo mais efetivo que o omeprazol. A atividade gastroprotetora pode estar relacionada com os fenilpropanoides, principalmente o verbascosídeo.

✓ No modelo de motilidade gastrointestinal, o extrato bruto administrado por via oral não apresentou efeito significativo sobre o esvaziamento e nem no trânsito intestinal quando comparados ao grupo controle, porém apresentou uma tendência em diminuir a motilidade gastrointestinal.

✓ As atividades anti-inflamatória e analgésica observadas para o extrato bruto das partes aéreas de *B. stachyoides* podem estar relacionadas aos efeitos inibitórios sobre enzimas e mediadores inflamatórios envolvidos no processo de inflamação e

dor, tais como COX-2, 5-lipoxigenase, histamina, bradicinina e óxido nítrico sintase induzível (iNOS), descritos na literatura para os fenilpropanoides, sendo o verbascoídeo o composto mais ativo.

✓ Os resultados obtidos no ensaio de toxicidade subcrônica indicaram que o extrato bruto das partes aéreas na dose de 900 mg/kg possui baixa toxicidade.

5.1 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Diante dos resultados biológicos bastante promissores, torna-se interessante a pesquisa de outras atividades farmacológicas relacionadas aos compostos isolados e descritos na literatura para a espécie vegetal *B. stachyoides*. Estudos de toxicidade mais completos também são importantes para avaliar a segurança e eficácia desta espécie, principalmente, se futuramente, houver interesse em torná-lo um medicamento fitoterápico. Pois, atualmente, existem poucos estudos relacionados à sua toxicidade. Além disso, a continuidade da elucidação estrutural de outros compostos presentes na planta é importante para o conhecimento dos mecanismos de ação envolvidos nas atividades terapêuticas.

REFERÊNCIAS

- ADHIKARY, B.; YADAV, S. K.; BANDYOPADHYAY, S. K. CHATTOPADHYAY, S. Epigallocatechin gallate accelerates healing of indomethacin-induced stomach ulcers in mice. **Pharmacol Rep**, v. 63, p. 527-536, 2011.
- AHMAD, I.; CHEN, S.; PENG, Y.; CHEN, S.; XU, L. Lipoxygenase inhibiting and antioxidant iridoids from *Buddleja crispa*. **J Enzyme Inhib Med Chem**, v. 23, p.140 - 143, 2008.
- AKIRA, S.; HIRANO, T.; TAGA, T. et al. Biology of multifunctional cytokines: IL 6 and related molecules (IL-1 and TNF). **Faseb J**, v. 4, p. 2860-2867, 1990.
- ALANKO, J.; RIUTTA, A.; HOLM, P.; MUCHA, I.; VAPATALO, H.; METSA-KETELA, T. Modulation of arachidonic acid metabolism by phenols: relation to their structure and antioxidant/prooxidant properties. **Free Radic Biol Med**, v. 26, n. 1-2, p. 193-201, 1999.
- ALLE, N.; ALLE-FILHO, N. Estudo em ratos das propriedades antiinflamatórias das drogas: indometacina, butazona, clinoril, naprosyn, benflogin e inflaril, na fase aguda da inflamação. **Rev Odontol Univ São Paulo**, v. 6, n. 1-2, p. 31-6, 1992.
- AMB, M. K., et al. Allelopathy: potential role to achieve new milestones in rice cultivation. **Rice Science**, v. 23, n. 4, p. 165-183, 2016.
- ANDREO, M. A.; BALLESTEROS, K. V. R.; HIRUMA-LIMA, C. A.; MACHADO DA ROCHA, L. R.; SOUZA BRITO, A. R. M.; VILEGAS, W. Effect of *Mouriri* pusaextracts on experimentally induced gastric lesions in rodents: Role of endogenous sulfhydryls compounds and nitric oxide in gastroprotection. **J Ethnopharmacol**, v. 107, p. 431-41, 2006.
- ANDRADE JR., D. R.; SOUZA, R. B.; SANTOS, S. A.; ANDRADE, D. R. Os radicais livres de oxigênio e as doenças pulmonares. **J Bras Pneumol**, v.31, n. 1, p.60- 68, 2005.
- ARAKI, H.; UKAWA H.; SUGAWA, Y.; YAGI, K.; TAKEUCHI, K. The roles of prostaglandin E receptor subtypes in the cytoprotective action of prostglandin E₂ in rat stomach. **Aliment Pharmacol Ther**, v. 14, n. 1, p. 116-124, 2000.
- ARRIETA-BAEZ, D.; RUIZ DE ESPARZA, R.; JIMÉNEZ-ESTRADA, M. Mexican plants used in the salmonellosis treatment. In: Kumar, Y. (Ed.), *Salmonella – A Diversified Superbug*. In Tech Open, Rijeka, p. 169-184, 2012.
- AVILA-ACEVEDO, J. G.; CASTAÑEDA, C. M.; BENITEZ, F. J.; DURAN, D. A.; BARROSO, V. R.; MARTINEZ, C. G.; MUÑOZ, J. L.; MARTINEZ, C. A., ROMO DE VIVAR, A. Photo protective activity of *Buddleja scordioides*. **Fitoterapia**, v.76, p.301-309, 2005.

BACKHOUSE, N.; DELPORTE, C.; APABLAZA, C.; FARÍAS, M.; GOÏTY, L.; ARRAU, S.; NEGRETE, R.; CASTRO, C.; MIRANDA, H. Antinociceptive activity of *Buddleja globosa* (matico) in several models of pain. **J Ethnopharmacol**, v. 119, p. 160-165, 2008a.

BACKHOUSEA, N.; ROSALES, L., APABLAZA, C.; FARIAS, M.; GOÏTY, L.; ERAZO, S.; NEGRETE, R.; THEODOLUZ, C.; RODRÍGUEZ, J.; DELPORTE, C. Analgesic, anti-inflammatory and antioxidant properties of *Buddleja globosa*, Buddlejaceae. **J Ethnopharmacol**, v. 116, p. 263-269, 2008b.

BAGCHI, D.; CARRYL, O.; TRAN, M.; KROHN, R.; BAGCHI, D.J.; GARG, A.; BAGCHI, M.; MITRA, S.; STOHS, S. Stress, diet and alcohol-induced oxidative gastrointestinal mucosal injury in rats and protection by bismuth subsalicylate. **J Appl Toxicol**, v. 18, n. 1, p. 3-13, 1998.

BALBINO, E. E.; DIAS, M. F. Farmacovigilância: um passo em direção ao uso racional de plantas medicinais e fitoterápicos. **Braz J Pharmacog**, v. 6, n. 20, p. 992-1000, 2010.

BARNES, J.P.; Putnan, A.R.; Burke, B.A. & Aasen, A.J. Isolation and characterization of allelochemicals in rye herbage. **Phytochemistry**, v. 26, n. 5, p.1385-1390, 1987.

BARREIROS, A. L. B.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P. Oxidative stress: relations between the formation of reactive species and the organism's defense. **Quim Nova**, v. 29, n. 1, p. 113-123, 2006.

BARROS, C. B. **Rev Biológico**, v. 64, p. 175, 2002.

