

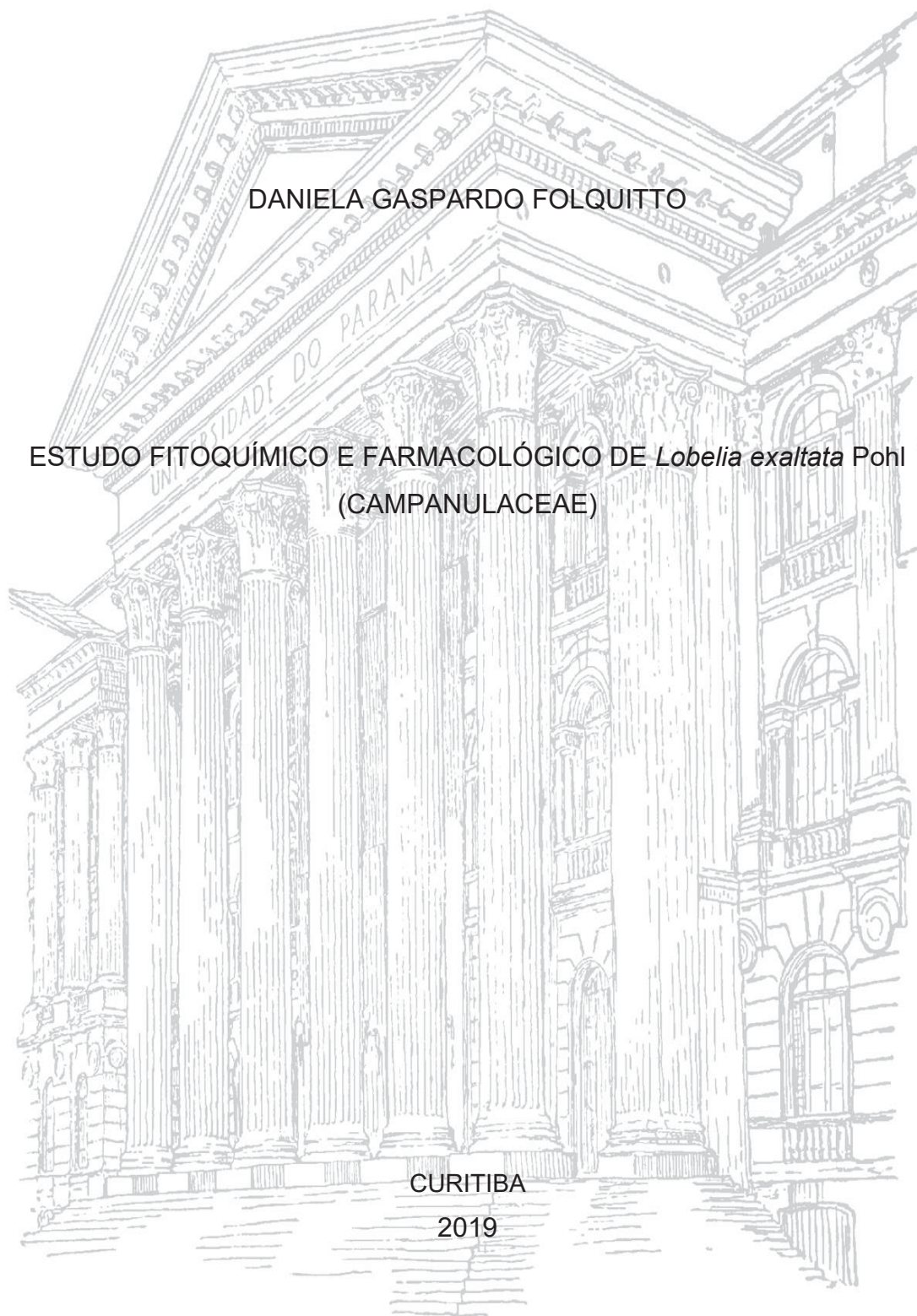
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

DANIELA GASPARDO FOLQUITTO

ESTUDO FITOQUÍMICO E FARMACOLÓGICO DE *Lobelia exaltata* Pohl
(CAMPANULACEAE)

CURITIBA

2019



ESTUDO FITOQUÍMICO E FARMACOLÓGICO DE *Lobelia exaltata* Pohl
(CAMPANULACEAE)

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

Orientador: Obdulio Gomes Miguel

Co-Orientador: Paulo Vitor Farago

CURITIBA

2019

Folquitto, Daniela Gaspardo

Estudo fitoquímico e farmacológico de *Lobeliaexaltata*Pohl (CAMPANULACEAE)
[recurso eletrônico] / Daniela Gaspardo Folquitto – Curitiba, 2019.

Tese (doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas.
Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, 2019.

Orientador: Professor Dr. Obdulio Gomes Miguel

Coorientador: Professor Dr. Paulo Vítor Farago

1. *Lobeliaexaltata*. 2. Neuroproteção. 3. Atividade anticonvulsivante. 4.
Citotoxicidade. 5. Atividade inseticida. I. Miguel, Obdulio Gomes. II. Farago, Paulo
Vítor. III. Universidade Federal do Paraná. IV. Título.

CDD 615.321



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SETOR SETOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO CIÊNCIAS
FARMACÉUTICAS - 40001016042P8

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIAS FARMACÉUTICAS da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da tese de Doutorado de **DANIELA GASPARDO FOLQUITO** intitulada: **Estudo fitoquímico e farmacológico de Lobelia exaltata Pohl Campanulaceae**, após terem inquirido a aluna e realizado a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua aprovação no rito de defesa. A outorga do título de doutor está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

CURITIBA, 03 de Maio de 2019.



OBDULIO GOMES MIGUEL
Presidente da Banca Examinadora



VANESSA LIMA GONÇALVES TORRES
Avaliador Externo (UEPG)



RANIERI GAMPOS
Avaliador Externo (UFAM)



CRISTIANE DA SILVA PAULA DE OLIVEIRA
Avaliador Externo (UFPR)



JULIANE NADAL DIAS SWIECH
Avaliador Externo (UFPR)

Aos meus pais Milton e Clara
minha eterna fonte de amor,
força e inspiração.

Ao meu marido, Ivan, sempre
Companheiro e paciente
me ajudando nos momentos difíceis.

Às minhas filhas
Gabi, por sua parceria,
amizade e valiosa ajuda
e
Helo pela paciência
e maturidade de compreender
as minhas ausências
durante sua infância

AGRADECIMENTOS

À Deus por me dar força e me inspirar principalmente nos momentos difíceis.

Aos meus pais que sempre me incentivaram e fizeram muito esforço e sacrifício para me dar um estudo de qualidade.

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

À Universidade Estadual de Ponta Grossa e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, pela parceria na realização dos experimentos.

Ao meu querido mestre e orientador Prof Dr Obdulio Gomes Miguel, pela confiança, por ensinar sempre com muita sabedoria humildade.

Ao meu co-orientador Prof Dr Paulo Vitor Farago que sempre abriu as portas dos laboratórios da UEPG para que este trabalho fosse realizado e por suas valiosas colaborações científicas.

À Prof Dra Marilis Dallarmi Miguel, pela competência e valiosa colaboração sobre pesquisa.

À Prof Dra Rosi Zanoni da Silva e Profa. Dra. Jane Manfron Budel pelo incentivo, apoio, amizade e colaboração no laboratório de farmacognosia da UEPG.

Aos Profs., Carla Cristine Kanufre, Adalci Leite Torres, Vanessa Gonçalves Lima Torres, Edmar Myioshi, pela participação nas análises e determinações dos resultados apresentados nesse trabalho.

Aos todos os outros professores da UFPR e UEPG que ajudaram de alguma forma para a realização deste estudo.

As amigas Juliane Nadal Dias Swiech e Camila Bugnoto Pereira, pela parceria em muitos momentos do desenvolvimento deste trabalho.

Às técnicas dos laboratórios de farmacognosia e farmacotécnica da Universidade Estadual de Ponta Grossa, Luciane Mendes Monteiro e Elizabete Munhoz, pela grande ajuda e companheirismo.

Aos colegas de doutorado Francis J.Z. Merino, Amanda M. Urban, Vinícius B. Oliveira, Samanta Golin por terem colaborado na realização de experimentos e análises.

Se enxerguei mais longe, foi porque me apoiei
sobre os ombros de gigantes.

Isaac Newton

RESUMO

Lobelia exaltata Pohl é uma planta nativa do Brasil, não ameaçada de extinção, encontrada nos estados do Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul. É utilizada popularmente para problemas cardíacos. Até o presente momento, não há relato de estudos realizados com esta espécie. O objetivo desse trabalho foi realizar o estudo fitoquímico, e avaliar as atividades neuroprotetora, ansiolítica, anticonvulsivante, citotóxica e inseticida do extrato cetônico e do extrato etanólico *L. exaltata*. Os extratos cetônico e etanólico das partes aéreas e sementes foram obtidos por extração em aparelho de Soxhlet modificado e particionados em solventes com polaridade crescente, obtendo-se as frações hexano, clorofórmio, acetato de etila e remanescente. A fração clorofórmio do extrato cetônico das partes aéreas foi purificada por técnicas cromatográficas e analisadas por RMN, IV e CG-MS, que possibilitou a identificação de 40 compostos, entre eles alcaloides, ácidos graxos e triterpenos. O extrato cetônico bruto e fração clorofórmio apresentaram atividade neuroprotetora de acordo com o Modelo da Doença de Parkinson nos testes de Preferência à Sacarose, Natação forçada e Reconhecimento Social. A partir do extrato cetônico bruto foi isolado o composto *mio*-inositol e ambos apresentaram atividade ansiolítica e anticonvulsivante utilizando o modelo zebrafish. A atividade citotóxica frente às células Jurkat e Calu-3 foi maior na fração alcaloidal do que na mistura de triterpenos numa concentração de 100 µg.mL⁻¹ em cada uma. Nas células HeLa e HRT não houve nenhum efeito citotóxico. A fração acetato de etila das partes aéreas de *L. exaltata* apresentou uma mortalidade de 80% para *Plutella xylostella* em 48 horas de tratamento, nenhuma outra fração das partes aéreas e sementes apresentou atividade inseticida. Foi possível concluir que *L. exaltata*, uma espécie nunca antes estudada, apresentou uma potencial atividade neuroprotetora, ansiolítica e anticonvulsivante em seus extratos e frações. Entretanto sugere-se que novos estudos sejam realizados a fim de verificar quais os compostos seriam responsáveis por tais atividades.

Palavras-chave: *Lobelia exaltata*. Neuroproteção. Atividade anticonvulsivante. Citotoxicidade. Atividade inseticida.

ABSTRACT

Lobelia exalta Pohl is a plant native to Brazil, not threatened with extinction, found in the states of Paraná, Santa Catarina and Rio Grande do Sul. It is commonly used for heart problems. Until now, there is no report of studies with this species. The objective of this work was to perform the phytochemical study, and to evaluate the neuroprotective, anxiolytic, anticonvulsant, cytotoxic and insecticidal activities of *L. exaltata*. The ketone and ethanolic extracts of the aerial parts and seeds were obtained by extraction in modified Soxhlet apparatus and partitioned in solvents with increasing polarity, obtaining the hexane, chloroform, ethyl acetate and remainder fractions. The chloroform fraction of the aerial parts ketone extract was purified by chromatographic techniques and analyzed by NMR, IR and GC-MS, which allowed the identification of 40 compounds, among them alkaloids, fatty acids, and triterpenes. The crude ketonic extract and chloroform fraction presented neuroprotective activity according to the Parkinson's Disease Model in the Tests of Preference to Sucrose, Forced Swimming and Social Recognition. From crude ketonic extract was isolated *myo*-inositol compound and showed both anticonvulsant and anxiolytic activity using the zebrafish model. The cytotoxic activity against Jurkat and Calu-3 cells was higher in the alkaloidal fraction than in the triterpene mixture at a concentration of 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ in each. In the HeLa and HRT cells there was no cytotoxic effect. The ethyl acetate fraction of the aerial parts of *L. exaltata* presented 80% mortality for *Plutella xylostella* in 48 hours of treatment, no other fraction of the aerial parts and seeds showed insecticidal activity. It was possible to conclude that *L. exaltata*, a species never before studied, presented a potential neuroprotective, anxiolytic and anticonvulsive activity in its extracts and fractions. However, it is suggested that further studies be conducted to ascertain which compounds would be responsible for such activities.

Key words: *Lobelia exaltata*. Neuroprotection. Anticonvulsive activity. Cytotoxicity. Insecticide activity.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1-	ESTRUTURA GERAL DOS ALCALOIDES PIPERIDÍNICOS.....	29
FIGURA 2-	ALCALOIDES ENCONTRADOS NO GÊNERO <i>Lobelia</i>	31
FIGURA 3-	TERPENOIDES ENCONTRADOS NO GÊNERO <i>Lobelia</i>	36
FIGURA 4-	POLIACETILENOS DE <i>Lobelia</i>	37
FIGURA 5-	NEOLIGNANA ENCONTRADA NO GÊNERO <i>Lobelia</i>	37
FIGURA 6-	FLAVONOIDES ENCONTRADOS NO GÊNERO <i>Lobelia</i>	38
FIGURA 7-	CUMARINAS ENCONTRADOS NO GÊNERO <i>Lobelia</i>	40
FIGURA 8-	OUTROS COMPOSTOS ENCONTRADOS NO GÊNERO <i>Lobelia</i>	41
FIGURA 9-	<i>Lobelia exaltata</i> Pohl EM SEU HABITAT.....	49
FIGURA 10-	ASPECTOS GERAIS DAS FOLHAS JOVENS E INFLORESCÊNCIA DE <i>Lobelia exaltata</i>	50
FIGURA 11-	ESTRUTURA QUÍMICA DOS COMPOSTOS ISOLADOS DE <i>Lobelia exaltata</i> Pohl.....	51
FIGURA 12-	FLUXOGRAMA DA PESQUISA CIENTÍFICA REALIZADA COM <i>L.</i> <i>exaltata</i>	59
FIGURA 13-	OBTENÇÃO DOS EXTRATOS E FRAÇÕES CETÔNICOS E ETANÓLICOS DAS PARTES AÉREAS E SEMENTES DE <i>L.</i> <i>Exaltata</i>	62
FIGURA 14-	FLUXOGRAMA DO PROCEDIMENTO DE PURIFICAÇÃO DO EXTRATO ETANÓLICO BRUTO.....	63
FIGURA 15-	FLUXOGRAMA DO PROCEDIMENTO DE PURIFICAÇÃO DO EXTRATO CETÔNICO DE <i>L. exaltata</i>	67
FIGURA 16-	ESQUEMA ILUSTRATIVO DA OBTENÇÃO E FRACIONAMENTO DO EXTRATO ETANÓLICO BRUTO.....	69
FIGURA 17-	FLUXOGRAMA DO PROCEDIMENTO DE PURIFICAÇÃO DO EXTRATO CETÔNICO (EXTRAÇÃO ÁCIDO-BÁSICA).....	72
FIGURA 18-	MODELO DE AQUÁRIO PARA TESTE CLARO/ESCURO.....	74
FIGURA 19-	PROCESSO DE CRIAÇÃO DE <i>Plutella xylostella</i>	85
FIGURA 20-	REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DO ESPECTRO DE RMN DE ¹ H (400 MHz MeOH d ₄) PARA FR 10 MA.....	93
FIGURA 21-	REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DO ESPECTRO DE RMN DE ¹³ C	

	(100 MHz MeOH D ₄) PARA FR 10 MA.....	93
FIGURA 22-	REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DO CROMATOGRAMA DE FR 10 MA DOS COMPOSTOS 17 e 36.....	94
FIGURA 23-	ESPECTRO DE MASSA REFERENTE AO PICO 36 DO CROMATOGRAMA DE FR 10 MA – OLEAMIDA.....	95
FIGURA 24-	ESPECTRO DE MASSA REFERENTE AO PICO 17 DO CROMATOGRAMA DA FR 10 MA – ÁCIDO HEXADECANOICO METIL ESTER.....	97
FIGURA 25-	ESPECTRO DE RMN DE ¹ H DE FR 128 (400 MHZ; CDCl ₃).....	99
FIGURA 26-	ESPECTRO DE RMN DE ¹³ C DE FR 128 (100 MHZ; CDCl ₃).....	100
FIGURA 27-	ESTRUTURA QUÍMICA DO ÁCIDO URSÓLICO.....	100
FIGURA 28-	ESPECTRO DE MASSA DO COMPOSTO 5- METIL 2- FURANCARBOXALDEÍDO DA FR-11Ac.....	102
FIGURA 29-	ESPECTRO DE MASSA DO COMPOSTO ACETOFENONA DA FR 11Ac.....	102
FIGURA 30-	ESPECTRO DE MASSA DO COMPOSTO ÁCIDO CETO BUTANOICO DA FR 11Ac.....	102
FIGURA 31-	ESPECTRO DE MASSA DO COMPOSTO N-DECANAL DA FR 11Ac.....	103
FIGURA 32-	ESPECTROS DE MASSA DO COMPOSTO 5- HIDROXIMETILFURFURAL FR 11Ac.....	103
FIGURA 33-	ESPECTROS DE MASSA DO COMPOSTO 3-HEPTANOL DA FR 11Ac.....	103
FIGURA 34-	ESPECTROS DE MASSA DO COMPOSTO 3-AMINO-2,4- DIMETIL PENTANO DA FR 11Ac.....	103
FIGURA 35-	ESPECTROS DE MASSA DO COMPOSTO 1,6-ANIDRO, B-D- GLICOPIRANOSE DA FR 11Ac.....	104
FIGURA 36-	ESPECTROS DE MASSA DO COMPOSTO 1,3-DIOXOLANE-4- METANOL DA FR-11Ac.....	104
FIGURA 37-	ESPECTROS DE MASSA DO COMPOSTO ÁCIDO HEXADECANOICO DA FR-11Ac.....	104
FIGURA 38-	ESPECTRO DE MASSA DO COMPOSTO 4-HIDROXI-4-METIL-	

.....2-PENTANONA DA FR 11Am.....	105
FIGURA 39- ESPECTRO DE MASSA DO COMPOSTO METOXI-FENIL	
.....OXIME DA FR 11Am.....	105
FIGURA 40- ESPECTRO DE MASSA DO COMPOSTO 2,6,10,15	
.....TETRAMETIL- HEPTADECANO DA 11Am.....	105
FIGURA 41- REPRESENTAÇÃO ORTEP DO MYO-INOSITOL.....	107
FIGURA 42- ESPECTRO DE FTIR DO MYO-INOSITOL DE <i>L. exaltata</i> Phol	
CAMPANULACEAE.....	107
FIGURA 43- ESPECTRO DE EDS DO MYO-INOSITOL DE <i>L. exaltata</i>	108
FIGURA 44- ELETROMIOGRAFIA FEG-SEM DE DO MYO-INOSITOL DE <i>L.</i>	
<i>exaltata</i> PHOL CAMPANULACEAE.....	109
FIGURA 45- ESPECTRO DE ¹ H-RMN DO MYO-INOSITOL OBTIDO DA	
ANÁLISE DE CRISTAIS ISOLOADOS DE PARTES AÉREAS	
DE <i>L. exaltata</i>	110
FIGURA 46- ESPECTRO DE ¹³ C-RMN DO MYO-INOSITOL OBTIDO DA	
ANÁLISE DE CRISTAIS ISOLOADOS DE PARTES AÉREAS DE	
<i>L. exaltata</i>	110
FIGURA 47- CROMATOGRAMA DE FCL 1 DE <i>L. exaltata</i>	111
FIGURA 48- ESPECTRO DE MASSA DA ACETOFENONA REFERENTE AO	
.....PICO 2 DO CROMATOGRAMA DE FCL 1 DE <i>L. exaltata</i>	112
FIGURA 49- REPRESENTAÇÃO DAS FRAGMENTAÇÕES EM	
ACETOFENONA.....	112
FIGURA 50- ESPECTRO DE MASSA DE [N-METIL-2 (2'-HIDROXIBUTIL)-6-(2''-	
HIDROXIBUTIL)- Δ^3 -PIPERIDINA], REFERENTE AO PICO 4 DO	
CROMATOGRAMA DE FCL-1 DE <i>L. exaltata</i>	114
FIGURA 51- REPRESENTAÇÃO DO FRAGMENTO ESTÁVEL M/Z 96	
OBSERVADO EM ALCALOIDES PIPERIDÍNICOS.....	114
FIGURA 52- REPRESENTAÇÃO DA FRAGMENTAÇÃO GERAL DE [N-METIL	
.....-2-(2-HIDROXIPROPIL)-6-(2-HIDROXIBUTIL)- Δ^3 -PIPERIDINA].....	114
FIGURA 53- REPRESENTAÇÃO DA FRAGMENTAÇÃO DE [N-METIL-2-(2'-	
HIDROXIBUTIL)-6-(2''-HIDROXIBUTIL)- Δ^3 -PIPERIDINA].....	115
FIGURA 54- NÚCLEO PIPERDÍNICO DOS ALCALOIDES DO GÊNERO	
<i>Lobelia</i>	115

FIGURA 55-	ESPECTRO DE MASSA LELOBANIDINE REFERENTE AO	
.....	PICO 10 DO CROMATOGRAMA DE FR CL1 DE <i>L. exaltata</i>	116
FIGURA 56-	REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DE FRAGMENTOS DE	
.....	ÍONS DE LELOBANIDINE REFERENTE AO PICO 10 DO	
	CROMATOGRAMA DE FR CL1 DE <i>L. exaltata</i>	117
FIGURA 57-	ESPECTRO DE MASSA HEPTACOSANO REFERENTE AO	
.....	PICO 8 DO CROMATOGRAMA DE FR CL1 DE <i>L. exaltata</i>	117
FIGURA 58-	ESPECTRO DE MASSA DE TRIDECANO DA FR ALKA I DE	
	<i>L. exaltata</i>	118
FIGURA 59-	ESPECTRO DE MASSA DE 2,6-DIMETIL,7-OCTEN-4-ONE DA	
	FR ALKA I DE <i>L. exaltata</i>	119
FIGURA 60-	ESPECTRO DE MASSA DE 3,5-DIMETIL-4-OCTANONE DA FR	
	ALKA I DE <i>L. exaltata</i>	119
FIGURA 61-	ESPECTRO DE MASSA DE 2,5-DIMETIL, 3-HEXANONE DA FR	
	ALKA I DE <i>L. exaltata</i>	119
FIGURA 62-	ESPECTRO DE MASSA ACETOFENONA DA FR ALKA I DE <i>L.</i>	
	<i>exaltata</i>	119
FIGURA 63-	ESPECTRO DE MASSA DE UNDECANO DA SUBFRAÇÃO	
	ALKA II DE <i>L. exaltata</i>	120
FIGURA 64-	ESPECTRO DE MASSA DE 2-(HIDROXIAMINO) ETIL	
	ACETATO DA SUBFRAÇÃO ALKA II DE <i>L. exaltata</i>	121
FIGURA 65-	ESPECTRO DE MASSA DE ISOAMIL NITRITO DA SUBFRAÇÃO	
	ALKA II DE <i>L. exaltata</i>	121
FIGURA 66-	ESPECTRO DE MASSA DE ÁCIDO CIANÚRICO DA	
	SUBFRAÇÃO ALKA II DE <i>L. exaltata</i>	121
FIGURA 67-	ESPECTRO DE MASSA DE 2-DIMETIL, 1,2,4-ÁCIDO	
	BENZENOTRICARBOXÍLICO DA SUBFRAÇÃO ALKA II	
	DE <i>L. exaltata</i>	121
FIGURA 68-	ESPECTRO DE MASSA DE N,N-DICICLOHEXIL-3-	
	FENIROPANAMIDA DA SUBFRAÇÃO ALKA II DE <i>L. exaltata</i>	122
FIGURA 69-	ESPECTRO DE MASSA DE ÁCIDO 2,6-	
	PIPERIDINEDICARBOXILICO DA SUBFRAÇÃO ALKA II DE	
.....	<i>L. exaltata</i>	123

FIGURA 70-	ESPECTRO DE MASSA 1-(2-NITRO-2-PROPENIL) -1-CICLOHEXENO DA SUBFRAÇÃO ALKA II DE <i>L. exaltata</i>	123
FIGURA 71-	ESPECTRO DE MASSA 1-METHYL-4-PIPERIDINYL 3-ETHYLPHENYLCARBAMATE DA SUBFRAÇÃO ALKA II DE <i>L. exaltata</i>	123
FIGURA 72-	ESPECTRO DE MASSA β -PIPERIDINOPROPIOFENONE DA SUBFRAÇÃO ALKA II DE <i>L. exaltata</i>	123
FIGURA 73-	ESPECTRO DE MASSA ÁCIDO N-HEXADECANOICO (ÁCIDO PALMÍTICO) DA SUBFRAÇÃO ALKA II DE <i>L. exaltata</i>	124
FIGURA 74-	ESPECTRO DE MASSA ÁCIDO 1-ETIL-2,3-DIMETIL-4-PIPERIDINOL DA SUBFRAÇÃO SUFRAÇÃO ALKA B ₁ DE <i>L. exaltata</i>	124
FIGURA 75-	ESPECTRO DE MASSA DE [N-METIL-2-(2-HIDROXIPROPIL)-6-(2-HIDROXIBUTIL)- Δ^3 -PIPERIDINA] DA SUFRAÇÃO ALKA B ₁ DE <i>L. exaltata</i>	124
FIGURA 76-	ESPECTRO DE MASSA DE [N-METIL-2-(2'-HIDROXIBUTIL)-6-(2''-HIDROXIBUTIL)- Δ^3 -PIPERIDINA] DA FRAÇÃO ALKA B ₁ DE <i>L. exaltata</i>	124
FIGURA 77-	ESPECTRO DE MASSA DE TRANS-2,3-DIMETIL-4-PIPERIDINOL DA SUBFRAÇÃO ALKA B ₁ DE <i>L. exaltata</i>	125
FIGURA 78-	ESPECTRO DE MASSA DE ESQUALENO DA SUBFRAÇÃO ALKA B ₁ DE <i>L. exaltata</i>	125
FIGURA 79-	ESQUEMA DE FRAGMENTAÇÃO DO ÁCIDO 2,6-PIPERIDINEDICARBOXILICO.....	126
FIGURA 80-	PROPOSTA DE BIOSÍNTESE DOS ALCALOIDES DA <i>Lobelia</i>	128

LISTA DE TABELAS

TABELA 1-	ATIVIDADES FARMACOLÓGICAS DAS ESPÉCIES DE <i>Lobelia</i> - ESTIMULAÇÃO RESPIRATÓRIA	43
TABELA 2-	ATIVIDADES FARMACOLÓGICAS DAS ESPÉCIES DE <i>Lobelia</i> - ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA.....	44
TABELA 3-	ATIVIDADES FARMACOLÓGICAS DAS ESPÉCIES DE <i>Lobelia</i> - ATIVIDADE NEUROPROTETORA.....	46
TABELA 4-	ATIVIDADES FARMACOLÓGICAS DAS ESPÉCIES DE <i>Lobelia</i> - ATIVIDADE ANTITUMORAL.....	47
TABELA 5-	ATIVIDADES FARMACOLÓGICAS DAS ESPÉCIES DE <i>Lobelia</i> - ATIVIDADE IMUNOMODULADORA.....	47
TABELA 6-	ATIVIDADES FARMACOLÓGICAS DAS ESPÉCIES DE <i>Lobelia</i> - INIBIDORES DE α -GLICOSIDASES.....	47
TABELA 7-	ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS DO MATERIAL VEGETAL.....	87
TABELA 8-	PERDA DE MASSA PERCENTUAL DETERMINADA PELO MÉTODO TERMOGRAVIMÉTRICO PARA PARTES AÉREAS DE <i>L. exaltata</i>	91
TABELA 9-	ANÁLISE DE CG-MS DA FRAÇÃO 10 MA DE <i>L. exaltata</i>	94
TABELA 10-	COMPOSTOS QUÍMICOS IDENTIFICADOS NA FR 11Ac DE <i>L.</i> <i>exaltata</i> por CG-MS.....	101
TABELA 11-	COMPOSTOS QUÍMICOS IDENTIFICADOS NA FR 11Am DE <i>L. exaltata</i> por CG-MS.....	105
TABELA 12-	COMPARAÇÃO ENTRE DADOS DA LITERATURA E OS ENCONTRADOS NO ESPECTRO FTIR DA SUBSTÂNCIA L1....	108
TABELA 13-	ANÁLISE DE CG-MS DE FCL 1 DE <i>L. exaltata</i>	112
TABELA 14-	COMPOSTOS IDENTIFICADOS SUBFRAÇÃO ALKA I DE <i>L.</i> <i>exaltata</i>	120
TABELA 15-	COMPOSTOS MAIS ABUNDANTES DA SUBFRAÇÃO ALKA II DE <i>L. exaltata</i>	120
TABELA 16-	COMPOSTOS IDENTIFICADOS NA SUBFRAÇÃO ALKA B1 DE <i>L. exaltata</i>	122
TABELA 17-	TEMPO DE PERMANÊNCIA DOS ANIMAIS NO	

	COMPARTIMENTO CLARO.....	129
TABELA 18-	TEMPO DE LATÊNCIA PARA A PRIMEIRA ENTRADA NO COMPARTIMENTO ESCURO.....	131
TABELA 19-	NÚMERO DE CRUZAMENTOS ENTRE OS COMPARTIMENTOS.CLARO E ESCURO.....	132

LISTAS DE GRÁFICOS

GRÁFICO 1 -	CURVAS DE CALORIMETRIA EXPLORATÓRIA DIFERENCIAL (DSC) PARA CAULES E FOLHAS DE <i>L. exaltata</i>	89
GRÁFICO 2 -	PERFIL DE DEGRADAÇÃO TÉRMICA (TG) DE FOLHAS SECAS DE <i>L.</i> <i>exaltata</i>	90
GRÁFICO 3 -	ATIVIDADE ANSIOLÍTICA DO ECB DAS PARTES AÉREAS DE <i>Lobelia</i> <i>exaltata</i>	129
GRÁFICO 4 -	LATÊNCIA PARA A PRIMEIRA ENTRADA NO COMPARTIMENTO ESCURO.....	132
GRÁFICO 5 -	NÚMERO DE CRUZAMENTOS ENTRE OS COMPARTIMENTOS CLARO E ESCURO.....	133
GRÁFICO 6 -	LATÊNCIA PARA ATINGIR O SCORE 4 (A e C) E SCORE 5 (B e D) APÓS A EXPOSIÇÃO AO PTZ (10mM).....	136
GRÁFICO 7 -	CONSUMO DE SACAROSE DOS GRUPOS SHAM E 6- OHDA TRATADOS COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE ECB E FCHCl ₃ DE <i>L.</i> <i>exaltata</i>	137
GRÁFICO 8 -	CONSUMO DE ÁGUA + SACAROSE DOS GRUPOS SHAM E 6-OHDA TRATADOS COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE ECB E F CHCl ₃ DE <i>L.</i> <i>exaltata</i>	140
GRÁFICO 9 -	TEMPO DE IMOBILIDADE DOS GRUPOS SHAM E 6- OHDA TRATADOS COM DIFERENTES	

	CONCENTRAÇÕES DE ECB E F CHCl ₃ DE <i>L. exaltata</i>	142
GRÁFICO 10 -	TEMPO DE ESCALADA DOS GRUPOS SHAM E 6-OHDA TRATADOS COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE ECB E F CHCl ₃ DE <i>L. exaltata</i>	143
GRÁFICO 11 -	TEMPO DE ESCALADA DOS GRUPOS SHAM E 6-OHDA TRATADOS COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE ECB E F CHCl ₃ DE <i>L. exaltata</i>	143
GRÁFICO 12 -	RELAÇÃO ENTRE A PRIMEIRA E SEGUNDA INVESTIGAÇÃO (RID) DOS GRUPOS SHAM E 6-OHDA TRATADOS COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE ECB E F CHCl ₃ DE <i>L. exaltata</i>	145
GRÁFICO 13 -	TEMPO DE PERMANÊNCIA NO SEPILHO FAMILIAR DOS GRUPOS SHAM E 6-OHDA TRATADOS COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE ECB E F CHCl ₃ DE <i>L. exaltata</i>	146
GRÁFICO 14 -	TEMPO DE PERMANÊNCIA NO SEPILHO NOVO DOS GRUPOS SHAM E 6-OHDA TRATADOS COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE ECB E F CHCl ₃ DE <i>L. exaltata</i>	147
GRÁFICO 15 -	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE MOTORA DOS EXTRATOS DE <i>L. exaltata</i> NO TESTE DE CAMPO ABERTO.....	148
GRÁFICO 16 -	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANSIOLÍTICA DOS EXTRATOS DE <i>L. exaltata</i> NO TESTE DE CAMPO ABERTO.....	149
GRÁFICO 17 -	EFEITO DE FALK E MISTURA DE TRITERPENOS DE <i>L. exaltata</i> SOBRE A VIABILIDADE DAS CÉLULAS JURKAT.....	151

GRÁFICO 18 -	EFEITO DE FALK E MISTURA DE TRITERPENOS DE <i>L. exaltata</i> SOBRE A VIABILIDADE DAS CÉLULAS Calu-3 PELO MÉTODO DO MTT.....	152
GRÁFICO 19 -	EFEITO DE FALK E MISTURA DE TRITERPENOS DE <i>L. exaltata</i> SOBRE A VIABILIDADE DAS CÉLULAS HeLa PELO MÉTODO DO MTT.....	153
GRÁFICO 20 -	EFEITO DE FALK E MISTURA DE TRITERPENOS DE <i>L. exaltata</i> SOBRE A VIABILIDADE DAS CÉLULAS HRT PELO MÉTODO DO MTT.....	153
GRÁFICO 21 -	MORTALIDADE DE <i>Plutella xylostella</i> FRENTE AOS EXTRATOS BRUTOS E FRAÇÕES DAS PARTES AÉREAS E SEMENTES DE <i>L. exaltata</i>	155

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	23
2	OBJETIVOS	25
2.1	OBJETIVO GERAL	25
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	25
3	REVISÃO DA LITERATURA	26
3.1	FAMÍLIA CAMPANULACEAE	26
3.2	REVISÃO DO GÊNERO <i>Lobelia</i> L.	27
3.2.1	Usos tradicionais	27
3.2.2	Aspectos Químicos	28
3.2.2.1	Alcaloides	28
3.2.2.2	Terpenoides	34
3.2.2.3	Poliacetilenos	35
3.2.2.4	Neolignanas	35
3.2.2.5	Flavonoides	35
3.2.2.6	Cumarinas	40
3.2.2.7	Outros compostos químicos	40
3.2.3	Aspectos Farmacológicos	41
3.3	ALGUMAS ATIVIDADES BIOLÓGICAS DE PLANTAS MEDICINAIS	51
3.3.1	Atividade Ansiolítica	51
3.3.3	Atividade Neuroprotetora	53
3.3.4	Atividade Citotóxica	56
3.3.5	Atividade Inseticida	57
4	MATERIAL E MÉTODOS	59
4.1	OBTENÇÃO DO MATERIAL VEGETAL	59
4.1.1	Coleta, Identificação e exsicata	59
4.2	ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS	60
4.2.1	Determinação da perda de água por dessecação	60
4.2.2	Determinação de Cinzas totais	60
4.3	ESTUDO TERMOANALÍTICO	61
4.4	ANÁLISE FITOQUÍMICA	61
4.4.1	Obtenção dos Extratos	61

4.4.2	Obtenção do Extrato Etanólico Bruto (EEB) das partes aéreas	61
4.4.3	Fracionamento do Extrato Etanólico Bruto (EEB)	62
4.4.4	Purificação, isolamento e caracterização das substâncias da Fração Clorofórmica (FCHCl ₃).....	64
4.4.5	Obtenção do extrato cetônico bruto (ECB).....	66
4.4.6	Fracionamento do Extrato Cetônico Bruto (ECB).....	66
4.4.7	Purificação e isolamento das substâncias do Extrato Cetônico Bruto (ECB).....	66
4.4.7.1	Purificação de L1	67
4.4.7.2	Purificação da Fração clorofórmio (FCHCl ₃)	68
4.4.8	Obtenção e Purificação da Fração Acetato de Etila (FAE).....	68
4.4.9	Obtenção da Fração Alcaloidal (FALK)	70
4.5	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANSIOLÍTICA E/OU ANTICONVULSIVANTE DO EXTRATO ETANÓLICO BRUTO E SUBSTÂNCIA ISOLADA DE <i>Lobelia</i> <i>exaltata</i> POHL EM PEIXES ZEBRAFISH (<i>Danio rerio</i>)	73
4.5.1	Animais.....	73
4.5.2	Tratamento	73
4.5.3	Teste de Atividade Ansiolítica do ECB DE <i>L. exaltata</i>	73
4.5.4	Teste da Atividade Anticonvulsivante do ECB e da substância L ₁ de <i>L.</i> <i>exaltata</i>	75
4.5.5	Análise estatística	76
4.6	AVALIAÇÃO DO EFEITO NEUROPROTETOR E COMPORTAMENTAL....	76
4.6.1	Animais.....	76
4.6.2	Tratamento	77
4.6.3	Cirurgia estereotorácica	77
4.6.4	Teste de Preferência à Sacarose	78
4.6.5	Teste de Reconhecimento Social	79
4.6.6	Teste De Natação Forçada Modificado	80
4.6.7	Discriminação Olfativa	80
4.6.8	Teste do campo aberto.....	81
4.7	ATIVIDADE CITOTÓXICA SOBRE CÉLULAS TUMORAIS	81
4.7.1	Cultura celular	81

4.8	ATIVIDADE INSETICIDA SOBRE <i>Plutella xylostella</i> Linnaeus (TRAÇA-DAS-CRUCÍFERAS)	84
4.8.1	Cultivo de <i>Brassica oleracea</i> var. <i>acephala</i>	84
4.8.2	Criação-estoque de <i>Plutella xylostella</i>	84
4.8.3	Bioensaio da atividade inseticida em discos de couve	86
4.9	ANÁLISE ESTATÍSTICA	86
5	RESULTADOS	87
5.1	ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS DO MATERIAL VEGETAL	87
5.1.1	Perda de água por dessecação e Cinzas.....	87
5.2	ESTUDO TERMOANALÍTICO.....	88
5.3	IDENTIFICAÇÃO E ELUCIDAÇÃO ESTRUTURAL DOS COMPOSTOS ISOLADOS.....	92
5.3.1	Identificação dos compostos do EEB – fração (FCHCl ₃) das partes aéreas <i>L. exaltata</i>	92
5.3.1.1	Identificação dos compostos de FR 10 MA do EEB	92
5.3.1.2	Identificação dos compostos de FR 128 do EEB	98
5.3.1.3	Identificação dos compostos de FR 11Ac de EEB	101
5.3.1.4	Identificação dos compostos de Fr 11Am do Extrato Etanólico Bruto	104
5.3.2	Identificação dos compostos do ECB das partes aéreas <i>L. exaltata</i>	105
5.3.2.1	Identificação de substância L ₁ do ECB.....	106
5.3.2.2	Identificação da fração FCL 1 do ECB	111
5.3.3	Identificação dos compostos da fração Alcaloidal do ECBn.....	118
5.3.3.1	Identificação de compostos da fração ALKA I	118
5.3.3.2	Identificação da fração ALKA II da Fração Alcaloidal	120
5.3.3.3	Identificação da subfração ALKA B ₁	121
5.4	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANSIOLÍTICA E ANTICONVULSIVANTE DO ESTRATO ETANÓLICO BRUTO E SUBSTÂNCIA ISOLADA DE <i>Lobelia exaltata</i> EM PEIXES ZEBRAFISH (<i>Danio rerio</i>).....	128
5.4.1	Teste da Atividade Ansiolítica do ECB de <i>Lobelia exaltata</i>	128
5.4.2	Teste da Atividade Anticonvulsivante do EBC e da substância L ₁ de <i>Lobelia exaltata</i>	134
5.5	AVALIAÇÃO DO EFEITO NEUROPROTETOR E COMPORTAMENTAL EM ANIMAIS.....	138

5.5.1	Teste de Preferência à Sacarose	138
5.5.2	Teste De Natação Forçada Modificado	141
5.5.3	Teste de Reconhecimento Social	144
5.5.4	Discriminação Olfativa	145
5.5.5	Teste de Campo Aberto	147
5.6	AVALIAÇÃO DO EFEITO DA FRAÇÃO ALCALOIDAL E FRAÇÃO TRITERPENOS DE <i>Lobelia exaltata</i> Pohl SOBRE CÉLULAS TUMORAIS.	150
5.6.1	Ensaio de viabilidade celular pelo método de redução do MTT das células Jurkat com a fração alcaloidal (FALK) e mistura de triterpenos.	150
5.6.2	Ensaio de viabilidade celular pelo método de redução do MTT das células Calu-3 com a fração alcaloide e mistura de triterpenos.	151
5.6.3	Ensaio de viabilidade celular pelo método de redução do MTT das células Hela com a fração alcaloidal (FALK) e mistura de triterpenos	152
5.6.4	Ensaio de viabilidade celular pelo método de redução do MTT das células HRT com a fração alcaloidal (FALK) e mistura de triterpenos	152
5.7	ATIVIDADE INSETICIDA DO EXTRATO CETÔNICO BRUTO E FRAÇÕES DAS PARTES AÉREAS E SEMENTES DE <i>Lobelia exaltata</i> POHL (CAMPANULACEAE) SOBRE A TRAÇA-DAS-CRUCÍFERAS	154
6.	CONSIDERAÇÕES FINAIS	157
	REFERÊNCIAS	158

1 INTRODUÇÃO

A humanidade, através dos tempos, sempre contou com a natureza para o tratamento, cura e prevenção de doenças. Os primeiros registros medicinais datam de aproximadamente 2.100 a.C, em que se utilizavam espécies como *Cedrus* (óleo de cedro) e *Cupressus sempevirens* (cipreste), *Glicyrrhiza glabra* (alcaçuz), *Commiphora species* (mirra) e *Papaver somniferum* (suco da papoula), sendo todas estas utilizadas até os dias de hoje. (CALIXTO, 2000; VEIGAS Jr., 2006; CALIXTO, 2008; KUNLE, 2012; YUNES; CECHINEL FILHO, 2012).

A medicina popular ou tradicional, com suas informações históricas de tratamentos medicinais de êxito é um forte aliado dos cientistas direcionando a busca por novos agentes bioativos naturais (CECHINEL FILHO, 2015). As investigações sobre as plantas medicinais abrangem não só aspectos fitoquímicos, mas também aspectos agroecológicos, microbiológicos, farmacológicos e biotecnológicos, visando ampliar as possibilidades na procura de novos agentes terapêuticos (DIXON, 2001; PHILLIPSON, 2001; MACIEL et al., 2002; FOGLIO et al., 2006).

O Brasil é um país com a maior parcela da biodiversidade mundial, em particular a sua flora, muito rica em espécies vegetais com potencial terapêutico (CALIXTO, 2005). No entanto, o potencial que o país possui para a descoberta de novos fármacos ainda é pouco explorado, diferente do que ocorre em países como Alemanha, Canadá e Estados Unidos que possuem um alto investimento em pesquisas na área das plantas medicinais (SOUSA et al., 2008). A partir do século XIX ocorreram novas descobertas de substâncias ativas, com atividade biológica e o Brasil tem avançado nesta direção, onde inúmeros estudos com resultados relevantes e promissores têm sido descritos por pesquisadores brasileiros (MIGUEL; MIGUEL, 2004; CALIXTO, 2008; CECHINEL FILHO, 2015).

A utilização dos fitoterápicos e plantas medicinais proporciona um maior acesso as pessoas, principalmente as carentes, a diferentes opções de tratamentos, além de valorizar o conhecimento popular. A terapia com fitoterápicos faz parte da Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares e é considerada parte fundamental nas políticas públicas, recomendada pela Organização Mundial da Saúde (BRASIL, 2006; BRASIL, 2007).

O potencial de busca de fitoterápicos existentes no Brasil, o grande número de plantas sem estudos, a falta de identificação botânica e sua extensiva utilização popular justificam os estudos para o desenvolvimento de estratégias e metodologias na busca por novos fármacos.

As espécies de *Lobelia* (Campanulaceae) têm sido utilizadas em todo o mundo por apresentarem importantes atividades farmacológicas, como estimulante respiratório, tratamento de dependência de drogas de abuso, atividade antitumoral, atividade antibacteriana e anti-inflamatória (FELPIN; LEBRETON, 2004; KESTING et al., 2009; KUO et al., 2011). Os principais constituintes das espécies desse gênero, são alcaloides piperidínicos tais como, lobelina, lobelanidina, norlobelanina, lobelanina, além de outros componentes: flavonoides, terpenos e triterpenos e cumarinas (CHEN et al., 2014).

Lobelia exaltata é uma espécie nativa do estado do Paraná que se desenvolve abundantemente em lugares brejosos, incluindo margens de estrada, normalmente não utilizados pela agricultura. Esta espécie foi estudada em uma dissertação de mestrado (FOLQUITTO, 2014) na qual, foi verificado que havia ainda propriedades biológicas importantes a serem avaliadas.

Neste sentido, devido à existência de poucas informações em literaturas técnicas e científicas acerca da composição química e atividades biológicas para este *taxon*, muitos compostos ainda restam para serem identificados e testados. O presente trabalho visa contribuir com a possibilidade de novas terapêuticas sobre atividade antidepressiva e anticonvulsivante, potencial neuroprotetor associado à Doença de Parkinson, atividade inseticida, propriedades citotóxicas e antitumorais de *Lobelia exaltata* Pohl (Campanulaceae), por meio de diferentes atividades biológicas e investigações fitoquímicas.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Realizar o estudo químico e biológico de *Lobelia exaltata* Pohl, Campanulaceae.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Analisar a composição química do extrato bruto e das frações das partes aéreas de *L. exaltata*;
- Isolar, purificar e identificar substâncias químicas por cromatografia em coluna (CC) e técnicas espectroscópicas;
- Avaliar o potencial ansiolítico e anticonvulsivante do extrato bruto e frações;
- Investigar o efeito neuroprotetor e comportamental *in vivo* do extrato bruto, das frações e dos compostos isolados;
- Pesquisar a atividade ansiolítica e/ou anticonvulsivante do extrato bruto e composto isolado em peixes zebrafish (*Danio rerio*);
- Avaliar a atividade citotóxica do extrato bruto e frações sobre células tumorais;
- Identificar o efeito inseticida do extrato bruto e frações no desenvolvimento de *Plutella xylostella* em folhas couve.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 FAMÍLIA CAMPANULACEAE

A família Campanulaceae Jussieu está presente em grande variedade de habitats compreendendo 84 gêneros e cerca de 2400 espécies. Quase todas as espécies são plantas herbáceas perenes, subarborescentes ou arbustivas, arvoretas ou árvores terrestres, aquáticas ou raramente epífitas (ANTONELLI, 2008).

Os caules podem ser simples ou ramificados, em geral são laticíferas; possuem vasos articulados que produzem um látex viscoso, abundante e geralmente branco. Apresentam folhas alternas, simples, inteiras ou finalmente serradas, fendidas até lobadas, nunca compostas e sem estipulas (LAMERS, 2007).

As flores são tipicamente pentâmeras, hermafroditas, actinomorfas ou zigomorfas, com 2-5 carpelos sincarpas. As sépalas são livres, as pétalas formam uma corola tubulosa ou campanulada. As anteras são livres e os filetes parcialmente livres ou totalmente condescidos. O ovário pode ser ínfero ou médio, plurilocular com muitos óvulos (MAGALHÃES et al., 1988).

O fruto é uma cápsula, frequentemente de deiscência por poros apicais com sementes pequenas e numerosas. Muitas vezes há flores vistosas e coloridas, reunidas em inflorescências de vários tipos. As vezes aproximam-se do tipo de um capítulo denso (CRONQUIST, 1984; LAMERS, 2007).

São plantas cosmopolitas, ou seja, possuem representantes em quase todos os países do globo terrestre, porém estão mais presentes em zonas tropicais e subtropicais (ANTONELLI, 2008).

A subfamília *Lobelioideae* apresenta látex com alcaloides piperidínicos, o que geralmente não é observado em outras subfamílias. É comum apresentarem metabólitos como fitoesteróis e poliacetilenos e raro a presença de saponinas (MAGALHÃES et al., 1988; LAMMERS, 2007; FOLQUITTO et al., 2014).

3.2 REVISÃO DO GÊNERO *Lobelia* L.

3.2.1. Usos tradicionais

Espécies de *Lobelia* têm sido utilizadas na medicina popular como infusões e tinturas desde tempos antigos em todo o mundo, para o tratamento de diversas doenças (BÓRIO, 1959). O uso tradicional mais citado de *Lobelia inflata* L. conhecida como “Indian Tobacco” é para tratar dependência química da nicotina e doenças respiratórias como asma e bronquite (STEAD; HGHEs, 2000; BÁLVÁNYOS et al., 2003; FELPIN; LEBETRON, 2004; KURSINSZKI, LUDÁNYI e SZÖKE, 2008; NAGANANDA et al., 2012).