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

BEAUTLER, E.; LITCHMAN, M. A.; COLLIER B. S.; KIPPS, T. J. Williams Hematology. New York, McGraw-Hill, 1995.

BECKMAN, J.S.; KOPPENOL, W.H. Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and the ugly. **Am J Physiol**, v. 271, p. 1424-37, 1996.

BELLIK, Y.; BOUKRAË, L.; ALZHRANI, H.A.; BAKHOTMAH, B.A.; ABDELLAH, F.; HAMMOUDI, S. M.; IGUER-OUADA, M. Molecular mechanism underlying anti-inflammatory and anti-allergic activities of phytochemicals: an update. **Molecules**, v. 18, p. 322-353, 2013.

BESSON, J.M. The neurobiology of pain. **The Lancet**, v. 353, n. 9164, p.1610-5, 1999.

BIO-MANGUINHOS/FIOCRUZ . **Febre amarela: sintomas, transmissão e prevenção**. Disponível em: <<https://www.bio.fiocruz.br/index.php/febre-amarela-sintomas-transmissao-e-prevencao#>>. Acesso em: 19 jul. 2017.

BISWAS, P.; ZHANG, J.; SCHOENFELD, J. D.; SCHOENFELD, D.; GRATZINGER, D.; CANOSA, S.; MADRI, J. A. Identification of the regions of PECAM-1 involved in β - and γ - catenin associations. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 329, p. 1225-1233, 2005.

BORGES, N. S.; DALCOL, I. GITZEL FILHO, A.; RIVERO, A. C.; ADOLPHO, L. O.; MARIN, D. F. Estudo fitoquímico e de atividade enzimática de *Artemisia verlotorum* Lamotte. Jornada acadêmica integrada, Universidade Federal de Santa Maria, Anais 25^a, 2010.

BOTTING, R. M. Inhibitors of cyclooxygenases: mechanisms, selectivity and uses. **J Physiol Pharmacol**, v. 57, p. 113-124, 2006.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA. Resolução RE nº 899 de 29 de maio de 2003. Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos métodos analíticos. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/documents/10181/2718376/RE_899_2003_COMP.pdf/ff6fdc6b-3ad1-4d0f-9af2-3625422e6f4b> Acesso em: 11 mar. 2013.

BRASIL. Agência de Vigilância Sanitária - ANVISA. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/noticias/-/asset_publisher/FXrpx9qY7FbU/content/vacina-contradengue-tem-preco-definido/219201>. Acesso em: 08 set. 2016.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA. Resolução da Diretoria Colegiada - RDC nº 26, de 13 de maio de 2014. Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos e o registro e a notificação de produtos tradicionais fitoterápicos. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/documents/33836/351410/Consolidado+de+normas+da+COFID+%28Vers%C3%A3o+V%29/3ec7b534-a90f-49da-9c53-ce32c5c6e60d>> Acesso em: 07 mai. 2017.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA. Instrução Normativa - IN nº 04, de 18 de junho de 2014. Determina a publicação do Guia de orientação para registro de Medicamento Fitoterápico e registro e notificação de Produto Tradicional Fitoterápico. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/documents/33836/2501251/Guia%2Bfinal%2Bdicol%2B180614+%282%29.pdf/f400c535-e803-4911-9ef8-100c0c2bb3c6>> Acesso em: 13 mai. 2017.

BRASIL. Farmacopeia Brasileira. 5 ed. V. 1. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brasília: Anvisa, 2010.

BRASIL. Ministério da Agricultura e Reforma Agrária. Regras para a Análise de Sementes, SNDA/DNDU/CLU, 2. Ed. Brasília, 2009.

BRASIL. Ministério da Saúde - MS. Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares no SUS: atitude de ampliação de acesso. 2 ed. Brasília, 2015.

BRASIL. Ministério da Saúde - MS. Dengue. Disponível em <<http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/oministerio/principal/secretarias/svs/dengue>>. Acesso em: 08 set. 2016.

BRZOZOWSKI, T.; KONTUREK, P. C.; KONTUREK, S. J.; BRZOZOWSKA, I.; PAWLIK, T. Role of prostaglandins in gastroprotection and gastric adaptation. **J. Physiol Pharmacol**, v. 56, p. 33-55, 2005.

BUSCONI, L.; MICHEL, T. Endothelial nitric oxide synthase. **J Biol Chem**, v. 268, n. 12, p. 8410-3, 1993.

CAMPOS, G. S.; BANDEIRA, A. C.; SARDI, S. I. Zika virus outbreak, Bahia, Brazil. **Emerg Infect Dis**, v. 21, p. 1885-1886, 2015.

CALIXTO, J.B. Twenty-five years of research on medicinal plants in Latin America: a personal view. **J Ethnopharmacol**, v. 100, p. 131–134, 2005.

CARVALHO. W. A.; LEMÔNICA, L. Mecanismos celulares e moleculares da dor inflamatória, modulação periférica e avanços terapêuticos. **Rev Bras Anestesiol**, v. 48, n. 2, p. 137-158, 1998.

CARVALHO, J. L. de C. **Contribuição ao estudo fitoquímica e analítico do *Nasturtium officinale* R. BR., Brassicaceae**. 88f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 2001.

CARVALHO, J. L. S.; MIGUEL, M. D.; MIGUEL, O. G.; DADALT, R. C. Processo de obtenção de extratos hidroalcoólico, extratos secos e derivados do agrião (*Nasturtium officinale*) e espécies medinais afins, com modificações introduzidas em equipamento Soxhlet para aplicações na indústria , área farmacêutica, cosmética, alimentícia e afins. Brasil. PI 0601703-7 A, 05 apr. 2006.

CERQUEIRA, N. F.; YOSHIDA, W. B. Óxido nítrico: revisão. **Acta Cir Bras**, v. 17, n. 6, p. 417-423, 2002. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-86502002000600011&lng=en&nrm=iso>. Acesso em: 07 mai. 2017.

CHANDRANATH, S. I.; BASTAKI, S. M.; SINGH, J. A. Comparative study on the activity of lansoprazole, omeprazole and PD-136450 on acidified ethanol- and indomethacin induced gastric lesions in the rat. **Clin Exp Pharmacol Physiol**, v. 29, p. 173-180, 2002.

CHIOU, W. F.; LIN, L. C.; CHEN, C. F. Acteoside protects endothelial cells against free radical-induced oxidative stress. **J Pharm Pharmacol**, v. 56, p. 743-748, 2004.

CORTES, A. R.; DELGADILLO, A. J.; HURTADO, M.; DOMINGUEZ-RAMIREZ, A. M.; MEDINA, J. R.; AOKI, K.. The antispasmodic activity of *Buddleja scordioides* and *Buddleja perfoliata* on isolated intestinal preparations. **Biol Pharm Bull**, v. 29, p. 1186–1190, 2006.

CULLING, C. F. A.; ALLISON, R. T.; BARR, W. T. **Cellular Pathology Technique**. London, Butterworth, 1985.

DEEPAK, M.; HANDA, S. S.: **Phytother Res**, v.14, p. 463, 2000.