Na medicina Ayurveda, conhecimento médico desenvolvido na Índia, a decocção das flores de *Lobelia nicotianaefolia* Heyne é utilizada para asma, bronquite e febre. As raízes para tratar doença nos olhos e as folhas para cura rápida de feridas, além de ser tradicionalmente usada para tratar dor e picada de cobra (KURDEKAR et al., 2012; TAMBOLI et al., 2012; VIGNESHWARAN, 2014).

Lobelia polyphylla Hook & Arn. é uma espécie consumida no Chile que apresenta os efeitos tóxicos, narcóticos e alucinógenos, produzidos após fumar ou ingerir as partes aéreas desta planta. *Lobelia tupa* L. conhecida como “devil Tobacco” contém um látex venenoso e cáustico que se ingerido provoca vômitos, irritações intestinais e delírio (VILLEGAS, ESPINOZA; URZÚA, 2014).

Lobelia pyramidalis Wall, na Índia, tem suas folhas e inflorescências utilizadas como antiespasmódica, para tratamento de asma, bronquite e febre assim como para dores no ciático e nas costas (JOSHI et al., 2011).

As folhas secas de *Lobelia flaccida* Pers são utilizadas como analgésicas e antiepiléticas na região do Cabo Oriental da África do Sul (STOLOM et al., 2016).

Uma outra espécie nativa americana conhecida pelo seu potencial medicinal é *Lobelia cardinalis* L., formulações da planta são utilizadas para diversos fins como emética, no tratamento de febre tifoide e até mesmo como “poção do amor” (BROWN et al., 2016).

Lobelia chinensis Lour é a espécie que sem dúvida apresentou o uso popular mais diversificado, de acordo com a atual pesquisa. Podemos citar: diurética, hemostática, antidoto para venenos, edema, icterícia, tratamento de doenças do

fígado, estômago e intestino, tumor de mama e de estômago, antimicrobiana, antiviral e anti-inflamatória (SHIBANO et al., 2001; KUO et al., 2011; ZHANG et al., 2013; CHEN et al., 2014; YANG et al., 2014; LI et al., 2015; LI et al., 2016).

3.2.2. Aspectos Químicos

As investigações fitoquímicas de várias espécies de *Lobelia*, como: *Lobelia giberroa* Hemsl., *Lobelia syphilitica* L., *Lobelia nicotianaefolia* Roth E. & S., *Lobelia salicifolia* Sweet, *Lobelia tupa* L., *Lobelia urens* L., *Lobelia cardinalis* L., *Lobelia puberula* Michx., *Lobelia yuccoides* Hillebr., *Lobelia portoricensis* (Vatke) Urb., *Lobelia polyphylla* Hook e Arn., *Lobelia berlandieri* A. DC., *Lobelia davidii* Franch., *Lobelia laxiflora* L., *Lobelia sessilifolia* Lamb., *Lobelia inflata* L., *Lobelia chinensis* Lour, *Lobelia exaltata* Pohl, possibilitaram a identificação de diferentes classes de metabólitos secundários sendo a maioria alcaloides piperidínicos. Além destes encontram-se também flavonoides, terpenoides, poliacetilenos, cumarinas, ácidos graxos, neolignanas, amidas, entre outros (BALVANYOS et al., 2004; KURSINSZKI; LUDANYI; SZOKE, 2008; STEAD; HUGHES, 2009; JOSHI et al., 2011; KURDEKAR et al., 2012; FOLQUITTO et al., 2014; VIGNESHWARAN; SOMEGOWDA; PRAMOD, 2014; VILLEGAS; ESPINOZA; URZUA, 2014; BROWN et al., 2016; STOLOM et al., 2016).

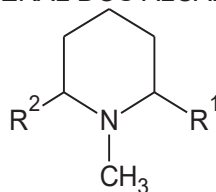
3.2.2.1 Alcaloides

Alcaloides consistem em um grupo altamente diversificado de compostos que contêm uma estrutura de anel e um átomo de nitrogênio. Esses compostos apresentam uma ampla distribuição no reino vegetal e exibem atividades biológicas significativas (LU et al., 2012).

Durante anos tem sido demonstrado que espécies de *Lobelia* (Campanulaceae) são caracterizadas pela grande presença de alcaloides contendo um anel piperidínico ou N-metilpiperidínico e um ou dois substituintes na posição C2 e/ou C6 do anel (FIGURA 1).

Alcaloides piperidínicos constituem uma extensa família de compostos de grande interesse, por possuírem importantes atividades biológicas (FELPIN; LEBRETON, 2004).

FIGURA 1 - ESTRUTURA GERAL DOS ALCALOIDES PIPERIDÍNICOS



FONTE: A autora (2018)

Diversas pesquisas sobre o gênero ao longo dos anos levaram ao isolamento e identificação de inúmeros alcaloides. Na (FIGURA 2) é possível observar os compostos já isolados.

Charlier e Tounder (1950) extraíram a fração alcaloídica das partes aéreas de *Lobelia giberroa* Hemsl e isolaram e identificaram os alcaloides lophilacrin e lophilin. Posteriormente Steinegger e Egger (1952) também isolaram os mesmos compostos da fração alcaloídica das partes aéreas de *L. syphilitica*.

Gedeon e Gedeon (1954) encontraram e identificaram a lobelanidina (**1**) como alcaloide majoritário e a lelobanidina (**2**) em *L. nicotianaefolia* por meio da fração clorofórmio.

Das partes aéreas de *L. tupa* e *L. inflata* foram identificados os alcaloides lobelina (**4**), lobelanina (**3**) e lobelanidina (**1**) e norlobelanidina (**5**), norlobelanina (**6**), norlobelina (**19**), 8-propil-10-phenil lobelionol (**26**), 3-hidroxi-3-fenil-propanoico norallosedamina (**20**), 3-hidroxi-3-fenil-propanoico allosedamina (**21**). Lobelina (**4**) aparece como o de maior concentração e o mais comumente encontrado nas espécies, entre elas, *L. urens*, *L. portonicens*, *L. inflata*, *L. nicotianaefolia* e *L. syphilitica*. (KACZMAREC; STEINEGGER, 1958; SIMON; SHOSTENKO, 1961; MELÉNDEZ et al., 1967; SZÖKE et al., 1997; KURINSKI, LUDÁNYI e SZÖKE, 2008; KESTING et al., 2009; TAMBOLI et al., 2012; VILLEGAS et al., 2014).

Lobinalina (**7**) foi obtida por extração ácido-base da fração CHCl₃ do extrato metanólico das partes aéreas de *L. cardinalis* (BROWN et al., 2016). Esse alcaloide foi o primeiro binitrogenado descoberto e posteriormente foi encontrado em outras

espécies de *Lobelia* (KACZMAREC; STEINEGGER, 1958; CHAUBAL et al., 1962; CLUGSTON; MACLEAN; MANSKE, 1966).

Três alcaloides piperidínicos foram isolados do extrato alcaloídico total de *L. berlandieri* uma espécie tóxica mexicana, sendo [N-metil-2,6-bis (2-hidroxibutil) - Δ_3 -piperidina] (**9**), [N-metil-2- (2-hidroxipropil) -6-(2-hidroxibutil) - Δ_3 -piperidina] (**10**), [N-metil-2-(2-oxobutil) -6-(2-hidroxibutil) Δ_3 -piperidina] (**11**) (WILLIAMS; RAY; KIM, 1987). Yang et al. (2014) também isolaram e identificaram esses três alcaloides de *L. chinensis*, além de mais outros quatro, Lobechedina A (**30**), Lobechedina B, (**31**), Lobechedina C (**32**), Andrachicinidina (**33**).

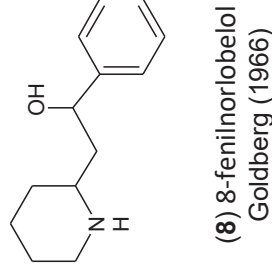
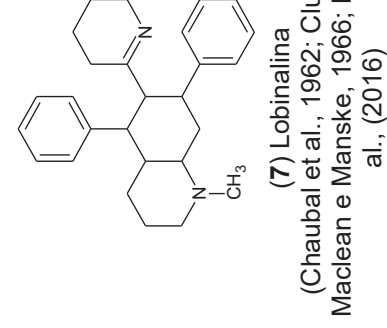
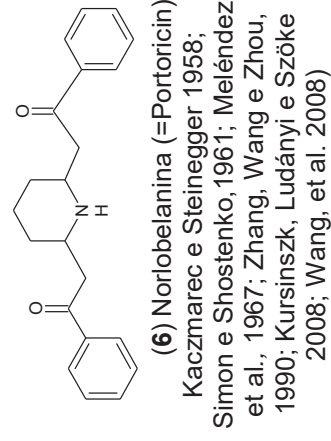
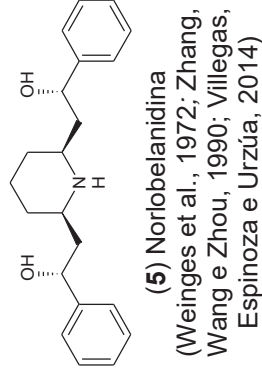
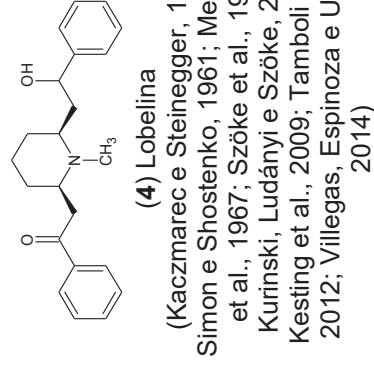
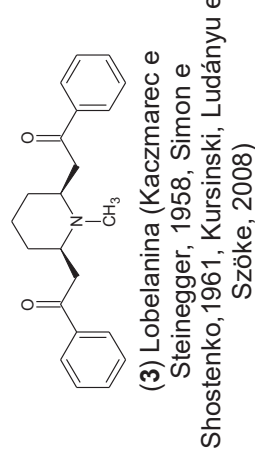
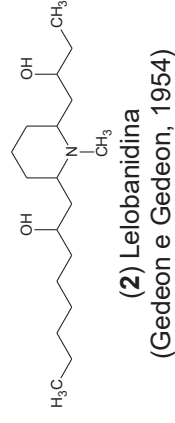
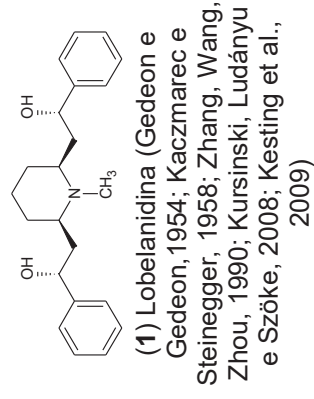
O composto lelobanonolina (**12**) foi identificado pela primeira vez em uma espécie chinesa, *L. davidii*, por Zhang; Wang; Zhou (1990). O mesmo também foi isolado de caules jovens de *L. polyphylla*, no Chile, juntamente com outros alcaloides piperidínicos: 1-(1-(2-hidroxi-2-fenilietil) -1-metilpiperidina) butano-2-ol (**25**), 8-propil-10-fenil lobelionol, (**26**), 1-(6-(2-hidroxipentil) -1-metilpiperidina) butano-2-ona (**27**), 1-metil-2-piperidinemetanol (**28**) (VILLEGAS et al., 2014).

A investigação fitoquímica de folhas, caules e flores de *L. laxiflora*, na Costa Rica, resultou no isolamento e elucidação estrutural de três novos alcaloides, cis-8,10-dietil 1-3,4-dehidrolobelidiol, (**13**), trans-8-etil-10-fenil-3,4-dehidrolobelidiol, (**14**), cis. -8-etil-10-fenil-3,4-dehidrolobelidiol (**15**). Esses alcaloides também foram identificados na mesma espécie no Egito (PHILIPOV et al., 1998; RAHMAN; MONEM, 2014).

Alcaloides inibidores da glicosidase foram isolados do extrato metanólico da espécie *L. sessilifolia* e do extrato aquoso de *L. chinensis*: o 7-O- β -D-glucopiranosil-homonojirimicina (**16**), Radicamina A (**17**) e Radicamina B (**18**). Esses alcaloides têm sido reportados como potentes inibidores da α -glicosidase do arroz, de todos os tipos de α -glicosidasas de mamíferos e também com o agente antidiabético oral (IKEDA et al., 2000; SHIBANO et al., 2001).

Kesting et al., 2009 identificaram dois novos alcaloides a partir do extrato bruto das partes aéreas de *L. syphilitica*, após purificação com coluna C18 SPE, (2R,6S,2''S), o [2''-O-Acetillobelina] (**23**) e 6-[(E)-2-(3-Metoxifenil) etenil] -2,3,4,5-tetrahidropiridina (**24**).

FIGURA 2 - ALCALOIDES ENCONTRADOS NO GÊNERO *Lobelia*



continua

FIGURA 2 - ALCALOIDES ENCONTRADOS NO GÊNERO *Lobelia*

continuação

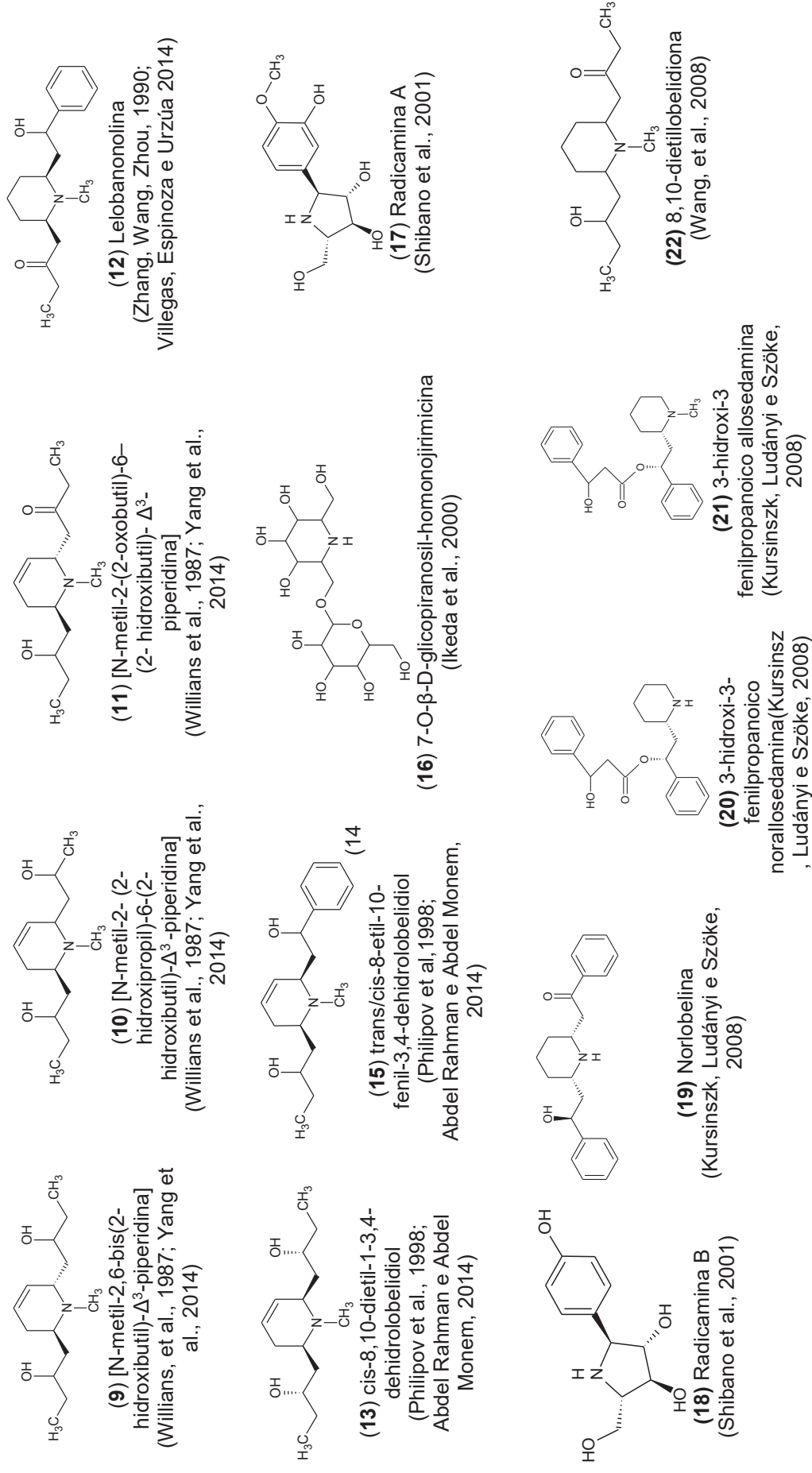
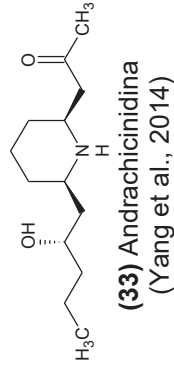
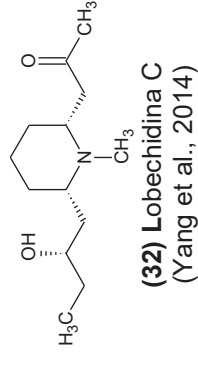
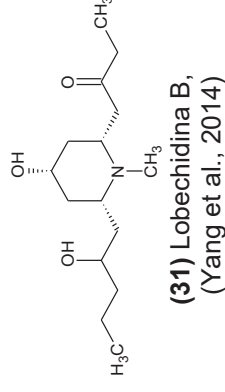
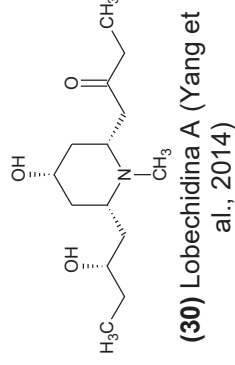
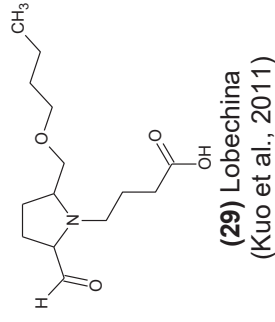
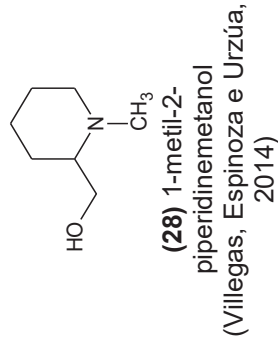
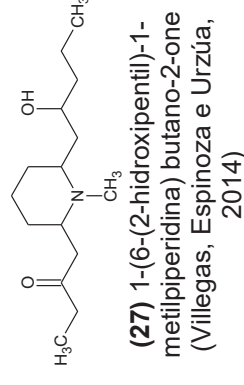
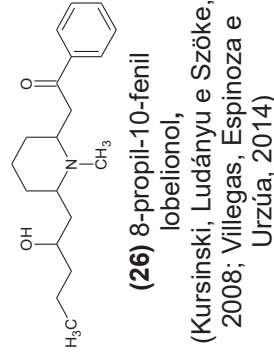
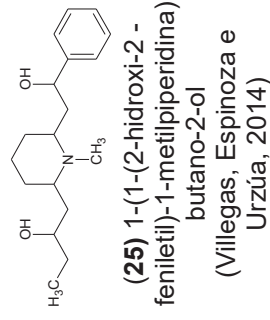
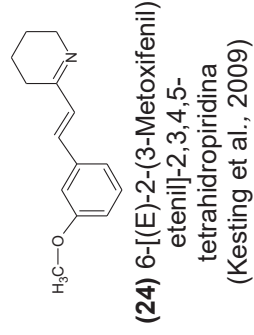
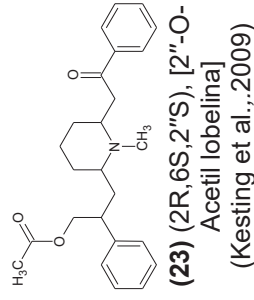


FIGURA 2 - ALCALOIDES ENCONTRADOS NO GÊNERO *Lobelia*

conclusão



FONTE: A autora (2018)

O gênero *Lobelia* têm apresentado um potencial terapêutico para uma variedade de distúrbios neurológicos. *L. nicotianaefolia* tem sido utilizada tradicionalmente na Índia como antiepilética. Tamboli et al. (2012) verificaram em seu estudo a ação antieplética da lobelina **(4)** (alcaloide majoritário de *L. nicotianaefolia*) e seus efeitos em ácido amino butírico (GABA) em cérebro de ratos frente ao Pentilenetetrazol (PTZ). Concluíram que **(4)** exibiu potente atividade anticonvulsivante com aumento significativo de GABA no cérebro e consequente redução de crises epiléticas. Já *L. flaccida* também é utilizada contra epilepsia na África, apresentou um resultado fraco para a ação anticonvulsivante do seu extrato aquoso frente ao PTZ (STOLOM et al, 2016).

L. cardinalis possui um alcaloide majoritário, a Lobinalina **(7)**, que mostrou ser um potente eliminador de radicais livres e inibir a absorção de [³H] -dopamina (DA) em sinaptossomas estriados de ratos. Esses efeitos que despertam interesse para desenvolvimento de terapêutica para distúrbios neuropatológicos que envolvem a neurotransmissão de radicais livres, colinérgicos e dopaminérgicos incluindo condições neurodegenerativas, como doença de Parkinson e abuso de drogas (BROWN et al., 2016).

3.2.2.2 Terpenoides

Terpenoides é uma classe de metabólitos secundários que se encontram distribuídos de forma ubíqua por todo o reino vegetal, podendo apresentar-se como triterpenoides livres, glicosídeos triterpênicos (saponinas), fitoesteróis e / ou seus precursores (PATLOLLA; RAO, 2012). Estes metabólitos têm demonstrado importante atividade antitumoral e um bom potencial para tratamento ou prevenção de diabetes e doença de Alzheimer (HILL; CONNOLLY, 2015).

No gênero *Lobelia* foram isolados e identificados da fração hexânica das espécies *L. davidii*, *L. chinensis* e *L. sessilifolia* os seguintes terpenoides: β-amirina **(36)**, β-amirina palmitato **(37)**, β-sitosterol **(34)**, Estigmasterol **(35)**, Cicloeucalenol **(38)**, Cicloeucalenol acetato **(39)**, Daucosterol **(40)**, Ácido Ursólico **(42)**, Ácido Oleanoico **(43)** (ZHANG; WANG; ZHOU, 1990; JIANG et al., 2009; KUO et al., 2011; SUN et al., 2012) (FIGURA 3).

Sun et al., 2012 isolaram e identificaram o composto Oleanol 28-aldeído 3-O- β –palmitato (**41**) de *L. sessilifolia*.

3.2.2.3 Poliacetilenos

Plantas da família Campanulaceae têm demonstrado a presença de derivados de C14-poliacetileno e por esta razão eles têm sido investigados como potenciais marcadores quimiossistemáticos (BENTLEY et al., 1973; ISHIMARU et al., 2003; WANG et al., 2014). Alguns desses compostos estão presentes no gênero *Lobelia* (FIGURA 4).

3.2.2.4 Neolignanas

Lignoides são compostos cujo esqueleto é formado por um grupo fenilpropânico e são abundantes em plantas ricas em fibras (TEPONNO; KUSARI; SPITELLER, 2016). Yang et al. (2014) relataram o isolamento e identificação das neolignanas, 7,8-eritro- e 7,8-treo-4,9,9'- trihidroxi-3,3'-dimetoxi-8. O.4'-neolignanas em *L. chinensis* (FIGURA 5).

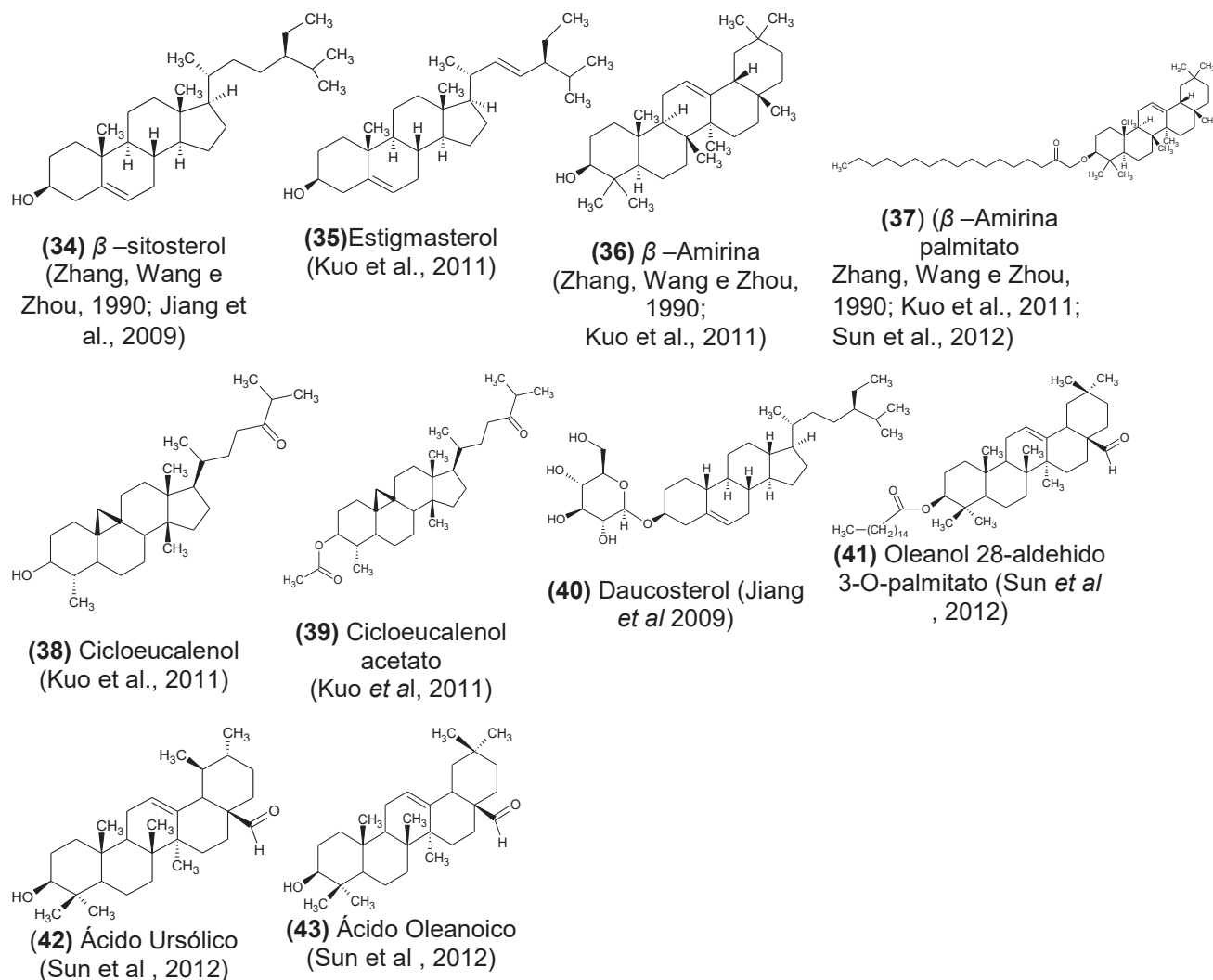
3.2.2.5 Flavonoides

Os flavonoides compreendem um grande grupo de metabólitos secundários caracterizados por uma estrutura de difenilpropano (C6-C3-C6). Eles são amplamente distribuídos no reino vegetal e comumente encontrados em frutas, vegetais e certas bebidas e são geralmente responsáveis pela cor e sabor dos alimentos e principalmente pela alta capacidade de agir como antioxidantes (KUMAR; PANDEY, 2013).

A atividade antioxidante dos flavonoides depende do arranjo de grupos funcionais sobre a estrutura nuclear. A configuração, a substituição e o número total de grupos hidroxila influenciam substancialmente vários mecanismos da atividade antioxidante, como a eliminação de radicais livres e a capacidade de quelação de íons metálicos (CAO; SOFIC; PRIOR, 1997; HEIM; TAGLIAFERRO; BOBILYA, 2002).

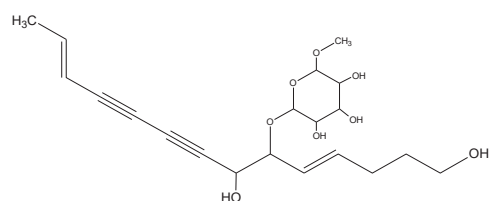
Os flavonoides também protegem os lipídios contra o dano oxidativo na peroxidação lipídica por vários mecanismos (KUMAR; PANDEY, 2012). Íons metálicos livres aumentam a formação de espécies reativas de oxigênio, pela redução do peróxido de hidrogênio com a geração do radical hidroxila altamente reativo. Devido aos seus potenciais “redox” mais baixos os flavonoides são termodinamicamente capazes de reduzir os radicais livres altamente oxidantes, como superóxido, radicais peroxila, alcoxila e hidroxila (MISHRA et al., 2013).

FIGURA 3 - TERPENOIDES ENCONTRADOS NO GÊNERO *Lobelia*



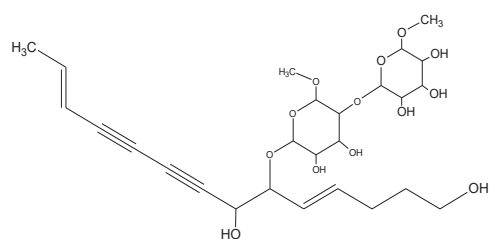
FONTE: A autora (2018)

FIGURA 4 - POLIACETILENOS DE *Lobelia*



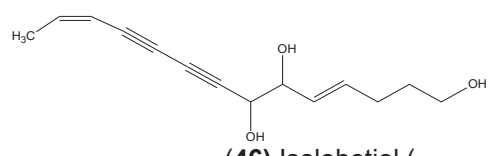
(44) Lobetiolina

(Ishimaru et al, 1991; Balvanyos et al., 2004; Zhou et al., 2008; Kesting et al., 2009)



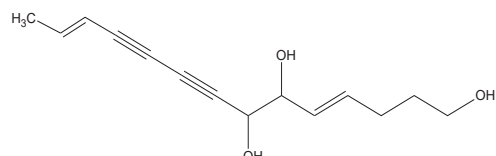
(45) Lobetiolina

(Balvanyos et al., 2004; Zhou et al., 2008; Kuo et al., 2011)



(46) Isolobetiol (

Yang et al., 2014)

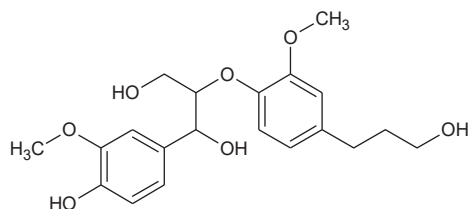


(47) Lobetiol

(Zhou et al., 2008; Yang et al., 2014)

FONTE: A autora (2018)

FIGURA 5 - NEOLIGNANA ENCONTRADA NO GÊNERO *Lobelia*



(48)

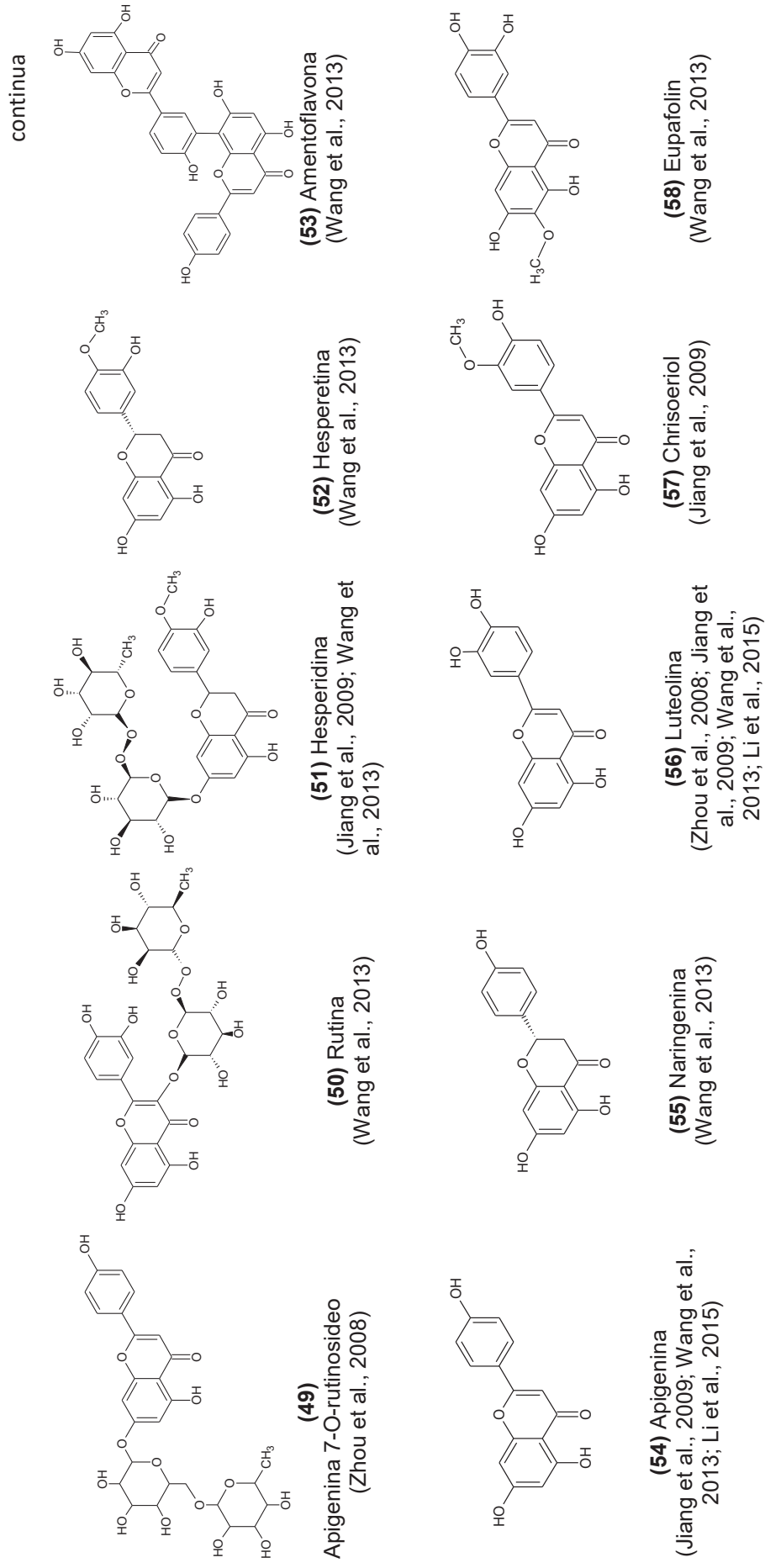
7,8-eritro- e 7,8-treo-4,9,9'- trihidroxi-3,3'-dimetoxi-8.O.4'-neolignanas
(Yang et al., 2014)

FONTE: A autora (2018)

Numerosos estudos pré-clínicos e alguns estudos clínicos sugerem que os flavonoides têm potencial para prevenção e tratamento de várias doenças e podem diminuir o risco de desenvolver câncer e doenças cardiovasculares (LI et al., 2015).

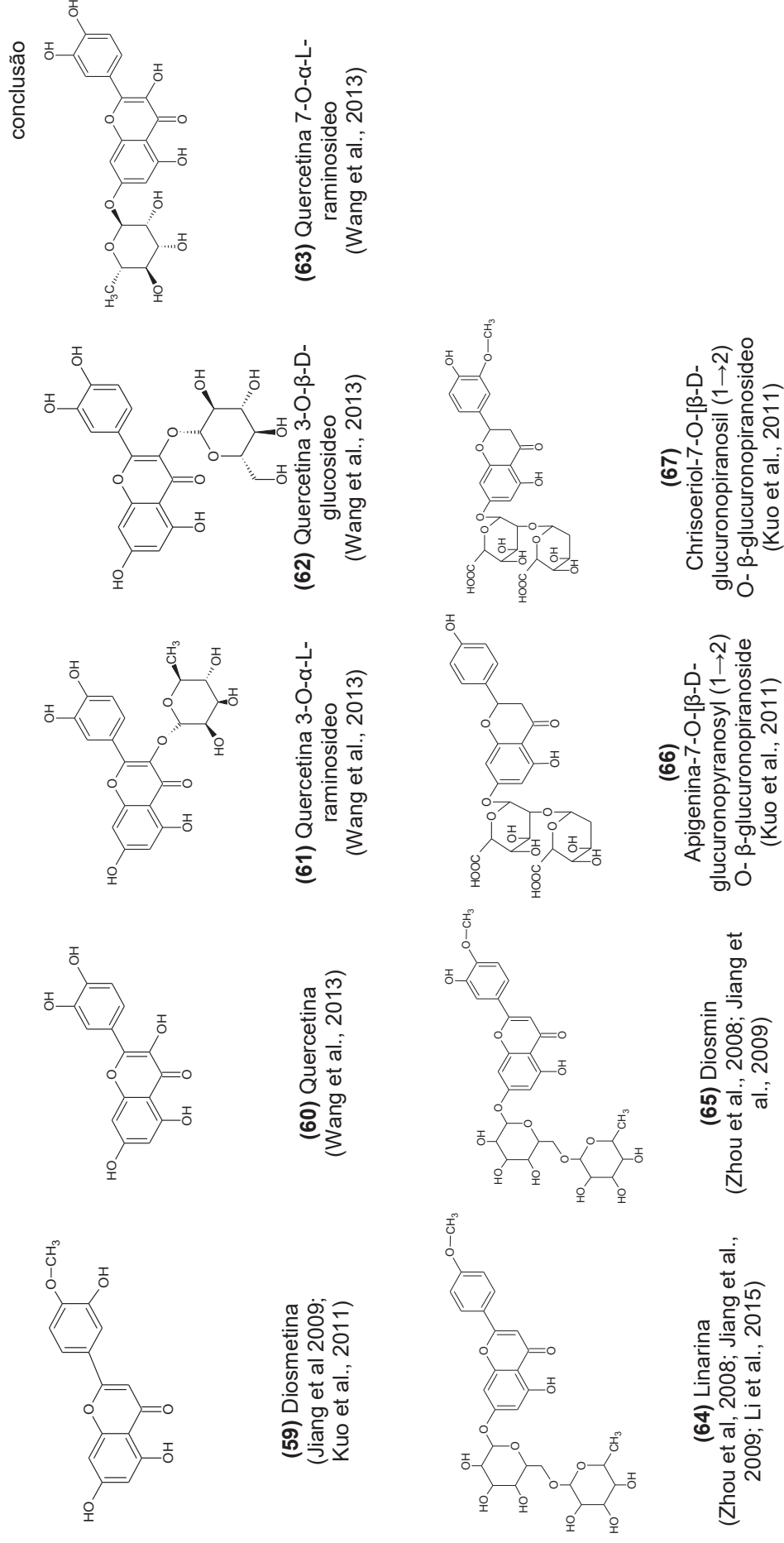
Os flavonoides isolados de *Lobelia sp.* estão apresentados na (FIGURA 6).

FIGURA 6 - FLAVONOIDES ENCONTRADOS NO GÊNERO *Lobelia*



FONTE: A autora (2018)

FIGURA 6 - FLAVONOIDES ENCONTRADOS NO GÊNERO *Labelia*



FONTE: A autora (2018)

3.2.2.6 Cumarinas

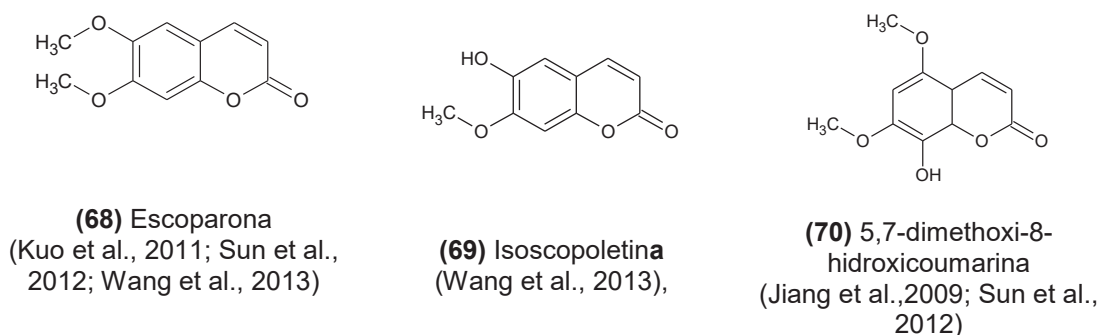
As cumarinas são um grupo de metabólitos secundários que apresentam odor e sabor característicos de baunilha. Elas pertencem ao grupo dos fenilpropanoides, substâncias fenólicas com anéis benzênicos e α -pirona fundidos. Nas plantas, as cumarinas contribuem para a defesa contra fitopatógenos, regulação do estresse oxidativo e, provavelmente, como moléculas de sinalização (TAMOKOU; MBAVENG; KUETE, 2017).

Biologicamente as cumarinas estão sendo estudadas por apresentarem forte atividade farmacológica, menor resistência a drogas, alta biodisponibilidade, amplo espectro, melhores efeitos curativos, para tratamento de vários tipos de doenças (WANG et al., 2009).

Muitos esforços têm sido feitos principalmente no desenvolvimento de anticoagulantes, antioxidantes (BUBOLS; VIANNA, 2013), antimicrobianos (antivirais, antifúngicos e antiparasitários) (MATOS et al., 2013), antineoplásicos baseados em cumarinas (KAPOOR, 2013; XIA et al., 2013).

Boysen e Hearn (2010) isolaram a cumarina escopoletina a partir da planta inteira de *Fatoua pilosa* Gaudich que apresentou relevante atividade anti-*Mycobacterium tuberculosis*. No gênero *Lobelia* três cumarinas foram isoladas da espécie *L. chinensis* (FIGURA 7).

FIGURA 7 - CUMARINAS ENCONTRADOS NO GÊNERO *Lobelia*



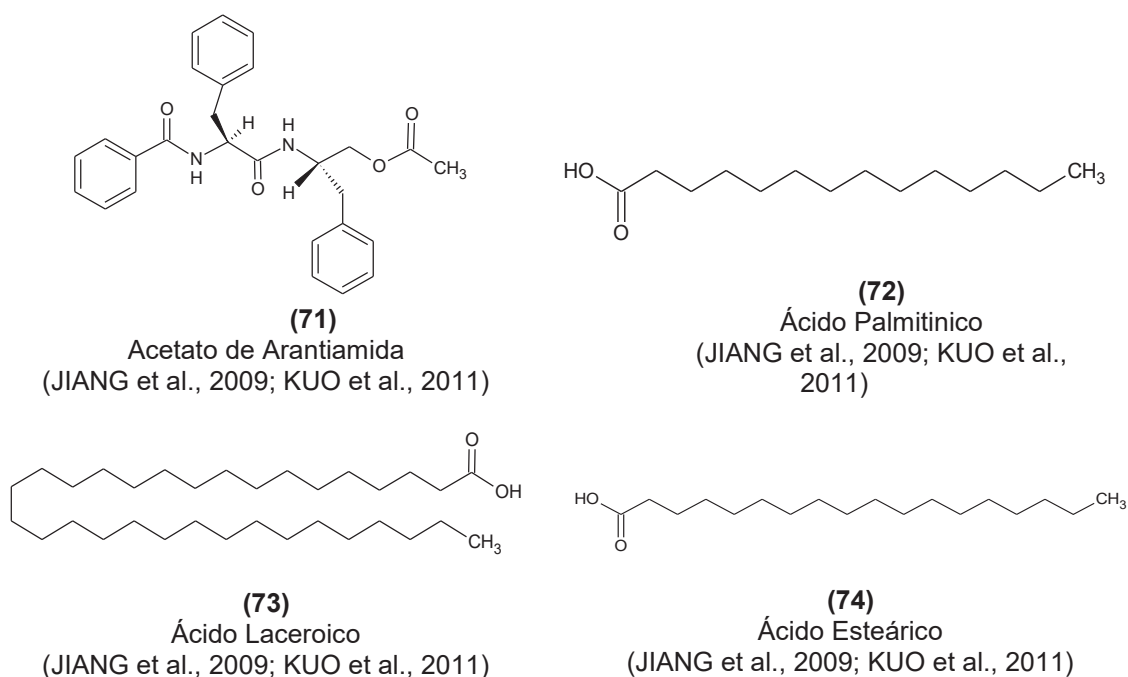
FONTE: A autora (2018)

3.2.2.7 Outros compostos químicos

Além dos compostos químicos descritos acima, Acetato de Arantiamida, Ácido Palmitínico, Ácido Laceroico e Ácido Esteárico foram encontrados em *L. chinensis* (FIGURA 8).

As amidas são produtos intermediários de síntese dos agentes terapêuticos. Quando conjugadas com outro anel alifático, aromático e heterocíclico produzem vários tipos de atividade biológica e estão associadas a um amplo espectro de atividades, incluindo propriedades antituberculose, anticonvulsivante, analgésica, anti-inflamatória, inseticida, antifúngica e antitumoral (KUSHWAHA; SAINI; KUSHWAHA, 2011).

FIGURA 8 - OUTROS COMPOSTOS ENCONTRADOS NO GÊNERO *Lobelia*



FONTE: A autora (2018)

3.2.3. Aspectos Farmacológicos

O gênero é reconhecido em várias farmacopeias devido às suas propriedades de estimulação respiratória em preparações contra asma e bronquite. O sulfato de lobelina é utilizado como substituto da nicotina no tratamento do tabagismo, e o seu hidrocloreto é administrado intramuscularmente como estimulante respiratório (MARTINDALE, 1989).

Os primeiros relatos de uso de *Lobelia* com ação antiasmática foi da espécie americana *L. inflata*, em 1813 por Cutler. Após essa data inúmeros estudos de outras espécies e seus alcaloides foram surgindo (BORIO, 1959).

O seu principal alcaloide, a lobelina é um composto lipofílico que pode ser considerado um agonista nicotínico apresentando efeitos como: bradicardia e hipotensão, hiperalgesia, algesia por administração intratecal, atividade ansiolítica, melhoria do aprendizado e da memória e ainda inibição da ação da anfetamina funcionando indiretamente como um antagonista do receptor de dopamina (DWOSKIN; CROOKS, 2002).

Felipe e Lebetron (2004), em seu estudo sobre a *Lobelia inflata*, comentam que a lobelina apresenta afinidade com receptores nicotínicos. O neurotransmissor acetilcolina atua nos receptores de acetilcolina (AChR), que são divididos em receptores muscarínicos (mAChR) e nicotínicos (nAChR) baseados nas atividades agonistas dos alcalóides, muscarina e nicotina. Os nAChR têm sido o foco de intensa pesquisa em nos últimos anos, devido ao seu envolvimento nos sistemas cognitivo, motor e comportamental. Assim, a modulação de transmissões colinérgicas pode ser útil para a terapia de vários distúrbios do SNC, como a doença de Parkinson e a Doença de Alzheimer. nAChR são encontrados nos músculos esqueléticos na junção neuromuscular e em numerosos locais no sistema nervoso central e periférico.

Os alcaloides piperidínicos, lobelina e lobelane, foram indicados como potenciais candidatos ao tratamento de abuso de metanfetamina por atenuarem os efeitos comportamentais induzidos pela metanfetamina através da interação com VMAT2 (vesicular monoamine transporter-2), onde os alcaloides se ligam ao tetrabenazina (TBZ), local de ligação de VMAT2 e inibe a reabsorção de dopamina (ZHENG et al., 2013).

Lobelane apresentou um efeito de diminuição da auto administração de metanfetamina em ratos (NEUGBAUER et al., 2007).

Tamboli, Rub e Bodhankar (2012) estudaram a atividade anticonvulsivante da lobelina isolada de *Lobelia nicotianaefolia* em cérebros de camundongos em nível GABAérgico, utilizando estricnina e pentilenetetrazol (PTZ) e concluíram que a lobelina exibiu uma potente atividade anticonvulsivante induzida por PTZ.

A lobelina inibiu a atividade de P-gp (P-glycoprotein) envolvida no potencial de resistência a multidroga em células tumorais. O potencial de reverter a resistência a

à drogas pode ser demonstrado em células tratadas com desoxirrubicina na qual a lobelina pode sensibilizar a resistência às células tumorais em concentrações não tóxicas (MA; WINK, 2008).

Há vários outros relatos na literatura sobre atividades anti-inflamatórias, analgésicas e antimicrobianas dos fitoesteróis do gênero *Lobelia* (AHMED, 1992; CECHINEL FILHO, 2000; VIRTUOSO et al., 2005; COSTA et al., 2010; PARVIN et al., 2011; PATIL; RAJPUT, 2012; SEN et al., 2012; TESTA et al., 2012; AHMED, 2013).

O ácido ursólico e o ácido oleanoico, triterpenos encontrados em espécies de *Lobelia*, apresentaram uma série de efeitos biológicos, como sedativo, anti-inflamatório, antibacteriano, antiviral, antiulcerogênico, além de possuir baixa toxicidade para as células normais e agir sobre algumas linhas de células tumorais, incluindo carcinoma da próstata, carcinoma hepatocelular, carcinoma do ovário, carcinoma gástrico, melanoma e outros (LIU, 1995; TORRES-SANTOS et al., 2004; MA et al., 2005; VASCONCELOS et al., 2006; SHAI, 2007; DHARMAPPA et al., 2009; KUETE et al., 2009; LEMES, 2011; FOLQUITTO, 2014; ZANG et al., 2014).