DÍAZ-RIVAS, J. O.; HERRERA-CARRERA, E.; GALLEGOS-INFANTE, J. A.; ROCHA-GUZMÁN, N. E.; GONZÁLEZ-LAREDO, R. F.; MORENO-JIMÉNEZ, M.R.; RAMOS-GÓMEZ, M.; REYNOSO-CAMACHO, R.; LARROSA-PÉREZ, M. GALLEGOS-CORONA, M. A. Gastroprotective potential of *Buddleja scordioides* Kunth Scrophulariaceae infusions; effects into the modulation of antioxidant enzymes and inflammation markers in an in vivo model. **J Ethnopharmacol**, v. 169, p. 280-286, 2015.

DI ROSA, M.; GIROUD, J.P.; WILLOUGHBY, D.A. Studies on the mediators of the acute inflammatory response induced in rats in different sites by carrageenan and turpentine. **J Pathol**, v.104, p. 15-29, 1971.

DRAY, A.; PERKINS, M. Bradykinin and inflammatory pain. **Trends Neurosci**, v.16, p. 99-104, 1993.

DUSSE, L. M. S.; VIEIRA, L. M.; CARVALHO, M. G. Revisão sobre óxido nítrico. **J Bras Patol Med Lab**, v. 39, n. 4, p. 343-350, 2003.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA (EMBRAPA). Crunive, P. E. et al. Plant chorophyl concentration micro controlled data storage type meter has up to 64 kilobytes and 16 square centimetres pixel capacity. R 200104291-A, 30 apr. 2002, 17 dec. 2002.

FERREIRA, M. P.; NISHIJIMA, C. M.; SEITO, L. N.; DOLLEDAL, A. L.; LOPES-FERREIRA, M.; DI STASI, L. C.; VILEGAS, W.; HIRUMA-LIMA, C.A. Gastroprotective effect of *Cissus sicyiodes* (Vitaceae): Involvement of microcirculation, endogenous sulfhydryls and nitric oxide. **J Ethnopharmacol**, v.117, p. 170-174, 2008.

FERREIRA, E. B.; SILVA, J. G. A; MACEDO, E. M. S.; LOTUFO, L. V; SILVA, M. G. V. Resumos da 32ª Reunião da Sociedade Brasileira de Química (SBQ), Fortaleza, Brasil, 2009.

FIEBICH, B.L.; HÜLL, M.; LIEB, K. et al. Prostaglandin E2 induces interleukin-6 synthesis in human astrocytoma cells. **J Neurochem**, v. 68, p. 704-709, 1997.

FIGUEREDO, C. A. de; GURGEL, I. G. D.; GURGEL JUNIOR, G. D. A Política Nacional de Plantas Mediciniais e Fitoterápicos: construção, perspectivas e desafios. **Physis**, v. 24, n. 2, p.381-400, 2014. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/physis/v24n2/0103-7331-physis-24-02-00381.pdf>>. Acesso em: 20 Jun. 2017.

FINNEY, D.J. **Probit Analysis**. 3 ed. Cambridge: University Press, 1974.

FLORA DO BRASIL. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/>>. Acesso em: 22 mai. 2017.

FONSECA, M. C. M. **Epamig pesquisa, produção de plantas medicinais para aplicação no SUS**. Espaço para o produtor. Viçosa, 2012.

FÖRSTERMANN, U.; CLOSS, E.I.; POLLOCK, J.S.; NAKANE, M.; SCHAWARZ, P.; GATH, I. KLEINERT, H. Nitric oxide synthase isozymes: characterization, purification, molecular cloning, and functions. **Hypertension**, v. 23, n. 2, p.1121-31, 1994.

FREIRE, C. S. R.; SILVESTRE, A. J. D.; NETO, C. P. Lipophilic extractives in *Eucalyptus globulus* kraft pulps. Behavior during ECF bleaching. **J Wood Chem Technol**, v. 25, p. 67-80, 2005.

FREIRE, M. O.; DYKE, T. E. V. Natural resolution of inflammation. **J Periodontol**, v. 63, p. 149–164, 2013.

FROELICH, S.; GUPTA, M. P.; SIEMS, K.; JENETT-SIEMS, K.. Phenylethanoid glycosides from *Stachytarpheta cayennensis* (Rich.) Vahl, Verbenaceae, a traditional antimalarial medicinal plant. **Braz J Pharmacog**, v 18, n. 4, p. 517-520, Out./Dez. 2008.

FUNES, L.; FERNANDEZ-ARROYO, S.; LAPORTA, O.; PONS, A.; ROCHE, E.; SEGURA-CARRETERO, A.; FERNANDEZ-GUTIÉRREZ, M. V. Correlation between plasma antioxidant capacity and verbascoside levels in rats after oral administration of lemon verbena extract. **Food Chem**, v. 117, p. 589–598, 2009.

FUNES, L.; LAPORTA, O.; CERDÁN-CALERO, M.; MICOL, V.; **Chem Phys Lipids**, v. 163, p. 190, 2010.

GARCEZ, W. S.; GARCEZ, F. R.; SILVA, L. M. G. E.; SARMENTO, U. C. Substâncias de Origem Vegetal com Atividade Larvicida Contra *Aedes aegypti*. **Rev Virtual Quim**, v.5, n. 3, p. 363-393, 2013.

GARLAND, E. L. Pain Processing in the Human Nervous System A Selective Review of Nociceptive and Biobehavioral Pathways. **Prim Care Clin Office Pract**, v. 39, p. 561–571, 2012.

GATTI, A. B.; PEREZ, S. C. J. G. A.; LIMA, M. I. S. Atividade alelopática de extratos aquosos de *Aristolochia esperanzae* O. Kuntze na germinação e no crescimento de *Lactuca sativa* L. L. e *Raphanus sativus* L. **Acta Bot Bras.**, v. 18, n. 3, p. 459-472, 2004.

GITZEL FILHO, A.; MOREL, A. F.; ADOLPHO, L.; ILHA, V.; GIRALT, E.;TARRAGÓ, T.; DALCOL, I. I. Inhibitory effect of Verbascosídeo isolated from *Buddleja brasiliensis* Jacq. ex Spreng on prolyl oligopeptidase activity. **Phytother Res**, v. 10, n. 26, p. 1472-1475, out. 2012.

GOMES, R. C.; BONAMINA, F.; DARIN, D. D.; SEITO, L. N. Antioxidative action of methanolic extract and buthanolic fraction of *Vochysia tucanorum* Mart. in the gastroprotection. **J Ethnopharmacol**, v. 121, p. 466-471, 2009.

GOVINDARAJAN, M.; RAJESWARY, M.; SIVAKUMAR, R. Larvicidal & ovicidal efficacy of *Pithecellobium dulce* (Roxb.) Benth. (*Fabaceae*) against *Anopheles stephensi* Liston & *Aedes aegypti* Linn. (Diptera: Culicidae). **Indian J Med Res**, v. 138, n.1, p. 129-134, 2013.

GUZIK, T. J.; KORBUT, R.; ADAMEK-GUZIK, T. Nitric oxide and superoxide in inflammation and immune function. **J Physiol Pharmacol**, v. 54, p. 469-487, 2003.