Da fração hexânica de *Lobelia exaltata* foram isolados e identificados os fitoesteróis: sitosterol, campesterol e estigmasterol; além dos triterpenos: ácido ursólico e ácido oleanoico, para os quais foi possível observar uma boa e moderada atividade antibacteriana dos isolados (FOLQUITTO, 2014).

Atividades farmacológicas como antimicrobiana, anti-inflamatória, citotóxica e neuroprotetora foram encontradas em várias publicações e estão ilustradas nas (TABELAS 1 a 6).

TABELA 1 - ATIVIDADES FARMACOLÓGICAS DAS ESPÉCIES DE *Lobelia* - ESTIMULAÇÃO RESPIRATÓRIA

ESPÉCIES DE LOBELIA	EXTRATOS/ COMPOSTOS	MODELO USADO	EFEITOS	REFERÊNCIAS
<i>L. portoricensis</i>	Composto (6) Composto (8)	<i>In vivo</i>	Estimulação respiratória em cães; leve efeito na diminuição da pressão arterial de cães, inibição da ação de ACTH em isolados intestinais em coelhos e porco da Índia.	MELÉNDEZ et al., (1967)

FONTE: A autora (2018)

TABELA 2 - ATIVIDADES FARMACOLÓGICAS DAS ESPÉCIES DE *Lobelia* - ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA

ESPÉCIES DE <i>LOBELIA</i>	EXTRATOS/ COMPOSTOS	MODELO USADO	EFEITOS	continua REFERÊNCIAS
<i>L. laxiflora</i>	Extrato etanólico de caule e flor, fração alcaloide e alcaloides (15), (16) e (17)	<i>In vivo</i> : Indução de edema de pata de rato por Carrageenan-(Car) e veneno de cobra (VC)	Forte supressão do edema de pata por Car-induzido e moderada supressão VC-induzido	PHILIPPOV et al., (1998)
	Fração alcaloide, e alcaloides (16) e (17)	<i>In vitro</i> : em soro normal humano (NHS) por teste de microtitulação	Forte atividade inibitória do sistema complemento (40 a 90%) pela via clássica.	
<i>L. chinensis</i>	Fração clorofórmio	Geração de ânion superóxido;	4,75 µg/ML; Significante inibição do ânion superóxido IC ₅₀ = 6,7 Mm;	KUO et al., 2011
	Composto (70)		Significante inibição do ânion superóxido	
	Fração clorofórmio	Inibição da liberação de elastase pela degranulação de neutrófilo	IC ₅₀ = 2,45 µg/ML; Significante inibição do ânion superóxido	
	Composto (31)		IC ₅₀ = 25 Mm; Moderada inibição do ânion superóxido	
<i>L. nicotianaefolia</i>	Extrato clorofórmico	Indução de inflamação pelo método de contorção induzida pelo ácido acético	100 mg.kg ⁻¹ e 200 mg.kg ⁻¹ ; 28,82% e 48,48% de redução de contorções	VIGNESHWARAN et al., 2014
<i>L. nicotianaefolia</i>	Extrato clorofórmico	Indução de inflamação pelo método de contorção induzida por placa quente	Aumento significativo no tempo médio de latência comparação com o controle	VIGNESHWARAN et al., 2014
	Extrato etanólico		Aumento significativo no tempo médio de latência comparação com o controle	
	Extrato etanólico	Neutralização do veneno de cobra de e sua fração fosfolipase 2 (PLA2) com os extratos seguido de teste em camundongos	DL _{50/12} µg e DL _{100/25} µg; Potencial neutralização da fração PLA2 do veneno de cobra	

TABELA 3 - ATIVIDADES FARMACOLÓGICAS DAS ESPÉCIES DE *Lobelia* - ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA

ESPÉCIES DE <i>LOBELIA</i>	EXTRATOS/ COMPOSTOS	MODELO USADO	EFEITOS	conclusão REFERÊNCIAS
<i>L. chinensis</i>	Extrato metanólico e frações	Citotoxicidade <i>In vitro</i> - Supressão sobre a produção de óxido nítrico induzido por LPS em macrófagos RAW264.7	Não induziu a citotoxicidade	LI et al., 2015
	Fração acetato de etila		Mostrou melhor atividade de inibição de óxido nítrico do que outras frações	
	Fração acetato de etila	<i>In vivo</i> Modelo de lesão pulmonar agudo do rato	Pré-tratamento de ratos (62,5, 125, 250 mg.kg ⁻¹); Diminuição nas citocinas pró-inflamatórias (TNF- α , IL- β , IL-6) e inibição da expressão iNOS, COX-2 expressão através da via NF- κ B.	
<i>L. flaccida</i>	Extrato aquoso	Edema de pata de rato induzido por carrageenan	$DL_{50} \geq 5000$ mg.kg ⁻¹ por via oral; Significante ação anti-inflamatória	STOLOM et al., 2016

FONTE: A autora (2018)

TABELA 4 - ATIVIDADES FARMACOLÓGICAS DAS ESPÉCIES DE *Lobelia* - ATIVIDADE NEUROPROTETORA

continua

ESPÉCIES DE <i>LOBELIA</i>	EXTRATOS/ COMPOSTOS	MODELO USADO	EFEITOS	REFERÊNCIAS
<i>L. nicotianaefolia</i>	Composto (6)	Modelo de convulsão induzida por PTZ	Potente atividade anticonvulsivante frente PTZ	TAMBOLI et al., 2012
<i>L. chinensis</i>	Fração alcaloidal	Método de Ellman's modificado por bioautografia	Baixa atividade inibidora da acetilcolinesterase para tratamento de Doença de Alzheimer	YANG et al., 2012
<i>L. laxiflora</i>	Fração alcaloidal	Método espectrofotométrico	Potente inibição da colinesterase comparada com a serina, de acordo com o método espectrofotométrico ligeiramente modificado	RAHMAN; MONEM, 2014
<i>L. flaccida</i>	Extrato aquoso	Modelo de convulsão induzida por PTZ	Insignificante atividade convulsivante.	STOLOM et al., 2016
<i>L. cardinalis</i>	Composto (9)		Apresentou efeito neuroprotetor pela afinidade de ligação semelhante em $\alpha 4\beta 2$ e $\alpha 7$ -nicAChRs, exibiu atividade agonista em nicAChRs em células SH-SY5Y e inibiu a absorção de [^3H] - dopamina (DA) em sinaptossomas estriados de ratos	BROWN et al., 2016

FONTE: A autora (2018)

TABELA 5 - ATIVIDADES FARMACOLÓGICAS DAS ESPÉCIES DE *Lobelia* - ATIVIDADE ANTITUMORAL

ESPÉCIES DE LOBELIA	EXTRATOS/ COMPOSTOS	MODELO USADO	EFEITOS	REFERÊNCIAS
<i>L. chinensis</i>	Extrato aquoso	Modelo "aberrant crypt foci" (ACF)	Apresento baixa, média de alta inibição em lesão pré-cancerosa em ratos respectivamente (dependente da dose)	HAN et al., 2013
<i>L. chinensis</i>	Compostos (11), (12), (13), (32), (33), (34), (35), (48), (49) e (50)	Ensaio do 5-difenil-2H-tetrazolio bromida (MTT) em linhagens celulares de câncer de pulmão MSTO-211H) e (NCI-H292)	Atividade citotóxica moderada contra os dois tipos de linhagens celulares de câncer de pulmão (48) IC ₅₀ = 12,36 µM e 9,31 µM (49) IC ₅₀ = 11,76 µM e 9,64 µM Outros compostos não apresentaram atividade	YANG et al., 2014

FONTE: A autora (2018)

TABELA 6 - ATIVIDADES FARMACOLÓGICAS DAS ESPÉCIES DE *Lobelia* - ATIVIDADE IMUNOMODULADORA

ESPÉCIES DE LOBELIA	EXTRATOS/ COMPOSTOS	MODELO USADO	EFEITOS	REFERÊNCIAS
<i>L. chinensis</i>	α glucano - BP1	Ensaio do MTT, de liberação de óxido nítrico; efeito do inibidor do receptor Toll-like 4 (TLR4) por ELISA, Ensaio de fagocitose com macrófagos RAW 264,7	Aumento da proliferação celular, fagocitose, produção de óxido nítrico e secreção de citocinas de maneira dependente da dose.	LI et al., 2016

FONTE: A autora (2018)

TABELA 7 - ATIVIDADES FARMACOLÓGICAS DAS ESPÉCIES DE *Lobelia* - INIBIDORES DE α-GLICOSIDASES

ESPÉCIES DE LOBELIA	EXTRATOS/ COMPOSTOS	MODELO USADO	EFEITOS	REFERÊNCIAS
<i>L. sessifolia</i>	Composto (18)	<i>In vitro</i> Métodos enzimáticos e colorimétricos	Atividade inibitória de glicosidases. Apresentou significativo potencial inibitório para α trehalase de rim suino	IKEDA et al., 2000
<i>L. chinensis</i>	Compostos (19) e (20)	<i>In vitro</i> Métodos enzimáticos e colorimétricos	Atividade inibitória de α-glicosidases	SHIBANO et al., 2001

FONTE: A autora (2018)

3.2.4 Lobelia exaltata Pohl

Lobelia exaltata Pohl é conhecida popularmente como “lobelia” sendo *Dortmanna exaltata* (Pohl) Kuntze, *Haynaldia exaltata* (Pohl) Kanitz, *Rapuntium exaltatum* (Pohl) C. Presl as sinonímias encontradas (TAKEDA e FARAGO, 2001; FLORA DO BRASIL, 2018). No (QUADRO 1) é apresentada a classificação da espécie em estudo de acordo com Engler e Cronquist.

QUADRO 1 -- ENQUADRAMENTO TAXONÔMICO DE *Lobelia exaltata* Pohl.

CLASSIFICAÇÃO TAXONÔMICA		
	Engler (1964)	Cronquist (1981)
Reino	Plantae	Plantae
Divisão	Embryophita	Magnoliophyta
Classe	Dicotyledoneae	Magnoliopsida
Sub-Classe	Sympetalae	Asteridae
Ordem	Campanulales	Campanulales
Família	Campanulaceae	Campanulaceae
Gênero	<i>Lobelia</i>	<i>Lobelia</i>
Espécie	<i>Lobelia exaltata</i> Pohl	<i>Lobelia exaltata</i> Pohl

FONTE: A autora (2014)

No Brasil, *L. exaltata* ocorre nas regiões Sul (PR, SC e RS) e Sudeste (MG, SP, PR) (BRAGA, 1956; TRINTA; SANTOS, 1989; TAKEDA; FARAGO, 2001; VIEIRA, 2010; FLORA DO BRASIL, 2018). No estado do Paraná, na região de Ponta Grossa, pode ser encontrada com muita frequência em banhados e lugares brejosos (FIGURA 9).

L. exaltata é uma espécie endêmica, nativa do Brasil, com altura de aproximadamente 1,5 e 3,5 m. Apresenta folhas sésseis, cartáceas, de filotaxia alternas, forma lanceolada, margem denteada (FIGURA 10). O caule é fistuloso e assim como a folha, glabro. As inflorescências são racemosas que podem ser únicas ou possuírem inflorescências secundárias na forma de candelabro, hirsutas ou glabras no eixo. As brácteas são lineares, lobo do cálice triangular e corola tubulosa com fendas longitudinais, a simetria das flores é zigomorfa com hipanto ovoide.

FIGURA 9 - *Lobelia exaltata* Pohl EM SEU HABITAT.



FONTE: A autora (2015)

Geralmente apresenta corola que varia entre branca e creme esverdeada (FIGURA 10). O fruto é do tipo cápsula com a metade livre e as sementes são inúmeras, pequenas e aladas. O sistema laticífero é bem desenvolvido e é possível observar o escoamento do látex esbranquiçado quando do rompimento de raiz, caule, folha, flor e fruto (BRAGA, 1956; VIEIRA, 1988, TAKEDA; FARAGO, 2001; FOLQUITTO, et al., 2014).

No estudo morfoanatômico de Folquitto et al. (2014) foi demonstrado que epiderme da lâmina foliar de *L. exaltata* apresenta-se uniestratificada. A cutícula é estriada e delgada em ambas as faces. A folha é anfiestomática com estômatos do tipo anisocíticos. O mesofilo é dorsiventral como frequentemente encontrado na família Campanulaceae. *L. exaltata* não apresenta tricomas em folhas e caules o que, neste aspecto, a diferencia facilmente da *Lobelia hassleri* Zahlb que externamente são muito semelhantes. O látex viscoso de coloração branca pode estar situado nos laticíferos próximos ao sistema floemático.

FIGURA 10 - ASPECTOS GERAIS DAS FOLHAS JOVENS E INFLORESCÊNCIA DE *Lobelia exaltata* Pohl

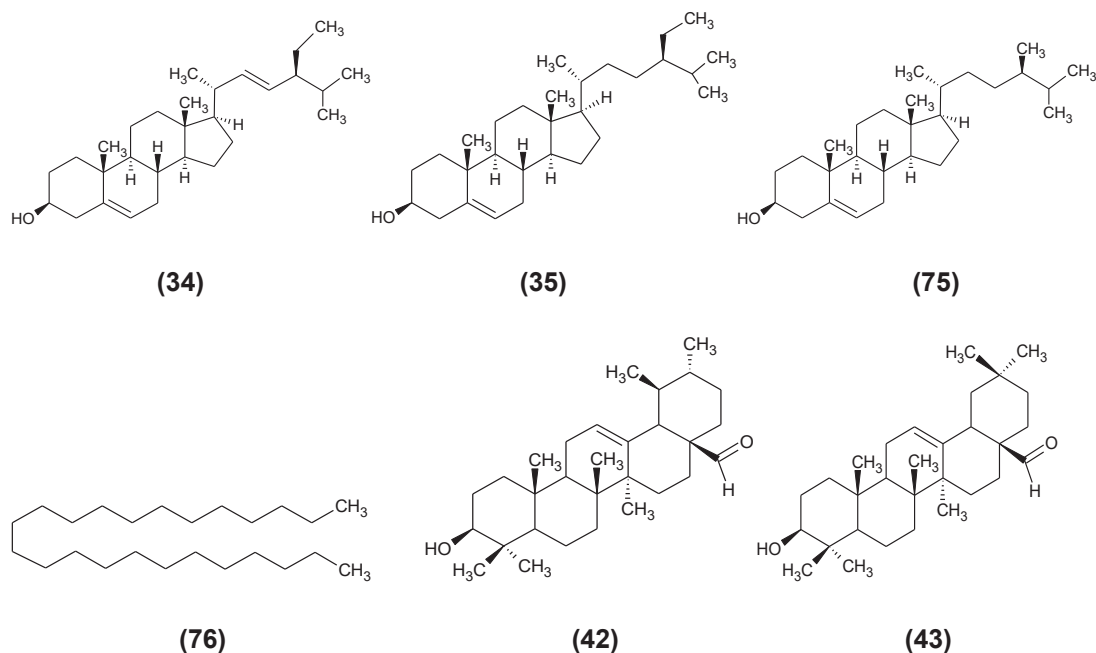


FONTE: A autora (2015)

Há poucos relatos na literatura sobre a utilização medicinal da espécie brasileira *Lobelia exaltata*. A única referência encontrada foi a de PIO-CORRÊA (1984) que em seu Dicionário das Plantas Úteis do Brasil e das Exóticas Cultivadas menciona a utilização popular de *L. exaltata* para tratar problemas cardíacos. Apesar disso, observou-se em estudos preliminares que esta espécie assim como o gênero, produzem importantes metabólitos secundários, como alcaloides, flavonoides, triterpenos e esteroides (FOLQUITTO et al, 2014).

Em um estudo realizado com as partes aéreas de *L. exaltata*, Folquitto (2014) isolou e identificou os seguintes compostos: diosmin **(65)**; ácido ursólico **(42)**, ácido oleanoico **(43)**; campesterol **(75)**, estigmasterol **(34)**, sitosterol **(35)** e o n-alceno, tetracosano **(76)**, conforme ilustra a (FIGURA 11) abaixo.

FIGURA 11 - ESTRUTURA QUÍMICA DOS COMPOSTOS ISOLADOS DE *Lobelia exalata* POHL



Fonte: A autora (2018)

3.3 ALGUMAS ATIVIDADES BIOLÓGICAS DE PLANTAS MEDICINAIS

3.3.1 Atividade Ansiolítica

Ansiedade é definida como “um estado de intensa apreensão incerteza e medo resultantes da antecipação de um evento ou situação ameaçadora, frequentemente em um grau em que o funcionamento físico e psicológico normal é interrompido” (APA, 2013). Confere ao indivíduo a capacidade de usar informações e experiências passadas para prever o futuro, permitindo o aumento das chances de resultados desejados. Quando a ansiedade se torna excessiva, pode ser considerada um transtorno e reduzir criticamente a qualidade de vida induzindo diversas doenças psicossomáticas (GRUPE; NITSCHKE, 2013; CORDIOLI et al, 2014).

Os transtornos de ansiedade compreendem agorafobia, fobia específica, transtorno de ansiedade social (fobia social), ataques de pânico, transtorno de ansiedade de separação e mutismo seletivo (APA, 2013). Dentre os distúrbios que afetam o sistema nervoso central (SNC), a ansiedade é uma das condições mais frequentemente diagnosticadas no mundo (BAXTER et al., 2014). De acordo com a

Anxiety and Depression Association of America (ADAA) (2016), 275 milhões de pessoas apresentam este tipo de desordem sendo as mulheres as mais afetadas.

Aproximadamente dois terços dos pacientes ansiosos respondem aos tratamentos atualmente disponíveis, mas a magnitude da melhora ainda não é satisfatória. Além disso, o tratamento também produz vários efeitos colaterais sistêmicos e exibem dependência e tolerância no tratamento crônico (CHATTERJEE et al., 2012). As substâncias ansiolíticas pertencentes principalmente às do grupo dos benzodiazepínicos e ocupam um lugar de destaque no “ranking” das drogas mais utilizadas (UHLENHUTH et al., 1999). Os benzodiazepínicos apresentam ação via receptor GABA (complexo molecular receptor-benzodiazepínico-ácido gama-aminobutírico do tipo A ou GABA-A, sendo que este receptor contém uma região específica de ligação para os benzodiazepínicos e para outras moléculas como os barbitúricos e álcool) (AZEVEDO; ALÓE; HASAN, 2004). O composto mais utilizado é o diazepam (PRUT; BELZUNG, 2003), no entanto, os usos clínicos dos benzodiazepínicos são limitados por seus efeitos colaterais como comprometimento psicomotor, sedação, miorelaxamento, ataxia, amnésia, potencialização de outros fármacos depressores centrais e dependência (CZOBOR et al., 2010). Com isso, observa-se uma busca incessante por novos fármacos com maior eficácia e menores efeitos colaterais.

As plantas medicinais são fontes amplamente aceitas, que desempenham um papel importante no programa de assistência médica em todo o mundo e tradicionalmente exibem propriedades farmacológicas com grande potencial para aplicações terapêuticas no tratamento de distúrbios do sistema nervoso central como distúrbios de ansiedade (CARLINI, 2003; FAUSTINO; ALMEIDA; ANDREATINI, 2010).

3.3.2 Atividade Anticonvulsivante

A epilepsia é um distúrbio do cérebro caracterizado por uma predisposição duradoura para gerar convulsões epiléticas com consequências neurobiológicas, cognitivas, psicológicas e sociais. (FISHER et al., 2014). Uma convulsão é uma descarga paroxística anormal dos neurônios cerebrais devido à hiperexcitabilidade cortical. A nova Classificação Internacional de Convulsões divide-as em 3 categorias:

início generalizado, início focal (anteriormente crises parciais) e início desconhecido (FISHER, 2017).

Fisiologicamente, uma convulsão resulta de uma descarga elétrica de alta voltagem de neurônios suscetíveis dentro de um foco epileptogênico (mecanismo que cria aumento persistente na probabilidade de convulsões espontâneas). Esses neurônios são conhecidos por serem hiperexcitáveis e por razões desconhecidas, permanecem em um estado de despolarização parcial (STALEY, 2015).

Os neurônios que cercam o foco epileptogênico são GABA-érgicos (liberam ácido gama-aminobutírico) e hiperpolarizados, e inibem os neurônios epileptogênicos. Às vezes, quando os neurônios epileptogênicos superam a influência inibitória circundante, a descarga de convulsões se espalha para estruturas corticais vizinhas e depois para estruturas subcorticais do tronco encefálico (KRALIC et al., 2002).

A epilepsia afeta todas as faixas etárias e é um dos distúrbios neurológicos mais comuns e mais incapacitantes. O diagnóstico preciso das convulsões é essencial, pois alguns pacientes podem ser diagnosticados erroneamente com epilepsia, levando a tratamentos incorretos, o que muitas vezes tem consequências graves. Embora muitos pacientes tenham controle de crises usando um único medicamento, outros requerem vários medicamentos, cirurgia ressecatória, dispositivos de neuromodulação ou terapias dietéticas. Além disso, um terço dos pacientes continuará a ter convulsões não controladas. (DEVINSKY et al., 2018).

Inúmeras pesquisas visam descobrir novas estratégias farmacológicas anticonvulsivantes a partir de plantas medicinais para auxiliar no desenvolvimento de novos fármacos pela indústria farmacêutica. Na revisão de Quintans Junior et al. (2008) sobre plantas com propriedades anticonvulsivantes foram encontradas 16 plantas na flora brasileira com indicação para o tratamento de quadros convulsivos.

3.3.3 Atividade Neuroprotetora

Doença de Parkinson (DP) é uma doença neurovegetativa crônica e progressiva, descrita pela primeira vez em 1817 por James Parkinson como uma síndrome de múltiplos sinais físicos, como bradicinesia / acinesia, rigidez, distúrbios posturais e tremores (JANKOVIC, 2008; AMRO et al., 2018).

Duzentos anos depois da importante descrição de James Parkinson sobre "a paralisia trêmula", a maioria de suas observações clínicas originais resistiu ao teste do tempo. Além da percepção da DP como um distúrbio do movimento, tornou-se aparente outras características não motoras, como comprometimento cognitivo, disfunção autonômica, distúrbios do sono, depressão e hiposmia (odor prejudicado), fazem parte da doença e adicionam-se consideravelmente ao fardo total (POEWE et al., 2017).

Acredita-se que a causa da DP é a perda ou degeneração progressiva dos neurônios dopaminérgicos na substância nigra *pars compacta* (SNc) que comumente usam dopamina para se comunicar com outras células na região além do desenvolvimento de corpos de Lewy (uma marca patológica) em neurônios dopaminérgicos (MACPHEE; STEWART, 2006). Essa perda preferencial de neurônios produtores de dopamina resulta em acentuado comprometimento do controle motor. Os corpos de Lewy, ou agregados intracelulares anormais, contêm várias proteínas, incluindo a alfa-sinucleína e a ubiquitina, que prejudicam o funcionamento ótimo dos neurônios (BEITZ, 2014; AMRO et al., 2018).

Algumas publicações sugerem que o estresse ambiental e o próprio envelhecimento podem promover a neuropatologia (uma inflamação crônica no cérebro, especificamente, a exposição às toxinas ambientais como por exemplo, pesticidas, drogas de abuso, ou o estresse do processo de envelhecimento).

Esse processo inflamatório ao longo do tempo gera senescência celular em neurônios do cérebro. Do ponto de vista patológico, a substância nigra *pars compacta* do cérebro e o *Locus Ceruleus* são afetados por anormalidades típicas de pacientes com DP, incluindo despigmentação, perda neuronal e gliose. No momento em que os sintomas da DP ocorrem, cerca de 60-70% dos neurônios da substância nigra *pars compacta* desaparecem (CECCATELLI, 2013; CHINTA et al., 2013).

Sobre a sintomatologia, além dos distúrbios clássicos do movimento, também podemos citar os sintomas não-motores como: depressão, apatia, ansiedade, sintomas maníacos, prejuízo da memória, disfunção olfatória, hipotensão ortostática, incontinência urinária, constipação intestinal, sialorreia, alucinações e delírios, hipersexualidade, síndrome de desregulação dopaminérgica (MARSH, 2013; JANKOVIC, 2007; CHEN; CHENG, 2008; TOLOSA et al., 2009; AARSLAND, 2012).

A depressão é o sintoma cognitivo mais comum na DP, que ocorre principalmente pela falta de ou insuficiência de dopamina na região nigroestriatal (TADAIESKY et al., 2008). Apatia, desinteresse por atividades diárias, familiares, objetos, além de ansiedade e perda da autoestima são frequentes. (SCHRAG, 2004; Grover et al., 2015). A sintomatologia da própria DP pode ser confundida com depressão pois nos dois casos há sintomas de perda de peso, apatia, anedonia, aparência triste, perda de energia, com isso a doença é negligenciada e os pacientes demoram mais a receber tratamento levando a um maior comprometimento cognitivo e de suas atividades diárias.

Além da depressão, os pacientes com DP também apresentam problemas com a memória e dificuldades no aprendizado. As memórias podem ser classificadas de acordo com seu tempo de retenção, sua natureza, ou conteúdo em: memória declarativa ou explícita; memórias implícitas ou não declarativas e memórias operacionais ou de trabalho. O prejuízo da memória ocorre pela diminuição nos níveis de dopamina nos gânglios da base levando a um prejuízo nas memórias implícitas e no córtex pré-frontal, levando a um prejuízo nas memórias operacionais (BEZARD et al., 2001; PRADO, 2008).

O desenvolvimento da demência na DP é muito comum e se agrava com a progressão da doença. Consiste numa síndrome disexecutiva com comprometimento da atenção, funções executivas e, secundariamente, a memória. Perdas da inervação colinérgica, dopaminérgica e noradrenérgica têm sido sugeridas como sendo os principais déficits neuroquímicos. Embora existam controvérsias com respeito ao sítio e tipo de patologia envolvida, a demência está provavelmente associada com a difusão das lesões da DP para outros núcleos subcorticais e para o sistema límbico e córtex cerebral. A patologia principal parece ser uma degeneração dos corpos de Lewy com perda celular e sináptica nas estruturas corticais e límbicas (EMRE, 2003; CAIXETA; VIEIRA, 2008).

A diminuição da função olfatória (hiposmia) é um dos sinais mais prevalentes na DP e pode anteceder os sintomas motores da DP. Algumas pesquisas relacionam a hiposmia ao decréscimo do transporte estriatal da dopamina, atribuindo aos testes olfatórios valor de diagnóstico pré-clínico. A maioria dos pacientes com DP não percebem sua dificuldade olfatória antes de serem testados para tal (QUAGLIATO et

al., 2007). Técnicas para detecção desse sintoma podem ser desenvolvidas para auxiliar no diagnóstico precoce da DP (MORLEY; DUDA, 2011).

As terapias farmacológicas utilizadas no tratamento dos sintomas motores da doença, com frequência agravam a sintomatologia cognitiva podendo levar ao aparecimento de alucinações após longo período de utilização. Nenhuma das terapias atuais para qualquer um dos distúrbios neurodegenerativos diminui ou interrompe a neurodegeneração, e os pacientes com esses distúrbios pioram progressivamente (YACOUBIAN, 2017).

Diversos estudos com modelos animais foram realizados utilizando toxinas como a 6-hidroxidopamina (6-OHDA) e como 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetraidropiridina (MPTP) que comprovaram o desenvolvimento de depressão e outros sintomas cognitivos nos animais testados (SMEYNE; JACKSON-LEWIS, 2005; REKSIDLER et al., 2009; YASSUDA et al., 2011; PAUL et al., 2017). Estudos com animais utilizando 6-OHDA, nos quais foram realizados testes de labirintos aquáticos mostraram alterações na memória espacial, evidenciando deficiências de memória semelhante as encontradas nas fases iniciais da DP (FERRO et al., 2005; TADAIESKY et al., 2008).

3.3.4 Atividade Citotóxica

O câncer é a principal razão para mortalidade envolvendo de alguma forma mais de um terço da população global. A alta toxicidade e complicações relacionadas aos antineoplásicos e frequentes recidivas impulsionam a busca científica para descoberta de novas drogas com ações antitumorais (NEWMAN, CRAGG; SNADER, 2003; BUTLER, 2004; ASADI-SAMANI et al., 2015). Cerca de 70% das drogas antitumorais existentes no mercado foram desenvolvidas a partir de produtos naturais (CALIXTO, 2003). Essas substâncias primeiramente precisam ser testadas em ensaios de citotoxicidade *in vitro*, como por exemplo o método do corante vital 3(4,5-dimetiltiazol-2il)-2,5-difenil brometo de tetrazolina (MTT). Esse método é muito utilizado para a determinação da viabilidade de células isoladas e para avaliar a função celular em nível mitocondrial (PEREIRA, 2017).

Um exemplo importante é o da *Catharanthus roseus* (L.) G. Don, conhecida popularmente como vinca. Esta espécie era utilizada pela população de Madagascar

para o tratamento de diabetes, porém durante experimentos científicos demonstrou atividade antitumoral em modelos de leucemias e linfomas levando ao isolamento dos alcaloides vimblastina e vincristina, atualmente, muito utilizados no tratamento de linfoma de Hodgkin, sarcoma de Kaposi, câncer de ovário e testículos e leucemia linfoblástica aguda infantil (BRANDÃO et al., 2010).

No gênero *Lobelia*, o extrato aquoso de *L. chinensis* foi estudado em lesões pré-cancerosas de cólon de ratos, induzidos por dimetilhidrazina (DMH) e utilizando o modelo "aberrant crypt foci" (ACF). O número de células apoptóticas de ratos no grupo DMH não diferiu significativamente do grupo controle, enquanto que a diferença entre o grupo controle e o grupo com tratamento com *L. chinensis* foi clara, evidenciando um efeito antitumoral desta espécie (HAN et al, 2013).

3.3.5 Atividade Inseticida

Os insetos ocupam lugares fundamentais nos ecossistemas do mundo e atualmente mais de um milhão de espécies de insetos são conhecidas. (NIROUMAND, 2016). No entanto, alguns insetos podem transportar parasitas e microrganismos que são prejudiciais aos seres humanos por transmitirem doenças, danificarem as culturas e elevarem os custos relacionados a agricultura. Apesar de existir um vasto número de inseticidas sintéticos, o uso destes têm sido restritos, por seu alto custo, efeitos ambientais prejudiciais e aumento da resistência a inseticidas (JBILOU; ENNABILI; SAYAH, 2006).

Substâncias com menores riscos à saúde humana e ao ambiente vem sendo avaliadas. Os problemas decorrentes da utilização de pesticidas apontam para a necessidade de se desenvolver novos tipos de agentes de controle mais seletivos e menos agressivos ao homem e ambiente (CORREA; SALGADO, 2011).

As espécies vegetais são alternativas eficientes aos inseticidas visto que se apresentam como ricas fontes de novas substâncias naturais que podem ser utilizadas para desenvolver métodos eficazes, sustentáveis e seguros para o controle de insetos (YANG; TANG, 1988; KHAN et al., 2017).

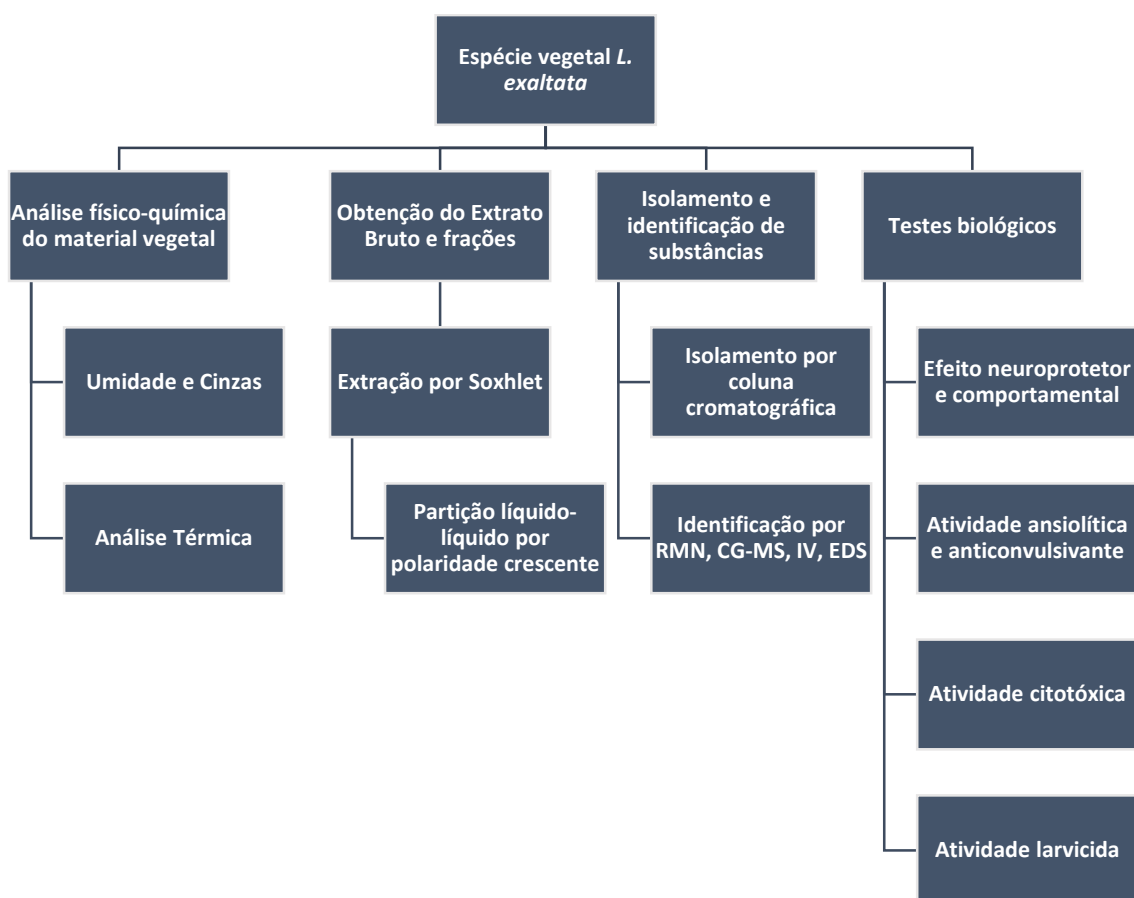
A atividade inseticida de plantas, seus derivados ou extratos têm sido desenvolvida por diferentes estratégias de controle de pragas. Os efeitos deletérios dos extratos vegetais ou compostos puros sobre os insetos avaliam seus efeitos

tóxicos, letais, repelentes, “antifeedant”, fumigantes, reguladores do crescimento e efeito deterrente na oviposição (NIROUMAND, 2016).

4 MATERIAL E MÉTODOS

A presente pesquisa abrange 4 diferentes linhas de análise da espécie vegetal *L. exaltata*. A (FIGURA 12) mostra um resumo das técnicas e métodos empregados em cada parte da pesquisa científica realizada com a espécie em estudo.

FIGURA 12 - FLUXOGRAMA DA PESQUISA CIENTÍFICA REALIZADA COM *L. exaltata*



Fonte: A autora, 2018.

O trabalho foi regularizado de acordo com a resolução nº. 35, de 27 de abril de 2011, do Ministério do Meio Ambiente, que prevê o acesso às atividades do patrimônio genético.

4.1 OBTENÇÃO DO MATERIAL VEGETAL

4.1.1 Coleta, Identificação e exsiccata

O material vegetal foi coletado em 16 de março de 2015, no município de Ponta Grossa (25°15'32"S e 50°13'87"O, 835m de altitude), Paraná, Brasil, submetido à dessecação em estufa a 40°C com circulação de ar úmido. A seguir o material foi seccionado em moinho de facas, reduzido a pó (BRASIL, 2010) constituindo massa equivalente a 2.671,81g. O material vegetal foi acondicionado em recipientes ao abrigo da luz e umidade para ser utilizado posteriormente em ensaios químicos e biológicos.

Uma exsicata foi preparada com o material vegetal florido e enviada ao herbário do Instituto de Ciências Naturais da Universidade Federal do Rio Grande do Sul para a sua identificação taxonômica. Este material foi analisado e identificado pelo Dr. Nelson Ivo Matzenbacher como sendo *Lobelia exaltata* Pohl, Campanulaceae, sob registro ICN - Nº 192140.

4.2 ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS

4.2.1 Determinação da perda de água por dessecação

A metodologia escolhida para a determinação da perda de água por dessecação foi adaptada da Farmacopeia Brasileira (2010). O ensaio foi realizado em sextuplicata, na qual as partes aéreas pulverizadas (5g) foram colocadas em 6 cadinhos e levadas à estufa a 100° C por 1h. Posteriormente foram acondicionados em dessecador até atingir a temperatura ambiente e pesadas até peso constante.

4.2.2 Determinação de Cinzas totais

O método utilizado para determinação das cinzas totais foi realizado segundo a Farmacopeia Brasileira (2010). A amostra seca pulverizada (5g) foi acondicionada em cadinhos previamente calcinados, arrefecidos e pesados. As amostras foram incineradas em mufla (EDG 3000 10P-S), aumentando-se gradativamente a temperatura até, no máximo 600°C± 50 °C por 4 h ou até que todo carvão tenha sido eliminado. O material foi resfriado em dessecador e pesado. As análises foram realizadas em sextuplicata e a porcentagem de cinzas totais em relação ao material seco foi calculada.

4.3 ESTUDO TERMOANALÍTICO

O estudo termooanalítico das partes aéreas de *L. exaltata* foi realizado por termogravimetria (TG) e por calorimetria exploratória diferencial (DSC).

A curva de TG foi obtida no intervalo de temperatura de 20 a 600°C, utilizando termobalança modelo DTA 50 da marca Shimadzu, sob atmosfera dinâmica e fluxo de ar sintético (150 mL.min⁻¹), razão de aquecimento de 15 °C.min⁻¹, utilizando cadinho de alumínio aberto contendo massa de amostra em torno de 5 mg de folhas e caules secos de *L. exaltata*. A calibração do instrumento foi verificada antes dos ensaios empregando-se um padrão de oxalato de cálcio monoidratado, conforme norma ASTM (The American Society for Testing and Materials) (1983).

Também foram obtidas curvas de TG e DSC a partir de 10 mg de amostras de folhas e caules secos de *L. exaltata*, aquecidas a uma taxa constante de 10 °C.min⁻¹, sendo obtidas no intervalo de temperatura entre 20 e 600°C, sob fluxo de nitrogênio (50 mL.min⁻¹), em célula calorimétrica de alumina aberta. O instrumento STA 6000 (PERKIN ELMER, Whaltam, MA, Estados Unidos) foi calibrado usando Índio (In; PF: 156,6 °C; $\Delta H_{\text{fusão}}$: 28,54 J.g⁻¹) como padrão.

4.4 ANÁLISE FITOQUÍMICA

4.4.1 Obtenção dos Extratos

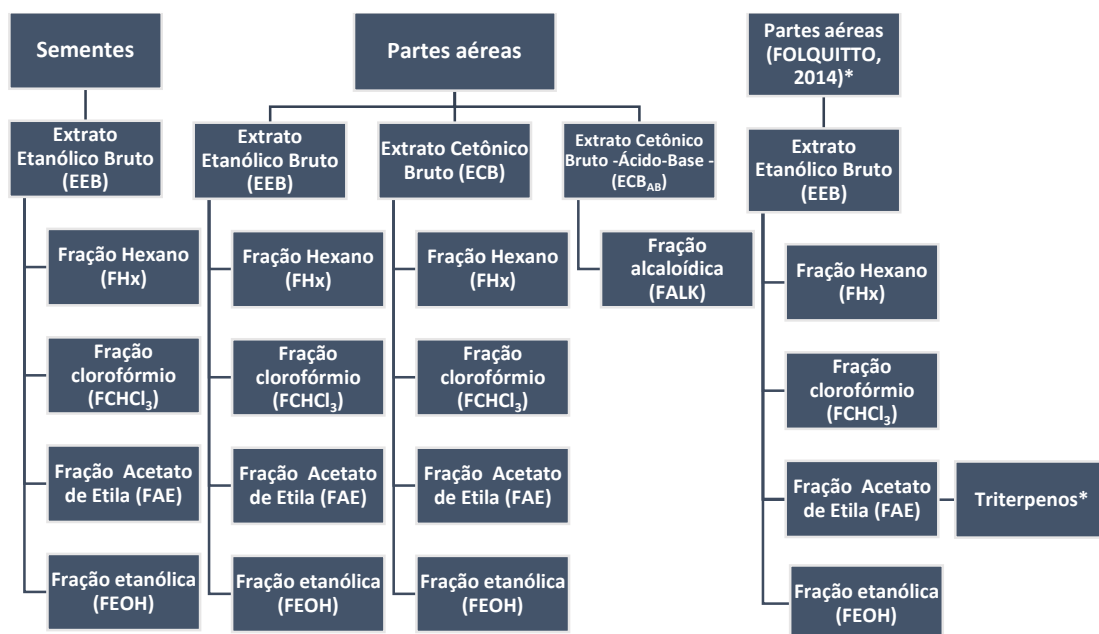
Os extratos e frações de *L. exaltata* utilizados nesta pesquisa foram obtidos de diferentes formas. A (FIGURA 13) mostra um resumo desses procedimentos. Todos os solventes empregados foram de grau analítico.

4.4.2 Obtenção do Extrato Etanólico Bruto (EEB) das partes aéreas

As partes aéreas de *L. exaltata* (2.671,81 g) foram submetidos a extração em um aparelho de Soxhlet modificado utilizando 4500 mL de etanol 96% como líquido extrator por um período de 24 horas, com esgotamento total da extração (CARVALHO, 2001). O extrato obtido foi filtrado e submetido à concentração em Soxhlet por destilação até ¼ do seu volume e posteriormente levado ao banho-maria para

remoção total do solvente. O extrato obtido (282,76g) foi mantido sob refrigeração para posterior particionamento.

FIGURA 13 - OBTENÇÃO DOS EXTRATOS E FRAÇÕES CETÔNICOS E ETANÓLICOS DAS PARTES AÉREAS E SEMENTES DE *L. exaltata*



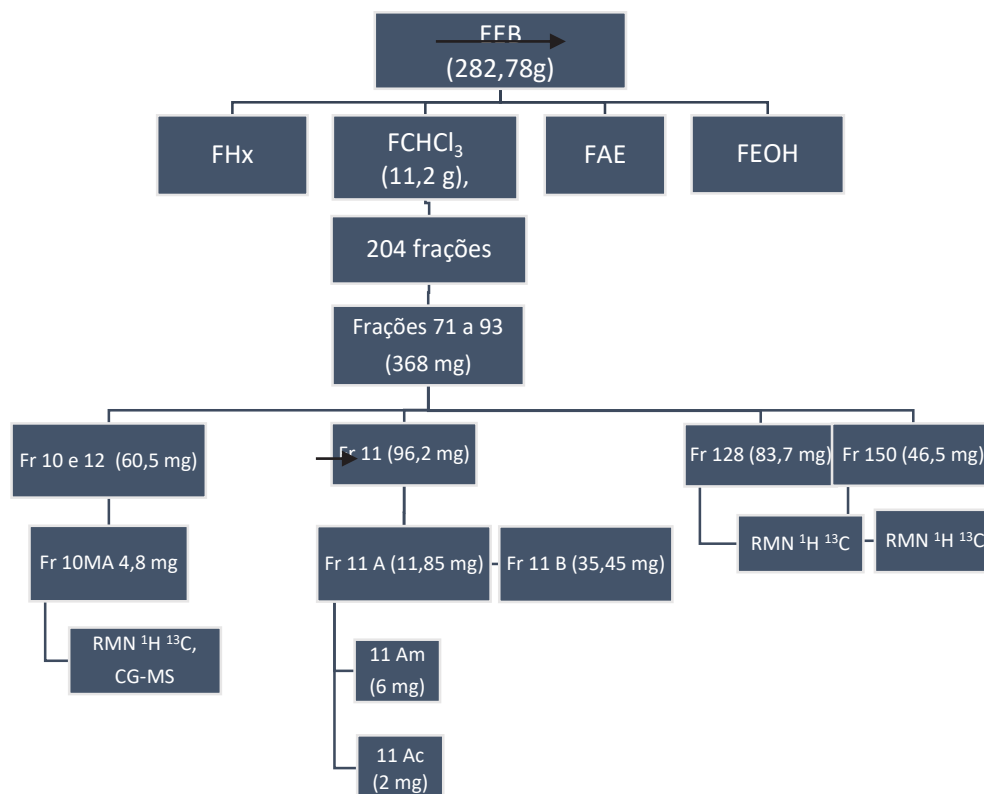
* Triterpenos foram obtidos a partir das partes aéreas durante a pesquisa de mestrado (FOLQUITTO, 2014) e foi utilizado na atual pesquisa para realização de testes de citotoxicidade.
 FONTE: A autora (2018)

4.4.3 Fracionamento do Extrato Etanólico Bruto (EEB)

A partição líquido-líquido consiste na separação dos componentes de uma mistura baseado nos coeficientes de partição entre dois solventes imiscíveis e propicia uma semi-purificação dos constituintes aplicados à extração (CECHINEL FILHO e YUNES, 1998).

A (FIGURA 14) sumariza os procedimentos de fracionamento e purificação do EEB descritos a seguir.

FIGURA 14 - FLUXOGRAMA DO PROCEDIMENTO DE PURIFICAÇÃO DO EXTRATO ETANÓLICO BRUTO



FONTE: Autora (2018)

Nota:

O EEB de *L. exaltata* foi particionado por meio de aparelho de Soxhlet modificado conectado ao condensador de bolas e a um balão de fundo chato com pérolas de vidro. Todo o sistema foi levado ao aquecimento em manta aquecedora, deixado sob refluxo até esgotamento. Foram utilizados solventes em escala de polaridade crescente e obtidas as frações: hexano (FHx), clorofórmio (FCHCl₃) e acetato de etila (FAE) e etanólica (FEOH).

Para a extração com solventes menos densos que o extrato bruto (hexano e acetato de etila) foi necessário utilizar um cartucho de vidro e funil adaptado até a base do cartucho, em aparelho de Soxhlet convencional. Neste caso, o solvente contido no balão é aquecido e evaporado e, após condensação, goteja dentro do funil, passando por dentro do cartucho. Assim, o extrato particionado de baixo para cima, promove o arraste de substâncias por afinidade. A abertura na parte superior do cartucho permite a saída do solvente (depois da extração), que irá preencher o espaço

entre o cartucho e as paredes do Soxhlet até que o menisco alcance o ponto de refluxo do canal lateral do aparelho e o solvente com as substâncias extraídas sejam descarregadas sobre o conteúdo do balão.

O aparelho de Soxhlet é modificado de modo a impedir o refluxo do solvente para o balão. A dilatação do canal lateral do Soxhlet foi retirada e o canal foi alargado na porção superior. Desta forma, quando o menisco atinge a curva do canal, não há refluxo, mas gotejamento constante. Nas duas situações, a partição se dá lentamente, com o máximo de contato possível (PAULA, 2014).

As frações obtidas foram concentradas em rotaevaporador sob baixa pressão, levadas a secar em banho-maria a 60°C, pesadas e armazenadas em geladeira para posterior estudo.

4.4.4 Purificação, isolamento e caracterização das substâncias da Fração Clorofórmica (FCHCl_3)

A purificação de FCHCl_3 foi realizada por meio de colunas cromatográficas (CC) abertas com fase estacionária sílica gel 60 Merck 0,063 – 0,200 mm e empacotada com hexano. À fase estacionária foi adicionada uma solução aquosa de bicarbonato de sódio a 10%.

FCHCl_3 (11,2 g diluída em MeOH) foi cromatografada utilizando fase móvel constituída de um sistema de passagem de solventes com gradientes de polaridades crescentes: hexano/clorofórmio e clorofórmio/metanol. A fase móvel iniciou com 100% de hexano, tendo clorofórmio como gradiente de polaridade, com variação de 5% até 100% de clorofórmio. Seguida da eluição com clorofórmio/metanol, com variação de 5% até 100% de metanol. O controle de eluição foi realizado por cromatografia em camada delgada (CCD), utilizando-se cromatoplasas de Sílica-gel 60 F254 Merck®, com fase móvel constituída por CHCl_3 : Metanol (MeOH): Hidróxido de amônia (NH_4OH), (8,3:1,5:0,2 mL v/v) e como revelador o Reativo de Dragendorff.

FCHCl_3 resultou em 204 frascos, as subfrações, 71 a 93 (368 mg) foram reunidas, após a verificação de suas características por CCD. Foram evidenciadas várias manchas alaranjadas com Rfs próximos, características de alcaloides. Essa subfração foi submetida novamente a CC empacotada com hexano e eluída com a mistura de solventes hexano/clorofórmio. A fase móvel iniciou com 50% de hexano,

tendo clorofórmio como gradiente de polaridade, com variação de 10%, até 100% de clorofórmio, seguido de um gradiente com variação de 10% de metanol até chegar em 100% de metanol onde foram coletadas 150 frações.

Após realização de CCD com revelador Dragendorff, as subfrações 10, 11 e 12 foram escolhidas. As subfrações 10 e 12 (60,5 mg) foram reunidas para a realização de uma CCD preparativa com objetivo de conseguir a separação dos compostos. Foi utilizada uma placa de CCD de 20 X 10 cm e a fase móvel: $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{NH}_4\text{OH}$ (83:15:2 mL). Apenas as laterais da placa foram reveladas com Dragendorff para visualização do local das manchas alaranjadas e com auxílio do UV elas foram raspadas. O raspado foi colocado em clorofórmio e filtrado em funil sinterizado. Por Último, com o resultado do filtrado da CCD preparativa, foi realizada uma CCD analítica de 5 cm x 20 cm. O local onde se encontravam os compostos foi raspado, lavado com clorofórmio e filtrado, restando 4,8mg de uma mistura de compostos nomeada de subfração 10 MA que foi enviada para análises de RMN de ^1H e ^{13}C e CG-MS.

Para a purificação da subfração 11 (96,2 mg), foi utilizado (86,2 mg) e realizada uma CCD preparativa (5 cm x 20 cm) com fase móvel $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{NH}_4\text{OH}$ (7,5:2,5:0,2 mL) e (10 mg) foi enviada para análise de RMN de ^1H e ^{13}C . O resultado da CCD preparativa foram as frações 11A (11,85 mg) coletada no ponto de chegada e fração 11B (5,45 mg) coletada no ponto de partida. Ao testar a solubilidade da fração 11A, apenas uma parte foi solúvel em MeOH, sendo a outra parte, solúvel em CHCl_3 , ficando então dividida em 11Am (8 mg) e 11Ac (2 mg).

A identificação dos compostos foi realizada por espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN) de ^1H e ^{13}C obtidas em espectrômetro Brucker® modelo AC400 operando na frequência base de 400 MHz e 100 MHz para os núcleos de ^1H e ^{13}C , realizada no Laboratório de RMN do Departamento de Química da Universidade Estadual de Ponta Grossa, pela Professora Dra. Barbara Fiorin.

Os deslocamentos químicos foram expressos em ppm em relação ao sinal do TMS (tetrametilsilano) em 0 ppm. Após a obtenção dos espectros de RMN, a identificação das substâncias foi realizada com base na comparação dos dados espectroscópicos com dados disponíveis na literatura.

As análises de cromatografia a gás com espectro de massa (CG-MS) foram realizadas pela Central Analítica do Instituto de Química da Universidade de São Paulo (CA-USP) em aparelho QP2010 Ultra – Shimadzu. usando um injetor Split na temperatura de 220°C, sendo da coluna 60°C, com rampa de aquecimento de 3°C.min⁻¹, temperatura inicial 15 °C e final 300°C, e temperatura do detector 250°C. O hélio foi usado como gás de arraste a 1 mL.min⁻¹. O sistema de ionização de elétrons CG-MS foi de 70 eV.

4.4.5 Obtenção do extrato cetônico bruto (ECB)

As partes aéreas de *L. exaltata* secas e trituradas (2,9 kg) foram colocados em aparelho de Soxhlet com acetona por extração contínua até esgotamento. Durante o processo de extração foi observado no fundo do balão contendo o ECB que ocorreu a precipitação uma quantidade significativa de um composto de tonalidade esbranquiçada. Após o esgotamento total, o ECB foi filtrado e o precipitado obtido durante o processo de extração foi separado e seco recebendo o nome de composto **L1**. O ECB obtido foi submetido à concentração em Soxhlet por destilação até ¼ do seu volume e posteriormente levado em banho-maria para remoção total do solvente. O extrato obtido foi mantido sob e refrigeração para posterior particionamento.

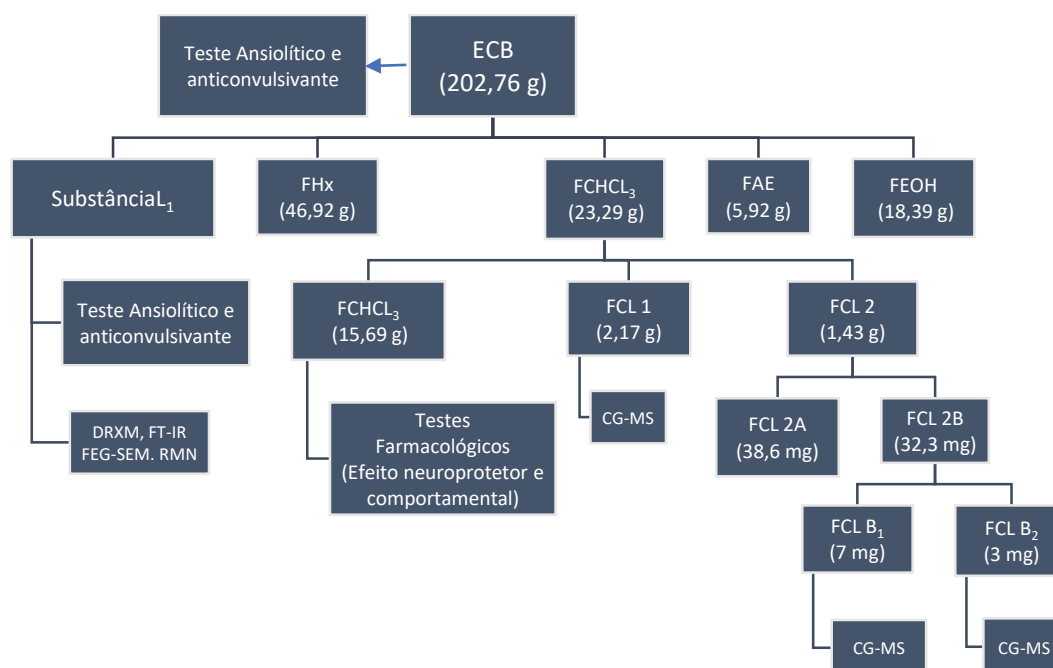
4.4.6 Fracionamento do Extrato Cetônico Bruto (ECB)

O fracionamento do ECB foi realizado da mesma forma que em 4.4.3, obtendo-se as frações: FHx (46,92 g), FCHCl₃ (23,29 g), FAE (5,92 g) e fração etanólica remanescente (FEOH 18,39 g).

4.4.7 Purificação e isolamento das substâncias do Extrato Cetônico Bruto (ECB)

A purificação e isolamento das substâncias do ECB foi apresentado primeiramente em um fluxograma, na (FIGURA15), a fim de auxiliar na melhor compreensão procedimento.

FIGURA 15 - FLUXOGRAMA DO PROCEDIMENTO DE PURIFICAÇÃO DO EXTRATO CETÔNICO DE *L. exaltata*



FONTE: Autora (2018)

4.4.7.1 Purificação de L1

O precipitado resultante da extração de ECB foi lavado com éter e depois com etanol 100% e então filtrado e seco à vácuo. À massa restante foi adicionado água e mantida sob refrigeração (4° a 6°C) por 7 dias para completa recristalização. Após foi filtrado e seco ao ar.

A substância isolada L1 foi submetida à análise espectroscópica de RMN de ^1H e ^{13}C e espectrométricas de infravermelho (IV), difratometria de raios X e Microscopia Eletrônica de Varredura por Emissão de Campo (*Field Emission Gun Scanning Electron Microscopy* - FEG-SEM).

Os dados de difração, para análise de cela unitária, foram coletados empregando um difratômetro Bruker – D8 Venture equipado com detector de área Photon 100 CMOS, duas fontes de radiação monocromática de Mo-K α ($\lambda = 0,7107 \text{ \AA}$) e Cu-K α ($\lambda = 1,5418 \text{ \AA}$), e dispositivo Kryoflex II, para realização de coletas à baixa temperatura. A análise foi realizada a 300K utilizando-se a fonte de Cu-K α . Para a realização da análise foi selecionado um fragmento cristalino de uma porção de

cristais imersos em óleo mineral, o qual foi transferido cuidadosamente para um *micro-mount* que foi fixado no goniômetro do difratômetro. Os dados foram processados utilizando o programa APEX3¹. Os parâmetros de célula unitária encontrados foram comparados com dados da literatura utilizando a base de dados do CCDC (*Cambridge Crystallographic Data Centre*).

FEG-SEM foi realizada em microscópio eletrônico de varredura por emissão de campo, TESCAN, modelo Mira 3, Brno, República Tcheca. A amostra foi submetida à metalização em ouro em metalizador IC-50 Ion Coater (SHIMADZU), Quioto, Japão). Para obtenção das eletromiografias foi empregada voltagem de aceleração de 15Kv e utilizado software específico (Eletron Optical Design).

Nas análises de absorção na região do infravermelho (IV) foram utilizadas pastilhas em KBr, para determinação das frequências de vibrações em ligações atômicas, com o aparelho Shimadzu IR Prestige 21, no laboratório multiusuário (C-LABMU/PROPESP), na UEPG.

4.4.7.2 Purificação da Fração clorofórmio (FCHCl₃)

A FCHCl₃ foi dividida em duas partes, uma destinada a testes farmacológicos de atividade neuroprotetora (15,69 g). A outra foi purificada com metanol resultando em duas subfrações: FCL 1 (2,17 g) e FCL 2 (1,43 g).

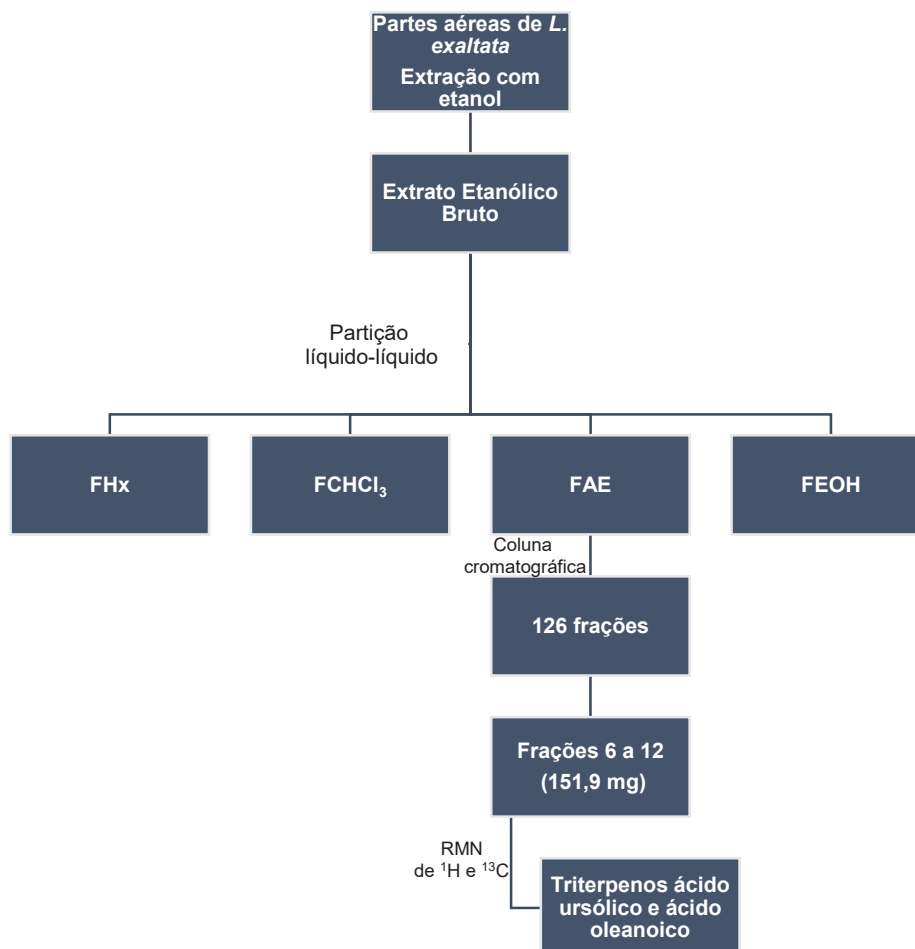
A fração FCL 2 foi submetida a CCD preparativa (5 cm x 20 cm) com fase móvel CHCl₃/MeOH/NH₄OH (7,5:2,5:0,2 mL) obtendo-se a FCL 2A (38,6 mg) e FrCL2B (32,3 mg). Parte da fração FCL 2B foi solúvel em MeOH recebendo o nome de fração FCL 2B₁ (7 mg) e a outra parte foi solúvel em CHCl₃ recebendo o nome de FCL 2B₂ (3 mg).

As frações FCL 1, FCL 2B₁ e FCL 2B₂ foram submetidas a análise por CG-MS.

4.4.8 Obtenção e Purificação da Fração Acetato de Etila (FAE)

A obtenção e purificação da FAE ocorreu durante a pesquisa de mestrado da autora (FOLQUITTO, 2014) e está esquematizada a seguir na (FIGURA 16).

FIGURA 16 - ESQUEMA ILUSTRATIVO DA OBTENÇÃO E FRACIONAMENTO DO EXTRATO ETANÓLICO BRUTO



FONTE: Adaptado de Folquitto (2014)

FAE (5,48g) foi cromatografada em coluna de sílica gel 60 (0,063-0,2mm/70-230 mesh) utilizando a fase móvel constituída de um sistema de passagem de solventes com gradientes de polaridades crescentes: hexano/ AcOEt (40:60 v/v) e AcOEt /metanol (110:50 v/v) com variação de 5% até 100% de AcOEt. Seguida da eluição com AcOEt /metanol, com variação de 5% até 50% de metanol.

A FAE resultou em 126 frascos, as frações 6 a 12 (151,9 mg) foram reunidas. Na CCD realizada foram evidenciadas manchas amarelas quando reveladas com NEU. Essa subfração recebeu o nome de AI e foi identificada por RMN de ¹H e ¹³C como sendo a mistura dos triterpenos, ácido ursólico e oleanoico. Esta mistura foi utilizada posteriormente para teste de atividade citotóxica (FOLQUITTO, 2104).

4.4.9 Obtenção da Fração Alcaloidal (FALK)

Uma nova amostra das partes aéreas de *L. exaltata* (3,590 g) foi triturada, reduzida a pó e utilizada acetona para obtenção de um novo Extrato Cetônico Bruto novo (ECB_N - 227,83 g) como descrito em 4.4.4. Parte desse extrato foi utilizado em testes biológicos (84,66 g) e a outra parte (193,17 g) foi obtida a FALK. Todo este processo está apresentado no fluxograma na (FIGURA 17) para melhor compreensão.

O ECB_N foi solubilizado em solução de HCl 3% e em seguida colocado em aparelho de Soxhlet para extração com CHCl₃. O processo foi acompanhado com CCD revelada com Dragendorff, confirmando que a fração ácida continha os alcaloides e repetido mais uma vez com o CHCl₃ para esgotamento total dos alcaloides. Posteriormente a fração ácida foi alcalinizada com NH₄OH até pH 10 e extraído com CHCl₃ em Soxhlet até reação negativa frente a reativo de Dragendorff.

A fração CHCl₃ concentrada em rotaevaporador forneceu 18,63 g do extrato alcaloidal, solubilizado em MeOH, foi passado em coluna cromatográfica, eluindo-se com hexano; hexano/CHCl₃, com variação de 5% até 100% de CHCl₃ e CHCl₃/MeOH com variação de 5% até 100% de em um gradiente 5% MeOH e volume de 50 mL, resultando em 140 frações. A partir da fração 72 observou-se manchas alaranjadas em CCD quando reveladas com Dragendorff.

As frações de 72-106 foram reunidas (2,59 g) e cromatografadas em sistema de eluição: Hexano/AcOEt (70:30) em gradiente 10/10 mL seguido de AcOEt/MeOH até 100mL de MeOH puro e por fim MeOH/H₂O até 50:50 mL resultando em 86 subfrações. Destas, as subfrações 76-83 foram reunidas por semelhança e levadas a secar formando um precipitado esbranquiçado que recebeu o nome de ALKA I (3 mg). As subfrações 84-86 foram reunidas e purificadas com MeOH e CHCl₃ e quando secas apresentaram um pó pardo recebendo o nome de ALKA II (27,4 mg).

As subfrações de 35 a 74 (82mg) foram reunidas e cromatografadas utilizando uma coluna aberta empacotada com a fase estacionária Sephadex® LH20 (Amersham Pharmacia, G&E), e eluída com (100 mL) de metanol, seguida de (100 mL) AcOEt e a amostra solubilizada em de metanol resultando em 60 sufrações, 1 a 3 foram reunidas e recromatografadas com Sephadex® LH20 novamente invertendo-se a ordem dos solventes (primeiro AcOEt e depois MeOH) obtendo-se 40 frações.

Na sequência as subfrações de 1 a 20 foram reunidas, levadas a secar e obteve-se ALKA B₁.

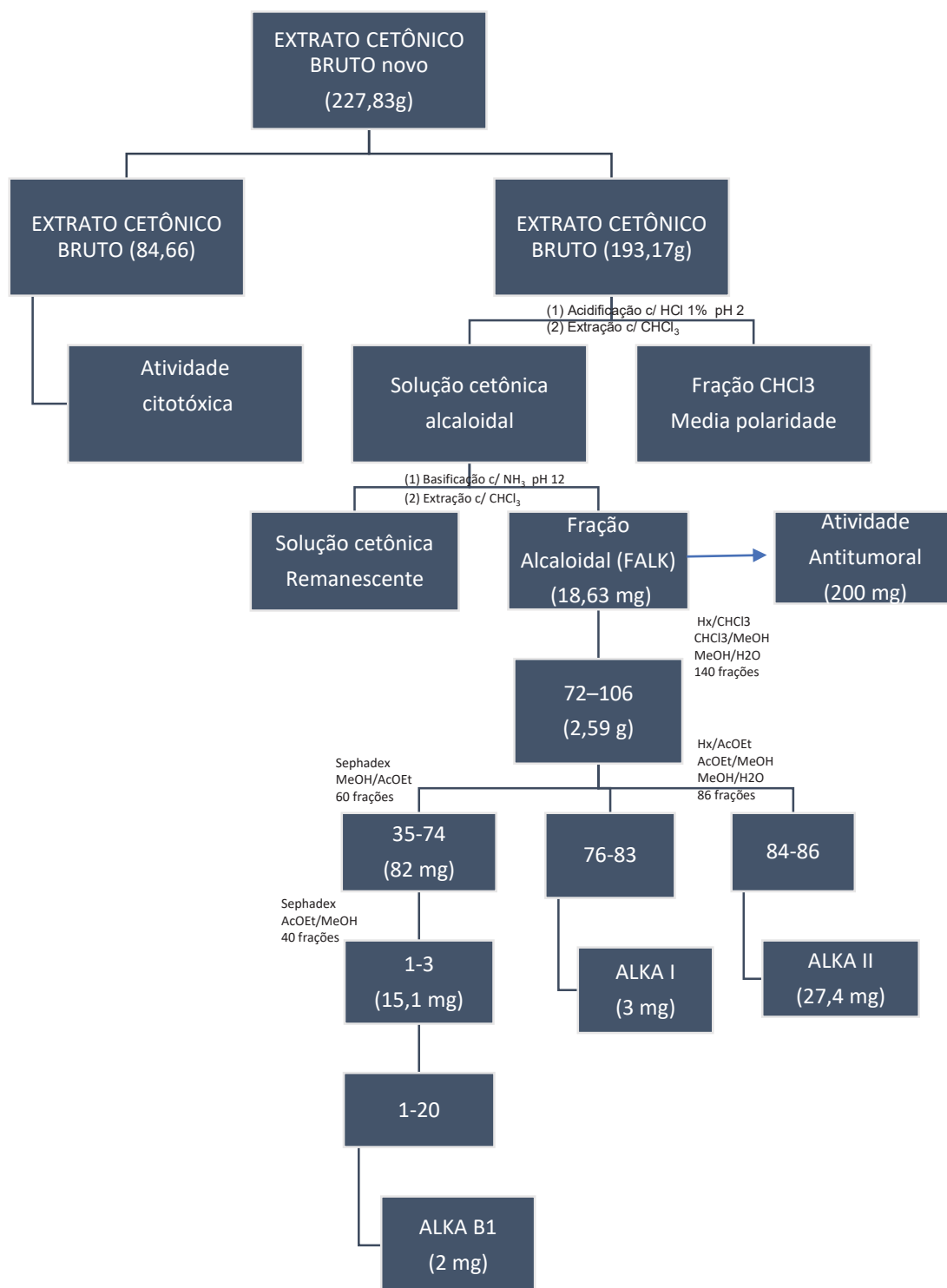
4.4.10 Obtenção do Extrato Etanólico Bruto das sementes (EEBs)

As sementes de *L. exaltata* (300 g) foram submetidos à extração em um aparelho de Soxhlet modificado utilizando-se 1.500 mL de etanol 96% como líquido extrator por um período de 24 horas, com esgotamento total da extração (Carvalho, 2001). O extrato obtido foi filtrado e submetido à concentração em Soxhlet por destilação até $\frac{1}{4}$ do seu volume e posteriormente levado em banho-maria para remoção total do solvente. O extrato obtido (31,74g) foi mantido sob refrigeração para posterior particionamento.

4.4.11 Fracionamento do Extrato Etanólico Bruto das sementes (EEBs)

O fracionamento do EEBs foi realizado da mesma forma que no item 4.4.3, obtendo-se as frações: FHxs (5,26 g), FCHCL₃s (1,61 g), FAEs (0,59 g) e FEOHs (2,06 g).

FIGURA 17 - FLUXOGRAMA DO PROCEDIMENTO DE PURIFICAÇÃO DO EXTRATO CETÔNICO
(extração ácido-básica)



FONTE: A autora (2018)

4.5 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANSIOLÍTICA E/OU ANTICONVULSIVANTE DO EXTRATO ETANÓLICO BRUTO E SUBSTÂNCIA ISOLADA DE *Lobelia exaltata* POHL EM PEIXES ZEBRAFISH (*Danio rerio*)

4.5.1 Animais

Todos os procedimentos em que se utilizaram animais foram aprovados pelo Comitê de Ética para uso de animais (CEUA) da Universidade Estadual de Ponta Grossa, sob o protocolo nº 038/2017.

Peixes zebrafish (*Danio rerio*) adultos (4 a 6 meses, proporção de 50-50% de macho:fêmea) foram comprados em uma loja comercial especializada em peixes ornamentais (Peixe.com Aquarismo) na cidade de Ponta Grossa/PR. Os animais foram mantidos em aquários de 100L (50-100 peixes/aquário) por no mínimo 2 semanas para se ambientarem. Todos os tanques foram preenchidos com água sem cloro (previamente tratado com 132 $\mu\text{L.L}^{-1}$ de AquaSafe®), mantidos sob filtração mecânica e química, em temperatura de $26\pm 2^\circ\text{C}$ e pH entre 7,0 e 8,0. Os tanques foram iluminados por lâmpadas fluorescentes com um ciclo de 14/10h claro/escuro (luz acesa às 7:00h). Os animais foram alimentados com uma ração comercial para peixes (Alcon BASIC®, Alcon, Brasil). Todos os animais usados neste estudo eram “naive” (saúdáveis e livres de sinais de doenças). Foram mantidos de acordo com o National Institute of Health Guide for Care and Use of Laboratory Animals (2011).

4.5.2 Tratamento

Os peixes foram colocados em um béquer de 300 mL, preenchido com água do aquário moradia, por 10 minutos. Nesta água foram diluídos o clonazepam (controle positivo), o ECB e a substância **L**₁. Após esta exposição, os animais foram submetidos ao teste de atividade ansiolítica e ao teste de atividade anticonvulsivante. O clonazepam utilizado foi da marca Rivotril® 2,5 mg.mL⁻¹ (Laboratório Roche).

4.5.3 Teste de Atividade Ansiolítica do ECB DE *L. exaltata*

Para analisar se o ECB apresenta atividade ansiolítica os peixes foram divididos em 5 grupos (n=7 por grupo): controle negativo (água + propilenoglicol);

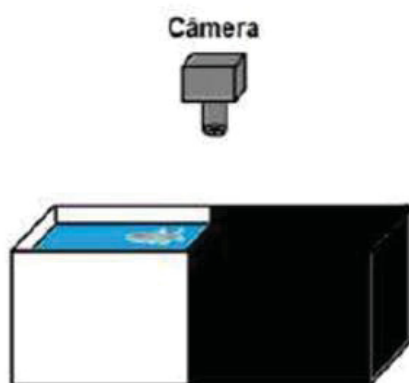
clonazepam (controle positivo) $0,75 \text{ mg.L}^{-1}$; ECB (100 mg.mL^{-1}); (250 mg.mL^{-1}); (500 mg.mL^{-1}) (GEBAUER et al., 2011). As concentrações dos extratos foram determinadas por meio de experimentos pilotos.

Para preparar as diferentes concentrações do ECB, inicialmente foi feita uma solução mãe na concentração de 1g.L^{-1} . Como ECB é pouco solúvel em água adicionou-se 0,2% de propilenoglicol com posterior agitação em ultrassom, até a completa solubilização, em seguida foi adicionada a água do aquário moradia até completar o volume final. A partir dessa solução foram preparadas as diluições nas concentrações de 100, 250 e 500 mg.L^{-1} .

A seguir foram preparados 300 mL das soluções testes, onde o peixe permaneceu, individualmente, por 10 minutos antes de ser colocado no aquário claro/escuro (adaptado de GEBAUER et al., 2011).

O teste da atividade ansiolítica foi realizado em um aquário claro/escuro ($18 \text{ cm} \times 9 \text{ cm} \times 7 \text{ cm}$), dividido em 2 partes iguais, conforme ilustrado na (FIGURA 18) uma com fundo, laterais e tampa de cor preta e outra com fundo laterais de cor branca sem tampa permitindo entrada da luz (lado claro).

FIGURA 18 - MODELO DE AQUÁRIO PARA TESTE CLARO/ESCURO



FONTE: Adaptado de CAMPOS (2016).

Entre os dois lados há uma comporta corrediça de cor preta que pode ser levantada do fundo do aquário. Durante o teste, os peixes foram colocados no compartimento claro, preenchido com água do aquário moradia, até uma altura de 3 cm e deixado nesse ambiente por 5 minutos. Após, a comporta foi aberta permitindo a passagem do peixe para o lado escuro. Como este aquário é bastante raso, restringe a habitação inferior, que é um comportamento de ansiedade bem estabelecido em um

novo ambiente. Desta forma, a estratégia de proteção é a preferência pelo ambiente escuro. Ao abrir a comporta e permitir a passagem do peixe para a área escura, o seu comportamento foi filmado por 5 minutos e depois verificado: a latência para a primeira entrada no compartimento escuro; o tempo gasto no compartimento claro; e o número de cruzamentos entre os compartimentos (CAMPOS, 2016).

4.5.4 Teste da Atividade Anticonvulsivante do ECB e da substância L₁ de *L. exaltata*

Inicialmente, para avaliar o possível efeito anticonvulsivante, os peixes foram divididos em 5 grupos (N=7 por grupo): controle negativo (água + propilenoglicol +PTZ); controle positivo (clonazepam 0,75 mg.L⁻¹ + PTZ); ECB (100 mg.mL⁻¹+ PTZ); (250 mg.mL⁻¹ + PTZ); (500 mg.mL⁻¹ + PTZ) (adaptado de MUSSULINI et al., 2013).

Posteriormente, para avaliar o efeito anticonvulsivante da substância L₁, os peixes foram divididos em 5 grupos (N=7 por grupo): controle negativo (água + propilenoglicol +PTZ); controle positivo (clonazepam 0,75 mg.L⁻¹ + PTZ) (substância L₁ (10 mg.mL⁻¹ + PTZ); (1 mg.mL⁻¹ + PTZ); (0,1 mg.mL⁻¹ + PTZ) (adaptado de MUSSULINI et al., 2013).

Os peixes foram cuidadosamente colocados de modo individual em um aquário (15 cm x10 cm x15 cm) contendo uma solução de PTZ (Sigma-Aldrich), na concentração de 10mM em água do aquário moradia. Seu comportamento foi filmado e gravado por uma webcam durante uma sessão única de 20 minutos. Todos os vídeos dos testes comportamentais foram avaliados por 2 pesquisadores treinados e de forma cega.

No vídeo foi analisado o comportamento do peixe de acordo com o score de crise convulsiva em modelo de zebrafish (MUSSULINI et al., 2013). Este score apresenta 6 estágios: estágio 0 (nado principalmente no fundo do aquário e em curtos espaços), estágio 1 (aumento da atividade de natação e aumento da frequência de abertura do opérculo), estágio 2 ("burst swimming", movimentos erráticos), estágio 3 (movimentos circulares), estágio 4 (comportamento semelhante a crise convulsiva clônica), estágio 5 (perda da postura corporal, comportamento semelhante a crise convulsiva tônica, extensão rígida do corpo) e estágio 6 (morte). Foi analisada a latência para atingir os diferentes estágios e quais estágios cada peixe atingiu.

4.5.5 Análise estatística

Os dados obtidos no teste de claro/escuro e a latência para atingir os diferentes estágios no teste do PTZ foram analisados pelo teste de Kruskal-Wallis seguido do teste post-hoc de comparação múltipla de Dunn's. Em todas as análises, o nível de significância foi de $p < 0,05$.

4.6 AVALIAÇÃO DO EFEITO NEUROPROTETOR E COMPORTAMENTAL

4.6.1 Animais

Esta pesquisa foi aprovada pelo Comitê de ética no uso de animais da UEPG, nº de Processo CEUA 009/2015/Protocolo UEPG-2216/2015.

Os animais utilizados foram ratos Wistar machos, com três meses de idade e peso em torno de 300 g. Esses animais foram obtidos e mantidos no biotério da UEPG, em ambiente climatizado (22°C), com ciclo claro/escuro de 12 h (ciclo claro inicia às 07:00 h) e ração *ad libitum*. Também foram utilizados ratos Wistar jovens (com um mês de idade) para realização do teste de reconhecimento social.

Os animais foram divididos de acordo com os testes realizados. Para os testes de preferência a sacarose e reconhecimento social, natação forçada e discriminação olfativa foram utilizados 5 grupos contendo 24 animais cada. Esses 24 animais utilizados por mês foram divididos da seguinte maneira: animais controle SHAM-operados tratados com veículo, SHAM-operados tratados com ECB e FCHCl₃ de *L. exaltata* solubilizado em salina, DMSO a 5% e Tween 2%, nas seguintes concentrações: ECB - 600mg/kg, 300mg/kg e 150mg/kg e FCHCl₃ - 150mg/kg e 50mg/kg.

Animais com lesão na via nigroestriatal (ver 4.6.3) tratado com veículo e animais com lesão na via nigroestriatal tratados com ECB e FCHCl₃ solubilizado em salina, DMSO a 5% e Tween 2%, nas seguintes concentrações: ECB - 600mg/kg, 300mg/kg e 150mg/kg e FCHCl₃- 150mg/kg e 50mg/kg. O número amostral final de animais pode variar, pois a mortalidade durante e após a realização da cirurgia estereotáxica geralmente é alta e difícil de ser prevista (Adaptado de DALLA VECCHIA, 2015).

4.6.2 Tratamento

O tratamento foi realizado por gavagem com ECB e FCHCl₃ de *L. exaltata*, solubilizados em soro fisiológico com DMSO a 0,5% e Tween 2% ou somente soro fisiológico com DMSO a 0,5% e Tween 2% (veículo) durante 21 dias antes do procedimento cirúrgico e mais 7 dias pós cirurgia. Foi escolhida essa forma de tratamento por 21 dias pré-cirurgia para verificar a atividade antidepressiva do ECB e FCHCl₃, que só se manifesta completamente após 3 a 4 semanas de uso. Os 7 dias de tratamento pós cirurgia foram realizados com objetivo de tentar prevenir a morte neuronal decorrente de administração da 6-hidroxidopamina (6-OHDA). Os animais do grupo controle SHAM-operados, foram submetidos a todos os procedimentos cirúrgicos dos animais lesados, exceto a injeção intracerebral de 6-OHDA, sendo esta substituída por salina.

4.6.3 Cirurgia estereotorácica

Todos os procedimentos de lesão da via nigroestriatal foram realizados através de cirurgia estereotática, para garantir a reprodutibilidade de localização das injeções das drogas.

Foram administradas 10 mg/Kg de nortriptilina, intraperitoneal (i.p.), 10 minutos antes da cirurgia estereotática, para proteger neurônios noradrenérgicos e serotoninérgicos, para que apenas os neurônios dopautosérgicos sejam lesados. O uso de um antidepressivo tricíclico juntamente com a 6-OHDA é necessário, pois a noradrenalina apresenta grande semelhança estrutural com a dopamina e pode ser carregada pelos transportadores de noradrenalina para dentro dos neurônios noradrenérgicos causando assim a morte desses neurônios. Em seguida foi administrado Pentabiótico de uso veterinário, na dose de 1mg/kg por via i.m. O Pentabiótico é composto por: Benzilpenicilina benzatina 3.000.000UI, Benzilpenicilina procaína 1.500.000UI, Benzilpenicilina potássica 1.500.000UI, Diidroestreptomicina base (sulfato) 1.250 mg e Estreptomicina base (sulfato) 1.250 mg. Essa combinação de antibióticos tem por finalidade ampliar o espectro bacteriano (DALLA VECCHIA, 2015).

Para ocasionar a lesão na via nigroestriatal, os animais foram anestesiados com tiopental (50 mg/Kg, i.p.) e devidamente tricotomizados. Em seguida, foram

colocados no equipamento estereotáxico. Álcool iodado foi utilizado para fazer a antissepsia local e posteriormente ocorreu a aplicação do anestésico local (lidocaína 0,2 mL com 2% de vasoconstritor) via subcutânea logo abaixo da pele que recobre o crânio dos ratos (MOREIRA, et al., 2010).

Com auxílio de bisturi, a pele e a fáscia muscular que recobrem o crânio dos animais foram afastadas, o bregma (intersecção anterior das suturas cranianas) foi localizado e utilizado como ponto de referência para encontrar as coordenadas do feixe prosencefálico medial, sendo essas: anteroposterior (AP), - 1,9 mm do bregma; medio-lateral (ML) $\pm$ 1,9 mm da linha média; dorsoventral (DV), - 7,9 mm do crânio (PAXINOS; WATSON, 2005).

Utilizando-se uma broca de baixa rotação, foram feitas perfurações nos crânios, através das quais as agulhas foram inseridas e 4 μ g por hemisfério cerebral (para administrações bilaterais) da toxina 6-OHDA (Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, MO, USA), dissolvida com 0,2% de ácido ascórbico, foram microinjetados no feixe prosencefálico medial (FPM), conforme procedimento descrito em trabalhos anteriores (DA CUNHA et al., 2008). Durante a cirurgia, foi administrado bicarbonato de sódio i.p. (fármaco básico), para acelerar a excreção do tiopental (fármaco ácido) e evitar possíveis problemas cardiorrespiratórios no animal durante e após a cirurgia.

4.6.4 Teste de Preferência à Sacarose

O consumo de solução de sacarose é frequentemente usado como uma medida de anedonia (perda da capacidade de sentir prazer, próprio da depressão) em animais (CRAFT; DEVRIES, 2006). O total de animais analisados foi de 120 (24 animais por mês). Uma semana após a cirurgia, os animais foram separados, ficando apenas um por caixa moradia, com acesso livre a ração e 2 bebedouros com água durante 24 horas (fase de adaptação), onde puderam consumir água em qualquer um dos bebedouros. Após esta adaptação, a água foi trocada por uma solução de sacarose 0,8% em um dos bebedouros de cada animal (SLATTERY; MARKOU; CRYAN, 2007). Os bebedouros foram trocados de lado na caixa 24 h depois para se evitar o efeito de perseverança. O uso de um teste com 48 horas de duração permite minimizar os efeitos de neofobia (repulsa ao que é novidade) e perseverança a algum local ou lado da caixa. O consumo de água e solução de sacarose foi avaliado

simultaneamente nos grupos SHAM e 6-OHDA, através da pesagem dos bebedouros antes e depois do teste.

4.6.5 Teste de Reconhecimento Social

O experimento foi realizado utilizando-se o procedimento descrito por Dantzer et al. (1987), e padronizado por Prediger et al. (2003), Prediger et al. (2005) e Prediger et al. (2006). Este é um modelo válido para o estudo da memória olfatória de curta-duração. Os mesmos animais utilizados no teste de anedonia permaneceram isolados e foram utilizados para este teste no 14º dia após a cirurgia (reconhecimento social utilizando rato jovem diferente).

O teste de reconhecimento social consistiu em duas apresentações sucessivas (5 minutos cada), separadas por um intervalo de 30 minutos. Durante a primeira apresentação, um rato jovem (1 mês de idade) foi colocado na caixa do rato adulto, e registrou-se o tempo de investigação (cheirar, lambar, se aproximar,) ao rato jovem. Ao final da primeira apresentação, o rato jovem foi retirado da caixa do rato adulto, ficando isolado em outra caixa durante o intervalo entre as apresentações. Após um intervalo de 30 min, o mesmo rato jovem foi reapresentado ao rato adulto, registrando-se novamente o tempo de investigação do animal adulto durante a segunda apresentação.

O que acontece neste tipo de experimento é que quando se utiliza um intervalo pequeno (menor que 40 minutos) entre as duas apresentações, o rato adulto é capaz de reconhecer o jovem para o qual foi previamente apresentado, verificando-se uma redução no tempo de investigação durante a segunda apresentação. Entretanto, quando se utiliza um intervalo superior a 40 minutos entre as duas apresentações, o rato adulto perde a capacidade de reconhecimento, não sendo verificada redução no tempo de investigação durante a segunda apresentação.

O tempo gasto na investigação do rato adulto foi medido e expresso como a razão entre a segunda exposição e primeira exposição (Ratio of Investigation Duration (RID)). Uma redução no RID reflete uma diminuição no comportamento de investigação durante a segunda exposição, demonstrando a capacidade de reconhecimento do rato adulto.

4.6.6 Teste De Natação Forçada Modificado

O teste de natação forçada que foi utilizado é o teste modificado por Porsolt et al. (1978). Os mesmos animais foram utilizados para os testes de natação forçada e discriminação olfativa, totalizando 120 animais analisados (24 animais por mês).

A lesão utilizada em todos esses testes foi bilateral. Quatorze dias após a cirurgia, os ratos foram colocados em um cilindro de plástico opaco (diâmetro de 20 cm, altura de 50 cm, contendo água até 30 cm) durante 15 minutos (sessão treino) e seguido por uma sessão teste (24 horas após a sessão treino) durante 5 minutos.

A sessão teste foi filmada e gravada por uma câmera posicionada acima do cilindro para posterior análise. Os seguintes comportamentos foram quantificados: imobilidade (tempo que o animal permanece parado de todas as suas atividades comportamentais e permanece flutuando na água com movimentos mínimos), natação (tempo que o animal permanece realizando movimentos de natação circular no cilindro) e escalada (tempo que o animal permanece realizando movimentos verticais das patas dianteiras na parede do cilindro).

Após a sessão treino e teste, os animais foram secos e colocados em um ambiente aquecido por 2 horas, antes de retornar a caixa moradia. A água do cilindro foi trocada entre cada animal.

4.6.7 Discriminação Olfativa

O teste de discriminação olfativa foi realizado de acordo com Soffié e Lamberty (1988) e, posteriormente, modificado por Prediger et al. (2005 a,b). Para tal, os animais foram isolados 72 hs antes do teste, para que seu cheiro ficasse impregnado no sepilho da caixa moradia. A caixa onde o teste foi realizado caracteriza-se por possuir 2 compartimentos idênticos (30 cm x 30 cm x 20 cm), separados por uma porta que possibilita o trânsito por ambos os compartimentos.

O chão do compartimento direito foi forrado com sepilho retirado da caixa moradia do animal (sepilho familiar) e o chão do compartimento esquerdo foi forrado com sepilho não familiar. No 22º dia após a cirurgia, o rato foi solto no lado direito e durante 5 minutos foi marcado o tempo que ele permaneceu explorando cada ambiente.

4.6.8 Teste do campo aberto

O campo aberto consiste de uma arena, em cuja base retangular, há nove demarcações nas quais se permite avaliar a atividade exploratória e comportamental dos animais. Neste teste, os animais foram colocados individualmente voltados a uma das paredes do campo e foram observados durante 5 minutos, com 1 minuto de adaptação prévia: (1) o número de comportamentos de autolimpeza (*grooming*), (2) de autolevantar (*rearing*), (3) o número de passagens entre os quadrantes da arena (*crossing*), (4) número de defecação, oriunda da estimulação autonômica, e (5) o tempo de imobilidade (CRUSIO; SCHWEGLER; VAN-ABEELLEN, 1989).

4.6.9 Análise estatística

Para as análises, os grupos foram comparados por meio de análise de variância (ANOVA), seguido do teste Tukey. Um valor de $p \leq 0,05$ foi adotado para indicar diferenças estatisticamente significativas. Todos os dados resultantes da atividade biológica *in vivo* foram avaliados pelo programa GraphPad Prism, versão 5.01 para Windows. Os dados foram expressos como média $\pm$ erro padrão da média. A análise de variância (ANOVA) com *post hoc* de Newman-Keuls foi usado para comparações estatísticas, com nível de significância de 5% ($\alpha = 0,05$).

4.7 ATIVIDADE CITOTÓXICA SOBRE CÉLULAS TUMORAIS

4.7.1 Cultura celular

As linhagens celulares, American Type Culture Collection (ATCC), Calu-3 (ATCC® HTB-55™/célula epitelial de adenocarcinoma de pulmão), HeLa (ATCC® CCL-2™/ célula epitelial de adenocarcinoma de colo do útero), Jurkat (Clone E6-1 ATCC TIB-152™/linfócitos T de origem leucêmica do tecido hematopoiético) e HRT 18G (ATCC® CRL-11663™/ adenocarcinoma colorretal ileocecal) foram adquiridas e cedidas pela Profa. Dra Carla Cristine Kanunfre da Universidade Estadual de Ponta Grossa, adquiridas no Banco de Células do Rio de Janeiro (BC-RJ).

As células foram cultivadas em garrafas de 25 ou 75 cm² com meio RPMI 1640® (criado por Roswell Park Memorial Institute) (MURPHY, 1991), em pH 7,4, o

que constitui uma mistura de sais enriquecidos com aminoácidos, vitaminas e outros componentes essenciais para o crescimento celular, suplementado com 10% de soro fetal bovino (SBF, Life Technologies), 24 mmol.L⁻¹ de bicarbonato de sódio e antibiótico (penicilina 10000 UI e estreptomicina 10 mg.mL⁻¹, Sigma). As culturas foram mantidas a 37°C em estufa com atmosfera úmida e 5% de gás carbônico (CO₂).

As frações FALK e triterpenos foram preparadas na concentração de 100 mg.mL⁻¹ solubilizadas em dimetilsulfóxido (DMSO 0,4%). As soluções estoques foram diluídas em meio de cultivo RPMI 1640® com 10% de SFB, nas diferentes concentrações empregadas no experimento, 5, 25, 50, 100 e 200 µg.mL⁻¹ de FALK e 5,12,5, 25, 50 e 100 µg.mL⁻¹ da fração triterpeno, no momento antecedente ao início dos experimentos (SYLVESTRE et al., 2006; CARDILE et al., 2009).

Em todos os experimentos foi utilizado como controle negativo, o meio de cultura sem a adição de extratos. O plaqueamento foi realizado em triplicata para cada concentração das frações e controles.

A viabilidade das células foi determinada pelo azul de Tripan, avalia a integridade da membrana celular. Após o período de incubação, as células foram retiradas da garrafa de cultivo e uma alíquota de 100 µL da suspensão de células devidamente homogeneizada e diluída em azul de Tripan (0,4% em PBS) (1:1). As células foram observadas e contadas em câmara de Neubauer sob microscopia óptica. O azul de Tripan penetra no interior de células que perderam a integridade da membrana. As células consideradas viáveis apresentaram-se íntegras, redondas e incolores e as células não viáveis apresentaram-se coradas em azul. A viabilidade das células excedeu 95% (MERCHANT, KAHN e MURPHY, 1964).

4.7.2 Ensaio de viabilidade celular pelo método de redução do MTT [brometo 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2il-tetrazólico]

A citotoxicidade foi determinada pelo ensaio da redução do MTT para investigar a atividade das desidrogenases mitocondriais, por conseguinte, atividade metabólica celular. Isso é possível pois as células vivas têm a habilidade de formar cristais insolúveis de formazano de coloração violeta, quando reduzem o MTT. Com isso é possível observar que quanto maior a viabilidade celular, maior será a redução do

MTT e conseqüentemente, maior será absorvância espectrofotométrica (MOSMANN, 1983).

As células HeLa, Calu-3 e HRT que se desenvolvem aderidas foram semeadas em placas de 96 poços, na concentração de 1×10^5 células/poço (HeLa, HRT e Calu-3). As células cultivadas em suspensão, Jurkat foram semeadas em placas de 96 poços, na concentração de $1,5 \times 10^5$ células por poço. A viabilidade das células excedeu 95%, como determinado pelo azul de tripan. O plaqueamento foi realizado em triplicata para cada concentração das frações utilizadas e do veículo.

As linhagens celulares estudadas, após o cultivo foram tratadas com FALK e as fração triterpeno e incubadas pelo período de 72 h, a 37°C em estufa com atmosfera úmida e 5% de CO₂ sendo a viabilidade celular determinada pela redução do MTT.

Após o cultivo, as células Jurkat (células em suspensão) foram transferidas para tubos de 2 mL e centrifugadas a 1500 rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi desprezado e adicionados 200 µL de uma mistura 1:10 de MTT em meio RPMI com 10% de SFB em cada tubo. As células foram deixadas na estufa a 37 °C por 30 minutos e centrifugadas novamente a 2500 rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi desprezado e 200 µL de DMSO foi adicionado ao precipitado formado de cor púrpura (formazan). A cor do sobrenadante foi medida em espectrofotômetro UV/Vis SHIMADZU-1601 a 550 nm.

Para as culturas de crescimento de células em adesão (Calu-3, HRT e HeLa, o meio de cultivo foi retirado com auxílio de uma pipeta e foi adicionado 200 µL da solução do MTT 1:10 em cada poço.

As culturas foram incubadas à 37 °C por 2 h até a observação da presença dos cristais de formazan. Todo o volume do meio de MTT foi retirado cuidadosamente com a pipeta e para a solubilização dos cristais (produto da redução do MTT) foi adicionado 200 µL de DMSO. A leitura foi realizada em espectrofotômetro UV/Vis SHIMADZU-1601 a 550 nm e as absorvâncias foram utilizadas para o cálculo da porcentagem de viabilidade celular por meio da fórmula descrita abaixo:

$$Viabilidade (\%) = \left(\frac{Abs_T}{Abs_C} \right) \times 100$$

(Abs_T – absorvância do tratado; Abs_C – absorvância do controle)

4.7.3 Ensaio de viabilidade celular pelo método de Sulfarodamina (SRB)

Após ter realizado o protocolo do MTT, todo meio foi retido das placas e as células foram lavadas com PBS e o ácido tricloroacético 10% -TCA, gelado foi adicionado para a fixação das células. As placas ficaram em geladeira por 30 minutos para a fixação das células. As placas foram então lavadas com água destilada e depois secaram por 24 horas em temperatura ambiente. A solução de SRB 0,2% foi adicionada em cada poço e mantidas por 30 minutos em temperatura ambiente, posteriormente as placas foram lavadas 5 vezes com ácido acético 1% e secas por 30 minutos ou “overnight”, por último foi adicionado 150 µL de TrisBase 10mM dando coloração rosa aos poços. A leitura espectrofotométrica da absorbância foi realizada em leitor de placas (Biotek, µQuant), em comprimento de onda de 550 nm (PAPAZIS et al., 1997).

4.8 ATIVIDADE INSETICIDA SOBRE *Plutella xylostella* Linnaeus (TRAÇA-DAS-CRUCÍFERAS)

A criação de *P. xylostella* foi realizada segundo Torres et al. (2006), no Laboratório de Entomologia Agrícola da UEPG (Universidade Estadual de Ponta Grossa, em condições ambientais controladas à temperatura de 25 ± 1 °C, umidade relativa de $70 \pm 10\%$ e fotofase de 12 horas.

4.8.1 Cultivo de *Brassica oleracea* var. *acephala*

Sementes de couve portuguesa, *Brassica oleracea* var. *acephala*, foram semeadas em bandejas de isopor contendo substrato Plantmax®, em casa de vegetação. Após 35 dias, foram transplantadas para canteiro definitivo recebendo tratos culturais padrão para a cultura (CAMARGO, 1992; BOIÇA JUNIOR et al., 2005). Irrigações por aspersão foram realizadas quando necessárias.

4.8.2 Criação-estoque de *Plutella xylostella*

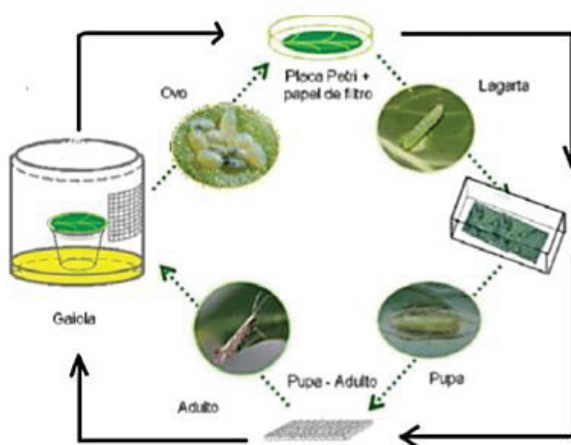
No laboratório de entomologia da Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG), lagartas recém-eclodidas foram confinadas em recipientes plásticos com dimensões 15 cm x 10cm x 5 cm, alimentadas com folhas de plantas de couve portuguesa, previamente lavadas em água corrente, visando obter número suficiente de insetos para os experimentos.