GWANNON. Disponível em: <<http://www.gwannon.com/species/Buddleja-stachyoides>>. Acesso em: 26 mai. 2011.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. Free **Radicals in Biology and Medicine**. Oxford, U.K.: Oxford University Press; 1999.

HARBONE, J.B. Recent advances in the ecological chemistry of plant terpenoids. p. 399-426, 1991. In: J.B. HARBONE & F.A. TOMAS-BARBERAN (EDS.). Ecological chemistry and biochemistry of plant terpenoids. **Oxford Sci Publ**, New York.

HARBONE, J.B. Plant secondary metabolism. p. 132-155, 1997. In: M.J. CRAWLEY (ED.). **Plant Ecology**, 2 ed. Blackwell Science Ltda.

HARRIS, G. K.; QIAN, Y.; LEONARD, S. S.; SBARRA, D. C.; SHI, X. Luteolin and chrysin differentially inhibit cyclooxygenase-2 expression and scavenge reactive oxygen species but similarly inhibit prostaglandin E2 formation RAW 264.7 cells. **J Nutr**, v.136, p.1517-1521, 2006.

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

HAZRA, B.; BISWAS, S.; MANDAL, N. Antioxidant and free radical scavenging activity of *Spondias pinnata*. **BMC Complement Altern Med**, v. 8, n. 63, p.1-10, 2008.

HEBEDA, C. B.; BOLONHEIS, S. M.; NAKASATO, A.; BELINATI, K.; SOUZA, P. D. C.; GOUVEA, D. R.; LOPES, N. P.; FARSKY, S. H. P. Effects of chlorogenic acid on neutrophil loco- motion functions in response to inflammatory stimulus. **J Ethnopharmacol**, v. 135, p. 261-269, 2011.

HEILMANN, J.; SALIS, I.; KIRMIZIBEKMEZ, H.; SCHIHL, W.; HARPUT, S.; STICHER, O. **Planta Med**, v. 66, p. 746, 2000.

HEINZMANN, B. M.; BARROS, F. M. C. Potencial das plantas nativas brasileiras para o desenvolvimento de fitomedicamentos tendo como exemplo *Lippia alba* (mill.) N. E. Brown (verbenaceae). UFSM, **Saúde Santa Maria**, v. 33, n.1, p. 43-48, 2007.

HIROKAWA, M.; MIURA, S.; YOSHIDA, H.; KUROSE, I.; SHIGEMATSU, T.; HOKARI, R.; HIGUCHI, H.; WATANABE, N.; YOKOYAMA, Y.; KIMURA, H.; KATO, S.; ISHII, H. Oxidative stress and mitochondrial damage precedes gastric mucosal cell death induced by ethanol administration. **Alcohol Clin Exp Res**, v. 22, n. 3, p. 111S-114S, 1998.

HOFFMANN, C. E. F. et al. Atividade alelopática de *Nerium Oleander* L. e *Dieffenbachia picta* schott em sementes de *Lactuca sativa* L. L. e *Bidens pilosa* L. **Rev Ciên Agroveterinárias**, v. 6, n. 1, p. 11-21, 2007.

HOUGHTON, P.J.; MENSAH, A. Y.; IESSA, N.; HONG, L. Y. Terpenoids in *Buddleja*: relevance to chemosystematics, chemical ecology and biological activity **Phytochemistry**, v. 64, p. 385-393 26, 2003.

HOUGHTON, P. J.; HYLANDS, P. J.; A.Y. MENSAH, A. Y.; HENSEL, A.; DETERS, A. M. In vitro tests and ethnopharmacological investigations: Wound healing as an example **J Ethnopharmacol**, v.100, p.100-107, 2005.

HU, C. H.; KITTS, D. D. Luteolin and luteolin-7-O-glucoside from dandelion flower suppress iNOS and COX-2 in RAW264.7 cells. **Mol. Cell. Biochem**, v. 265, p.107-113, 2004.

HUNSKAAR, S.; FASMER, O. B.; HOLE, K. Formalin test in mice, a useful technique for evaluating mild analgesics. **J Neurosci Meth**, v. 14, p. 69-76, 1985.

IALENTI, A.; IANARO, A.; MONCADA, S.; DI ROSA, M. Modulation of acute inflammation by endogenous nitric oxide. **Eur J Pharmacol**, v. 211, p. 177, 1992.

IOSET, J. R.; MARSTON, A.; GUPTA, M. P.; HOSTETTMANN, K. **J Nat Prod**, v. 64, p. 710, 2001.

ISACCHI, B.; IACOPI, R.; BERGONZI M. C.; GHELARDINI, C., GALEOTTI, N.; NORCINI M.; VIVOLI, E.; VINCIERI, F. F.; BILIA, A. R. Antihyperalgesic activity of verbascoside in two models of neuropathic pain. **J Pharm Pharmacol**, v. 63, n. 4, p. 594-601, 2011.

JABRI, M-A.; WANNES, D.; HAJJI, N.; SAKLY, M.; MARZOUKI, L.; SEBAI, H. Role of laxative and antioxidant properties of *Malva sylvestris* leaves in constipation treatment. **Biomed Pharmacother**, v. 89, p. 29-35, 2017.

JAMES, S.L. Role of nitric oxide in parasitic infections. **Microbiol Rev**, v. 59, n. 4, p. 533-47, 1995.

JANG, Y. S.; JEON, J. H.; LEE, H. S. **J Am Mosq Control Assoc**, v. 21, p. 400, 2005.

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

KATSUNG, B. G. **Farmacologia (Básica & Clínica)**. 6 ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, p. 408-423, 1998.

KAY, H.; GRINDLE, K.; MAGNESS, R. Ethanol exposure induces oxidative stress and impairs nitric oxide availability in the human placental villi: a possible mechanism of toxicity. **Am J Obstet Gynecol**, v.182, n.3, p. 682-688, 2000.

KHANH, T. D. et al. The exploitation of crop allelopathy insustainable agricultural production. **J Agron Crop Sci**, v. 191, n. 3, p. 172-184, 2005.

KIM, J. H.; CHOI, S. K.; LIM, W. J.; CHANG, H. I. Protective effect of astaxanthin produced by *Xanthophyllomyces dendrorhous* mutant on indomethacin-induced gastric mucosal injury in rats. **J Microbiol Biotechnol**, v. 14, p. 996-1003, 2004.

KIM, S. S.; SON, Y. O.; CHUN, J. C.; KIM, S. E.; CHUNG, G. H.; HWANG, K. J.; LEE, L. C. Antioxidant property of an active component purified from leaves of paraquat-tolerant *Rhemannia glutinosa*. **Redox Rep**, v.10, p.11-318, 2005.

KONG, L. D.; WOLFENDER, J. L.; CHRISTOPHER, H. K. C.; HOSTETTMANN, K.; TAN, R. X. **Planta Med**, v. 65, p. 744, 1999.

KOSTER, R.; ANDERSON, M.; DE BEER, E. J. Acetic acid for analgesic screening. **Fed Proc**, v. 18: p. 412-416, 1959.