As folhas foram trocadas diariamente até que todos os insetos atingissem a fase de pupa. Essas foram coletadas diariamente e colocadas em tubos de vidro de fundo chato, medindo 1 cm de diâmetro, fechados com filme plástico transparente PVC com pequenos orifícios para circulação do ar.

Após a emergência, os adultos foram coletados diariamente com auxílio de um sugador. Foi feita a sexagem e formados casais, que foram confinados em gaiolas plásticas transparentes circulares com uma abertura retangular vedada lateralmente com malha fina de "nylon" para possibilitar a circulação do ar.

A parte superior da gaiola continha um orifício circular onde foi colocada uma esponja embebida com uma solução de mel a 10%, presa com uma rolha de pano tamponando o orifício. Dentro dessas gaiolas, foram colocados discos de folha de couve medindo 8 cm de diâmetro sobre papel-filtro em um copo plástico contendo uma esponja umedecida com água destilada em sua abertura, para permitir a oviposição. Os discos foram substituídos diariamente e aqueles com as posturas, acondicionados em placa de Petri até a eclosão das larvas, mantendo-se então, os procedimentos já descritos (MEDEIROS et al., 2003; TORRES et al., 2006). O esquema na (FIGURA 19) resume o processo de criação de *P. xylostella*.

FIGURA 19 - PROCESSO DE CRIAÇÃO DE *Plutella xylostella*



FONTE: Torres (2014).

4.8.3 Bioensaio da atividade inseticida em discos de couve

O teste foi realizado segundo Torres (2004), no qual foram utilizadas placas de Petri de 9 cm de diâmetro e suas respectivas tampas. O EEB e as frações FHx, FCHCl₃, FAE e FEOH das partes aéreas e O EEBs, FHxs, FCHCl₃s, FAEs e FEOHs das sementes de *L. exaltata* foram utilizados em solução aquosa, na concentração de 5% (p/v), adicionando DMSO 5% e Tween 80 a 2%, para avaliação da mortalidade de larvas de *P. xylostella*.

Discos de 8 cm de diâmetro de folhas de couve foram pulverizados com as soluções testes até preenchimento total das folhas. Posteriormente foram colocados em placa de Petri contendo papel-filtro levemente umedecido com água destilada e deixados ao ar livre para perda do excesso de umidade superficial por cerca de 1 h.

Sobre as folhas de couve foram introduzidas sem chance de escolha a 10 larvas de 1º. instar de *P. xylostella* em esquema inteiramente casualizado com 10 tratamentos em quadruplicata. A avaliação das mortalidades foi realizada até as larvas atingirem o estágio de pupa. Como controle negativo foi utilizado água destilada, DMSO 5% e Tween 80 a 2%.

Os dados obtidos foram submetidos a ANOVA através do programa ASSISTAT 7.7 e as diferenças entre as médias, foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

4.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para as análises *in vitro*, os grupos foram comparados por meio da análise de variância (ANOVA), seguido do teste Tukey. Um valor de $p \leq 0,05$ foi adotado para indicar diferenças estatisticamente significativas. Todos os dados resultantes da atividade biológica *in vivo*, foram avaliados pelo programa GraphPad Prism, versão 5.01 para Windows. Os dados foram expressos como média $\pm$ erro padrão da média. A análise de variância (ANOVA) com *post hoc* de Bonferroni foi usado para comparações estatísticas, com nível de significância de 5% ($\alpha = 0,05$).

5 RESULTADOS

5.1 ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS DO MATERIAL VEGETAL

5.1.1 Perda de água por dessecação e Cinzas

Os resultados obtidos para as análises físico-químicas do material vegetal de *L. exaltata* estão demonstrados na TABELA 7 como média $\pm$ desvio padrão.

TABELA 8 - ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS DO MATERIAL VEGETAL

Análise	Temperatura	Material vegetal
Umidade (%)	100°C	12,79 $\pm$ 0,648
Cinzas totais (%)	600°C	6,81 $\pm$ 0,365

FONTE: A autora (2018)

A determinação destas análises é importante para o controle de qualidade do material vegetal, uma vez que, auxilia na caracterização da identidade botânica permitindo a identificação de adulterações, presença de materiais estranhos (pureza inorgânicas) e estabilidade microbiológica na matéria-prima vegetal (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010; SONAGLIO et al., 2010). Esses parâmetros de qualidade são de realização simples e econômica, amplamente utilizados para garantir a confiabilidade dos vegetais utilizados na produção de medicamentos fitoterápicos (ANVISA, 2010).

A perda de água por dessecação para a *L. inflata* não deve ser superior a 10% segundo a Farmacopeia Brasileira III (1977), para *L. exaltata* a perda foi de 12,79%, resultado muito semelhante ao o encontrado por Borio (1959), para *L. stellfeldii* (12,06%). *L. exaltata* é uma espécie que vive em lugares bastante úmidos (brejosos) o que pode explicar um maior teor de umidade em relação a espécie farmacopeica.

Não existem teores máximos para cinzas totais e de perda por dessecação estabelecidos oficialmente para a espécie em estudo. O teor de cinzas de *L. exaltata* foi de 6,81%, entretanto a espécie farmacopeica *L. inflata* apresenta um máximo de cinzas de 10% (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 1977) sendo também menor do que o encontrado para *Lobelia langeana* Dusén (8,911%) (BORIO, 1959), *Lobelia. Stellfeldii* R. Braga (6,9 a 8%) (MOREIRA, 1979) e *Lobelia hassleri* Zahlbr. (7,5 a 8,5%)

(MOREIRA, 1979), indicando que *L. exaltata* não possui excesso de substâncias aderentes de origem terrosa que poderiam estar presentes como contaminantes.

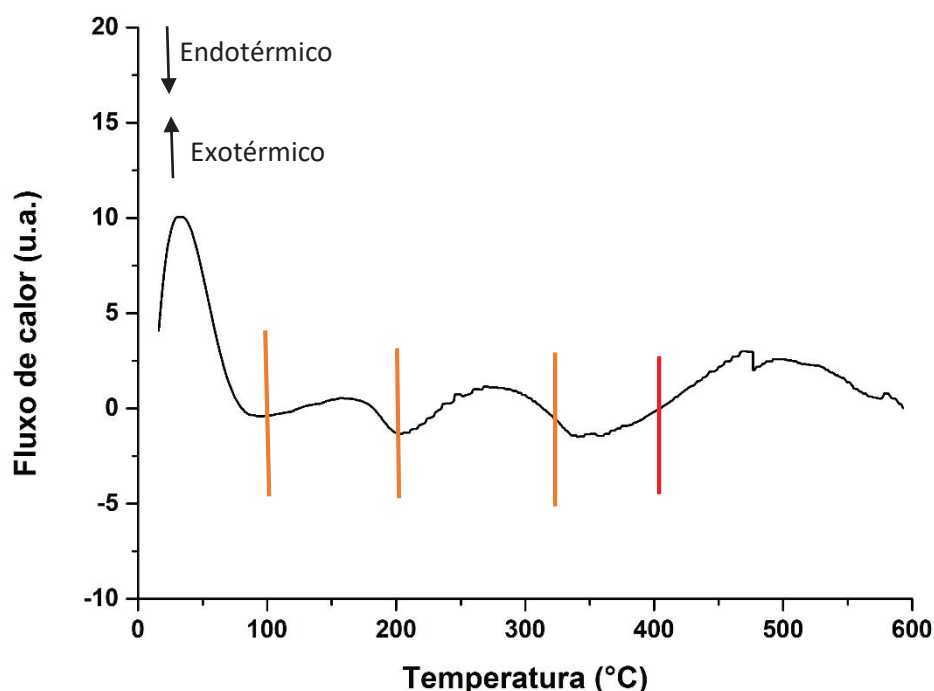
5.2 ESTUDO TERMOANALÍTICO

Os resultados obtidos a partir da termogravimetria são apresentados por meio das curvas de TG e DSC. TG representa a perda de massa em função da temperatura ocasionada pela liberação de materiais voláteis e máxima taxa de decomposição da biomassa. DSC envolve aquecimento da amostra e medida subsequente da temperatura e da energia associadas a uma série de eventos térmicos incluindo fusão, cristalização reações de decomposição. Esses eventos podem ser divididos em endotérmicos e exotérmicos (COSTA, 2011).

A presença do evento endotérmico a 80°C provavelmente está relacionado às reações de desidratação e liberação de compostos com baixo peso molecular (JEGUIRIM et al., 2010) sendo geralmente associada a primeira perda de massa nas curvas de DSC (GRÁFICO 1).

O processo endotérmico que ocorreu a 200 °C corresponde à perda de constituintes voláteis da amostra. O outro entre 320 °C e 360 °C foi atribuído à desidratação e despolimerização dos componentes da celulose, levando também a formação de produtos voláteis (SWIECH, 2018). Essa decomposição pode também estar associada a uma ampla variedade de metabólitos secundários, principalmente alcaloides, presentes na planta (FERNANDES et al., 2012).

GRÁFICO 1 - CURVAS DE CALORIMETRIA EXPLORATÓRIA DIFERENCIAL (DSC) PARA CAULES E FOLHAS DE *L. exaltata*



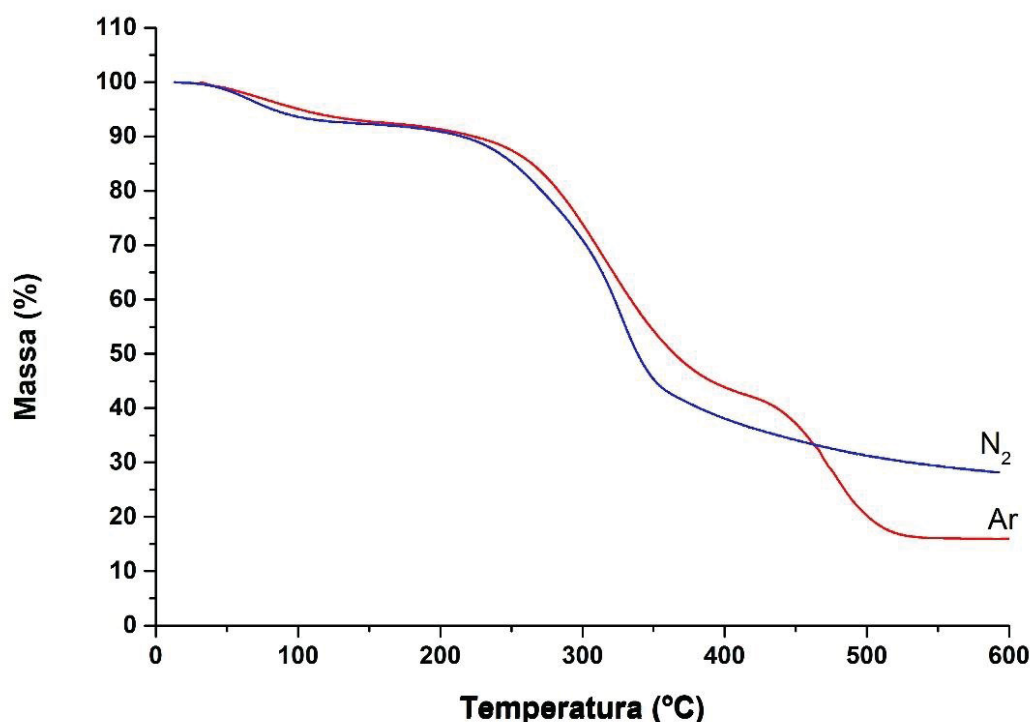
FONTE: A autora, (2017).

Um leve processo exotérmico foi observado a partir de 400°C, que segundo Pereira et al. (2015), ocorre pela pirólise, levando a produção de açúcares anidros como os principais produtos de termólise.

A curva termogravimétrica das partes aéreas de *L. exaltata* (GRÁFICO 2) apresentou um perfil de degradação térmica com quatro perdas de massa em atmosfera de ar sintético e com três perdas de massa em atmosfera de nitrogênio.

A primeira etapa caracteriza-se principalmente pelas reações de desidratação e liberação de compostos com baixo peso molecular presentes na amostra (GARCIA-MARAVÉ et al., 2015). Este estágio ocorreu entre 31 a 160 °C, sendo observado aproximadamente 7,4% de perda de massa. É importante destacar que até 160°C houve uma estabilidade térmica dos compostos presentes nas partes aéreas de *L. exaltata* indicando que a extração à quente (em aparelho de Soxhlet) é um método confiável para obtenção dos metabólitos secundários.

GRÁFICO 2 - PERFIL DE DEGRADAÇÃO TÉRMICA (TG) DE CAULES E FOLHAS DE *L. exaltata*



FONTE: a autora, (2017.)

Na segunda etapa ocorreu uma perda de massa mais acentuada que corresponde a 49,93% no intervalo entre 160 a 415°C. Nesta etapa se dá a pirólise oxidativa (EL MAY et al., 2012), ocorre a liberação de voláteis ocasionados pela quebra da hemicelulose e celulose, decomposição parcial da lignina, e formação de material carbonoso que ocorre entre 250 e 300°C (PEREIRA et al., 2015). Também ocorre a oxidação e decomposição de metabólitos como taninos e flavonoides (SOUZA, 2015), degradação térmica dos triglicerídeos, principalmente os constituídos por ácidos graxos poli-insaturados (ARAÚJO et al., 2006; SILVA Jr. et al., 2006; BENÍCIO; QUEIROGA NETO; HOLANDA, 2013).

Aragão et al. (2002), estudaram a aplicação de TG no controle da qualidade de *Cissampelos sympodialis* Eichl., comparando folhas e raízes, extrato hidroalcoólico bruto e fração alcaloides totais. Verificaram que após o processo de extração, os alcaloides tornaram-se substâncias majoritárias e o comportamento cinético dos extratos passou a assumir o comportamento cinético dos alcaloides que ficou entre 270 a 325°C, entretanto Macedo (1998), relatam que as curvas de TG em uma matriz vegetal complexa possuem um o comportamento cinético que é comandado pelas

substâncias majoritárias, onde as folhas, caules e raízes apresentam uma grande quantidade de substâncias graxas, resinas, fibras (hemicelulose e celulose) e lignina, fazendo com que estas substâncias sejam responsáveis pelo comportamento cinético nesta etapa.

Na terceira etapa observou-se uma perda de massa que corresponde a 26,6% no intervalo de 415 a 574°C. Esta etapa representa a combustão onde ocorre a oxidação da lignina e do material carbonoso formado na etapa da pirólise oxidativa (RUEDA-ORDÓÑEZ; TANNOUS, 2016).

As faixas de temperaturas e as respectivas perdas de massa durante as etapas estão apresentadas na (TABELA 8).

Acima de 600 °C não foi observada perda de massa, o que indica que não ocorre mais nenhuma reação na amostra. Ao fim do processo observou-se que restaram 28,14% de resíduo carbonífero e 16,29% de cinzas, em atmosfera de Nitrogênio (N₂) e atmosfera de ar sintético respectivamente.

TABELA 9 - PERDA DE MASSA PERCENTUAL DETERMINADA PELO MÉTODO TERMOGRAVIMÉTRICO PARA PARTES AÉREAS DE *L. exaltata*

Etapas		Atmosfera de N ₂		Atmosfera de ar sintético	
		Partes aéreas	%	Partes aéreas	%
1	T _i (°C)	20	7,5	20	7,44
	T _F (°C)	160		160	
2	T _i (°C)	160	52,19	160	49,93
	T _F (°C)	378		415	
3	T _i (°C)	378	24,05	415	26,33
	T _F (°C)	600		600	
4	T _i (°C)		28,14		16,29
	T _F (°C)				

T_i: Temperatura inicial da etapa; T_F: Temperatura final da etapa; %: perda percentual de massa degradada em cada etapa.

FONTE: A autora, (2017).

A termogravimetria é uma técnica útil para que se conheça o comportamento térmico (curva TG) de uma planta e de seu componente majoritário, podendo auxiliar na autenticidade da espécie vegetal e de seu extrato bruto, sendo este um parâmetro importante para o controle de qualidade (ARAGÃO et al., 2002).

5.3 IDENTIFICAÇÃO E ELUCIDAÇÃO ESTRUTURAL DOS COMPOSTOS ISOLADOS

5.3.1 Identificação dos compostos do EEB – fração (FCHCl₃) das partes aéreas *L. exaltata*

A investigação química de FCHCl₃ levou a separação de uma mistura de compostos denominadas fração FR 10 MA, Fr 128, Fr 11 Ac e Fr 11 Am.

5.3.1.1 Identificação dos compostos de FR 10 MA do EEB

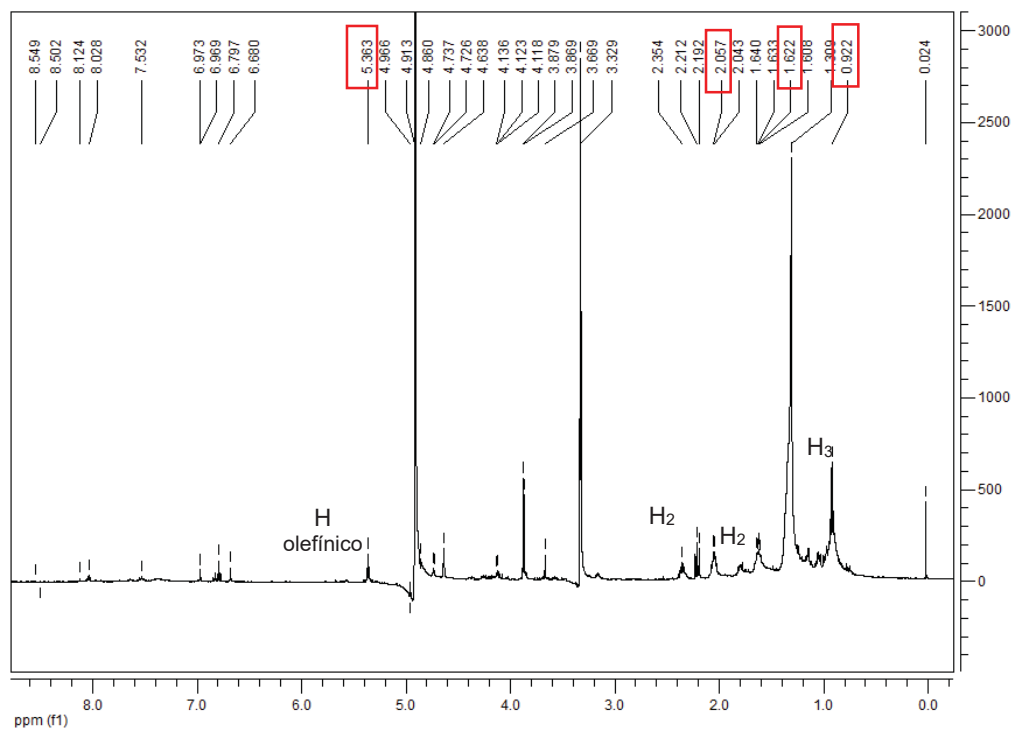
Os resultados da investigação química da fração 10 MA, das análises de RMN de ¹H e ¹³C e do CG-MS encontram-se representados nas (FIGURAS 19 e 20), referentes as análises de RMN de ¹H e ¹³C e CG-MS, respectivamente.

Análises de RMN de ¹H e ¹³C de FR 10 MA encontram-se representadas a seguir nas (FIGURAS 20 e 21).

O RMN de ¹H evidencia um deslocamento químico (δ) em 0,92 ppm referente a uma metila (-CH₃), e δ 1,30 a 1,64 ppm referente aos CH₂, e δ 1,62 e δ 2,06 ppm também referentes a metilenos, além de um sinal em δ 5,35 ppm, referente ao hidrogênio olefínico.

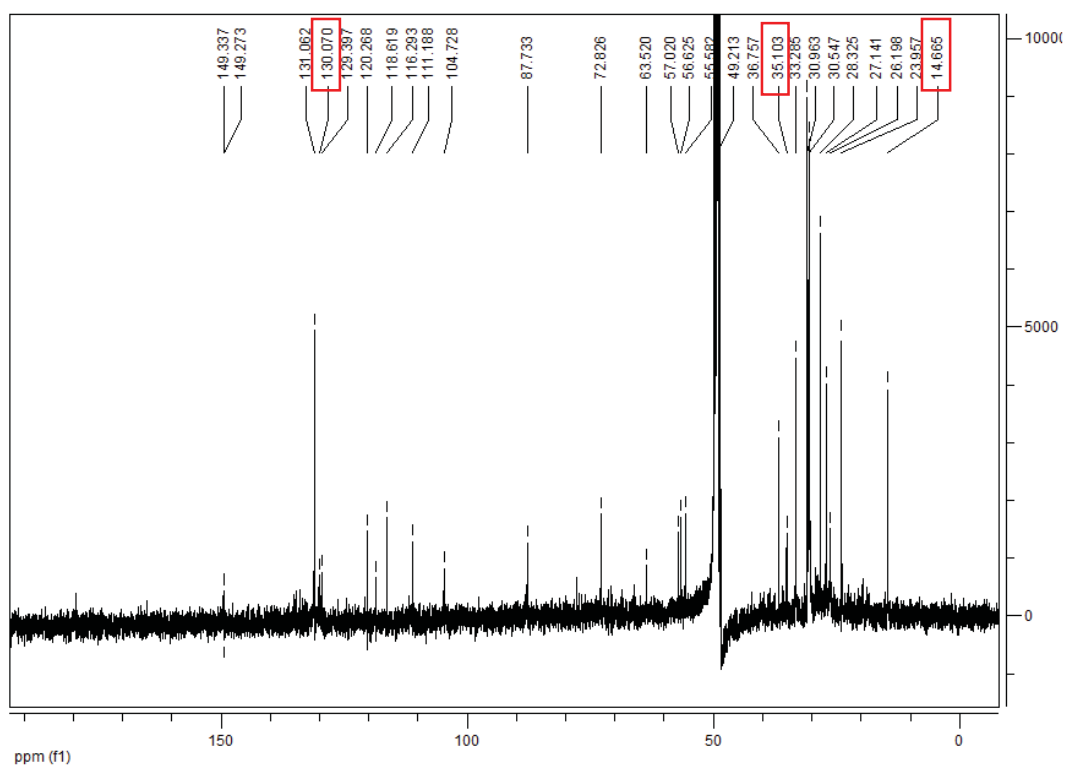
O espectro de RMN ¹³C mostra deslocamentos químicos característicos de CH₃ em δ 14,6 ppm uma região de CH₂ entre δ 21,9 e δ 35,1 ppm e δ 130,07 ppm referente ao carbono olefínico, sugerindo a presença de uma oleamida.

FIGURA 20 - REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DO ESPECTRO DE RMN DE ^1H (400 MHz MeOH d_4) PARA FR 10 MA



FONTE: A autora (2018).

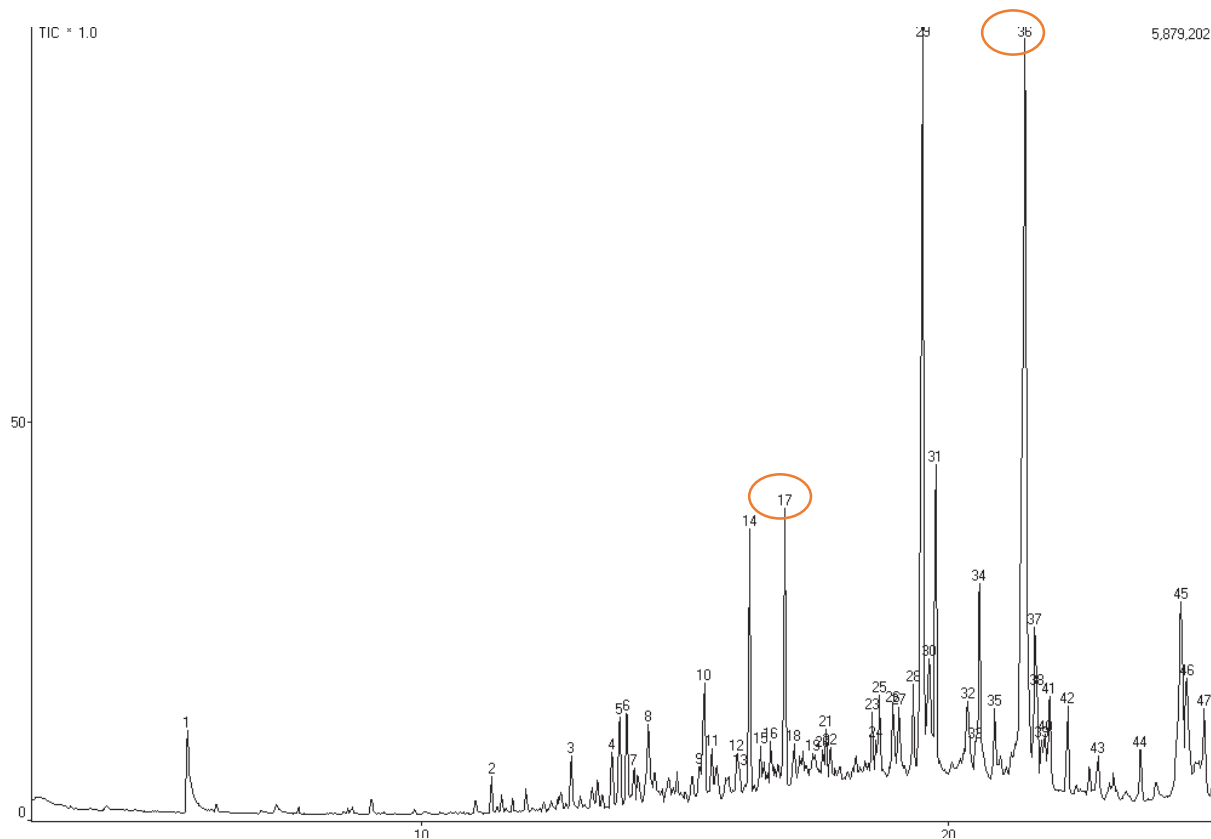
FIGURA 21 - REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DO ESPECTRO DE RMN DE ^{13}C (100 MHz MeOH d_4) PARA FR 10 MA.



FONTE: A autora (2018).

A seguir a (FIGURA 22) demonstra o resultado da análise de CG-MS de FR 10 MA

FIGURA 22 - REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DO CROMATOGRAMA DE FR 10 MA dos COMPOSTOS 17 e 36.



FONTE: A autora (2018).

Os sinais foram analisados por várias bibliotecas do Instituto Nacional de Padrões e Tecnologia NIST, WILEY e o resultado está representado na (TABELA 9).

TABELA 10 - ANÁLISE DE CG-MS DA FRAÇÃO 10 MA DE *L. exaltata*

TR (min)	Compostos	M (g.mol ⁻¹)	FM	Área do pico (%)
6,899	Ácido hexadecanoico, metil ester (sinal 17)	270	C ₁₇ H ₃₄ O ₂	3,52
21,452	Oleamida (sinal 36)	281	C ₁₈ H ₃₅ NO	24,20

TR: Tempo de retenção; M: Massa molar; FM: Fórmula molecular

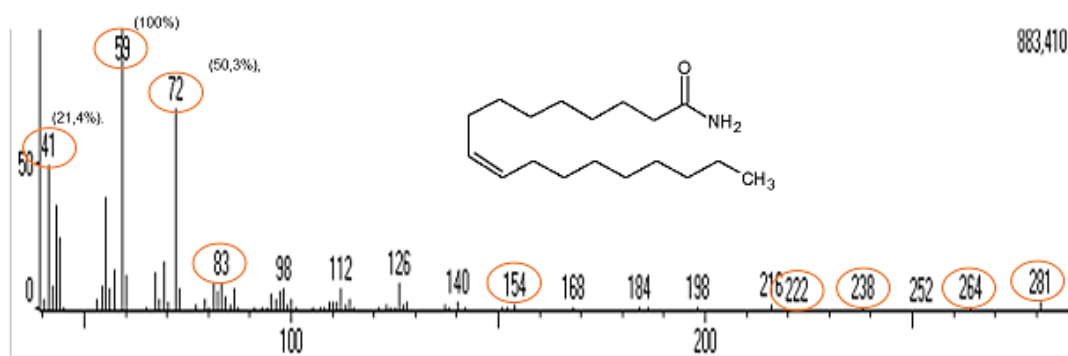
FONTE: A autora (2018).

A análise de CG-MS de FR 10 MA revelou a presença de compostos derivados de ácidos graxos com uma predominância da oleamida (FIGURA 23), dados que corroboram com os já apresentados nas análises de RMN de ^1H e ^{13}C .

Oleamida (24,20%); RT 21,452 min; m/z 59 (100%) com fórmula molecular $\text{C}_{18}\text{H}_{35}\text{NO}$, PM 281; íon abundante à m/z 59 (100%) 72 (50,3%), 41 (21,4%). O fragmento m/z 264 indicou a perda de NH_3 (-17 unidades de massa) e formação de um ceteno ($\text{H}_2\text{C}=\text{C}=\text{O}$). O fragmento m/z 238 mostrou perda de $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_3$ (-43 unidades de massa) da extremidade alifática, m/z 222 e 59 (clivagem β acompanhada por rearranjo de “McLafferty” com a formação de $\text{CH}_3-\text{CO}-\text{NH}_2$), m/z 154 (clivagem alílica entre C7-C8, seguida de rearranjo) e m/z 97 e 83 (fragmentos de íons das clivagens C6-C7 e C5-C6 do ceteno a m/z 264). Estes dados estão de acordo com os descritos por Bisogno et al. (1997) e confirmam que o composto apresentado é a oleamida (FIGURA 23).

As amidas graxas são estudadas em vários sistemas do organismo e estão associadas à regulação do sistema cardiovascular, nervoso, digestivo, metabólico, reprodutivo e imune. (FARREL; MERKLER, 2008). Estudos indicam efeitos supressivos, exemplificados pela diminuição da contratilidade do coração, vasorrelaxação, neuroproteção em condições neurológicas crônicas e efeitos antiinflamatórios (MACKIE, 2006). Algumas amidas graxas vêm sendo estudadas por seus efeitos na proliferação de células de câncer *in vitro*, ação que tem sido demonstrada pela dependência de três fatores: cadeia graxa, grupo amino e tipo celular (BISOGLNO, et al., 1998; PACHER; BÁTKAI; KUNOS, 2006).

FIGURA 23 - ESPECTRO DE MASSA REFERENTE AO PICO 36 DO CROMATOGRAMA DE FR 10 MA – OLEAMIDA



FONTE: A autora (2018).

Oleamida é uma amida graxa naturalmente encontrada em animais e vegetais e tem recebido atenção por ter sido relatado várias atividades biológicas como indução do sono, supressão imunológica, ativação de receptores de serotonina e ácido gama-amino butírico (GABA), além de se ligar ao receptor canabinóide conferindo propriedades canabinomiméticas. (MENDELSON, 2001).

D'Oca (2010), em seu estudo, realizou a síntese de amidas graxas e verificou uma importante atividade antimicrobiana contra *Micobacterium tuberculosis*.

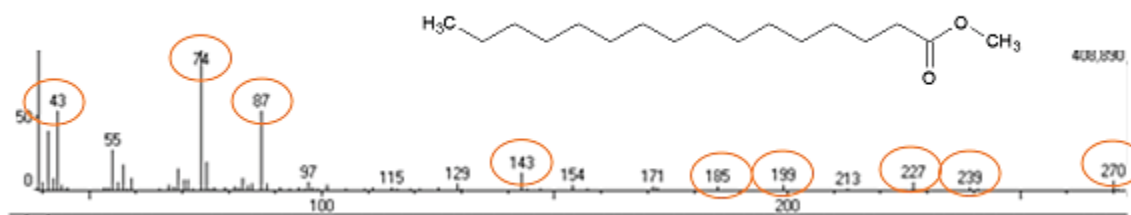
Akanmu, Adeosun e Ilesanmi (2007) investigaram o efeito da oleamida na depressão, por comportamento “novelty-induced” (inibição da alimentação produzida por um ambiente novo; “hipofagia induzida por novidades” e a possível influência da variação sexual, concluindo que a oleamida reduziu significativamente todos os comportamentos “novelty-induced” em camundongos durante o período exploratório que foi reforçado durante o período de habituação, indicando um efeito inibitório central. Os resultados confirmaram a multiplicidade de receptores do sistema nervoso central e neurotransmissores com os quais a oleamida interage, justificando os seus diversos efeitos neurofarmacológicos e propriedades antidepressivas.

Murillo Rodríguez et al. (2001) verificaram a capacidade da oleamida afetar processos de memória e também seu efeito na atividade locomotora, temperatura central e percepção da dor em ratos Wistar. Concluíram que oleamida é um lipídio que afeta vários parâmetros fisiológicos de maneira similar à maconha e a canabinoides endógenos e além disso, como sua concentração no líquido (LCR) aumenta durante a privação do sono, acreditam que ela possa mediar, pelo menos em parte, a síndrome causada pela privação do sono.

O sinal 17 revelou-se como uma outra amida graxa, como demonstrado pelo espectro de massa na (FIGURA 24).

Ácido hexadecanoico metil éster (metil palmitato) (3,52 %); RT 16,899 min; PM 270 m/z com fórmula molecular $C_{17}H_{34}O_2$. Íon abundante à m/z 74 (100%) 87 (58,3%), 75 (20,8%), 43 (14,9%), 143 (12,4%), 227 (6,22%), 239 (3,84%), 185 (3,05%), 199 (2,48%).

FIGURA 24 - ESPECTRO DE MASSA REFERENTE AO SINAL 17 DO CROMATOGRAMA DA FR 10 MA – ÁCIDO HEXADECANOICO METIL ÉSTER



FONTE: A autora (2018).

O fragmento m/z 239 mostrou a perda de (OCH_3) , o fragmento m/z 227 mostrou perda de $-CH_2-CH_2-CH_3$ (-43 unidades de massa) da extremidade alifática, o fragmento m/z 87 $[CH_2=CHC(=OH)OCH_3]$ e o fragmento m/z 74 $[CH_2=C(OH)OCH_3]$ (SEIKI et al., 1997; DOSHI et al., 2015).

He et al. (2014) investigaram a composição química da espécie *Genebra anandria* (L.) Sch. Bip onde também isolaram e identificaram o ácido hexadecanoico metil éster (metil palmitato) da fração éter de petróleo.

Uma fração de ésteres metílicos isolados de ácidos graxos de *Sesuvium portulacastrum* L. foram estudadas quanto a sua composição química e atividade antimicrobiana contra microrganismos patogênicos humanos. A análise cromatográfica revelou a presença do ácido palmítico e outros ácidos graxos que apresentaram atividade antimicrobiana moderada contra *Bacillus subtilis* e *Aspergillus fumigatus* e *A. niger* (CHANDRASEKARAN; SENTHILKUMAR; VENKATESALU, 2011).

Um estudo das folhas de *Justicia secunda* Vahl, uma planta tropical utilizada popularmente na Nigéria para anemia e hipertensão, relata análise da composição do óleo essencial por GC-MS demonstrando a presença de metil palmitato, além de ácido octadecatrienóico metil éster, oleamida entre outros (HAMILTON-AMACHREE; UZOEKWE, 2017).

O Metil palmitato foi descrito como repelente de insetos e como inibidor de larvas de *Gryllodes sigillatus* Walker (HENDERSON; WELL; JEANNE, 1991). Esse composto também demonstrou uma atividade acaricida contra *Tetranychus cinnabarinus* em uma concentração não tóxica para humanos, podendo ser um promissor acaricida natural (WANG et al., 2009).

Saeed et al. (2012) avaliaram a atividade antiinflamatória de metil palmitato em diferentes modelos experimentais em ratos e os resultados mostraram uma redução do edema de pata induzido por carragenina, redução dos níveis plasmáticos de fator de necrose tumoral- α (TNF- α) e interleucina-6 (IL-6) demonstrando ser uma substância eficaz na redução da inflamação em vários modelos experimentais.

5.3.1.2 Identificação dos compostos de FR 128 do EEB

A identificação do composto de Fr 128, proveniente da purificação da FCHCl₃ do EEB foi realizada por RMN de ¹H e ¹³C e estão representados nas (FIGURAS 22 e 23).

A análise por RMN ¹H (FIGURA 25) indicou um esqueleto de triterpeno pentacíclico do tipo ursano para FR 128, caracterizado pela presença de sinais de hidrogênios referentes a metilas em δ 0,78 (H-25), δ 0,82 (H-29), δ 0,91 (H-30), δ 1,0 (H-24), δ 1,09 (H-26), δ 1,14 (H-27), δ 1,27 (H-23) ppm. Um sinal em δ 3,92 característico de hidrogênio da hidroxila (3 β -OH) e um sinal em δ 5,38 (H-12) típico de hidrogênio olefínico.

O espectro de ¹³C (FIGURA 26) apresentou sinal em δ 125,7 e δ 138,02 ppm referente aos carbonos olefínicos C-12 e C-13, além dos sinais em δ 79,07 ppm e δ 177,6 ppm atribuídos aos carbonos (C-3) e (C-28), respectivamente.

RMN (CHCl₃, 100 MHz) δ 38.07 (C1), 27.2 (C2), 79.07 (C3), 38.87 (C4), 55,23 (C5), 18,31 (C6), 33.09 (C7), 39.5 (C8), 47,6. (C9), 37.0 (C10), 23.3 (C11), 125.7 (C12), 138.02 (C13), 42.01 (C14), 28.04 (C15), 24.2 (C16), 47.9 (C17), 52.7 (C18), 39.1 (C19), 38.8 (C20), 30.7 (C21), 36.7 (C22), 28.2 (C23), 15.5 (C24), 15.6 (C25), 17.02 (C26), 23.6 (C27), 177.6 (C28), 17,02 (C29), 21.02 (C30).

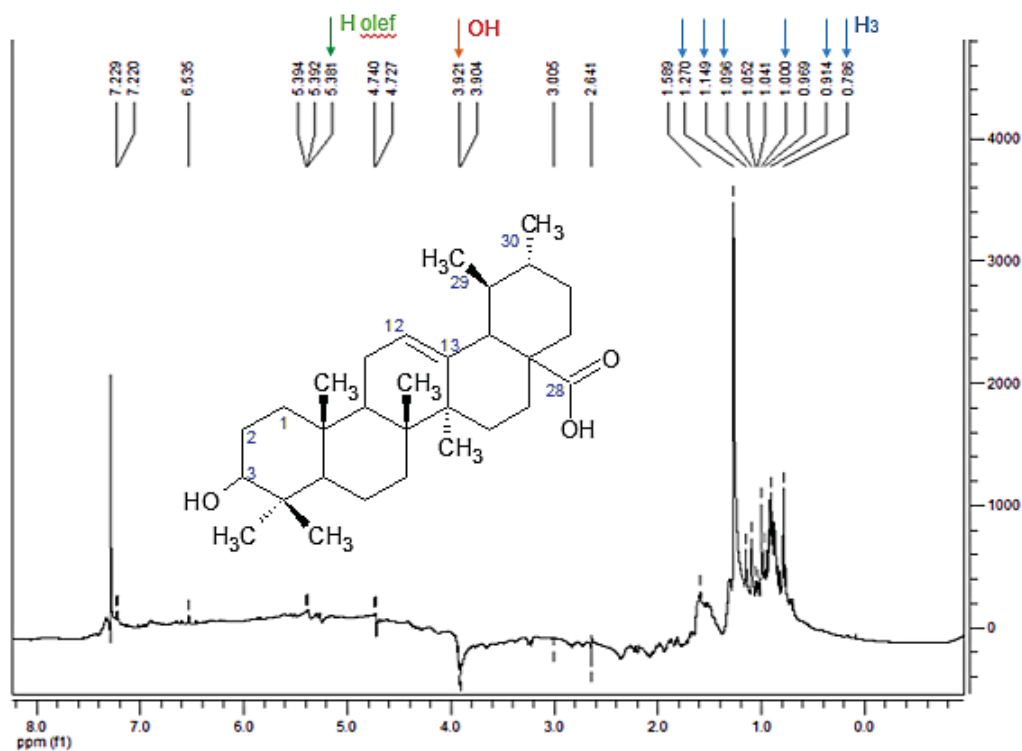
Os dados apresentados encontram-se de acordo com os descritos na literatura para o ácido ursólico (FIGURA 27) (MAHATO, 1998; TAKEOKA et al., 2000; SEEBACHER et al., 2003; COSTA, 2007; COSTA et al., 2008; FABRI, 2013; FOLQUITTO, 2014; PADUA et al., 2014).

Os triterpenos pentacíclicos são metabólitos secundários de plantas que são derivados da ciclização do esqualeno (XU; FAZIO; MATSUDA, 2004). Encontram-se em diferentes órgãos de plantas como cascas do caule e cobertura de folhas. Estão presentes em baixas quantidades em todas as plantas, no entanto, existem algumas

espécies com alta quantidade desses triterpenos como é o caso da *Betula alba* L., que apresenta altas quantidades de lupeol, betulina, ácido betulínico, ácido oleanólico e ácido ursólico (JÄGER et al., 2009).

Os ursanos além de apresentarem citotoxicidade contra várias linhagens celulares, ainda possuem outras atividades farmacológicas como atividade antigênica, anti-inflamatória, antioxidante e capacidade de melhorar a diferenciação celular, o que faz desses compostos potenciais drogas o desenvolvimento de modernas contra o câncer (LASZCZYK, 2009).

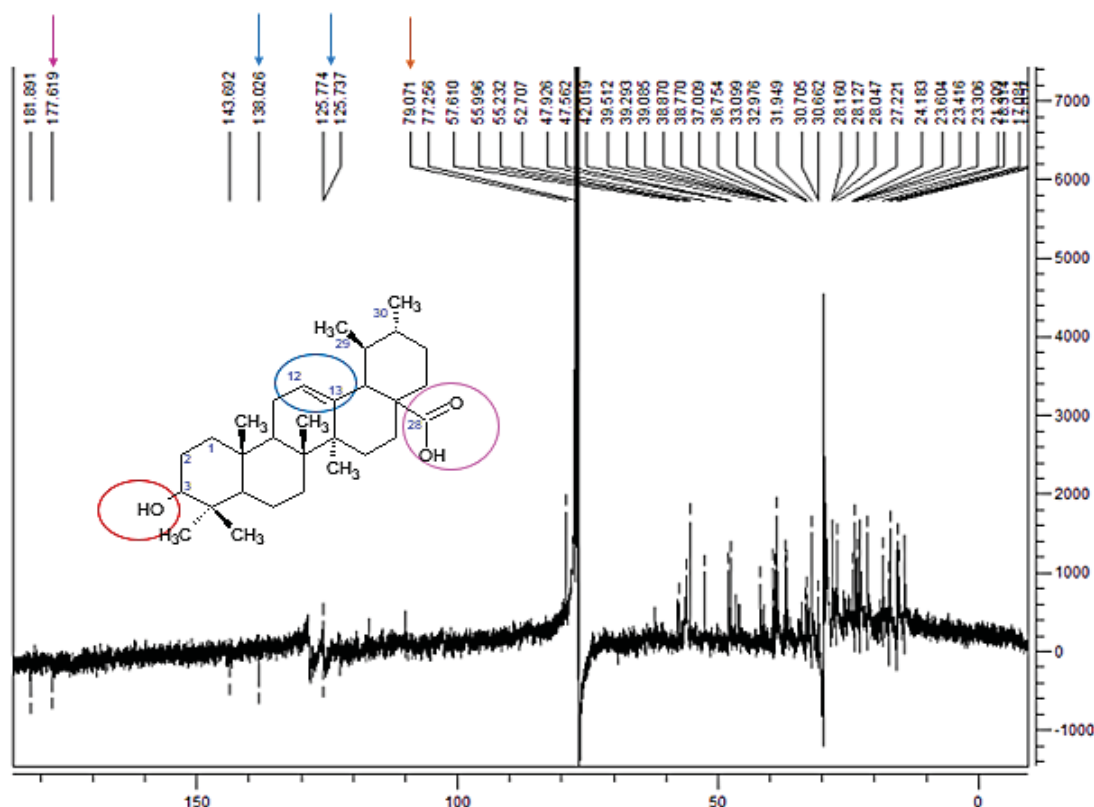
FIGURA 25 - ESPECTRO DE RMN DE ^1H DE FR 128 (400 MHZ; CDCl_3)



FONTE: A autora (2018).

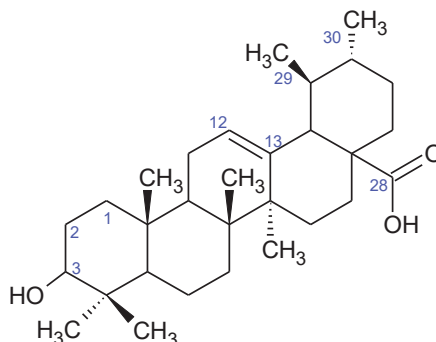
PADUA et al. (2014) analisaram os efeitos antiinflamatórios do ácido ursólico e metil ursolato, isolados de cascas de maçã (*Malus domestica*, Borkh, Rosaceae), por meio de edema de pata induzida por zymosan, pleurisia e um em modelo experimental de artrite. Os resultados mostraram uma diminuição do edema da pata em 46 e 44%, respectivamente.

FIGURA 26 - ESPECTRO DE RMN DE ^{13}C DE FR 128 (100 MHz; CDCl_3)



FONTE: A autora (2018).

FIGURA 27 - ESTRUTURA QUÍMICA DO ÁCIDO URSÓLICO



FONTE: A autora (2018).

Ambos ursólico e metil ursolato inibiram o extravasamento de proteínas na cavidade torácica; edema túbio-femoral em 40 e 48%, respectivamente. Além disso, diminuíram os níveis de mediadores relacionados à inflamação sinovial, de $\text{TNF-}\alpha$ e níveis de $\text{IL-1}\beta$.

A espécie *Peltodon radicans* Pohl (Lamiaceae), utilizada no tratamento de picadas de cobra e escorpiões foi estudada química e biologicamente. Os autores

determinaram da atividade bloqueadora da ação edematogênica do veneno de *Bothrops atrox* dos extratos de flores e folhas, em camundongos por via peritoneal e realizaram ainda o isolamento e caracterização dos constituintes químicos desses extratos. Concluíram que os extratos apresentaram ação antiedematogênica relacionando esta ação aos triterpeno isolados, o ácido ursólico e o ácido tormêntico (COSTA et al., 2008).

O ácido ursólico também foi isolado por espécies de *Lobelia* como é o caso da *L. sessilifolia* utilizada popularmente na China para tratamento de tosse, cirrose ascite, abscesso e picada de cobra (SUN et al., 2012). Em outro estudo de *L. exaltata* o ácido ursólico foi isolado juntamente com outros dois triterpenos, o ácido oleanoico e a β -amirina da fração acetato de etila que apresentou uma boa atividade antimicrobiana (FOLQUITTO, 2014).

5.3.1.3 Identificação dos compostos de FR 11Ac de EEB

A avaliação da composição química de Fr 11Ac por CG-MS proveniente da purificação do extrato etanólico possibilitou a identificação de 10 compostos os quais estão listados na (TABELA 10) e seus espectros de massa nas (FIGURAS 28 a 37). De modo geral, a fração apresentou principalmente compostos como açúcares e produtos de degradação de açúcar, ácidos graxos, álcoois, ésteres, cetonas, e aldeídos, que se apresentaram solúveis em clorofórmio.

TABELA 11 - COMPOSTOS QUÍMICOS IDENTIFICADOS NA FR 11Ac DE *L. exaltata* por CG-MS
continua

TR (MIN)	COMPOSTOS	M (g.mol ⁻¹)	FM	ÁREA DO SINAL (%)
4,383	5- metil 2-Furancarboxaldeído	110	C ₆ H ₆ O ₂	2,56
5,975	Acetofenona	120	C ₈ H ₈ O	2,38
7,408	Ácido cetobutanoico	102	C ₄ H ₆ O ₃	2,24
8,042	Decanal	156	C ₁₀ H ₂₀ O	9,60
8,225	5-Hidroximetilfurfural	126	C ₆ H ₆ O ₃	13,20
9,358	3-Heptanol	116	C ₇ H ₁₆ O	3,13
1,442	3-Amino-2,4-dimetil pentano	115	C ₇ H ₁₇ N	4,68

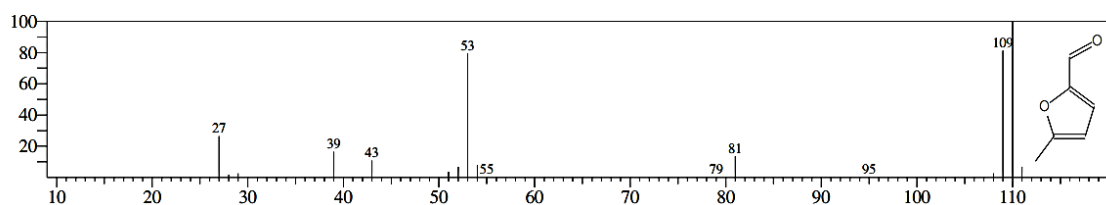
TABELA 12 - COMPOSTOS QUÍMICOS IDENTIFICADOS NA FR 11Ac DE *L. exaltata* por CG-MS
conclusão

TR (MIN)	COMPOSTOS	M (g.mol ⁻¹)	FM	ÁREA DO SINAL (%)
11,881	1,6-anidro, β-D-Glicopiranosose	162	C ₆ H ₁₀ O ₅	24,69
14,108	1,3-Dioxolane-4-metanol	104	C ₄ H ₈ O ₃	3,32
17,075	Ácido n-Hexadecanoico (ácido palmítico)	256	C ₁₆ H ₃₂ O ₂	7,67

TR: Tempo de retenção; M: Massa molar; FM: Fórmula molecular

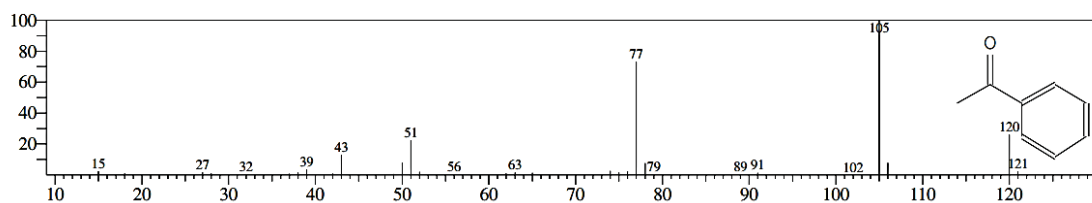
FONTE: A autora (2018)

FIGURA 28 - ESPECTRO DE MASSA DO COMPOSTO 5-METIL 2-FURANCARBOXALDEÍDO DA FR-11Ac



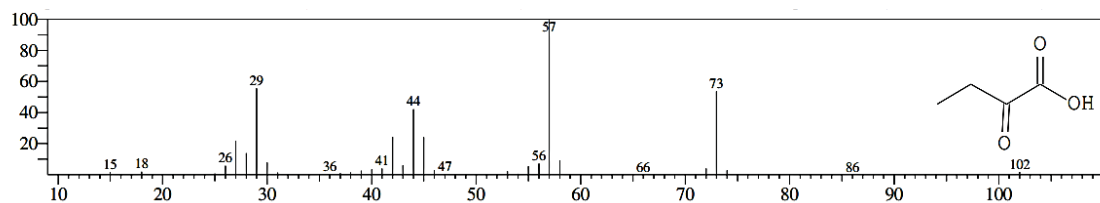
FONTE: A autora (2018).

FIGURA 29 - ESPECTRO DE MASSA DO COMPOSTO ACETOFENONA DA FR 11Ac



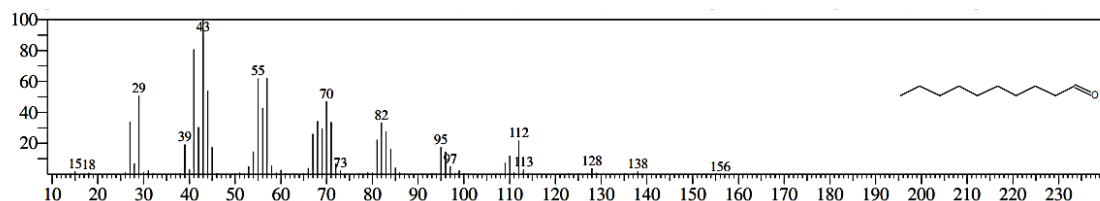
FONTE: A autora (2018).

FIGURA 30 - ESPECTRO DE MASSA DO COMPOSTO ÁCIDO CETOBUTANOICO DA FR 11Ac



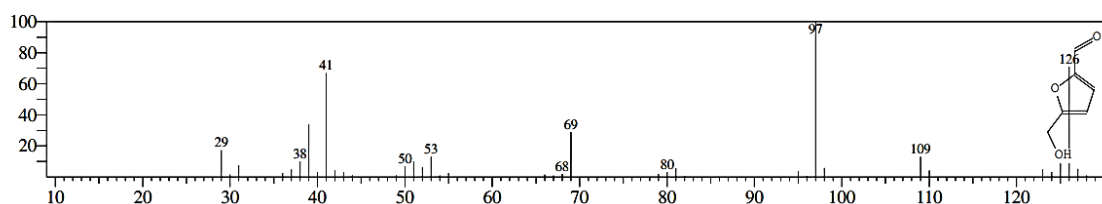
FONTE: A autora (2018).

FIGURA 31 - ESPECTRO DE MASSA DO COMPOSTO N-DECANAL DA **FR 11Ac**



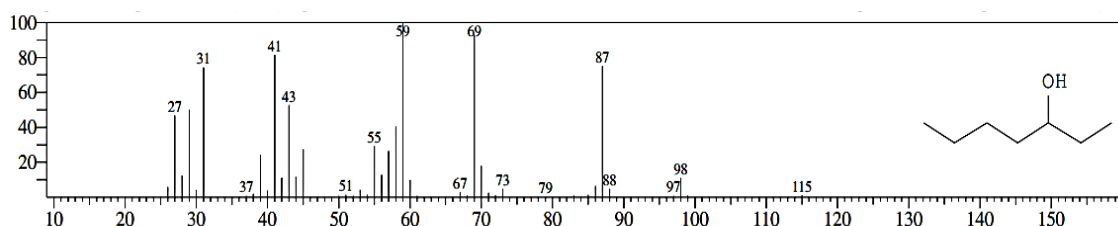
FONTE: A autora (2018).

FIGURA 32 - ESPECTROS DE MASSA DO COMPOSTO 5-HIDROXIMETILFURFURAL **FR-11Ac**



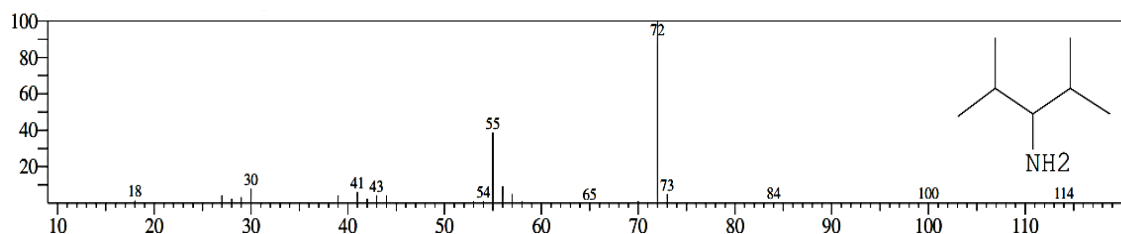
FONTE: A autora (2018).

FIGURA 33 - ESPECTROS DE MASSA DO COMPOSTO 3-HEPTANOL DA **FR11Ac**



FONTE: A autora (2018).

FIGURA 34 - ESPECTROS DE MASSA DO COMPOSTO 3-AMINO-2,4-DIMETIL PENTANO DA **FR 11Ac**



FONTE: A autora (2018).

FIGURA 35 - ESPECTROS DE MASSA DO COMPOSTO 1,6-ANIDRO, B-D-GLICOPIRANOSE DA FR 11Ac

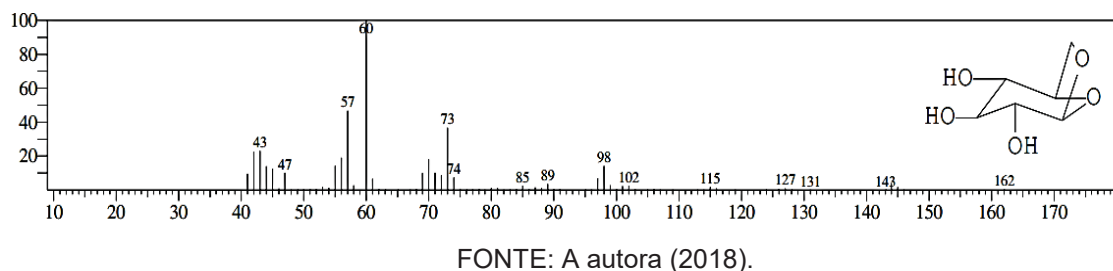


FIGURA 36 - ESPECTROS DE MASSA DO COMPOSTO 1,3-DIOXOLANE-4-METANOL DA FR-11Ac

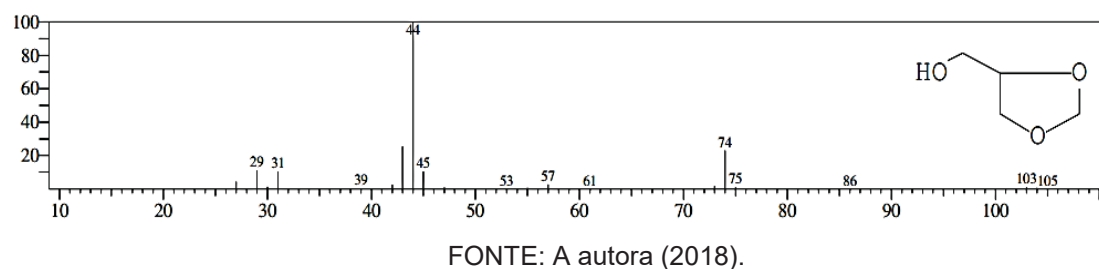
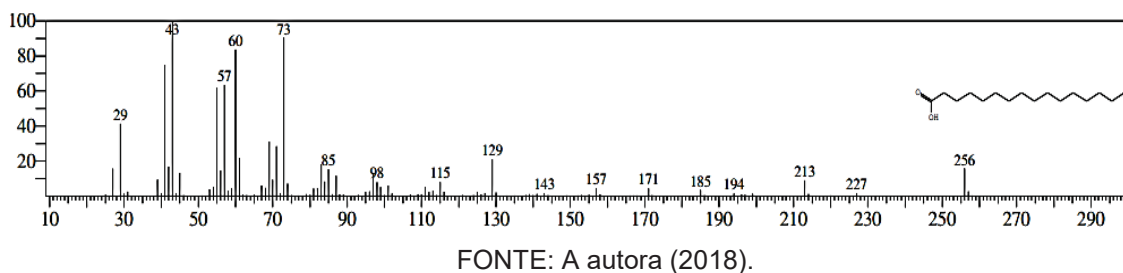


FIGURA 37 - ESPECTROS DE MASSA DO COMPOSTO ÁCIDO HEXADECANOICO DA FR-11Ac



5.3.1.4 Identificação dos compostos de Fr 11Am do Extrato Etanólico Bruto

A avaliação da composição química de Fr 11Am por CG-MS proveniente da purificação do extrato etanólico possibilitou a identificação de vários compostos e as maiores áreas de pico estão listados na (TABELA 12) e seus espectros de massa nas (FIGURA 38 a 40). De modo geral, a fração apresentou principalmente compostos como açúcares e produtos de degradação de açúcar, ácidos graxos álcoois e aldeídos, que se apresentaram solúveis em clorofórmio.

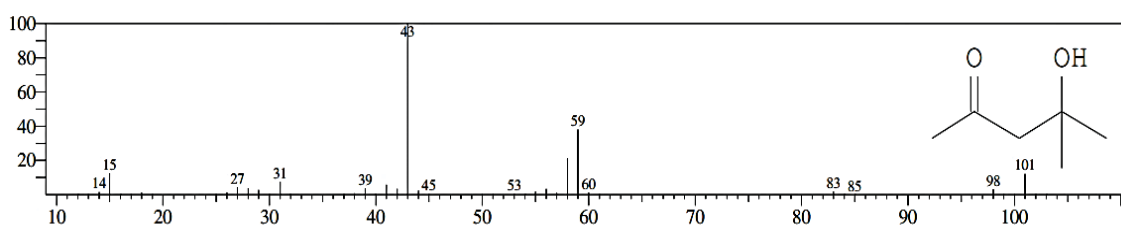
TABELA 13 - COMPOSTOS QUÍMICOS IDENTIFICADOS NA FR 11Am DE *L. exaltata* por CG-MS

TR (MIN)	COMPOSTOS	M (g/mol)	FM	ÁREA DO SINAL (%)
3,300	4-hidroxi-4-metil, 2-Pentanona	116	C ₆ H ₁₂ O ₂	26,54
3,702	Metoxi-fenil-Oxime-,	151	C ₈ H ₉ NO ₂	6,79
19,427	2,6,10,15-tetrametil- Heptadecano	296	C ₂₁ H ₄₄	5,54

TR: Tempo de retenção; M: Massa molar; FM: Fórmula molecular

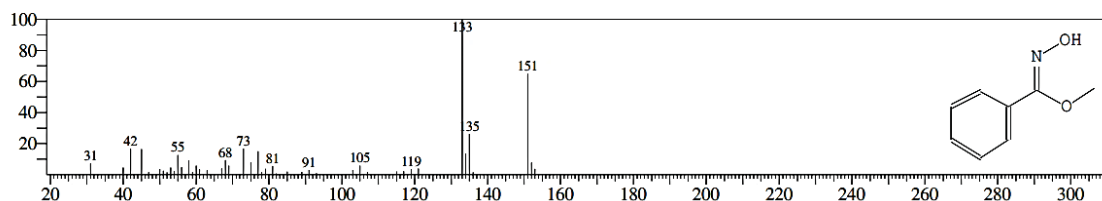
FONTE: A autora (2018).

FIGURA 38 - ESPECTRO DE MASSA DO COMPOSTO 4-HIDROXI-4-METIL-2-PENTANONA DA FR-11Am



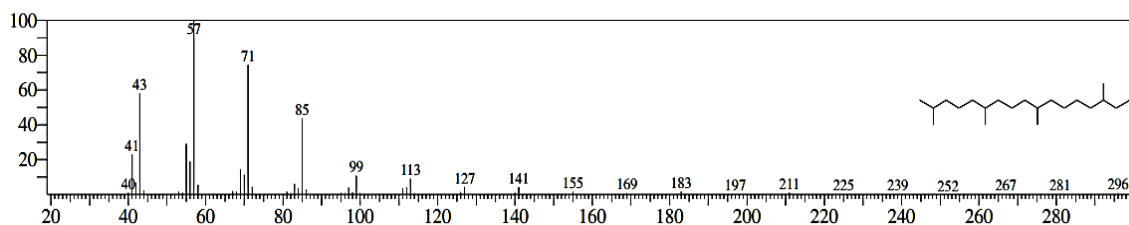
FONTE: A autora (2018).

FIGURA 39 - ESPECTRO DE MASSA DO COMPOSTO METOXI-FENIL- OXIME DA FR 11Am



FONTE: A autora (2018).

FIGURA 40 - ESPECTRO DE MASSA DO COMPOSTO 2,6,10,15-TETRAMETIL- HEPTADECANO DA FR 11Am



FONTE: A autora (2018).

5.3.2 Identificação dos compostos do ECB das partes aéreas *L. exaltata*

5.3.2.1 Identificação de substância L₁ do ECB

A substância L₁, obtida a partir da recristalização do ECB apresentou-se como cristais esbranquiçados com um rendimento de 12,8g.

Na difratometria de raios x de monocristal (DRXM), a análise de cela unitária do cristal estudado apresentou os seguintes resultados: $a = 6.65 \text{ \AA}$, $b = 12.11 (5) \text{ \AA}$, $c = 19.00 \text{ \AA}$, $\alpha = 90.00$ graus, $\beta = 93.78$ graus, $\delta = 90.00$ graus. O volume de cristal foi registrado a $1523 \text{ \AA}^3$. Esses parâmetros estão de acordo com os já relatados anteriormente na literatura (RABINOWITZ; KRAUT, 1964; REBECCA; BOYCE; SOMASUNDRAM, 2012) indicando que o cristal isolado das partes aéreas de *L. exaltata* é o *myo*-inositol (ciclohexano-1,2,3,4,5,6-hexol). A fórmula química e o peso molecular são respectivamente $C_{12}H_{24}O_{12}$ e 360.31, evidenciando que existem duas unidades assimétricas.

A cristalografia de raios-X é um importante método para a caracterização da estrutura atômica de compostos químicos, capaz de determinar a disposição de átomos e ligações químicas dentro de um cristal por uma representação tridimensional baseada na densidade eletrônica.

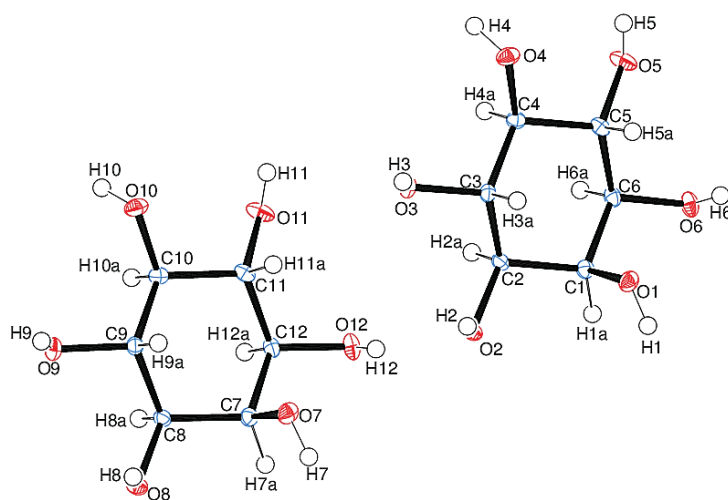
A partir da análise de raios-X, os cristais mostraram ter configuração de célula monoclinica com P21/n. O composto orgânico está representado na figura ORTEP (FIGURA 41), mostrando a numeração para C, H e O.

O espectro de absorção na região do infravermelho, em pastilhas de KBr (FIGURA 42) confirmou as características de L₁ como sendo o *myo*-inositol. Foi possível observar uma banda de estiramento da ligação de O-H muito forte na região de 3412 cm^{-1} ; o estiramento da ligação C-H (sp^3-1s) com deformação assimétrica como resultado de uma banda de absorção de fraca intensidade na região 2935 cm^{-1} . A região 1393 cm^{-1} foi dominada por movimentos dos hidrogênios de metina, tanto no plano (H-C-O) quanto fora do plano (H-C-C), e as deformações de flexão do plano C-O-H. A banda 1050 cm^{-1} mostrou deformações de estiramento de C-O e C-C como contribuições significativas para dobragem de hidrogênio com metina hydrogenada e flexão de átomos pesados (C-C-O e C-C-C). A (TABELA 12) descreve as principais bandas encontradas no espectro FTIR do cristal analisado comparando os resultados com os dados da literatura (WILLIAMS; ATALLA, 1984; MISHRA; SRIVASTAVA; SHUKLA, 2017).

A Microscopia Eletrônica de Varredura por Emissão de Campo (Field Emission Gun Scanning Electron Microscopy - FEG-SEM) é uma técnica de alta resolução que realiza a emissão de elétrons por um canhão de aplicação de um campo elétrico ("Field Emission Gun"), permitindo a obtenção de imagens com ampliação de até 500.000 X e espectros de EDS e de WDS (microanálise química quantitativa por níveis de comprimento de onda de raios X).

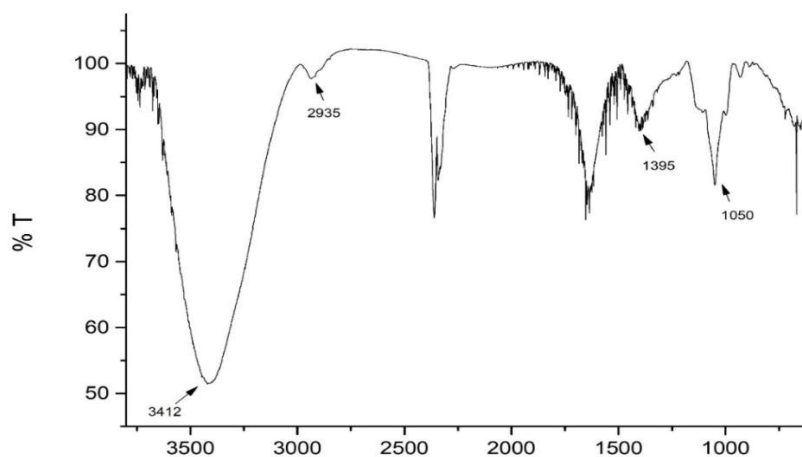
O espectro de EDS da substância L1 mostrou picos característicos de carbono (27,29%) e oxigênio (72,71%) compatível com o *myo*-inositol como demonstrado na (FIGURA 43).

FIGURA 41 - REPRESENTAÇÃO ORTEP DO *MYO-INOSITOL*



FONTE: A autora (2017)

FIGURA 42 - ESPECTRO DE FTIR DO *MYO-INOSITOL* DE *L. exaltata* *Phol* CAMPANULACEAE



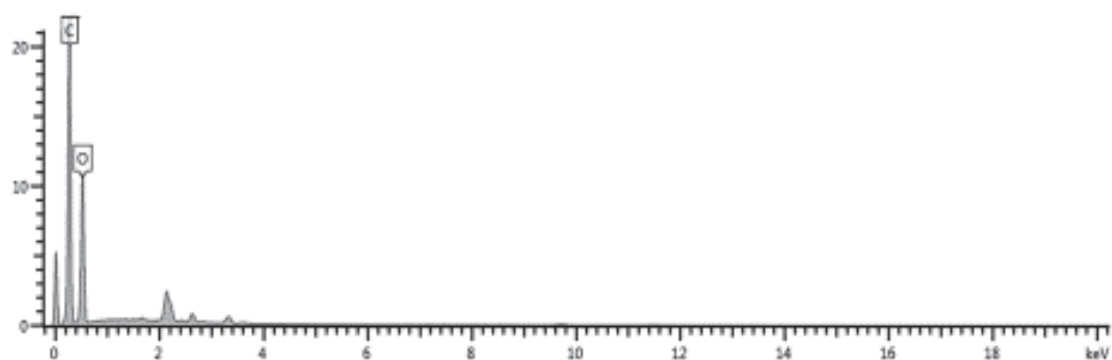
FONTE: A autora (2018)

TABELA 14 - COMPARAÇÃO ENTRE DADOS DA LITERATURA E OS ENCONTRADAS NO ESPECTRO FTIR DA SUBSTÂNCIA L₁

BANDAS	RESULTADO SUBSTÂNCIA L ₁ (cm ⁻¹)	LITERATURA MYO-INOSITOL (cm ⁻¹)	REFERÊNCIAS
Acoplamento com alongamento de C-O e alongamento com vibração de C-C	1050	1050	(PAIVA et al., 2010; SILVERSTEIN; WEBSTER; KIEMLE, 2011)
Dobramento C-O-H acoplamento com dobramento C-C-H	1395	1160 a 1460 1440 a 1358	(WILLIAMS; ATALLA, 1984) (MISHRA; SRIVASTAVA; SHUKLA, 2017)
Estiramento de C-H	2935	2880 e 2970 3082 a 3008	(WILLIAMS; ATALLA, 1984) (MISHRA; SRIVASTAVA; SHUKLA, 2017)
Estiramento de O-H	3412	Entre 3100 e 3450 3428	(WILLIAMS; ATALLA, 1984) (MISHRA; SRIVASTAVA; SHUKLA, 2017)

FONTE: A autora (2018).

FIGURA 43 - ESPECTRO DE EDS DO MYO-INOSITOL DE *L. exaltata*

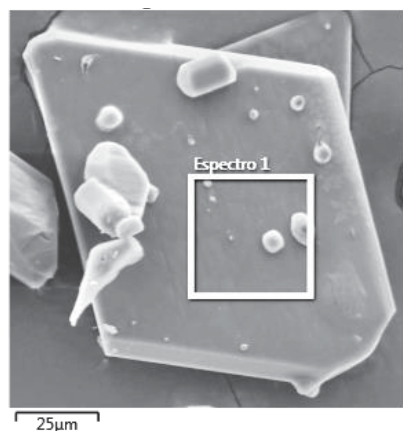


FONTE: A autora (2018)

O cristal apresentou uma forma quadrada planar na eletromiografia FEG-SEM como demonstrado na (FIGURA 44).

Para confirmar a pureza dos cristais de *myo*-inositol foram realizados a espectroscopia de ¹H e ¹³C-NMR. Na análise unidimensional de ¹H-NMR e ¹³C-NMR, obteve-se os espectros representados nas (FIGURAS 45 e 46) respectivamente.

FIGURA 44 - ELETROMIOGRAFIA FEG-SEM DE DO *MYO-INOSITOL* DE *L. exaltata* PHOL CAMPANULACEAE

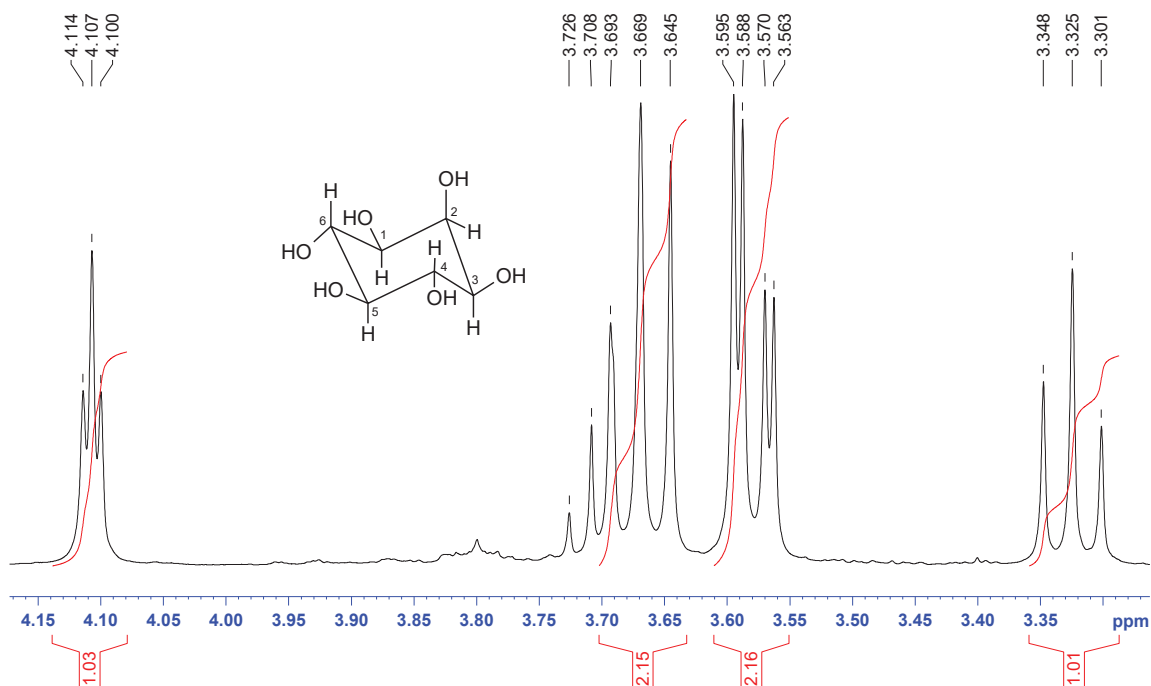


FONTE: A autora (2018).

O espectro de ^1H -RMN mostrado na (Figura 45) apresenta-se de acordo com a estrutura de uma unidade de *myo*-inositol ($\text{C}_6\text{O}_6\text{H}_{12}$). Observou-se que intensidade populacional dos hidrogênios foi 1:2:2:1. Essa intensidade refere-se aos hidrogênios H_2 (δH 4.11 ppm); $\text{H}_4\text{-H}_6$ (δH 3,67 ppm); $\text{H}_1\text{-H}_3$ (δH 3,58 ppm) e H_5 (δH 3,32 ppm). De acordo com os deslocamentos químicos e constantes de acoplamento os grupos de sinais observados são $\text{H}_2\text{-H}_4\text{-H}_6\text{-H}_1\text{-H}_3\text{-H}_5$ semelhante ao encontrado por Cerdan et al. (1985), Barrientos e Murthy (1996) e Rebecca, Boyce e Somasundram (2012).

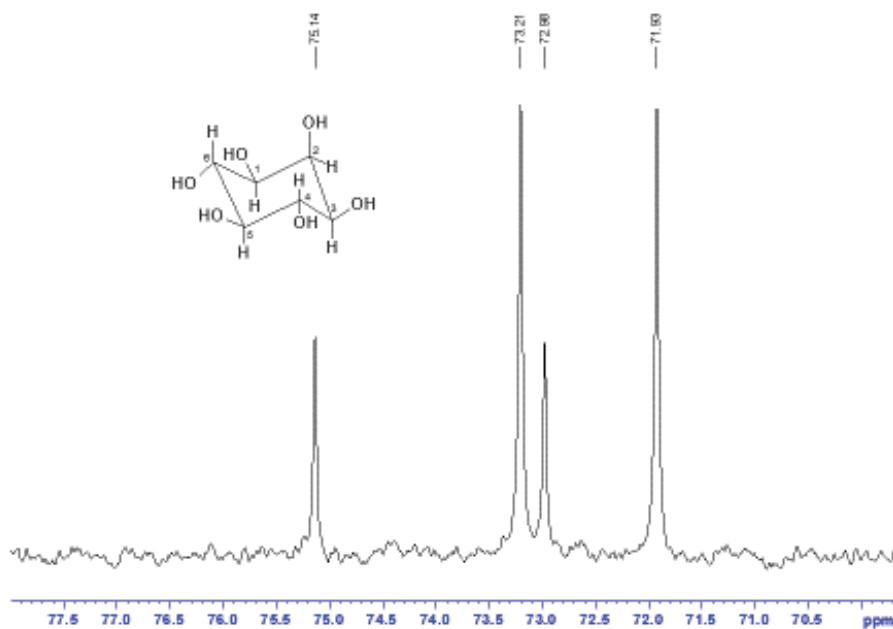
Na análise do espectro de ^{13}C -NMR (FIGURA 46) a amostra do cristal deu origem a quatro sinais referentes aos carbonos C_5 (δC 75.1 ppm), $\text{C}_1\text{-C}_3$ (δC 73.2 ppm), C_2 (δC 72.0 ppm) e $\text{C}_4\text{-C}_6$ (δC 71.9 ppm), com intensidade populacional de 1:2:1:2. Esses sinais provavelmente correspondem aos carbonos $\text{C}_5\text{-C}_1\text{-C}_3\text{-C}_2\text{-C}_4\text{-C}_6$ (ANGYAL; ODIER; 1982; CERDAN et al., 1985; BARRIENTOS; MURTHY, 1996; REBECCA; BOYCE; SOMASUNDRAM, 2012).

FIGURA 45 - ESPECTRO DE ^1H -RMN DO *MYO-INOSITOL* OBTIDO DA ANÁLISE DE CRISTAIS ISOLADOS DE PARTES AÉREAS DE *L. exaltata*



FONTE: A autora (2018).

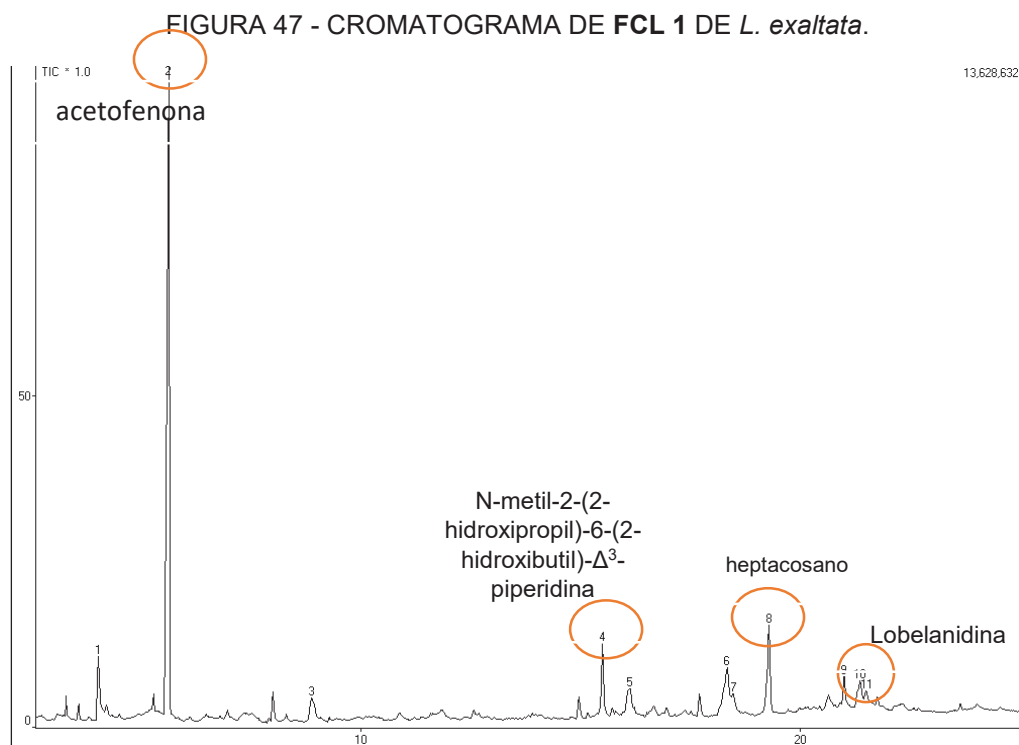
FIGURA 46 - ESPECTRO DE ^{13}C -RMN DO *MYO-INOSITOL* OBTIDO DA ANÁLISE DE CRISTAIS ISOLADOS DE PARTES AÉREAS DE *L. exaltata*



FONTE: A autora (2018).

5.3.2.2 Identificação da fração FCL 1 do ECB

A fração FCL 1, resultante da purificação da FCHCl₃ do ECB bruto foi submetida às análises de CG-MS e apresentou os seguintes resultados demonstrados no cromatograma abaixo (FIGURA 47).



FONTE: Central Analítica USP (2018)

A (TABELA 13) sumariza os principais compostos identificados pela análise de CG-MS para a FCL 1.

Na fração FCL 1 foi possível evidenciar a presença de 3 principais compostos: acetofenona, uma cetona aromática, heptacosano, um alcano de cadeia linear e o N-metil-2-(2-hidroxiopropil)-6-(2-hidroxiutil)- Δ^3 -piperidina, um alcaloide piperidínico.

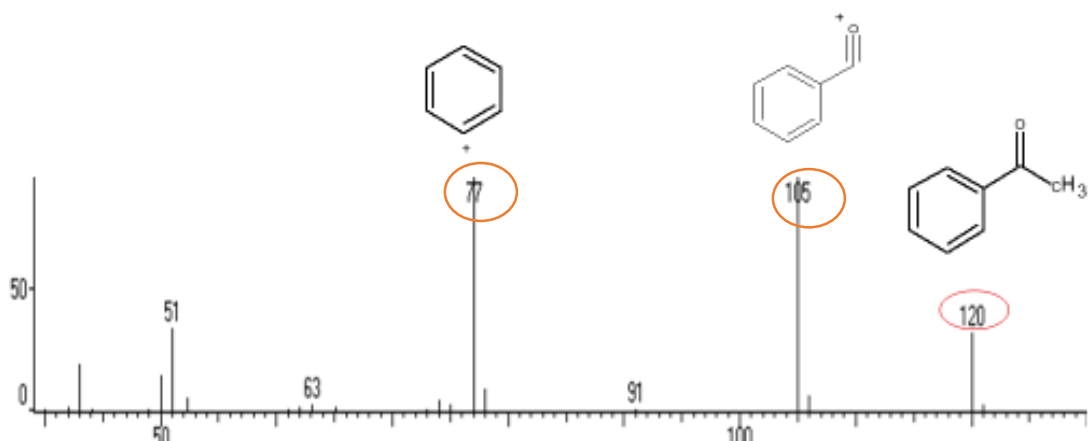
TABELA 15 - ANÁLISE DE CG-MS DE **FCL 1** DE *L. exaltata*.

TR	COMPOSTOS	M	FM	ÁREA DO SINAL (%)
5,629	Acetofenona	120	C ₈ H ₈ O	51,56
15,500	N-metil-2-(2-hidroxi-2-feniletil)-6-(2-hidroxibutil)- Δ^3 -piperidina	241	C ₁₄ H ₂₇ NO ₂	4,63
19,284	Heptacosano	380	C ₂₇ H ₅₆	8,47
21,637	(1-(2-hidroxi-2-feniletil)-1-metilpiperidina) butano-2-ol ou Lelobanidine	291	C ₁₈ H ₂₉ NO ₂	3,62

TR: Tempo de retenção; M: Massa molar; FM: Fórmula molecular

FONTE: A autora (2018).

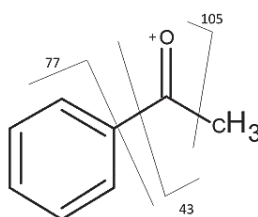
Acetofenona (3,52 %); RT 5,629 min; PM 120 m/z com fórmula molecular C₈H₈O. íon abundante à m/z 105 (100%) 77 (81%), 51(27%). A fragmentação de um CH₃ resulta na transição do íon molecular (m/z = 120) para o pico base (m/z = 105). Outra fragmentação de um C = O leva a uma alteração de 105 para 77 (FIGURAS 48 e 49)

FIGURA 48 - ESPECTRO DE MASSA DA ACETOFENONA REFERENTE AO PICO 2 DO CROMATOGRAMA DE FCL 1 DE *L. exaltata*

FONTE:

A autora (2018).

FIGURA 49 - REPRESENTAÇÃO DAS FRAGMENTAÇÕES EM ACETOFENONA



FONTE: A autora (2018).

A estrutura dos compostos fenólicos consiste de um anel aromático contendo uma hidroxila (fenol) ou mais (polifenol). Várias classes podem ocorrer de acordo com o número de anéis fenólicos e com os elementos estruturais que unem esses anéis. Dois grupos principais de polifenóis foram adotados na literatura, os flavonoides (polifenóis) e não flavonoides. (SIMÕES, 2010).

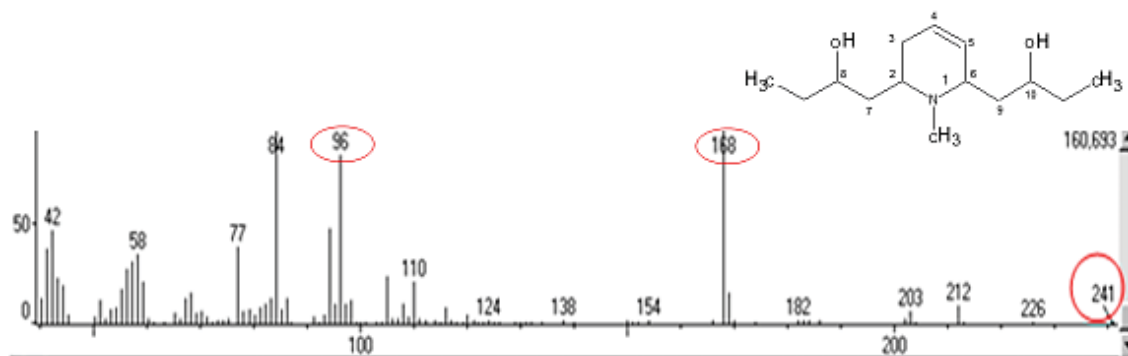
A acetofenona é um metabólito do grupo não flavonoide, juntamente com outros fenóis como os ácidos benzoicos, ácidos cinâmicos, taninos hidrolisáveis, benzofenonas etc (KHADEM; MARLES, 2010). É uma precursora de compostos aromáticos, com propriedades aromáticas semelhantes às da amêndoa, cereja, jasmim e morango. Um estudo de revisão sobre a Ocorrência de Moléculas Funcionais nas Flores de *Camelia sinensis* (L) O. Kuntze mostrou grande abundância de dois compostos aromáticos, a acetofenona e 1-feniletanol. Este estudo corrobora com o resultado obtido no presente estudo onde a FCL 1 de *L. exaltata*, também apresentou uma expressiva quantidade de acetofenona (51,56%) (CHEN et al., 2018).

O sinal 4 (FIGURA 47) de FCL 1 refere-se à dois alcaloides piperidínicos, *N*-metil-2-(2'-hidroxibutil)-6-(2''-hidroxibutil)- Δ^3 -piperidina - (4,66%); RT 5,629 min e o [*N*-metil-2-(2-hidroxipropil)-6-(2-hidroxibutil)- Δ^3 -piperidina].

O alcaloide [*N*-metil-2-(2'-hidroxibutil)-6-(2''-hidroxibutil)- Δ^3 -piperidina], m/z 241 (FIGURA 50), com fórmula molecular $C_{14}H_{27}NO_2$ é formado por m/z 182 [$M-C_4H_9O$]⁺ e m/z 168 [$M-C_5H_{11}O$]⁺ (100%). O fragmento a m/z 96 (FIGURA 51) é considerado um típico de *N*-metil- Δ^3 -piperidina. (PHILIPPOV et al., 1998; RAHMAN et al., 2014).

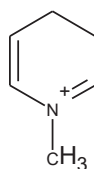
O outro alcaloide piperidínico foi identificado como [*N*-metil-2-(2-hidroxipropil)-6-(2-hidroxibutil)- Δ^3 -piperidina], m/z 227 e com fórmula molecular $C_{13}H_{25}NO_2$ (FIGURA 52). É espectralmente parecido com [*N*-metil-2-(2'-hidroxibutil)-6-(2''-hidroxibutil)- Δ^3 -piperidina], os fragmentos a m/z 168 e 154 são formados pela perda das cadeias laterais. Como o pico a m/z 168 é o de maior abundância relativa, a cadeia lateral menor, foi indicada estar na posição alílica (WILLIAMS; RAY; KIM, 1987).

FIGURA 50 - ESPECTRO DE MASSA DE [N-METIL-2-(2'-HIDROXIBUTIL)-6-(2''-HIDROXIBUTIL)- Δ^3 -PIPERIDINA], REFERENTE AO PICO 4 DO CROMATOGRAMA DE FCL-1 DE *L. exaltata*



FONTE: A autora (2018).

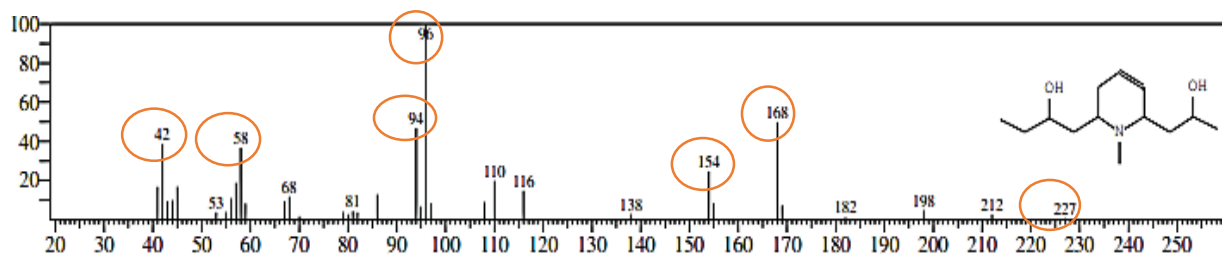
FIGURA 51 - REPRESENTAÇÃO DO FRAGMENTO ESTÁVEL M/Z 96 OBSERVADO EM ALCALOIDES PIPERIDÍNICOS



FONTE: A autora (2018)..

O fragmento 228 indica a fragmentação de um CH_3 . A fragmentação em m/z 196 mostra uma possível perda de um grupo C_3H_7 , levando a uma mudança para 182. O fragmento 168 pode ser originado pela perda da metila ligada ao nitrogênio (FIGURA 53).

FIGURA 52 REPRESENTAÇÃO DA FRAGMENTAÇÃO GERAL DE [N-METIL-2-(2-HIDROXIPROPIL)-6-(2-HIDROXIBUTIL)- Δ^3 -PIPERIDINA]

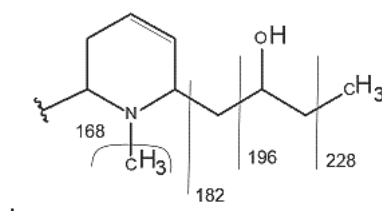


FONTE: A autora (2018).

Os alcaloides piperidínicos do gênero *Lobelia*, comumente apresentam um núcleo piperidínico com substituições em C-2 e/ou C-6 em anéis de piperidina ou N-

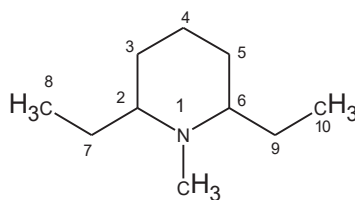
metilpiperidina, com cadeias funcionais que normalmente contêm grupos -C=O, -OH e que resultam em fragmentações espectrais de massa, características (FIGURA 54), (FRANCIS; FRANCIS, 1977; FELPIN; LEBRETON, 2004).

FIGURA 53 - REPRESENTAÇÃO DA FRAGMENTAÇÃO DE [N-metil-2-(2'-hidroxibutil)-6-(2''-hidroxibutil)- Δ^3 -piperidina]



FONTE: A autora (2018).

FIGURA 54 - NÚCLEO PIPERDÍNICO DOS ALCALOIDES DO GÊNERO *Lobelia*.



FONTE: A autora (2018).

As espécies de *Lobelia* são caracterizadas pela presença de látex rico em alcaloides a partir do qual foram isolados diversos alcaloides piperidínicos, tais como lobelina, norlobelanidina, e muitos outros (WILLIAMS et al., 1987, SHIBANO et al., 2001; FELPIN; LEBRETON, 2004; KESTING et al., 2009; KUO et al., 2011).

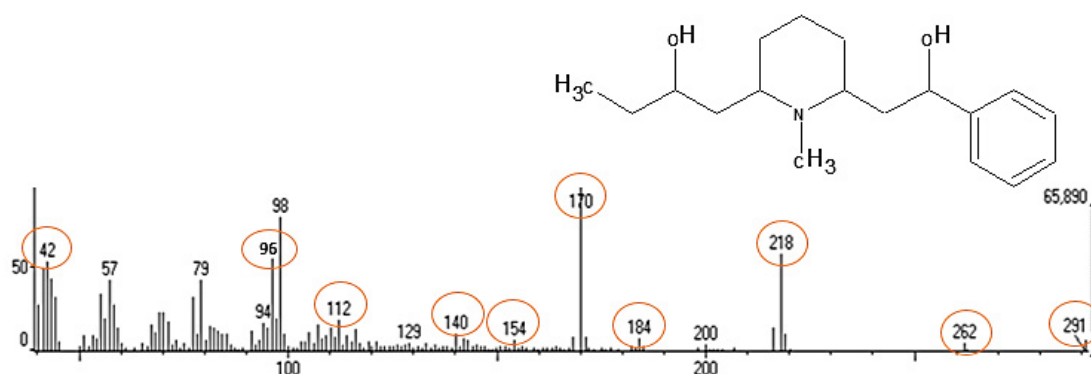
O [N-metil-2-(2-hidroxipropil)-6-(2-hidroxibutil)- Δ^3 -piperidina] e [N-metil-2-(2'-hidroxibutill)-6-(2''-hidroxibutil)- Δ^3 -piperidina] também foram isolados em um estudo de Williams, Ray e Kim (1987), da planta tóxica *Lobelia berlandieri* A. DC. Neste estudo os autores verificaram que os animais que se alimentavam de *L. berlandieri* ficavam em estado de narcose atribuindo este estado a presença dos alcaloides piperidínicos.

Rahman et al. (2014), testaram [N-metil-2-(2-hidroxipropil)-6-(2-hidroxibutil)- Δ^3 -piperidina] da espécie *L. laxiflora*, onde foi demonstrado uma potente inibição da atividade da colinesterase indicando a possibilidade de sua utilização em estudos farmacológicos para tratar doença de Alzheimer.

[*N*-metil-2-(2-hidroxiopropil)-6-(2-hidroxiutil)- Δ^3 -piperidina] isolado também de *L. laxiflora* foi aplicado em um modelo de inflamação aguda induzida por carragenina (Car) e veneno de cobra (CV) em camundongos. O alcaloide apresentou uma moderada ação anti-inflamatória pela capacidade de inibição da atividade do sistema complemento pela via clássica (PHILIPOV et al., 1998).

O íon com o pico a m/z 291 no espectro de massa da (FIGURA 55) corresponde a fórmula molecular $C_{18}H_{29}NO_2$. O íon intenso a m/z 170 foi formado pela perda de uma unidade de 2-fenil hidroxi etil [M-C₆H₅-CH(OH)CH₂]. O pico base a m/z 218 [M-C₂H₅-CH(OH)CH₂] e outro a m/z 184 [M-C₆H₅CH(OH)CH₂] indicam as duas cadeias laterais de compostos (FIGURA 56). O restante mostrou a fragmentação típica dos alcaloides de *Lobelia*. O composto foi identificado como 1(1-(2-hidroxi-2-feniletil)-1-metilpiperidina) butano-2-ol ou Lelobanidine e está de acordo com o descrito por Philipov et al. (1998).