KUNZE, W. A. A.; FURNESS, J. B. The enteric nervous system and regulation of intestinal motility. **Annu Rev Physiol**, v. 61, p. 117-142, 1999.

KÜPELI, E.; SAHIN, F. P.; YESILADA, E.; CALIS, I.; EZE, N. *In vivo* anti-inflammatory and antinociceptive activity of phenolic compounds from *Sideritis stricta*. **Z Naturforsch C**, v. 62, p. 519-525, 2007.

KUTLAR, A.; EMBURY, S. H. Cellular adhesion and the endothelium: P-selectin. **Hematol/ Oncol Clin N Am**, v. 28, p. 323-339, 2014.

LEE, J. Y.; WOO, E.; KANG, K. W. Inhibition of lipopolysaccharide-inducible nitric oxide synthase expression by Verbascosídeo through blocking of AP-1 activation. **J Ethnopharmacol**, v. 97, p. 561-566, 2005.

LEITE, H. P.; SARNI, R. S. Radicais livres, antioxidantes e nutrição. **Rev bras nutr clín**, v. 18, n. 2, p. 87-94, 2003.

LI, Y.Y., HUANG, S.S., LEE, M.M., DENG, J.S., HUANG, G.J. Anti-inflammatory activities of cardamonin from *Alpinia katsumadai* through heme oxygenase-1 induction and inhibition of NF- κ B and MAPK signaling pathway in the carrageenan-induced paw edema. **Int Immunopharmacol**, v. 25, p. 332-339, 2015.

LIU, M. J.; LI, J. X.; GUO, H. Z.; LEE, K. M.; QIN, L.; CHAN, K. M. The effects of verbascoside on plasma lipid peroxidation level and erythrocyte membrane fluidity during immobilization in rabbits: a time course study. **Life Sci**, v. 73, p. 883-892, 2003.

LOESER, J.D.; MELZACK, R. Pain: an overview. **The Lancet**, v. 353, n. 9164, p. 1607-9, 1999.

LOHMÜLLER, A.; LOHMÜLLER, F. Disponível em: <<http://www.f-lohmueller.de/botany/fam/s/Scrophulariaceae.htm>> Acesso em: 10 out. 2012.

LOPEZ-BELMONTE, J.; WHITTLE, B.J.; MONCADA, S. The actions of nitric oxide donors in the prevention or induction of injury to the rat gastric mucosa. **Br J Pharmacol**, v. 108, p. 73-78, 1993.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. **Plantas medicinais no Brasil: nativa e exóticas**. 2 ed. São Paulo: Instituto Plantarum de Estudos da Flora Ltda, 2008. p. 487.

MACEDO, E.M. S. **Estudo químico e farmacológico de *Senna martiana* (Benth) Irw. & Barn**. 162 f. Tese (Doutorado em Química Orgânica) - Centro de Ciência, Departamento de Química, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2011.

MACIAS, F.A.; GALINDO, J.C.G.; MOLINILLO, J.M.G; CASTELLANO, D.; VELASCO, R.F.; CHINCHILLA, D. Herbicide Models from Allelochemicals. **Pestic Sci**, v. 55, p. 633-675, 1999.

MACIAS, F. A. et al., Natural products as allelochemical 10. Dehydrozaluzanin C: a potent plant growth regulator with potential use as a natural herbicide template. **Phytochemistry**, v. 54, n.2, p. 165-171, 2000.

MACIAS, F.A.; MARIN, D.; OLIVEROS-BASTIDAS, A.; CHINCHILLA, D.; SIMONET, A.M.; MOLINILLO, J.M.G. Isolation and synthesis of allelochemicals from gramineae: Benzoxazinones and related compounds. **J Agric Food Chem**, v.54, p. 991-1000, 2006b.

MAGUIRE, J.D. Speed of germination - aid in selection and evaluation for seedling emergence and vigor. **Crop Sci**, v. 2, p. 176-177, 1962.

MAHENDRAN, G.; NARMATHA, V.B. Evaluation of analgesic, anti-inflammatory and antipyretic potential of methanol extract of *Swertia corymbosa* (Griseb.) Wight ex C.B. Clarke. **Int J Pharm Pharm Sci**, v. 5, n. 2, p. 459-63, 2013.

MAHLKE, J. D. ***Buddleja thyrsoides* LAM.: Estudo morfoanatômico, fitoquímico e biológico**. 118 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Centro Ciência da Saúde, Universidade Federal de Santa Maria, Rio Grande do Sul, 2007.

MARIAN, M.; PETER, A.; MIHALESCU, L.; VOSGAN, Z.; MATEI, G. Allelopathic potential of *Asarum europaeum* toward *Lycopersicon esculentum*. **An Univ Oradea Fasc Biol**, v. 18, n. 1, p. 39-44, 2011.

MEDEIROS, R.; PREDIGER, R. D. S.; PASSOS, G. F.; PANDOLFO, P.; FILIPE S. DUARTE, F. S.; JEFERSON L. FRANCO, J. L. F.; ALCIR L. DAFRE, A. L.; DI GIUNTA, G.; FIGUEIREDO, C. P.; TAKAHASHI, R. N.; CAMPOS, M. M.; CALIXTO, J. B. Connecting TNF- Signaling Pathways to iNOS Expression in a Mouse Model of

Alzheimer's Disease: Relevance for the Behavioral and Synaptic Deficits Induced by Amyloid Protein. **J Neurosci**, v. 27, n. 20, p. 5394-5404, 2007.

MELECCHI, M. I. S. **Caracterização química de extratos de *Hibiscus tiliaceus*: estudo comparativo de métodos de extração**. 218 f. Tese (Doutorado em Química) - Instituto de Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rio Grande do Sul, 2005.

MERSKEY, H.; BOGDUK, N. **Classification of chronic pain, IASP task force on taxonomy**. Seattle (WA): IASP press, 1994.

MICHEL, T. et al. Phosphorilation and subcellular translocation of endothelial nitric oxide synthase. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 90, p. 6252-6, 1993.

MIGUEL, M. D.; MOREIRA, T. F.; Oliveira, D.M.S.de; MIGUEL, O. G.; ZANIN, S. M. W.; DIAS, J. F. G.; KALEGARI, M. Atividade antioxidante, toxicidade e obtenção de extratos, frações e substâncias isoladas da espécie vegetal *Buddleja stachyoides* Cham. & Schltld. (Scrophulariaceae). BR1020120307200, 03 dez. 2012.

MÖLLER, B.; VILLIGER, P. M. Inhibition of IL-1, IL-6, and TNF- α in immune-mediated inflammatory diseases. **Springer Semin Immun**, v. 27, p. 391, 2006.

MONATH, T. P.; VASCONCELOS, P. F. Yellow fever. **J Clin Virol**, v. 64, p. 160-173, 2015.

MONCADA, S. et al. Nitric oxide: physiology, pathophysiology and pharmacology. **Pharmacol Reviews**, v. 43, n. 2, p. 109-42, 1991.

MONTANHER, A. B.; ZUCOLOTTO, S. M.; SCHENKEL, E. P.; FRÖDE, T. S. Evidence of anti-inflammatory effects of *Passiflora edulis* in an inflammation model. **J Ethnopharmacol**, v. 109, p. 281–288, 2007.