FIGURA 55 - ESPECTRO DE MASSA LELOBANIDINE REFERENTE AO PICO 10 DO CROMATOGRAMA DE FR CL1 DE *L. exaltata*



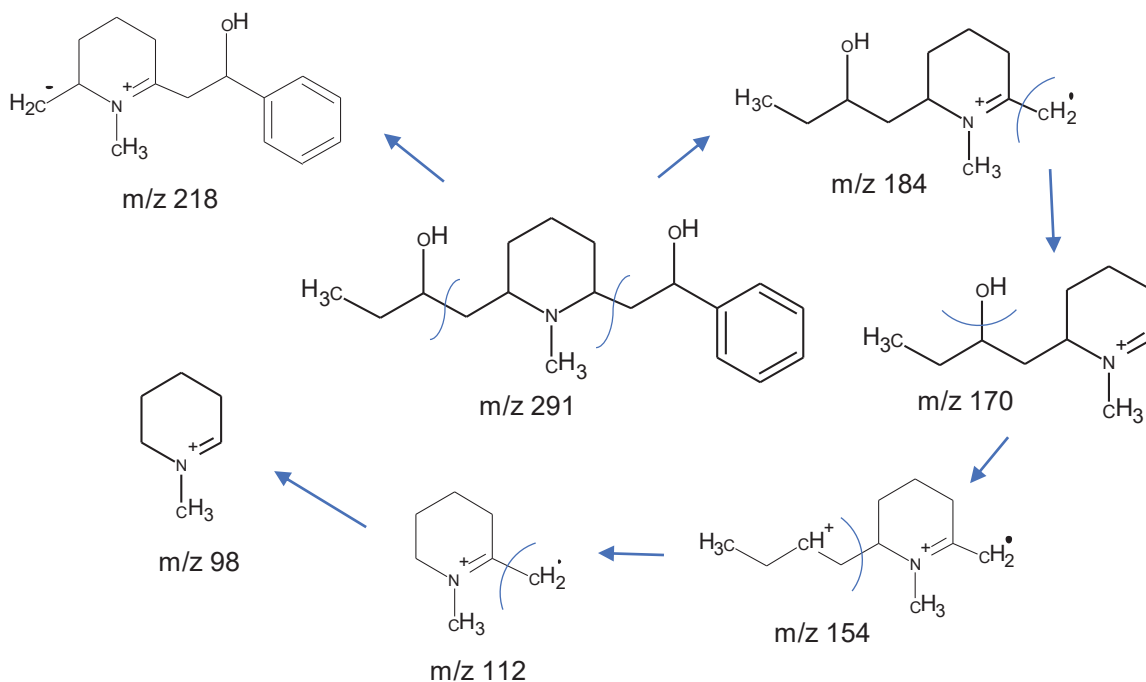
FONTE: A autora (2018).

Assim como em *L. exaltata*, lelobanidine foi isolado de outras espécies. Os primeiros a isolar este alcaloide foi Gedeon e Gedeon (1955), de *L. nicotianaefolia*, posteriormente também foi identificado por Kursinszki e Szőke, (2015) e St-Pierre, Lajeunesse e Desgagné-Penix (2017) de *L. inflata* e *L. nicotianaefolia* respectivamente utilizando métodos de Cromatografia de Camada Delgada, Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC) e Cromatografia Líquida com espectro de massa (LC-MS/MS).

O sinal com tempo de retenção a 19,284 foi identificado como Heptacosano (8,47%); m/z 380 com fórmula molecular $C_{27}H_{56}$. Este composto apresenta fragmentos

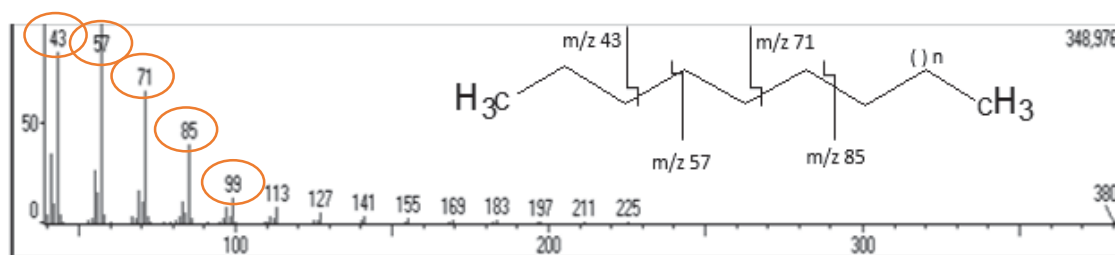
principais a m/z 57, 43, 71, 85, 99, representados na (FIGURA 57) que estão de acordo com o que referiu Silva (2014).

FIGURA 56 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DE FRAGMENTOS DE ÍONS DE LELOBANIDINE REFERENTE AO PICO 10 DO CROMATOGRAMA DE FR CL1 DE *L. exaltata*



FONTE: A autora (2018).

FIGURA 57 - ESPECTRO DE MASSA HEPTACOSANO REFERENTE AO PICO 8 DO CROMATOGRAMA DE FR CL1 DE *L. exaltata*



FONTE: A autora (2018).

O heptacosano, um n -alcano, é um hidrocarboneto alifático saturado de cadeia longa e tem sido identificado em diversas espécies de plantas pelo mundo. Na análise do óleo essencial de *Arabis purpurea* Sm. e *Arabis cypria* Holmboe (Brassicaceae), o heptacosano estava presente entre os seis compostos majoritários identificados representando $14.91 \pm 0.17 \%$ e $9.13 \pm 1.88 \%$ do óleo respectivamente

(POLATOĞLU et al., 2017). Dias (2014), identificou o mesmo composto por CG-MS na fração hexânica das folhas de *Bowdichia virgilioides* Kunth. (FABACEAE).

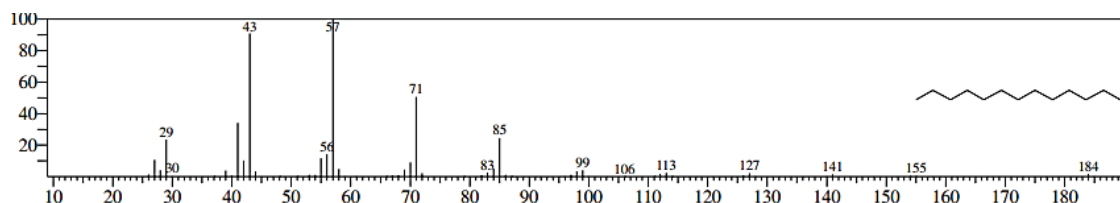
Os *n*-alcanos apresentam uma digestão mínima em animais e podem ser utilizados com êxito nas estimativas da ingestão e da composição botânica de dietas de herbívoros. Podem ser definidos como a “impressão digital” das plantas, pois supostamente, cada planta possui um perfil único de *n*-alcanos. Côrtes et al. (2005), identificaram e quantificaram por cromatografia gasosa, em espécies de gramíneas (*Brachiaria brizantha* (Hochst. Ex. A. Rich.) R. Webster), *Cynodon dactylon* (L.) Pers. e *Panicum maximum* Jacq.) e leguminosas (*Arachis pintoii* Krapov & W. C. Gregory e *Glycine wightii* Verdc.), os *n*-alcanos C24 a C35 e ainda descobriram que há maior concentração de C29, C31 e C33 na primavera, C27, C28, C29, C30 e C31, no verão e C27, C29, C31 e C33 no inverno.

5.3.3 Identificação dos compostos da fração Alcaloidal do ECBn

5.3.3.1 Identificação de compostos da fração ALKA I

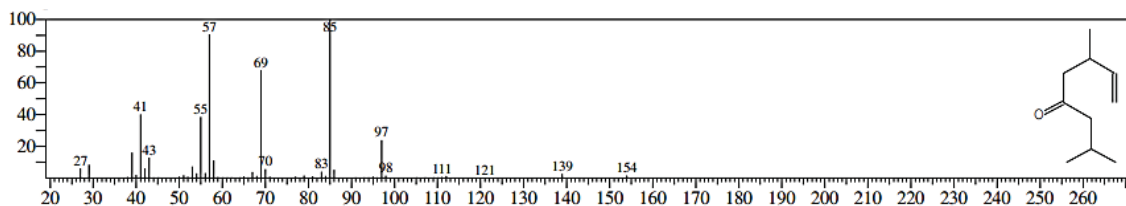
A subfração ALKA I apresentou principalmente hidrocarbonetos, ácidos carboxílicos e ésteres. Os espectros de massa dos compostos que apresentaram maiores picos estão representados nas (FIGURAS 58 a 62). O tempo de retenção (RT), fórmula molecular, peso molecular e concentração (%) são apresentadas na (TABELA 14).

FIGURA 58 - ESPECTRO DE MASSA DE TRIDECANO DE FR ALKA I DE *L. exaltata*.



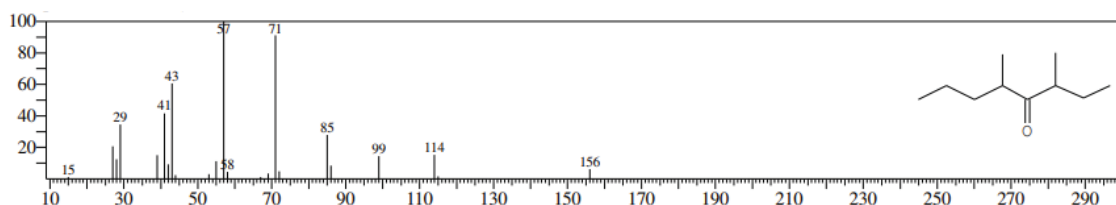
FONTE: A autora (2018).

FIGURA 59 - ESPECTRO DE MASSA DE 2,6-DIMETIL,7-OCTEN-4-ONE DA FR ALKA I DE *L. exaltata*.



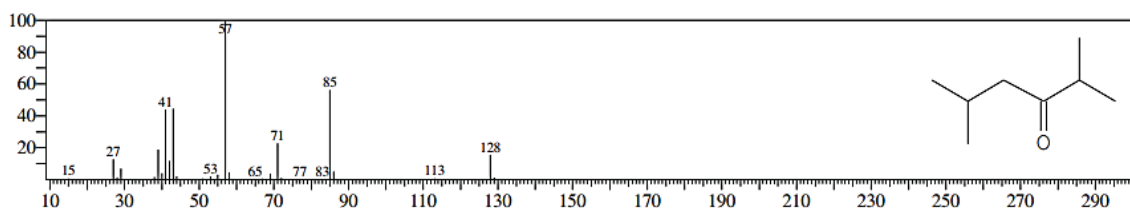
FONTE: A autora (2018).

FIGURA 60 - ESPECTRO DE MASSA DE 3,5-DIMETIL-4-OCTANONE DA FR ALKA I DE *L. exaltata*.



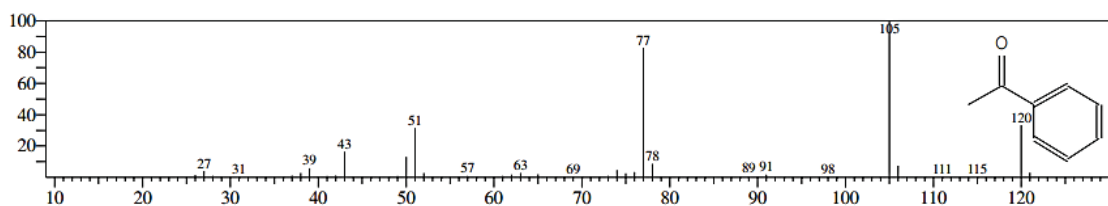
FONTE: A autora (2018).

FIGURA 61 - ESPECTRO DE MASSA DE 2,5-DIMETIL, 3-HEXANONE DA FR ALKA I DE *L. exaltata*



FONTE: A autora (2018).

FIGURA 62 - ESPECTRO DE MASSA ACETOFENONA DA FR ALKA I DE *L. exaltata*.



FONTE: A autora (2018).

TABELA 16 - COMPOSTOS IDENTIFICADOS SUBFRAÇÃO ALKA I DE *L. exaltata*.

continua

RT	ÁREA DO PICO	COMPOSTO	FÓRMULA MOLECULAR	PESO MOLECULAR
5,015	19,7%	Tridecano	C ₁₃ H ₂₈	184
18,864	10,5%	2,6-dimetil,7-octen-4-one	C ₁₀ H ₁₈ O	154

TABELA 17 - COMPOSTOS IDENTIFICADOS SUBFRAÇÃO ALKA I DE *L. exaltata*.

conclusão

RT	ÁREA DO PICO	COMPOSTO	FÓRMULA MOLECULAR	PESO MOLECULAR
19,171	9,97%	3,5-dimetil-4-octanone	C ₁₀ H ₂₀ O	156
19,171	9,97%	3,5-dimetil-4-octanone	C ₁₀ H ₂₀ O	156
18,518	5,39%	2,5-dimetil, 3-hexanone	C ₈ H ₁₆ O	128
6,025	4,47%	Acetofenona	C ₈ H ₈ O	120

FONTE: A autora (2018).

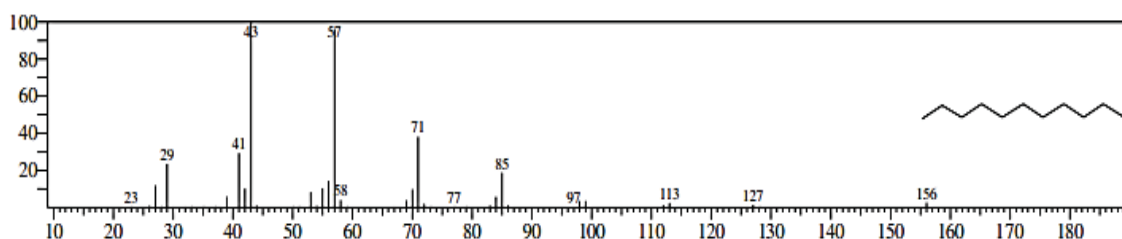
5.3.3.2 Identificação da fração ALKA II da Fração Alcaloidal

A fração ALKA II apresentou principalmente hidrocarbonetos, ácidos carboxílicos e ésteres. Os cinco compostos mais abundantes estão listados na (TABELA 15) e seus espectros de massa representados nas (FIGURAS 63 a 67).

TABELA 18 - COMPOSTOS MAIS ABUNDANTES DA SUBFRAÇÃO ALKA II DE *L. exaltata*.

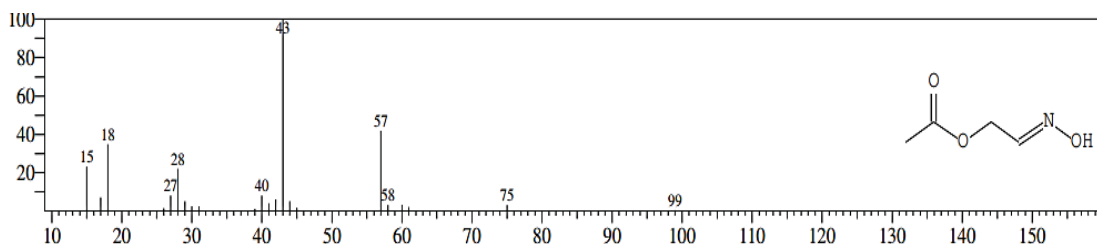
RT	ÁREA DO PICO	COMPOSTO	FÓRMULA MOLECULAR	PESO MOLECULAR
5,008	37%	Undecano	C ₁₁ H ₂₄	156
3,631	11,30%	2-(hidroxiamino) etil acetato	C ₄ H ₇ NO ₃	117
17,11	10,27%	Isoamil nitrito	C ₅ H ₁₁ NO ₂	117
21,025	5,77%	Ácido Cianúrico	C ₃ H ₃ N ₃ O ₃	129
5,9	5,6%	2-dimetil, 1,2,4-ácido benzenotricarboxílico	C ₁₁ H ₁₀ O ₆	238

FONTE: A autora (2018).

FIGURA 63 - ESPECTRO DE MASSA DE UNDECANO DA SUBFRAÇÃO ALKA II DE *L. exaltata*.

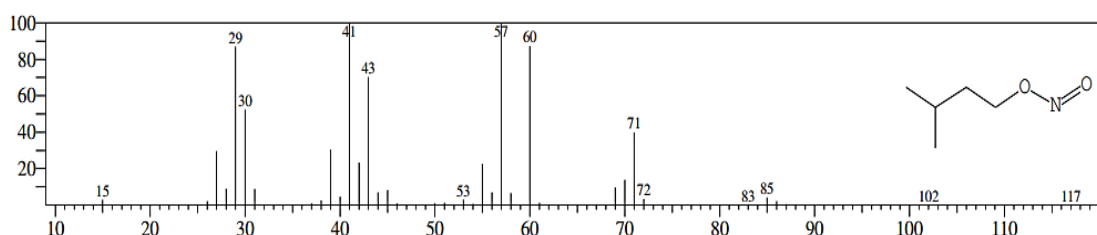
FONTE: A autora (2018).

FIGURA 64 - ESPECTRO DE MASSA DE 2-(HIDROXIAMINO) ETIL ACETATO DA SUBFRAÇÃO ALKA II DE *L. exaltata*



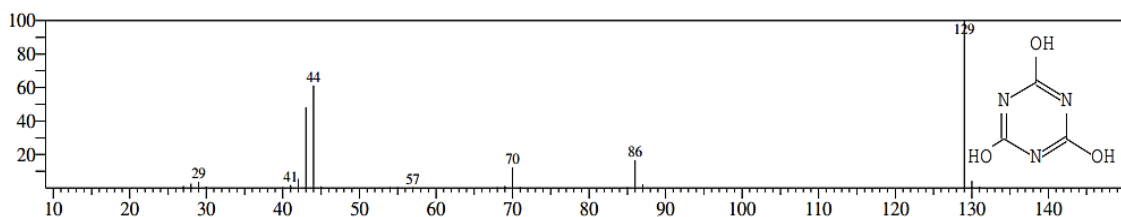
FONTE: A autora (2018).

FIGURA 65 - ESPECTRO DE MASSA DE ISOAMIL NITRITO DA SUBFRAÇÃO ALKA II DE *L. exaltata*.



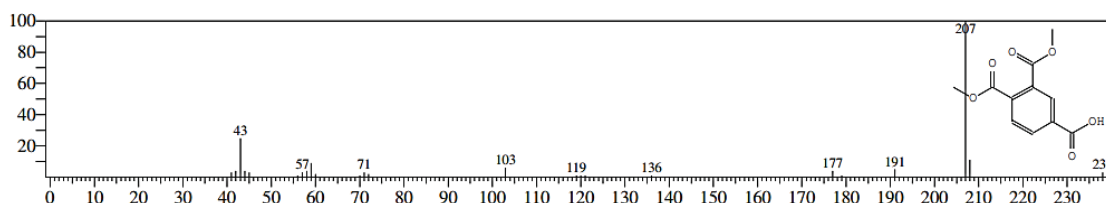
FONTE: A autora (2018).

FIGURA 66 - ESPECTRO DE MASSA DE ÁCIDO CIANÚRICO DA SUBFRAÇÃO ALKA II DE *L. exaltata*.



FONTE: A autora (2018).

FIGURA 67 - ESPECTRO DE MASSA DE 2-DIMETIL, 1,2,4-ÁCIDO BENZENOTRICARBOXÍLICO DA SUBFRAÇÃO ALKA II DE *L. exaltata*.



FONTE: A autora (2018).

5.3.3.3 Identificação da subfração ALKA B₁

A subfração ALKA B₁ da fração Alcaloidal apresentou alguns alcaloides piperidínicos, já descritos no item 5.3.2.2 além de hidrocarbonetos, ácidos e ésteres. Os principais compostos identificados com o tempo de retenção (RT), fórmula

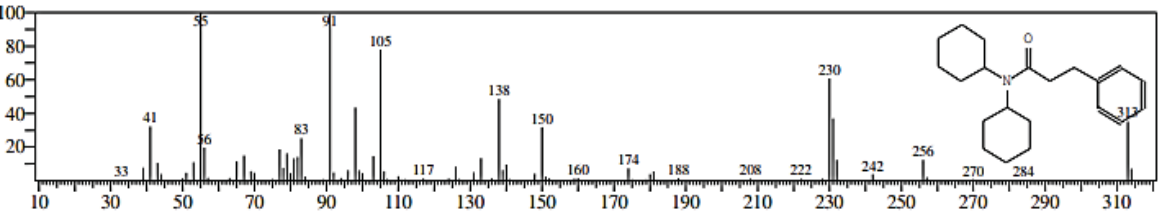
molecular, peso molecular e concentração (%) estão listados na (TABELA 16) e seus espectros de massa nas (FIGURAS 68 a 78).

TABELA 19 - COMPOSTOS IDENTIFICADOS NA SUBFRAÇÃO ALKA B₁ DE *L. exaltata*.

RT	Área do pico %	Composto	Fórmula molecular	Peso molecular
21,848	12,3	N,N-Diclclohexil-3-fenilropanamida	C ₂₁ H ₃₁ NO	313
19,636	11,30	Ácido 2,6-Piperidinodicarboxílico	C ₇ H ₁₁ NO ₄	173
19,191	10,2	1-(2-Nitro-2-propenil)-1-ciclohexeno	C ₉ H ₁₃ NO ₂	167
22,372	8,70	1-Metil-4-piperidinil 3-etil fenil carbamato	C ₁₅ H ₂₂ N ₂ O ₂	262
		beta.-Piperidinopropiofenone	C ₁₄ H ₁₉ NO	217
6,271	7,34	Acetofenona	C ₈ H ₈ O	120
17,107	5,84	Ácido <i>n</i> -hexadecanoico Ácido palmítico)	C ₁₆ H ₃₂ O ₂	256
20,156	4,10	1-ethyl-2,3-dimethyl-4-Piperidinol	C ₉ H ₁₉ NO	157
22,573	2,74	trans-2,3-dimethyl-4-piperidinol	C ₇ H ₁₅ NO	129
245,23	2,13	Esqualeno	C ₃₀ H ₅₀	410
20,488	1,40	[<i>N</i> -metil-2-(2-hidroxiopropil)-6-(2-hidroxiutil)-Δ ³ -piperidina]	C ₁₃ H ₂₅ NO ₂	227
20,488	1,40	[<i>N</i> -metil-2-(2'-hidroxiutil)-6-(2''-hidroxiutil)-Δ ³ -piperidina]	C ₁₄ H ₂₇ NO ₂	241

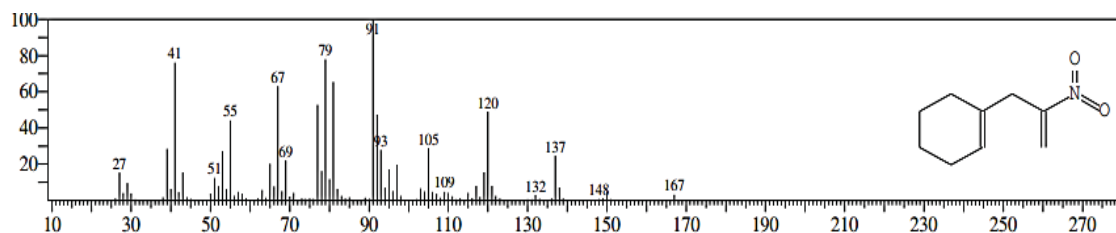
FONTE: A autora (2018).

FIGURA 68 - ESPECTRO DE MASSA DE N,N-DICICLOHEXIL-3-FENIROPANAMIDA DA SUBFRAÇÃO ALKA B₁ DE *L. exaltata*.



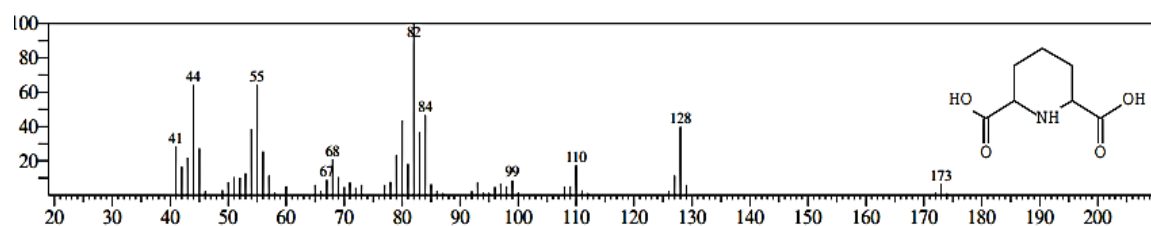
FONTE: A autora (2018).

FIGURA 69 - ESPECTRO DE MASSA DE ÁCIDO 2,6-PIPERIDINEDICARBOXILICO DA SUBFRAÇÃO ALKA B₁ DE *L. exaltata*.



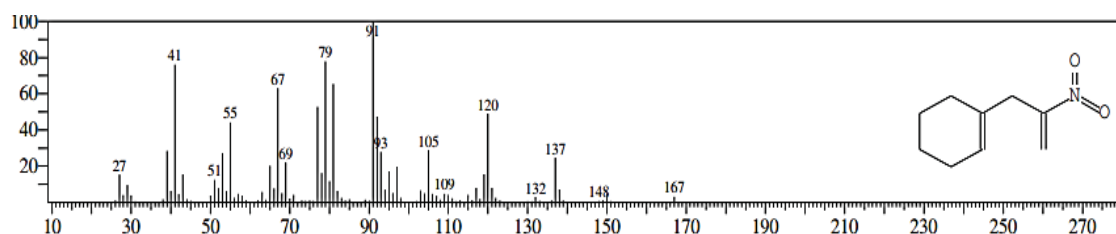
FONTE: A autora (2018).

FIGURA 70 - ESPECTRO DE MASSA 1-(2-NITRO-2-PROPENIL) -1-CICLOHEXENO DA SUBFRAÇÃO ALKA B₁ DE *L. exaltata*



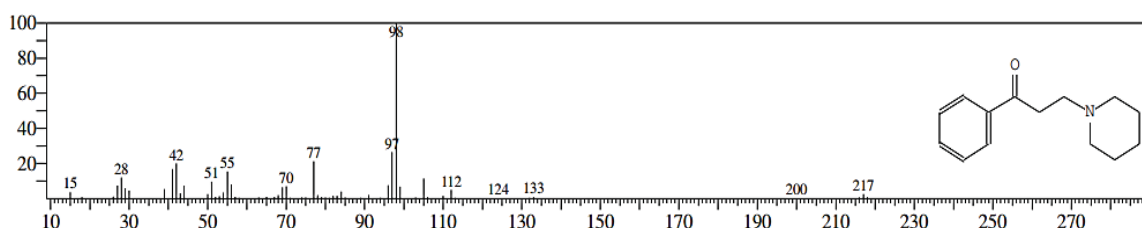
FONTE: A autora (2018).

FIGURA 71 - ESPECTRO DE MASSA 1-METHYL-4-PIPERIDINYL 3-ETHYLPHENYLCARBAMATE DA SUBFRAÇÃO ALKA B₁ DE *L. exaltata*.



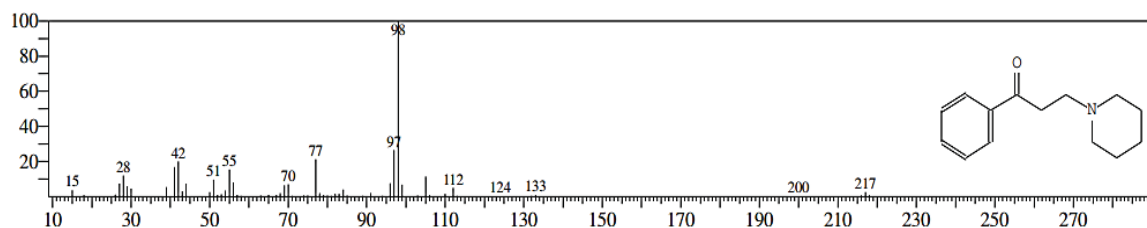
FONTE: A autora (2018).

FIGURA 72 - ESPECTRO DE MASSA β-PIPERIDINOPROPIOFENONE DA SUBFRAÇÃO ALKA B₁ DE *L. exaltata*.



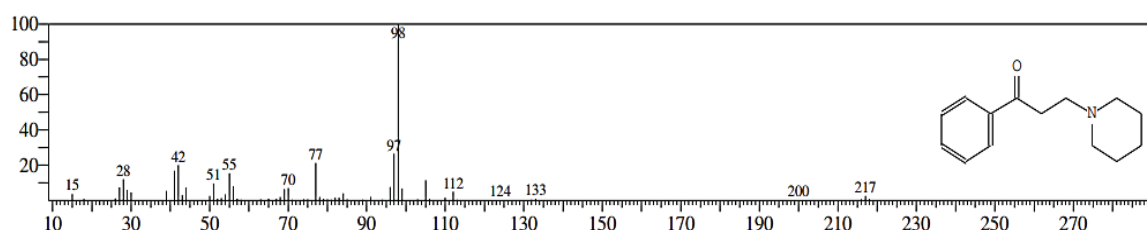
FONTE: A autora (2018).

FIGURA 73 - ESPECTRO DE MASSA ÁCIDO N-HEXADECANOICO (ÁCIDO PALMÍTICO) DA SUBFRAÇÃO ALKA B₁ DE *L. exaltata*.



FONTE: A autora (2018).

FIGURA 74 - ESPECTRO DE MASSA ÁCIDO 1-ETIL-2,3-DIMETIL-4-PIPERIDINOL DA SUBFRAÇÃO SUFRAÇÃO ALKA B₁ DE *L. exaltata*.



FONTE: A autora (2018).

FIGURA 75 - ESPECTRO DE MASSA DE [N-METIL-2-(2-HIDROXIPROPIL)-6-(2-HIDROXIBUTIL)- Δ^3 -piperidina] DA SUFRAÇÃO ALKA B₁ DE *L. exaltata*.

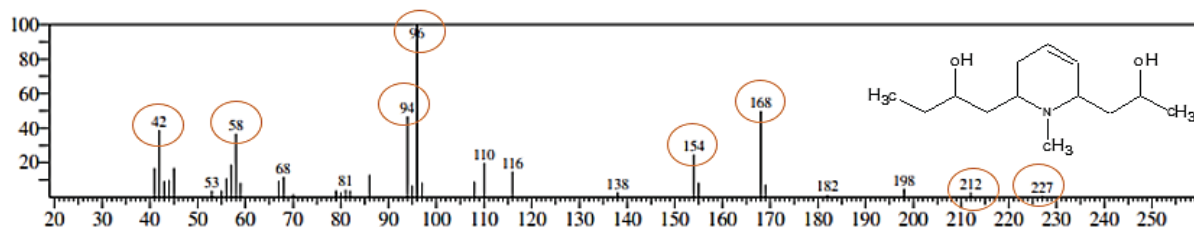
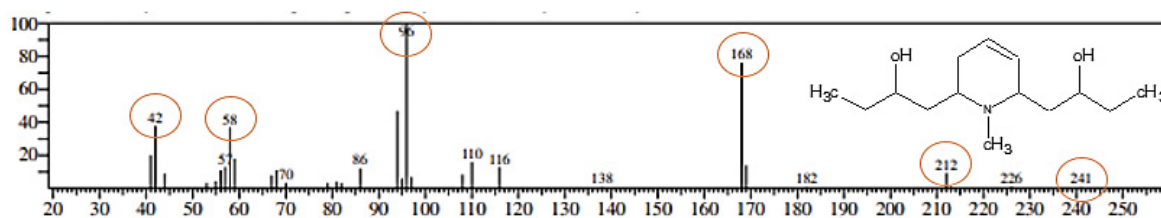


FIGURA 76 - ESPECTRO DE MASSA DE [N-METIL-2-(2'-HIDROXIBUTIL)-6-(2''-HIDROXIBUTIL)- Δ^3 -piperidina] DA FRAÇÃO ALKA B₁ DE *L. exaltata*.



FONTE: A autora (2018).

FIGURA 77 - ESPECTRO DE MASSA DE TRANS-2,3-DIMETIL-4-PIPERIDINOL DA SUBFRAÇÃO ALKA B₁ DE *L. exaltata*.

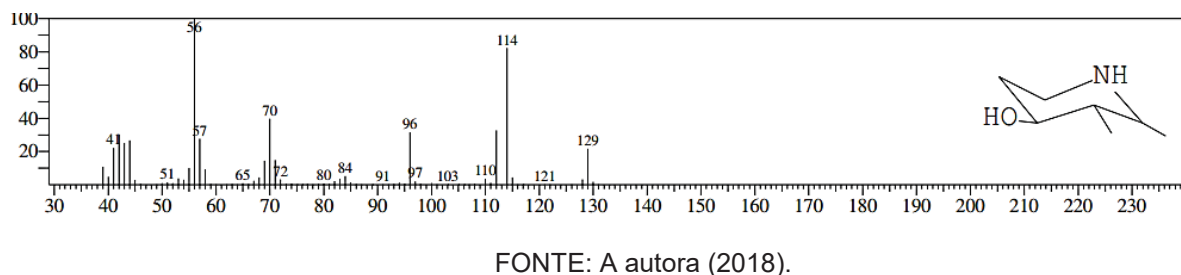
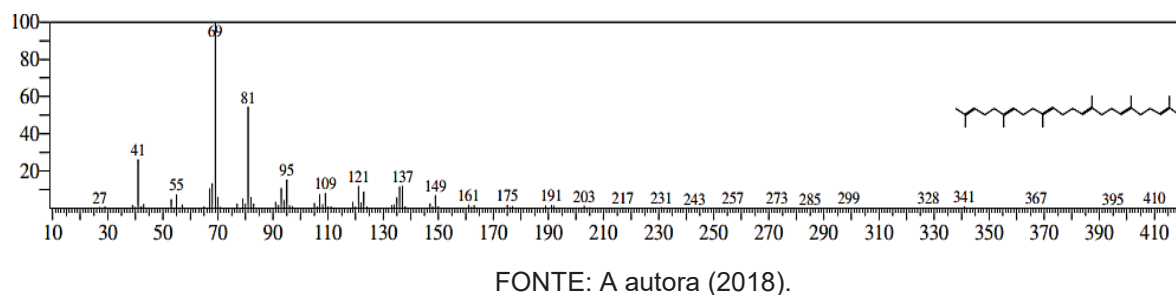


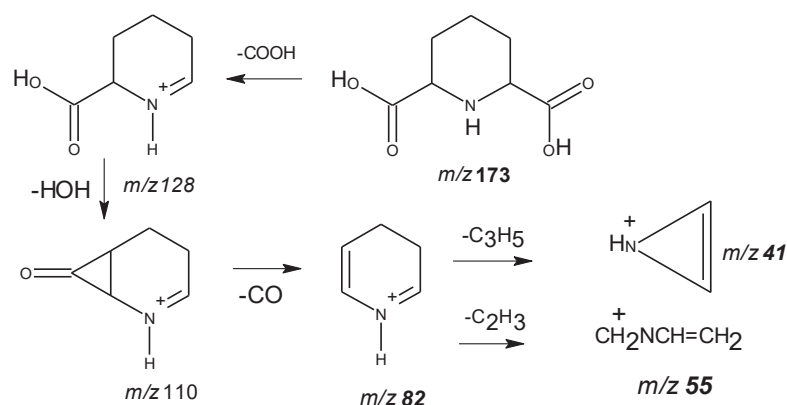
FIGURA 78 - ESPECTRO DE MASSA DE ESQUALENO DA SUBFRAÇÃO ALKA B₁ DE *L. exaltata*.



Ácido 2,6-Piperidinodicarboxílico é conhecido como inibidor da atividade da enzima diidrodipicolinato sintase (DHDPS), uma enzima chave na biossíntese da lisina que por sua vez está envolvida na biossíntese de parede celular de bactérias Gram positivas e Gram negativas. Juntamente com outros ácidos piperidínicos, o ácido 2,6-piperidinodicarboxílico foi testado em três espécies patogênicas, *Bacillus anthracis*, *Mycobacterium tuberculosis* e *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina. Os resultados sugeriram que os ácidos piperidínicos são potenciais antibacterianos por apresentarem interação favorável nos sítios de ligação da enzima DHDPS (MITSAKOS et al., 2008; SINGH; BORA, 2012).

Kuleshova et al. (1986), estudaram os espectros de massa dos isômeros de piperidina e estabeleceram as vias de fragmentação para o Ácido 2,6-Piperidinodicarboxílico (FIGURA 69), demonstrada na (FIGURA 79).

FIGURA 79 - ESQUEMA DE FRAGMENTAÇÃO DO ÁCIDO 2,6-PIPERIDINEDICARBOXILICO



FONTE: A autora (2018), adaptado de Kuleshova et al. (1986).

Os íons de fragmentação a m/z 173, m/z 128, m/z 110, m/z 82 e m/z 55 demonstrados na (FIGURA 79) estão de acordo com o encontrado na análise de CG-MS da subfração ALKA B1 DE *L. exaltata* confirmando a presença do composto ácido 2,6-Piperidinedicarboxílico.

Algumas β - piperidinofenonas (FIGURA 72) foram avaliadas quanto a sua atividade antibacteriana pelo método de inibição de crescimento e também quanto a atividade inflamatória pelo modelo da peroxidação estimulada por ascorbato-Fe (II) a fim de comparar os níveis de supressão da formação de malondialdeído. Foi possível verificar que algumas propionofenonas apresentaram atividade moderada, inibindo o crescimento de bactérias Gram-negativas (*Shigella desenteriae*, *Shigella flexneri* e *Escherichia coli*). Quanto a atividade antioxidante da maioria propionofenonas mostraram-se insignificantes até 10% (GASPARYAN et al., 2011).

O composto identificado como ácido palmítico ou ácido *n*-hexadecanoico (FIGURA 73) é um ácido graxo saturado de cadeia longa muito comum em plantas. Ravi e Krishnan (2017) isolaram ácido palmítico de folhas de *Kigelia pinnata* (Jacq.) DC (Bignoniaceae) fazendo sua elucidação estrutural CG-MS e obtendo um espectro de massa muito semelhante ao que propomos neste trabalho, além de RMN e FT-IR. Após a identificação o composto, eles testaram sua atividade citotóxica demonstrando uma significativa atividade contra células de carcinoma colo retal (HCT-116) com valores de IC_{50} de $0.8 \mu\text{g mL}^{-1}$ pelo método do MTT.

Os ácidos graxos: ácido láurico, palmítico, linolênico, linoleico, oleico, esteárico e mirístico de *Excoecaria agallocha* L. apresentaram potencial atividade antimicrobiana e antifúngica com aplicação clínica (AGORAMOORTHY et al., 2007).

Aparna et al. (2012) realizaram um estudo sobre a ação anti-inflamatória do ácido palmítico, verificando que houve inibição da fosfolipase A2 de forma competitiva com seu sítio ativo promovendo um efeito anti-inflamatório. A fosfolipase A2 catalisa a hidrólise das ligações ésteres na posição *sn*-2 dos fosfolipídios da membrana e libera ácidos graxos, como o ácido araquidônico e os lisofosfolipídios, esse seria o passo inicial na formação de potentes mediadores inflamatórios.

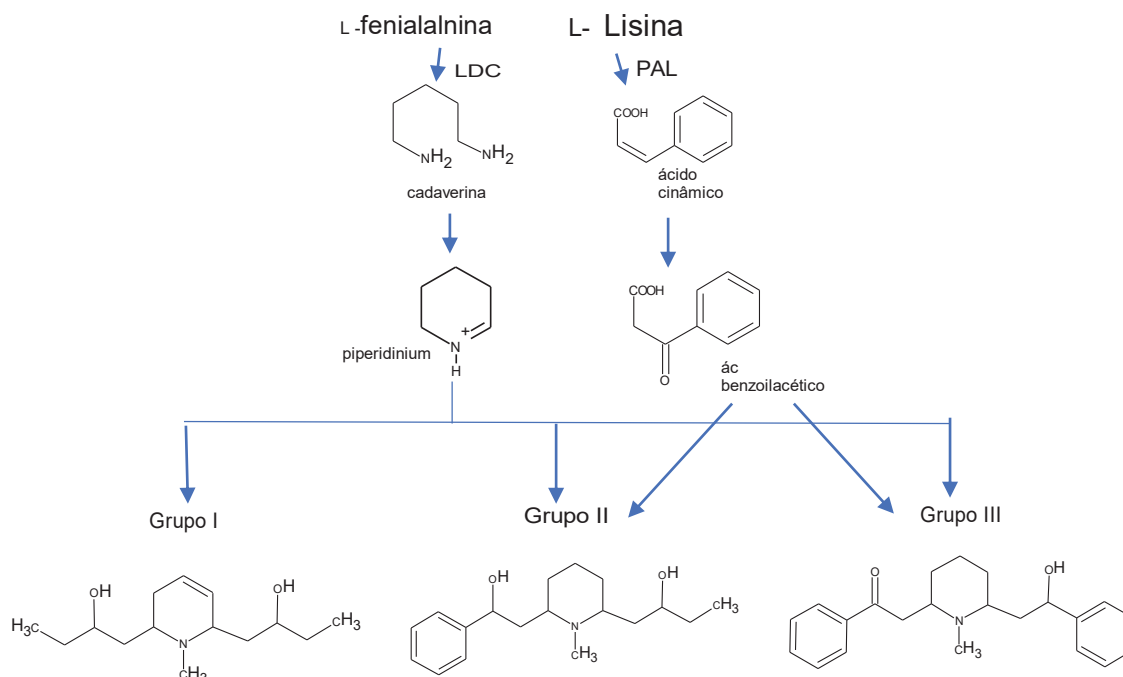
As metil piperidinas e piperidinas foram identificadas na FR CHCl₃ e na fração Alka B₁ como é o caso de [*N*-Metil-2-(2-hidroxiopropil)-6-(2-hidroxibutil)- Δ^3 -piperidina] e de [*N*-Metil-2-(2'-hidroxibutil)-6-(2''-hidroxibutil)- Δ^3 -piperidina], o que reforça a presença desses dois compostos na espécie *L. exaltata*. Não foram identificados na espécie em estudo os alcaloides normalmente encontrados em várias outras espécies como lobelina, norlobelina e lobelanidina. Este fato também nos leva a supor que a espécie em estudo não apresenta esses alcaloides piperidínicos.

Em *L. davidii* também não foi encontrada a lobelina e sim um outro alcaloide piperidínico, o 1 [6- (2 – hydroxy – 2 - phenylethyl) - 1- methyl – 2 - piperidiny] - butane-2-one, (lelobanonoline) (ZHANG, 1990).

St-Pierre, Lajeunesse e Desgagné-Penix (2017) em seu estudo sobre a determinação dos alcaloides piperidínicos em *L. inflata* (Indian Tobacco) identificaram vários alcaloides por LC-MS/MS e propuseram uma via biossintética que leva a formação dos alcaloides piperidínicos. Os alcaloides foram divididos em três grupos, onde: o grupo I incluiu alcaloides com cadeias laterais de piperidina sem grupos fenil; o grupo II compreendeu alcaloides com um grupo fenil em uma das cadeias laterais e o grupo III com dois grupos fenil. Os exemplos para cada grupo estão representados na (FIGURA 80).

O alcaloide piperidínico, o perhydro-2(R)-[2(S)-hydroxypentil]- 6(S)-[2(R)-hydroxypentyl]-N-methylpyridinium chloride dihydrate, (C₁₆H₃₄NO₂.Cl.2H₂O) identificado de *Siphocampylus verticillatus* uma espécie também da família Campanulaceae, nativa do sul do Brasil (LORENZI, 2008), se assemelha aos alcaloides encontrados em *L. exaltata* e à aqueles do grupo I que não possuem os grupos fenil nas cadeias laterais (FIGURA 80) (MIGUEL et al., 1996).

FIGURA 80 - PROPOSTA DE BIOSSÍNTESE DOS ALCALOIDES DA *Lobelia*



FONTE: A autora (2018), adaptado de St-Pierre; Lajeunesse; Desgagné-Penix (2017).

Este composto apresentou uma potente atividade antinociceptiva em modelos de nocicepção em ratos, sua atividade analgésica foi semelhante à da morfina e completamente revertida pela naloxona, um antagonista opioide não seletivo, sugerindo uma possível interação com o receptor opioide (SANTOS et al., 1995).

5.4 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANSIOLÍTICA E ANTICONVULSIVANTE DO ESTRATO ETANÓLICO BRUTO E SUBSTÂNCIA ISOLADA DE *Lobelia exaltata* EM PEIXES ZEBRAFISH (*Danio rerio*)

5.4.1 Teste da Atividade Ansiolítica do ECB de *Lobelia exaltata*

Os resultados dos testes para o tempo de permanência dos animais no compartimento claro estão mostrados na (TABELA 17).

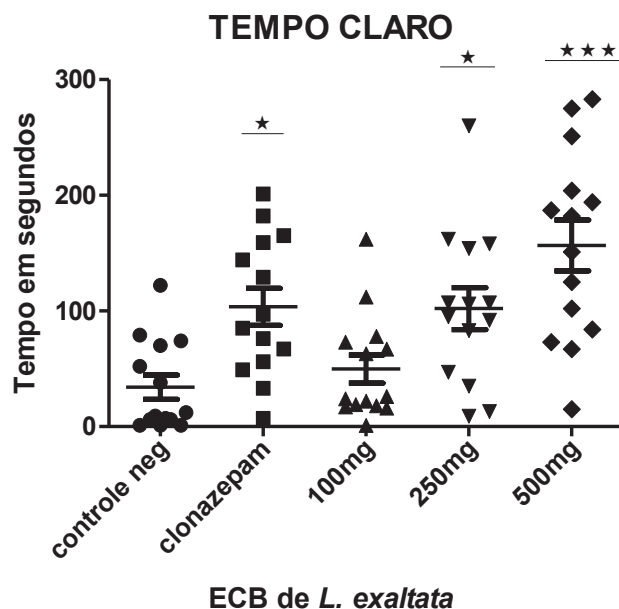
TABELA 20 - TEMPO DE PERMANÊNCIA DOS ANIMAIS NO COMPARTIMENTO CLARO

Teste	Concentração do teste	Tempo gasto (média)
Controle negativo	-	34,14 s
Clonazepam	0,75 mg.L ⁻¹	103,57 s
ECB	100 mg.L ⁻¹	49,85 s
	250 mg.L ⁻¹	102,01 s
	500 mg.L ⁻¹	156,64 s

FONTE: A autora, (2018).

Para avaliar se houve diferença estatística entre os grupos tratados e o grupo controle utilizou-se a comparação das médias através do teste estatístico de Kruskal-Wallis seguido pelo teste post-hoc de Dunn. Foi possível observar que houve um aumento da permanência na área clara, estatisticamente significativo entre os grupos: clonazepam 0,75 mg.L⁻¹, ECB 250 mg.L⁻¹ e ECB 500 mg.L⁻¹, quando comparados com o grupo controle negativo.

A relação entre os efeitos comportamentais induzidos pela administração do ECB e clonazepam em *zebrafish* estão apresentados no (GRÁFICO 3).

GRÁFICO 3 - ATIVIDADE ANSIOLÍTICA DO ECB DAS PARTES AÉREAS DE *Lobelia exaltata*

FONTE: A autora (2018). Tempo gasto em segundos no compartimento claro. O gráfico mostra pontos e médias (-), onde cada ponto representa um animal, * $p < 0,05$ comparado ao grupo controle negativo; ***: $p < 0,001$, comparado ao grupo controle negativo calculado pelo teste de Kruskal-Wallis, seguido pelo teste post hoc de Dunn.

O *zebrafish* (*Danio rerio*) tem sido amplamente utilizado em estudos de genética e de biologia do desenvolvimento. O baixo custo de habitação, facilidade de manuseio e entrega de fármaco, taxa de reprodução elevada e homologia de genes com mamíferos o torna modelo adequado para doenças humanas. Como outros vertebrados, zebrafish exhibe respostas cognitivas, sensorimotor, e respostas motoras básicas que são controladas pelo sistema nervoso central. O peixe-zebra apresenta uma sensibilidade aos principais fármacos neurotrópicos e capacidade de responder a eles de forma semelhante aos seres humanos (ZON; PETERSON. 2005; CACHAT et al., 2010; KALUEFF; STEWART; GERLAI, 2014).

O teste de claro/escuro avalia em um modelo de conflito entre a tendência de explorar novos ambientes e a aversão inata do animal por áreas abertas e iluminadas e preferência natural pela área mais escura do tanque (SERRA et al, 1999; BOURIN; HASCOËT, 2003; BLANK et al, 2009; MAXIMINO et al, 2010; MANSUR; SANTOS; GOUVEIA Jr, 2014; CAMPOS, 2016). Sendo assim como o comportamento do *zebrafish* é sensível a manipulações ansiolíticas induzem ao aumento do tempo de permanência e exploração do ambiente claro (PICH; SAMANIN, 1986; COSTALL et al., 1989).

Neste estudo, como esperado, observou-se que, os animais tratados com clonazepam, fármaco utilizado no tratamento dos transtornos de ansiedade, apresentaram um tempo de permanência no compartimento claro significativamente maior do que aqueles que não receberam tratamento. Comparativamente, as concentrações de 250 mg.L⁻¹ e 500 mg.L⁻¹ provocaram respostas mais significativas em relação aos grupos controle negativo que ao exposto à 100 mg.L⁻¹, apresentando um resultado dose dependente.