MONTRUCCHIO, D. P. **Avaliação da atividade antinociceptiva do extrato e do alcalóide S-(+)-dicentrina extraído de frutos de *Ocotea puberula* (Lauraceae)**. 162 f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) –Setor de Ciências Biológicas, Área: Farmacologia / Subárea: Neuropsicofarmacologia. Universidade Federal de Santa Maria, Rio Grande do Sul, 2012.

MUTEBLN, L.; IALENTI, A.; ANGELA IANARO, A.; DI ROSA, M. Endogenous nitric oxide increases prostaglandin biosynthesis in carrageenin rat paw oedema. **Eur J Pharmacol**, v. 286, p.219-222, 1995.

MUTHUSWAMY, S. K.; GILMAN, M.; BRUGGE, J. S. Controlled dimerization of ErbB receptors provides evidence for differential signaling by homo- and heterodimers. **Mol Cell Biol**, v. 19, p. 6845-6857, 1999.

NATHAN, C. Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. **FASEB J**, v. 6, p. 3051-64, 1992.

ODONTUYA, G.; HOULT, J. R. S.; HOUGHTON, P. J. Structure–activity relation ship for anti-inflammatory effect of luteolin and its derived glycosides. **Phytother Res**, v. 19, p. 782-786, 2005.

OLIVEIRA, D. M. S. de. **Estudo fitoquímico e atividades biológicas da espécie vegetal *Buddleja stachyoides* Cham. & Schltl. (Scrophulariaceae)**. 100 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Setor de Ciências da Saúde. Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2012.

OLIVEIRA, D. M. S. de; MIGUEL, M. D.; KALEGARI, M.; MIGUEL, O. G.; MOREIRA, T. F. Isolamento do verbacosídeo e validação de método analítico para padronização do extrato bruto das partes aéreas de *Buddleja stachyoides* Cham. & Schltl. (Scrophulariaceae). **Quim Nova**, v. 37, n. 2, 344-348, 2014.

OLIVEIRA, M. M. F. Alteração das plaquetas. Disponível em: <http://www.conhecersaude.com/adultos/3371-alteracoes_das_plaquetas.html>. 14/02/2011. Acesso em: 23 set. 2016.

OLIVEIRA, A. C. D.; ROPKE, C. Os dez anos da Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos (PNPMF) e os principais entraves da cadeia produtiva de extratos vegetais e medicamentos fitoterápicos no Brasil. 2016. **Rev Fitos**, Rio de Janeiro, v.10, n.2, p.185-198, 2016. ISSN: 2446-4775. Disponível em: <<http://revistafitos.far.fiocruz.br/index.php/revista-fitos/article/view/333>>. Acesso em: 18 jun. 2017.

OLIVEIRA, L. G. A.; DUQUE, F. F.; BELINELO, V. J.; SCHMILDT, E. R. E; ALMEIDA, M. S. Atividade alelopática de extrato acetato-etílico de folhas de *Solanum cernuum* Vell. **Rev Ciênc Agron**, v. 44, n. 3, p. 538-543, 2013.

ONO, M.; ODA, E.; TANAKA, T.; IIDA, Y.; YAMASAKI, T.; MASUOKA, C.; IKEDA, T.; NOHARA, T. DPPH radical-scavenging effect on some constituents from the aerial parts of *Lippia triphylla*. **J Nat Med**, v. 62, p. 101-106, 2008.

OSHIRO, M. C.; MIGUEL, M. D.; DIAS, J. F. G.; GOMES, E. C.; MIGUEL, O. G. A evolução do registro e prescrição de fitoterápicos no Brasil sob perspectiva legal e sanitária. **Vigil sanit debate**, v. 4, n. 4, p. 116-122, 2016.

OWEN, P.W.; HAUBNER, R.; HULL, W.E.; ERBEN, G.; SPIEGELHALDER, B.; BARTSCH, H.; HABER, B. Isolation and structure elucidation of the major individual polyphenols in carob fibre. **Food Chem Toxicol**, v. 41, p.1727-1738, 2003.

PAGANO, R. L.; DIAS, M. A.; DALE, C. S.; GIORGI, R. Neutrophils and the calcium-binding protein MRP-14 mediate carrageenan-induced antinociception in mice. **Mediators Inflamm**, v. 11, p. 203-10, 2002.

PAN, J.; YUAN, C.; LIN, C.; JIA, Z.; ZHENG, R. Pharmacological activities and mechanisms of natural phenylpropanoid glycosides. **Pharmazie**, v. 58, p. 767-775, 2003.

PAN, N.; HORI. H. **Redox Rep**, v. 2, p. 149, 1996.

- PAN, C-H.; TSAI, C-H.; LIN, W-H.; CHEN, G-Y.; WU, C-H. Ethanollic Extract of *Vitis thunbergii* Exhibits Lipid Lowering Properties via Modulation of the AMPK-ACC Pathway in Hypercholesterolemic Rabbits. **Evid Based Complement Alternat Med**, p. 2012, 2012.
- PAPOUTSI, Z.; KASSI, E.; MITAKOU, S.; ALIGIANNIS, N.; TSIAPARA, A.; CHROUSOS, G. P.; MOUTSATSOU, P. Acteoside and martynoside exhibit estrogenic/antiestrogenic properties. **J. Steroid Biochem. Mol. Biol.** **2006**, v. 98, p. 63-71, 2006.
- PETROIANU, A. Cirurgia do baço. In: Petroianu A, editor. **Clínica Cirúrgica**. Rio de Janeiro: Revinter, p.429-42, 2001.
- PIAO, M. S.; KIM, M.; LEE, D. G.; PARK, Y.; HAHM, K.; MOON, Y.; WOO, E. Antioxidative Constituents from *Buddleia officinalis*. **Arch Pharm Res**, v. 26, n. 6, p. 453-457, 2003.
- POPLAWSKI, J.; LOZOWICKA, B.; DUBIS, A. T.; LACHOWSKA, B.; WINIECKI, Z.; NAWROT, J. **Pest Manage Sci**, v. 56, p. 560, 2000.
- POTRICH, F.B.; BAGGIO, C.H.; FREITAS, C.S.; MAYER, B.; SANTOS, A.C.; TWARDOWSCHY, A.; GUEDES, A.; MARQUES, M.C.A. Ação de extratos de plantas medicinais sobre a motilidade do trato gastrointestinal. **Rev Bras PI Med**, v. 16, n. 3, p.750-754, 2014.
- QUANBO, X.; SHIGETOSHI, K.; TADATO, T.; TSUNEO, N. **Biol Pharmacol Bull**, v.19, p.1580, 1996.
- RADOMSKI, M.W. et al. An L-arginine: nitric oxide pathway present in human platelets regulates aggregation. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 87, p. 5193-7, 1990.
- RANG, H.P.; BEVAN, S.; DRAY, A. **Nociceptive peripheral neurons: cellular properties**. In: WALL, P.D.; MELZACK, R. Text book of Pain, 3 ed. Edinburgh: Churchill Livingstone, 1994. p. 57-78.
- RAUF, A.; UDDIN, G.; SIDDIQUI, B.S.; KHAN, A.; KHAN, H.; ARFAN, M.; MUHAMMAD, N.; WADOOD, A. In-vivo antinociceptive, anti-inflammatory and antipyretic activity of pistagremic acid isolated from *Pistacia integerrima*. **Phytomedicine**, v. 21, p. 1509-1515, 2014.
- RAWAT, M.S.M.; PANT, G.; PRASAD, D.; JOSHI, R.K. & PANDE, C.B. Plant growth inhibitors (Proanthocyanidins) from *Prunus armeniaca*. **Biochem Syst Ecol**, v. 26, p. 13-23, 1998.
- REPETTO, M.G.; LLESUY, S.F. Antioxidant properties of natural compounds used in popular medicine for gastric ulcers. **Braz J Med Biol Res**, v. 35, p. 523–534, 2002.
- RIBANI, M.; BOTTOLI, C. B. G.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F.; MELO, L. F. C. **Quim Nova**, v. 27, p. 771, 2004.

RICE, E. L. Allelopathy. Academic press, London, 1984.

RICE, E. L. Allelopathy: an overview. In: WALLER, G.R. Allelochemicals: role in agriculture and forestry. WASHINGTON, D.C. **J Am Chem Soc**, p.7-22, 1987.

RIZVI, S. J. H. et al. **A discipline called allelopathy**. In: RIZVI, S. J. H.; RIZVI, V. (Eds.). Allelopathy: basic and applied aspects. London: Chapman & Hall, p. 1-10, 1992.

RODRIGUES, A. L. S.; DA SILVA, G.; MATEUSSI, A. S.; FERNANDES, E. F.; MIGUEL, O. G.; YUNES, R. A.; CALIXTO, J. B.; SANTOS, A. R. S. Involvement of monoaminergic system in the 72 antidepressant-like effect of hydroalcoholic extract of *Siphocampylus verticillatus*. **Life Sci**, v. 70, p. 1347-1458, 2002.

SANTANU SAHA, E.V.S.; SU BRAHMANY, A.M. Evaluation of anti-inflammatory activity of ethanolic extract of seeds of *Holarrhena pubescens* (BUCH.-HAM.) WALL. **Int J Pharm Pharm Sci**. v. 5, n. 3, 2013.

SANTOS, I. P.C.; CRUZ, R. C. D.; CARVALHO, K. S.; SILVA, S. L. C., GUALBERTO, S. A. **Bioatividade de extratos aquosos da parte aérea de poincianella bracteosa sobre larvas de Aedes aegypti**. Enciclopédia Biosfera, v.11 n.21. Goiânia: Centro Científico Conhecer, 2015.

SANTOS, S. C. dos. **Caracterização e ranqueamento de cultivares DE Lactuca sativa L. (Asteraceae) e Allium cepa L. (Alliaceae) na padronização de bioensaios para fitotoxicidade**. 67 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Ambientais) - Tecnologia Ambiental, Universidade Federal de Alfenas, Alfenas, 2016.

SCHAPOVAL, E. E.; VARGAS, M. R.; CHAVES, C. G.; BRIDI, R.; ZUANAZZI, J. A.; HENRIQUES, A. T. **J Ethnopharmacol**, v. 60, p. 53, 1998.

SEIGLER, D.S. Chemistry and mechanisms of allelopathy interactions. **Agron J**, v. 88, p. 876-885, 1996.

SERHAN, C. N. Treating inflammation and infection in the 21st century: new hints from decoding resolution mediators and mechanisms. **FASEB J**, v. 31, p. 1273-1288, 2017.

SHI, Y. M.; WANG, W.; KANG, J. H.; SHI, Y. P.; JIA, Z. J.; WANG, Y.; SU, B. N.; YAO, S. D.; LIN, N. Y.; ZHENG, R. L. **Sci in China (C)**, v. 42, p. 420, 1999.

SIMMONDS, P. et al. Family Flaviviridae. In: KING, A.M.Q. et al. (Eds.), Virus Taxonomy: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Elsevier Academic Press, San Diego, CA, p. 1003-1020, 2012.

SHUTTLEWORTH, C.W.R.; KEEF, K.D. Roles of peptides in enteric neuromuscular transmission. **Regul Pept**, v. 56, n. 2-3, p.101-120, 1995.

- SILVA, D. P. B. da. **Atividade anti-inflamatória e antinociceptiva de 4-((1- fenil-1h-pirazol-4-il) metil) piperazina-1-carboxilato: um novo derivado piperazínico.** 91 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) - Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Goiás, Goiania, 2015.
- SILVA, E. L.; ARRUDA, E. J.; ANDRADE, C. F. S.; FERNANDES, M. F.; TEIXEIRA T. Z.; SCUDELER C. G. S.; CABRINI, I. Avaliação da Susceptibilidade ao Temephos de Populações de *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) dos Municípios de Maracaju e Naviraí, MS, Brasil. **Bio Assay**, v.10, p.1, 2015.
- SKRZYPEK, Z.; WYSOKINSKA, H.; SWIATEK, L.; WRÓBLEWSKI, A. E. Phenylpropanoid glycosides from *Penstemon serrulatus*. **J Nat Prod**, v. 62, p. 127-129, 1999.
- SONG, B. H.; YUN, S. I.; WOOLLEY, M.; LEE, Y. M. Zika virus: History, epidemiology, transmission, and clinical presentation. **J Neuroimmunol**, v. 308, p. 50-64, 2017.
- SOUZA, V.C. 2010. Scrophulariaceae in Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/2010/FB014541>>. Acesso em: 23 mai. 2011.
- SOUZA FILHO, A.P.S. et al. Potencial alelopático de forrageiras tropicais: efeitos sobre invasoras de pastagens. planta daninha. **VIÇOSA**, v. 15, n. 1, p. 53-60, 1997.
- SPERANZA, L.; FRANCESCHELLI, S.; PESCE, M.; REALE, M.; MENGHINI, L.; VINCIGUERRA, I.; GRILLI, A. Antiinflammatory effects in THP-1 cells treated with verbascoside. **Phytotherapy Research**, v. 24, p. 1398-1404, 2010.
- STEEDS, C. E. The anatomy and physiology of pain. **Surgery**, v. 31, n. 2, p. 49-53, 2013.
- SUBBARAO, G. V. et al. Evidence for biological nitrification inhibition in *Brachiaria pastures*. **Proc Natl Acad Sci**, v. 106, p. 17302-17307, 2009.
- SUCHITRA, A. D.; DKHAR, S.A.; SHEWADE, D.G.; SHASHINDRAN, C.H. Relative efficacy of some prokinetic drugs in morphine-induced gastrointestinal transit delay in mice. **World J Gastroenterol**, v. 9, n. 4, p. 779-783, 2003.
- SYAM, A. F.; SADIKIN, M.; WANANDI, S.I.; RANI, A. A. Molecular mechanism on healing process of peptic ulcer. **Acta Med Indones**, v. 41, p. 95-98, 2009.
- TERANO, A.; HIRAISHI, H.; OTA, S.; SHIGA, J.; SUGIMOTO, T. Role of superoxide and hydroxyl radicals in rat gastric mucosal injury induced by ethanol. **Gastroenterol Jpn**, v. 24, p. 488-493, 1989.
- TOMONORI, N.; EMI, O.; ATSUSHI, T.; MIKIO, Y.; MOTOYOSHI, S.; SANSEI, N.; TAKESHI, D.; AKIRA, M.; MASAO, M.; HIROAKI, N. **Chem Pharm Bull**, v. 45, p. 499, 1997.

TRACEY, W. R.; NAKANE, M.; POLLOCK, J.S.; FÖRSTERMANN, U. Nitric oxide synthases in neuronal cells, macrophages and endothelium are NADPH diaphorases, but represent only a fraction of total cellular NADPH diaphorase activity. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 195, p. 1035–1040, 1993.

TUKEY JÚNIOR, H. B. Implications of allelopathy in agricultural plant science. **Bot Rev**, v. 35, p. 1-16, 1969.

VACCARINI, C.E.; PALACIOS, S.M.; MERAGELMAN, K.M. & SOSA, V.E. Phytogrowth-inhibitory activities of a clerodane from *Viguiera tucumanensis*. **Phytochemistry**, v. 50, p. 227-230, 1999.

VENTURA, A. **A função do baço**. Disponível em: <<http://www.vidaesaude.org/biologia-vida/a-funcao-do-baco.html>> Acesso em: 23 set. 2016.

VERTUANI, S.; BEGHELLI, E.; SCALAMBRA, E.; MALISARDI, G. COPETTI, S.; DAL TOSO, R.; BALDISSEROTTO, A.; MANFREDINI, S Activity and Stability Studies of Verbascosídeo, a Novel Antioxidant, in Dermo-Cosmetic and Pharmaceutical Topical Formulations. **Molecules**, v. 16, p. 7068-7080, 2011.

VIANA, A. F.; FERNANDES, H. B.; SILVA, F. V.; OLIVEIRA, I. S.; FREITAS, F. F.; MACHADO, F. D. ET AL. GASTROPROTECTIVE ACTIVITY OF CENOSTIGMA macrophyllum Tul. var. acuminata Teles Freire leaves on experimental ulcer models. **J Ethnopharmacol**, v.150, p. 316-323, 2013.

VICTORA, C. G.; SCHULER-FACCINI, L.; MATIJASEVICH, A.; RIBEIRO, E.; PESSOA, A.; BARROS, F.C. Microcephaly in Brazil: how to interpret reported numbers? **Lancet**, v. 387, p. 621-624, 2016.

VINEGAR R, SCHREIBER W, HUGO R. Biphasic development of carrageenan oedema in rats. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 166, n. 1, p. 96-103, 1969.

WAHID S. F.; SANUSI, S.; ZAWAWI, M.M. A comparison of the pattern of liver infection in dengue hemorrhagic fever with classic dengue fever. **Southeast Asian J Trop Med Public Health**, v. 31, p. 259-63, 2000.

WALLACE JL, MA L. Inflammatory mediators in gastrointestinal defense injury. **Exp Biol Med**, v. 226, p. 1003-1015, 2001.

WALLACE, J.L. Nitric oxide, aspirin-triggered lipoxins and NO-aspirin in gastric protection. **Inflamm Allergy Drug Targets**, v. 5, p. 133-137, 2006.

WALLACE, J. L. Prostaglandins, NSAIDs, and Gastric Mucosal Protection: Why Doesn't the Stomach Digest It self? **Physiol Rev**, v. 88, p. 1547-1565, 2008.

WANMACHER, L.; FERREIRA, M. B. C. **Farmacologia clínica para dentistas**. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 1995. p.107-11.

WANG, P. F.; ZHENG, R. L.; GAO, J. J.; JIA, Z. J.; WANG, W. F.; YAO, S. D.; ZHANG, J. S.; LIN, N. Y. **Sci China (C)**, v. 39, p. 154, 1996.

WANG, P. F.; KANG, J. H.; ZHENG, R. L.; YANG, Z. H.; LU, J. F.; GAO, J. J.; JIA, Z. Scavenging effects of phenylpropanoid glycosides from pedicularis on superoxide anion and hydroxyl radical by the spin trapping method. **J Biochem Pharmacol**, v. 51, p. 687, 1996.

WHITE, C. S. Monoterpenes: Their effects on ecosystem nutrient cycling. **J Chem Ecol**, v. 20, n. 6, p. 1381-1406, 1994.

WHITE M. Mediators of inflammation and the inflammatory process. **J Allergy Clin Immunol**, v. 103, n. 3, p. S378-S381, 1999.

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

WHO. World Health Organization. **Dengue fact sheet**: Disponível em: <http://www.searo.who.int/entity/vector_borne_tropical_diseases/data/data_factsheet/en/> Acesso em: 15 mai. 2017.

WHO. World Health Organization. **Guidelines on safety monitoring of herbal medicines in pharmacovigilance systems**. Geneva: World Health Organization, 2004. p.1.

WOLIN, M.S. Interactions of oxidants with vascular signaling systems. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v. 20, p.1430-42, 2000.

YALÇIN, F. N.; ERSÖZ, T.; AKBAY, P.; ÇALIS, I. Iridoid and Phenylpropanoid Glycosides from *Phlomis samia*, *P. monocephala* and *P. carica*. **Turk J Chem**, v. 27, p. 295-305, 2003.

YEN, G. C.; LAI, H. H.; CHOU, H. Y. Nitric oxide scavenging and antioxidant effects of *Urariacrinita* root. **Food Chem**, v. 74, p. 471-478, 2001.

YOSHIYUKI, K.; HIROMICHI, O.; SANSEI, N.; SHIGERU, A. **Planta Med**, v. 53, p. 148, 1987.

ZAMMARCHI, L. et al. Zika virus infection in a traveller returning to Europe from Brazil. **Euro Surveill**, v. 20, p. 21153, 2015.

ZANLUCA, C.; MELO, V. C.; MOSIMANN, A. L.; SANTOS, G. I.; SANTOS, C. N.; LUZ, K. First report of autochthonous transmission of Zika virus in Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* v. 110, p. 569-572, 2015.

ZIMMERMAN, M. Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. **Pain**, v. 16, p. 109-110, 1983.

ANEXO I - AUTORIZAÇÃO DE ACESSO AO PATRIMÔNIO GENÉTICO



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

ANEXO II - CERTIFICADO DO COMITÊ DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS



Nº 794

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: 23075.011375/2014-31

APROVADO: 22/05/2014 – R.O. 04/2014

TÍTULO: Investigação farmacológica de extratos vegetais utilizados popularmente – ênfase em atividades antinociceptiva e anti-inflamatória

AUTORES: Deise Prehs Montrucchio, Fernanda Maria Martins Ocampos, Daniella Maria Soares de Oliveira, Ana Flávia Schwabe Duarte, Mariana Saragioto Krause, Vinicius Bednarczuck de Oliveira, Luciane Dalarmi

DEPARTAMENTO: Farmácia (Setor de Ciências da Saúde)


 Prof. Dr. Aleksander Roberto Zampronio
 Coordenador da CEUA