Outro parâmetro analisado, o tempo de latência para a primeira entrada para o compartimento escuro está apresentado na (TABELA 18)

TABELA 21 - TEMPO DE LATÊNCIA PARA A PRIMEIRA ENTRADA NO COMPARTIMENTO ESCURO

Teste	Concentração do teste	Tempo gasto (média)
Controle negativo	-	2,85 s
Clonazepam	0,75 mg.L ⁻¹	22,85 s
ECB	100 mg.L ⁻¹	11,42 s
	250 mg.L ⁻¹	39,14 s
	500 mg.L ⁻¹	41,42 s

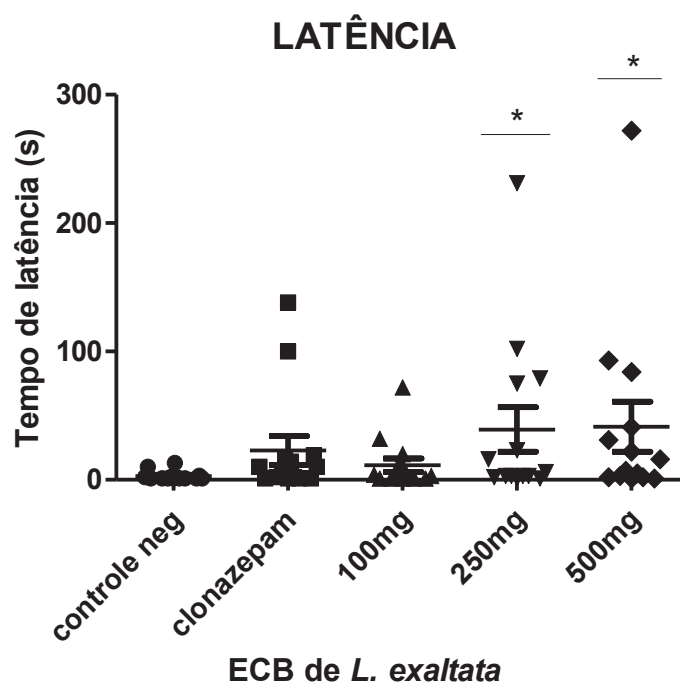
FONTE: A autora, (2018).

Na avaliação deste parâmetro houve diferença significativa entre os grupos em relação ao controle negativo. No teste post-hoc de Dunn observamos diferenças entre ECB 250 mg.L⁻¹ e 500 mg.L⁻¹, quando comparados com o grupo controle negativo. Esses resultados estão apresentados no (GRÁFICO 4).

Quanto a latência para o acesso ao compartimento escuro notou-se que os animais tratados com ECB 250 e 500 mg.L⁻¹ demoraram mais tempo para a primeira entrada. Esse comportamento está associado a uma redução do medo e uma maior ousadia para explorar um novo ambiente, não sendo sugestivo de presença de alterações locomotoras, já que o número de cruzamentos entre os compartimentos não apresentou diferença estatística.

Considerando que agentes ansiolíticos promovem aumento na atividade exploratória no compartimento claro (BENCAN; SLEDGE; LEVIN, 2009; GEBAUER, 2010) com aumento dose-dependente no tempo de permanência na área clara podemos supor que o ECB apresentou um efeito ansiolítico nas concentrações de 250 e 500 mg.L⁻¹ semelhante ao clonazepam.

GRÁFICO 4 - LATÊNCIA PARA A PRIMEIRA ENTRADA NO COMPARTIMENTO ESCURO



FONTE: A autora (2018). O gráfico mostra pontos e médias (-), onde cada ponto representa um animal, * $p < 0,05$ comparado ao grupo controle negativo; calculado pelo teste de Kruskal-Wallis, seguido pelo teste post hoc de Dunn.

O último parâmetro analisado foi o número de cruzamentos entre os compartimentos claro e escuro. A média do número de cruzamentos de cada grupo estão apresentados na (TABELA 19)

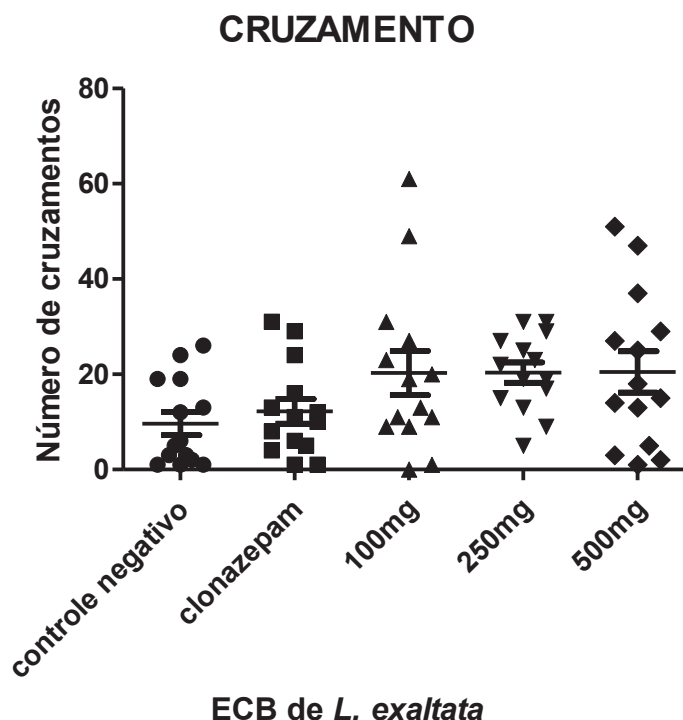
TABELA 22 - NÚMERO DE CRUZAMENTOS ENTRE OS COMPARTIMENTOS CLARO E ESCURO

Teste	Concentração do teste	Tempo gasto (média)
Controle negativo	-	8,21 s
Clonazepam	0,75 mg.L ⁻¹	15,28 s
ECB	100 mg.L ⁻¹	20,28 s
	250 mg.L ⁻¹	20,35 s
	500 mg.L ⁻¹	20,50 s

FONTE: A autora, (2018).

Nesse parâmetro, utilizando a comparação das médias através do teste estatístico de Kruskal-Wallis seguido pelo teste post hoc de Dunn, não houve diferença entre os grupos tratados em relação ao grupo controle, considerando $p < 0,05$. Esses resultados estão no (GRÁFICO 5).

GRÁFICO 5 - NÚMERO DE CRUZAMENTOS ENTRE OS COMPARTIMENTOS CLARO E ESCURO



FONTE: A autora (2018). Número de cruzamentos entre os compartimentos claro e escuro. O gráfico pontos e médias (-), onde cada ponto representa um peixe calculado pelo teste de Kruskal-Wallis, seguido pelo teste post hoc de Dunn.

Costall et al. (1989), em um experimento sobre avaliação de ansiedade em caixa teste claro/escuro no comportamento exploratório de ratos descobriram que o aumento do comportamento exploratório em roedores estava associado a um aumento do tempo gasto na área iluminada, com as transições entre os dois compartimentos permanecendo inalteradas, concluindo que a aversão a atividade exploratória no lado claro foi antagonizada por agentes ansiolíticos.

Entretanto, Belzung et al. (1994), em seus estudos relataram que as transições entre claro e escuro revelaram um índice de atividade exploratória em ratos e que o tempo gasto em cada compartimento é um reflexo da aversão, constatando que os ansiolíticos aumentaram a locomoção e o tempo gasto na zona de luz, enquanto os ansiogênicos os diminuíram (HASCÖET[™]; BOURIN, 1998; BOURIN; HASCÖET, 2003).

Assim como o observado em *L. exaltata*, um estudo sobre propriedades ansiolíticas do extrato metanólico de *Urtica urens*, em ratos, mostrou que o extrato

desta planta causou um efeito ansiolítico comparável ao do diazepam quando aplicado o teste claro/escuro (DOUKKALI et al., 2015).

5.4.2 Teste da Atividade Anticonvulsivante do ECB e da substância L₁ de *Lobelia exaltata*

Na avaliação da atividade anticonvulsivante o ECB de *L. exaltata*, apresentou diferença estatisticamente significativa entre os grupos analisados na latência para atingir o score 4 (comportamento semelhante a crise convulsiva) e o score 5 (extensão rígida do corpo). Na análise da latência para atingir o score 4 (GRÁFICO 6A), houve diferença entre o controle negativo e os grupos pré-expostos ao clonazepam ($p \leq 0,01$, teste post-hoc de Tukey) e as concentrações de 250 e 500 mg.L⁻¹ de ECB de *L. exaltata* ($p \leq 0,001$, teste post-hoc de Tukey). Já quando os peixes foram expostos as concentrações de 100 mg.L⁻¹ de ECB de *L. exaltata* não houve diferença em relação ao grupo controle negativo. Resultados semelhantes foram obtidos na latência para atingir o score 5 (GRÁFICO 6B). Nenhum dos peixes atingiu o score 6 (morte) no período analisado e não foi observada diferença estatisticamente significativa nos scores de 0 a 3 em relação ao controle negativo.

Para analisar se o *myo*-inositol isolado e purificado do ECB de *L. exaltata* poderia apresentar esta mesma atividade anticonvulsivante, foi avaliado se a pré-exposição do zebrafish ao *myo*-inositol aumenta a latência ao score 4 (GRÁFICO 6C) e score 5 (GRÁFICO 6D). O resultado mostrou que houve diferença entre os grupos na latência para atingir o score 4 ($p \leq 0,001$; ANOVA de uma via). O grupo controle negativo apresentou latência menor do que o grupo pré-exposto ao clonazepam 75µM (controle positivo) ($p \leq 0,001$, teste post-hoc de Tukey) e as concentrações de 1,0 e 10,0 mg.L⁻¹ de *myo*-inositol ($p \leq 0,001$, teste post-hoc de Tukey). Resultados semelhantes foram obtidos na latência para atingir o score 5. Nenhum dos peixes atingiu o score 6 no período analisado.

O modelo de convulsão induzida pelo pentilenotetrazol (PTZ) é amplamente utilizado para o estudo da epilepsia. O PTZ induz a convulsões através da inibição do receptor GABA_A no sistema nervoso central (ZON; PETERSON, 2005; CACHAT et al., 2010; KALUEFF; STEWART; GERLAI, 2014). Afrikanova et al. (2013) realizaram testes de validação em modelo de respostas locomotoras utilizando PTZ e drogas

antiepiléticas em *zebrafish* verificando que apesar das diferenças entre as espécies, cérebro maduro x cérebro imaturo, absorção e metabolismo, há uma boa correlação entre os dados de *zebrafish* e roedores, reforçando a relevância do modelo do PTZ no peixe *zebrafish*.

Em vários ensaios *in vivo* a indução da epilepsia tanto em roedores como em *zebrafish*, (AFRIKANOVA et al., 2013; GALANOPOULOU et al., 2013), após a administração de proconvulsivantes químicos, como o antagonista de GABA_A, pentilenotetrazol (PTZ), tem demonstrando serem ótimos candidatos para estudos neuroquímicos e comportamentais (BERGHMANS et al, 2007; MAKHIJA; JAGTAP, 2014; MACHADO et al., 2015).

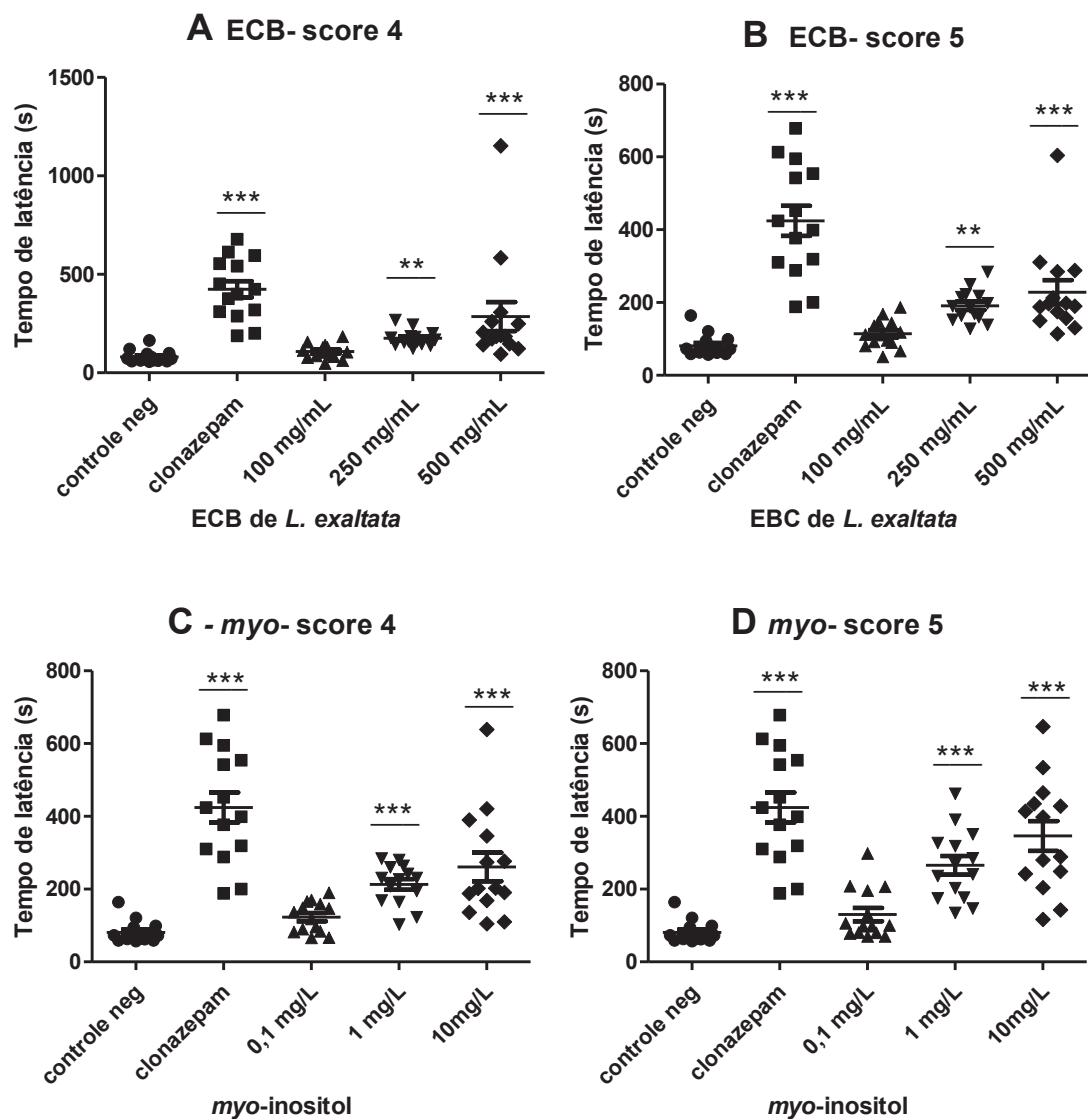
Apesar de espécies como *L. nicotianaefolia*, *L. chinensis*, *L. laxiflora*, *L. cardinalis* (TAMBOLI; RUB; BODHANKAR, 2012; YANG et al., 2012; RAHMAN; MONEM, 2014; STOLOM et al., 2016; BROWN et al., 2016) já terem sido estudadas em alguns aspectos neurofarmacológicos, *L. exaltata* ainda não foi avaliada para essa atividade.

Plantas medicinais tem sido investigadas quanto o seu potencial anticonvulsivante em peixes, ratos e camundongos. O açafrão, obtido a partir dos rizomas de *Curcuma longa* L. é utilizado no sul da Ásia na medicina tradicional para o tratamento da epilepsia.

Orellana-Paucar et al. 2012.testaram a atividade anticonvulsivante da curcumina e do sesquiterpenoide bisabolene de *C. longa*. observando a inibição das convulsões induzidas por PTZ tanto em *zebrafish* como em camundongos.

O extrato etanólico de folhas de *Cyperus articulatus* L. também demonstrou um potencial efeito para prevenir as convulsões induzidas por PTZ em camundongos. As concentrações de extratos utilizadas foram de 50, 150 e 300 mg/kg, sendo que o grupo 150 mg/Kg apresentou escores mais baixos de latência, frequência e duração de crises convulsivas do que o grupo controle positivo (HERRERA-CALDERON et al, 2017).

GRÁFICO 6 - LATÊNCIA PARA ATINGIR O SCORE 4 (A e C) E SCORE 5 (B e D) APÓS A EXPOSIÇÃO AO PTZ (10mM).



FONTE: A autora (2018). Pré-exposição ao extrato cetônico bruto de *L. exaltata* Pohl (A e B) e do myo-inositol (C e D); ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$ comparado com o grupo controle negativo (ANOVA de uma via, seguido pelo teste post-hoc de Tukey).

Manjusha e Suneel (2016), relataram a atividade anticonvulsivante significativa do extrato aquoso de *Murraya koenigii* (L.) Sprengel (AEMK) em camundongos e ratos por convulsões induzidas por PTZ e estriçnina, respectivamente nas doses de 200 mg/kg e 400 mg/kg via oral, mais PTZ 75 mg/kg e estriçnina 2 mg/kg, intraperitoneal concluindo que AEMK diminuiu a gravidade das

convulsões, aumentou a porcentagem de proteção, diminuiu a taxa de mortalidade exibindo uma atividade anticonvulsivante significativa.

Huerta-Reyes et al. (2013), também testaram o efeito anticonvulsivante do extrato metanólico das partes aéreas de *Heteropterys brachiata* (L.) DC. (Malpighiaceae). O modelo utilizado foi de camundongos em teste de convulsões induzidas por PTZ, concluindo que na dose de 500 mg/kg o extrato mostrou uma atividade anticonvulsivante significativa.

A importância do *myo*-inositol tem sido relatada em diversas pesquisas recentes, estabelecendo relação entre o *myo*-inositol e seus efeitos sobre a saúde humana. As funções e os papéis do *myo*-inositol em seres humanos foram associados ao transtorno bipolar, produção de *L*-chiro-inositol e *D*-chiro-inositol na ação da insulina, esclerose múltipla, doença de Alzheimer, regulação da via do sorbitol em pacientes diabéticos, epilepsia entre outros (XU et al., 2008; XU et al., 2011; TANG et al., 2009; REBECCA, 2012; MOUNSEY; TESSMAN, 2012; ZHANG et al, 2016).

O pré-tratamento com *myo*-inositol atenuou a gravidade de convulsões e várias alterações bioquímicas provocadas pelo estado epilético, experimentalmente induzido no modelo de convulsão com lítio-pilocarpina em ratos (BELMAKER; BERSUDSKY, 2007) e preservou as estruturas dos neurônios, apresentando um efeito positivo na perda de células do hipocampo e sinapses provocadas pelo efeito epilético induzido pelo ácido cáínico em ratos Wistar (KOTARIA et al., 2013).

Myo-inositol e Acetyl-L-carnitine (ALCAR) aumentaram a atividade motora em modelos animais e modularam o metabolismo de membrana dos fosfolípidios e do fosfato em zebrafish (LEVINE et al., 2003).

Além de propriedades anticonvulsivantes do inositol também é possível destacar outras atividades biológicas relevantes. Zhang et al. (2016), verificaram a neuroproteção em células dopaminérgicas no modelo Doença de Parkinson frente ao dano induzido por 6-OHDA. Anekonda et al. (2011), avaliaram o efeito protetor do hexofosfato de inositol contra citotoxicidade em células MC65 e em rato Tg2576. O tratamento com o inositol forneceu proteção completa contra a citotoxicidade e foi possível propor um novo tratamento protetor para Doença de Alzheimer.

O ferro desempenha um papel importante na doença de Parkinson, induzindo neurodegeneração dependente do estresse oxidativo. A utilização do hexofosfato de inositol (IP6) protegeu a apoptose induzida por 6-OHDA em células dopaminérgicas

mesencefálicas imortalizadas de ratos sob condições normais e excesso de ferro, concluindo que IP6 pode oferecer neuroproteção em doença de Parkinson (XU; KANTHASAMY; REDDY, 2011).

Nozadze et al., (2011) pesquisaram a atividade anticonvulsivante do *myo-inositol* e seu isômero *scyllo-inositol*, utilizando o PTZ para induzir convulsões em ratos.

No presente estudo, o ECB das partes aéreas de *L. exaltata* e o *myo-inositol* apresentaram significativa atividade anticonvulsivante em peixes zebrafish frente ao PTZ. O *myo-inositol*, isolado pela primeira vez de ECB das partes aéreas de *L. exaltata*, demonstrou que esse composto reduziu significativamente o estágio de início da convulsão e também a duração da convulsão, sugerindo um forte potencial como agente de terapia anticonvulsiva.

Podemos sugerir neste caso que o *myo-inositol* encontrado em grande quantidade ECB pode ser o responsável pela ação anticonvulsivante deste extrato. Estudos futuros devem ser realizados com essa espécie vegetal nativa e de fácil cultivo e que apresenta um grande potencial de compostos químicos de interesse à saúde.

5.5 AVALIAÇÃO DO EFEITO NEUROPROTETOR E COMPORTAMENTAL EM ANIMAIS

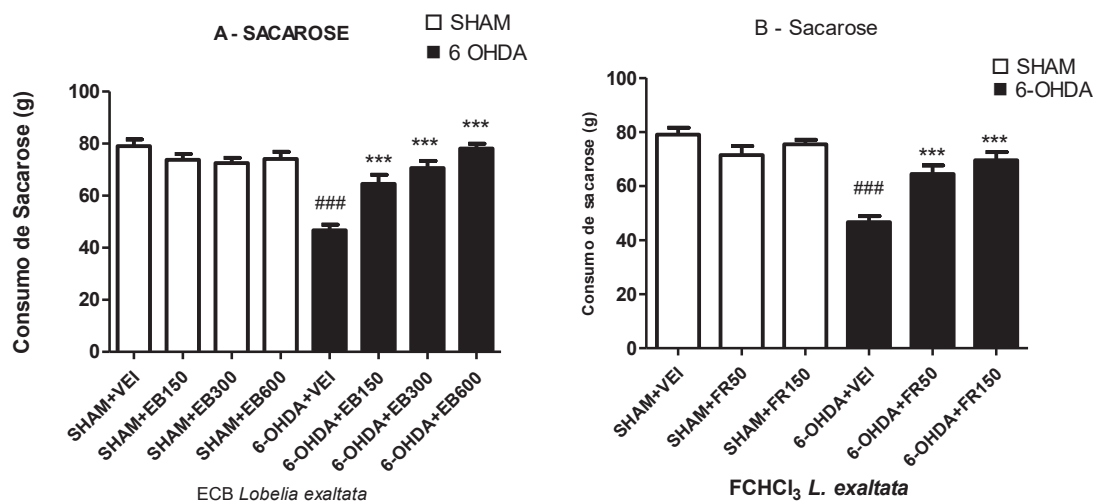
5.5.1 Teste de Preferência à Sacarose

Os resultados obtidos em relação ao consumo de sacarose no pré tratamento (grupo SHAM) mostrou que as concentrações testadas tanto para o ECB como para a FCHCl₃ foram próximas as do grupo SHAM+veículo. Os animais do grupo 6-OHDA tratados com os extratos de *L. exaltata* em todas as concentrações testadas apresentaram consumo de sacarose estatisticamente maior, quando comparados ao grupo 6-OHDA+veículo. O mesmo aconteceu com a FCHCl₃ de *L. exaltata*, nas concentrações testadas (GRÁFICOS 7A e 7B).

Conforme observado nos (GRÁFICOS 8A e 8B) não foi encontrada diferença significativa no consumo total de líquidos entre os fatores pré-tratamento, tratamento e interação entre ambos.

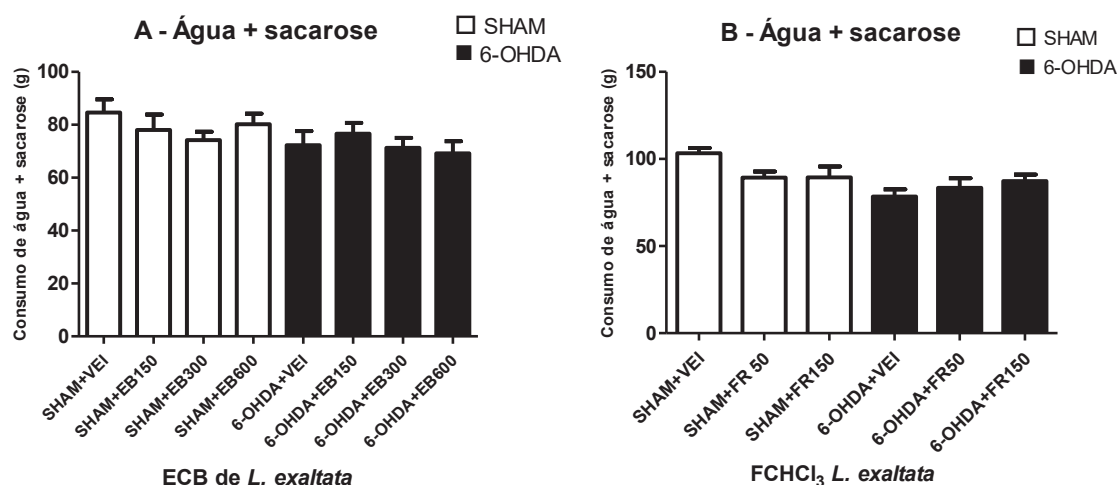
Na presente pesquisa foi possível observar que no pré-tratamento com *L. exaltata* os animais não perderam a capacidade de sentir prazer, considerando que o consumo de sacarose foi próximo ao do grupo SHAM+veículo. Na comparação entre grupo SHAM e grupo 6-OHDA tratados com o veículo pode-se dizer que houve a lesão bilateral com o 6-OHDA na substância nigra causando um efeito tipo depressivo, pois esse grupo apresentou anedonia. Os animais do grupo 6-OHDA tratados com as diferentes concentrações do ECB e da FCHCl₃ apresentaram um maior consumo de sacarose quando comparados ao veículo, indicando que tanto esses extratos em todas as concentrações protegendo os animais do comportamento depressivo causado pela neurotoxina uma vez que os animais não perderam a capacidade de sentir prazer.

GRÁFICO 7 - CONSUMO DE SACAROSE DOS GRUPOS SHAM E 6-OHDA TRATADOS COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE ECB E FCHCl₃ DE *L. exaltata*.



FONTE: A autora (2016). Os **Gráficos 6A e 6B** mostram o consumo de sacarose dos grupos SHAM e 6-OHDA tratados com diferentes concentrações do ECB. (veículo, 150, 300 e 600 mg/kg) e FCHCl₃ (veículo, 50 e 150 mg/kg), respectivamente, 7 dias após lesão bilateral. **(A)** ### $p \leq 0,001$ comparado com o grupo SHAM+veículo, *** $p \leq 0,001$ comparado com o grupo 6-OHDA+veículo, **(B)** ### $p \leq 0,001$ comparado com o grupo SHAM+veículo, *** $p \leq 0,001$ comparado com o grupo 6-OHDA+veículo, (ANOVA de uma via, seguido de test post hoc de Newman-Keuls).

GRÁFICO 8 - CONSUMO DE ÁGUA + SACAROSE DOS GRUPOS SHAM E 6-OHDA TRATADOS COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE ECB E FCHCl₃ DE *L. exaltata*.



FONTE: A autora (2016). **Gráficos 8A e 8B** mostram o consumo de Água + sacarose dos grupos SHAM e 6-OHDA tratados com diferentes concentrações do ECB. (veículo, 150, 300 e 600 mg/kg) e FCHCl₃ (veículo, 50 e 150 mg/kg), respectivamente, 14 dias após lesão bilateral. Não houve diferença estatística entre os grupos $p > 0,05$ (ANOVA de uma via).

No consumo total de líquidos não se observou o efeito de 6-OHDA, tanto no fator pré-tratamento quanto para o fator tratamento para todas as concentrações dos extratos testados de ECB e FCHCl₃. Isso indica que não houve efeito da neurotoxina nos animais e a diminuição do consumo da sacarose foi pela anedonia e não por prejuízo da atividade motora.

A preferência pela sacarose é um teste frequentemente usado como medida de anedonia em roedores (Wang et al., 2008). Anedonia, ou incapacidade de sentir prazer em atividades agradáveis ou gratificantes, sendo principal sintoma da depressão (PAPP et al., 1991). Este teste torna-se útil para descoberta de novas drogas antidepressivas, uma vez que a redução na taxa de preferência à sacarose em relação ao controle é indicativa de anedonia (LIU et al., 2018).

A lesão bilateral induzida pela neurotoxina 6-OHDA na via nigroestriatal promove um comportamento tipo depressivo nos animais (TADAIESKY et al., 2008) podendo também causar efeitos motores (SLATTERY et al., 2007). O teste de preferência à sacarose possibilita a avaliação de dois parâmetros: um é a comparação entre o consumo de sacarose e consumo de água, onde o animal tem preferência natural pela sacarose; o outro, é o consumo total dos dois líquidos, necessário para excluir a ideia de possíveis prejuízos motores causados pela toxina (SLATTERY; MARKOU; CRYAN, 2007; SANTIAGO et al., 2010).

5.5.2 Teste De Natação Forçada Modificado

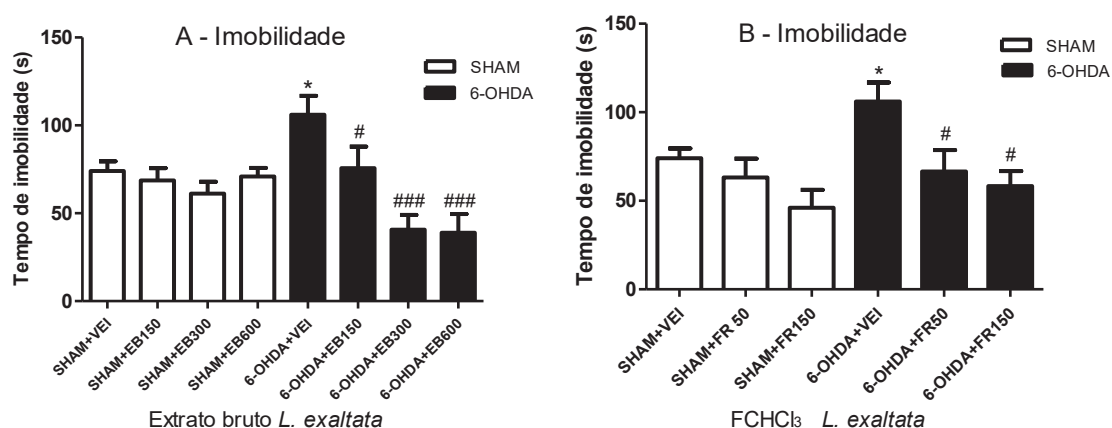
No teste de natação forçada os animais lesados mostraram diferenças significativas entre os grupos experimentais nos fatores pré-tratamento e tratamento, no tempo de imobilidade dos animais durante os 5 minutos da sessão de teste que foi utilizado como parâmetro indicativo de um comportamento do tipo depressivo.

Os resultados indicaram que os animais 6-OHDA tratados com veículo apresentaram um tempo de imobilidade maior quando comparado com o grupo SHAM tratado com veículo. Mas, quando os animais do grupo 6-OHDA foram tratados com ECB 150, 300 e 600 mg/kg de *L. exaltata* houve uma redução no tempo de imobilidade quando comparados aos animais do grupo 6-OHDA tratados com veículo (GRÁFICO 9A). O mesmo aconteceu quando os animais foram tratados com a FCHCl₃, onde houve um tempo de imobilidade maior dos animais tratados com 6-OHDA quando comparados com o grupo SHAM tratado com veículo e uma diminuição na imobilidade quando comparados aos animais do grupo 6-OHDA tratados com 50 e 150 mg/kg de FCHCl₃ (GRÁFICO 9B).

Quanto ao tempo de natação, também foram encontradas diferenças significativas no pré-tratamento e tratamento. Os animais do grupo 6-OHDA tratados com veículo apresentaram uma redução no tempo de natação quando comparados com o grupo SHAM tratados com veículo. Esta redução foi revertida com o tratamento *L. exaltata* em todas nas concentrações de 300 e 600 mg/kg do ECB e na concentração 150 mg/kg da FCHCl₃, como podemos observar nos GRÁFICOS (10A e 10B).

Nos resultados do tempo de escalada, não foram observadas diferenças estatísticas entre os grupos analisados de ECB e FCHCl₃ no fator pré tratamento e no fator tratamento.

GRÁFICO 9 - TEMPO DE IMOBILIDADE DOS GRUPOS SHAM E 6-OHDA TRATADOS COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE EBC E FCHCl₃ DE *L. exaltata*.



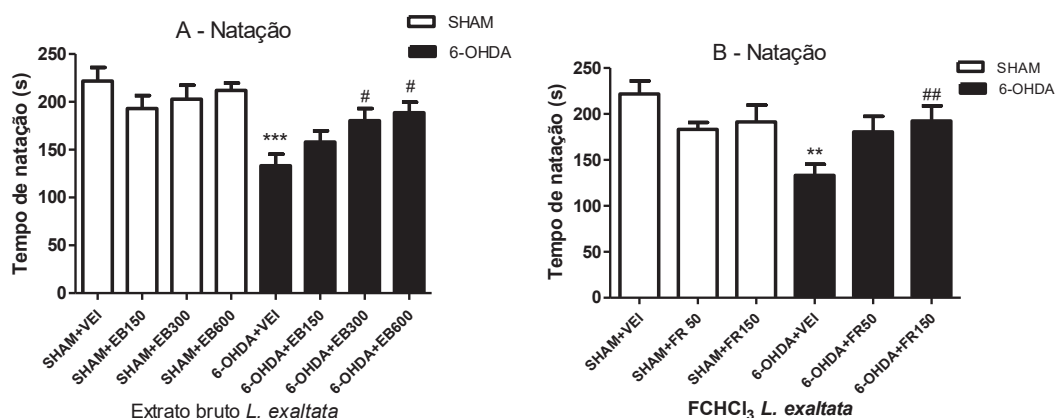
FONTE: A autora (2016). **Gráficos 9A e 9B** mostram o tempo de imobilidade dos grupos SHAM e 6-OHDA tratados com diferentes concentrações do ECB. (veículo, 150, 300 e 600 mg/kg) e FCHCl₃ (veículo, 50 e 150 mg/kg), respectivamente, 21 dias após a cirurgia. **(A)** * $p \leq 0,05$ comparado com o grupo SHAM+veículo, ### $p \leq 0,001$ comparado com o grupo 6-OHDA+veículo, **(B)** * $p \leq 0,05$ comparado com o grupo SHAM+veículo, *** $p \leq 0,001$ comparado com o grupo 6-OHDA+veículo (ANOVA de uma via, seguido de test post hoc de Newman-Keuls).

O teste de natação forçada é um outro teste utilizado para avaliar o comportamento depressivo dos animais e pode confirmar os resultados do teste de Preferência a Sacarose, porém sem levar em consideração os danos motores que possam ter sido causados pela administração da toxina. Esse teste leva ao desespero comportamental pois o animal é colocado em uma situação que não consegue fugir (PORSOLT; BERTIN; JALFRE, 1978). Durante o teste, ao passar do tempo, os animais tentam a ficar imóveis apenas mantendo a cabeça para fora com movimentos mínimos. A maioria dos antidepressivos utilizados clinicamente diminuem a duração dessa imobilidade (CASTAGNÉ; PORSOLT; MOSER, 2009).

No presente estudo que o tempo de imobilidade foi significativamente maior nos animais lesados com 6-OHDA entretanto houve uma diminuição da imobilidade nos animais lesados e tratados com o ECB e FCHCl₃ de *L. exaltata*. Esses animais se mantiveram por maior tempo sob agitação, ou seja, nadando, o que pode indicar que houve uma neuroproteção (redução da morte dos neurônios dopaminérgicos) e uma possível reversão do estado tipo depressivo.

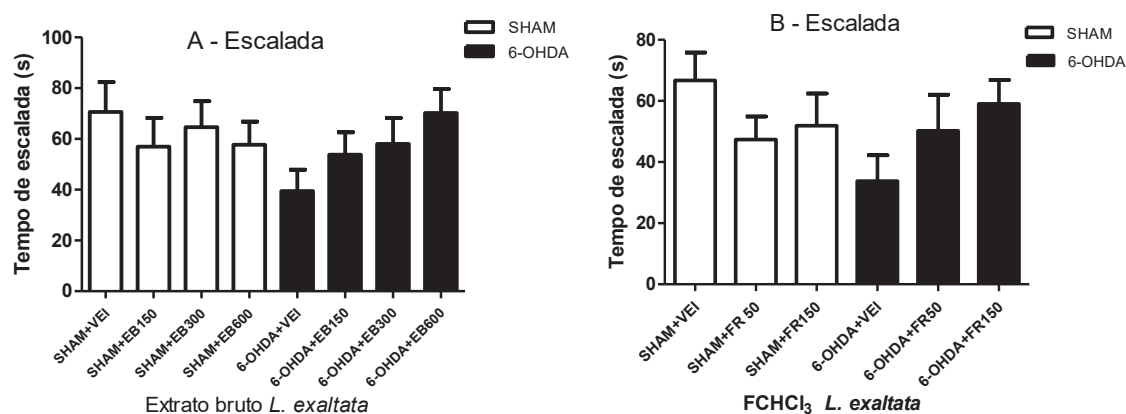
O pré-tratamento com os extratos não influenciou os animais do grupo controle (SHAM), pois não foi encontrada diferença estatística entre os grupos tratados e o veículo.

GRÁFICO 10 - TEMPO DE NATAÇÃO DOS GRUPOS SHAM E 6-OHDA TRATADOS COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE EBC E FCHCl₃ DE *L. exaltata*



FONTE: A autora (2016). **Gráficos 10A e 10B** mostram o tempo de natação dos grupos SHAM e 6-OHDA tratados com diferentes concentrações do ECB. (veículo, 150, 300 e 600 mg/kg) e FCHCl₃ (veículo, 50 e 150 mg/kg), respectivamente. 21 dias após a cirurgia. **(A)** *** $p \leq 0,001$ comparado com o grupo SHAM+veículo, # $p \leq 0,05$ comparado com o grupo 6-OHDA+veículo, **(B)** ** $p \leq 0,01$ comparado com o grupo SHAM+veículo, # $p \leq 0,05$ comparado com o grupo 6-OHDA+veículo (ANOVA de uma via, seguido de test post hoc de Newman-Keuls).

GRÁFICO 11 - TEMPO DE ESCALADA DOS GRUPOS SHAM E 6-OHDA TRATADOS COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE EBC E FCHCl₃ DE *L. exaltata*



FONTE: A autora (2016). Gráficos 11A e 11B mostram o tempo de escalada dos grupos SHAM e 6-OHDA tratados com diferentes concentrações do ECB. (veículo, 150, 300 e 600 mg/kg) e FCHCl₃ (veículo, 50 e 150 mg/kg), respectivamente, 21 dias após a cirurgia. Não houve diferença estatística entre os grupos $p=0,43$ para ECB e $p=0,23$ para FALK (ANOVA de uma via, seguido de test post hoc de Newman-Keuls).

Há de observar que o tratamento prévio com doses empregadas dos extratos, antes da lesão com 6-OHDA durante 21 dias antes da cirurgia foi escolhida para que

o mesmo pudesse desempenhar seu efeito antidepressivo, que se instala gradativamente.

É importante destacar que o Teste de Preferência à Sacarose foi realizado 7 dias após a cirurgia e o Teste de Natação forçada 14 dias após o procedimento cirúrgico, sendo assim os animais não estando mais em tratamento na realização do Teste de Natação forçada, o que reforça a hipótese de neuroproteção e reversão do quadro antidepressivo dos animais lesados.

5.5.3 Teste de Reconhecimento Social

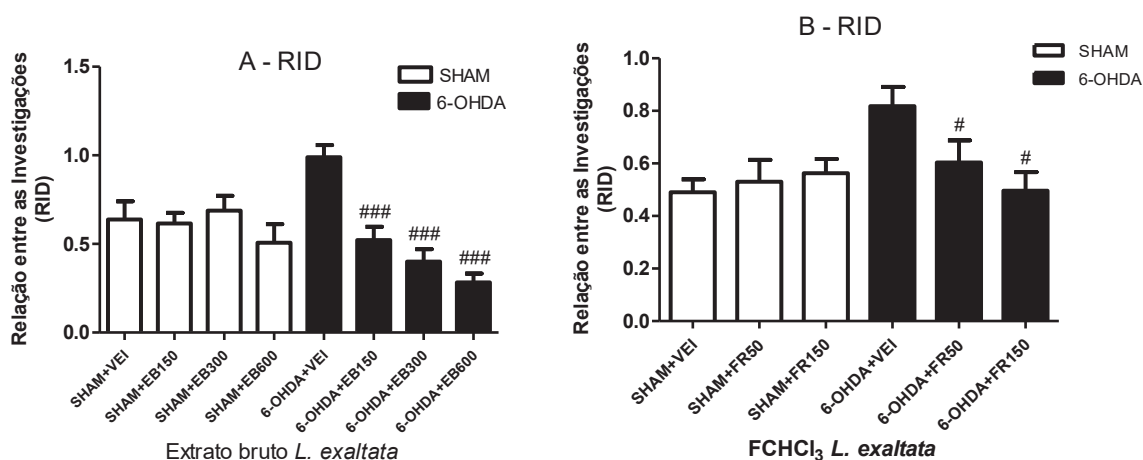
Os (GRÁFICOS 12A e 12B) expressam os efeitos obtidos no pré-tratamento e tratamento dos animais com ECB. (veículo, 150, 300 e 600 mg/kg) e FCHCl₃ (veículo, 50 e 150 mg/kg) no teste de reconhecimento social ao ser apresentado o mesmo rato jovem duas vezes ao rato adulto.

A análise de ANOVA de uma via mostrou um significativo aumento da razão entre as investigações (RID) no fator pré-tratamento no tratamento para o ECB. O grupo 6-OHDA+veículo apresentou uma maior relação entre os tempos da segunda investigação e primeira investigação do que o grupo todas as concentrações do grupo SHAM e grupo 6-OHDA tratado com ECB (GRÁFICO 12A). Na FCHCl₃, o grupo 6-OHDA+veículo também apresentou um aumento estatístico significativo em relação a todas as outras concentrações, tanto do grupo SHAM quanto do grupo 6-OHDA (GRÁFICO 12B).

O Teste de Reconhecimento Social avaliou a memória social dos ratos e foi utilizado para verificar se ocorreram prejuízos na memória olfativa de curta duração. A redução nos níveis de alguns neurotransmissores como noradrenalina, serotonina e dopamina provocam a diminuição da memória social (CASTELLANO; CABIB; PUGLISI-ALLEGRA, 1996).

Mais especificamente o hipocampo, o corpo estriado e o córtex pré-frontal apresentam vias dopaminérgicas que são responsáveis pelo aprendizado e memória (SEAMANNS; FLORESCO; PHILLIPS, 1998) O bulbo olfatório de mamíferos apresentam um grande número de neurônios dopaminérgicos que são importantes no reconhecimento e distinção de odores (DAVILA et al., 2003).

GRÁFICO 12 - RELAÇÃO ENTRE A PRIMEIRA E SEGUNDA INVESTIGAÇÃO (RID) DOS GRUPOS SHAM E 6-OHDA TRATADOS COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE EBC E FCHCl₃ DE *L. exaltata*



FONTE: A autora (2016). **Gráficos 12A e 12B** mostram RID entre os grupos SHAM e 6-OHDA tratados com diferentes concentrações do ECB. (veículo, 150, 300 e 600 mg/kg) e FCHCl₃ (veículo, 50 e 150 mg/kg), respectivamente, 10 dias após a cirurgia. . **(A)** ### p ≤ 0,001 comparado com o grupo 6-OHDA+veículo, **(B)** # p ≤ 0,05 comparado com o grupo 6-OHDA+veículo (ANOVA de uma via, seguido de test post hoc de Newman-Keuls).

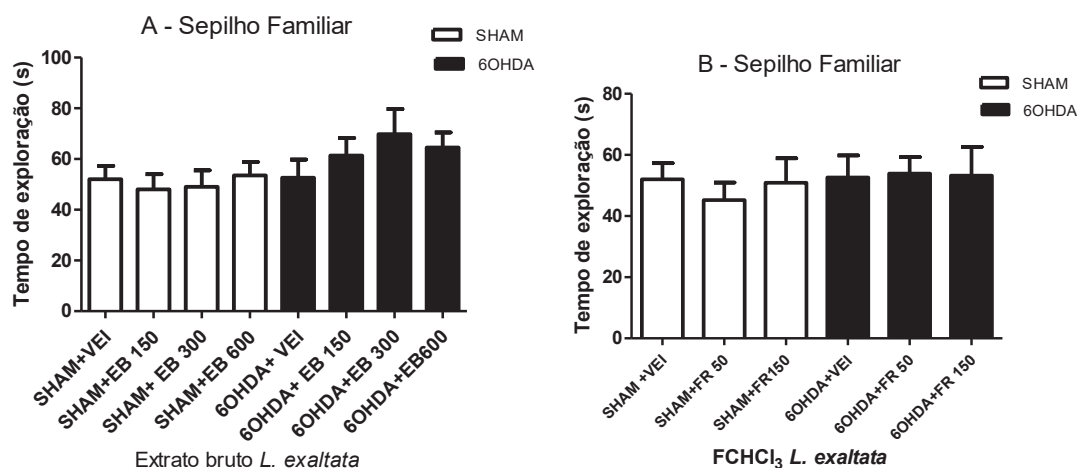
No presente estudo utilizou-se o RID, que avalia a relação entre o tempo de reconhecimento entre a segunda e a primeira apresentação do rato jovem ao rato adulto. Os animais do grupo 6-OHDA+veículo tanto do ECB como da FCHCl₃ apresentaram um maior RID quando comparado aos animais do mesmo grupo em todas as concentrações testadas. Com isso pode-se dizer que os extratos de *L. exaltata* apresentaram um potencial neuroprotetor melhorando a memória dos animais lesados.

5.5.4 Discriminação Olfativa

O teste de discriminação olfativa avaliou o tempo (segundos) que os animias permaneceram no sepilho familiar (GRÁFICOS 13A e 13B) e o tempo que permaneceram no sepilho novo (GRÁFICOS 14A e 14B).

OS resultados demonstram que não houveram diferenças estatísticas significativas no fator pré-tratamento e no fator tratamento em nenhuma concentração testada para ECB e FCHCl₃ para o tempo de permanência no sepilho novo e no sepilho familiar.

GRÁFICO 13 - TEMPO DE PERMANÊNCIA NO SEPILHO FAMILIAR DOS GRUPOS SHAM E 6-OHDA TRATADOS COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE EBC E FCHCl₃ DE *L. exaltata*



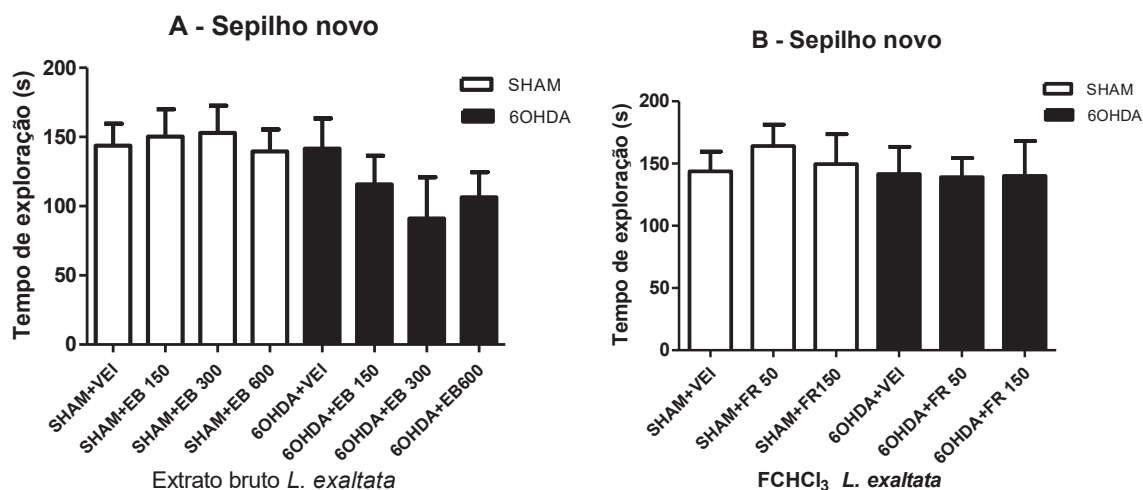
FONTE: A autora (2016). **Gráficos 13A e 13B** mostram o tempo de permanência dos animais no sepilho familiar dos grupos SHAM e 6-OHDA tratados com diferentes concentrações do ECB. (veículo, 150, 300 e 600 mg/kg) e FCHCl₃ (veículo, 50 e 150 mg/kg), respectivamente, 11 dias após a cirurgia. Não houve diferença estatística entre os grupos $p=0,24$ para ECB e $p=0,95$ para FCHCl₃ (ANOVA de uma via, seguido de test post hoc de Newman-Keuls).

Os indivíduos acometidos pela Doença de Parkinson, apresentam também um comprometimento nas funções olfatórias. Há uma deficiência na discriminação e reconhecimento de odores e juntamente com a depressão pode ter uma grande importância na detecção precoce da doença (DOTY; DEEMS; STELLAR, 1988).

O teste de discriminação olfatória baseia-se na preferência de ratos adultos em permanecer em ambientes impregnados com seu cheiro (sepilho familiar) em detrimento de ambientes inodoros ou com cheiros desconhecidos (sepilho não-familiar) (CARR et al., 1976). Os ratos saudáveis tendem a reconhecer seu cheiro e tendem a ficar mais tempo do lado da caixa contendo o sepilho familiar. Estudos prévios em roedores têm demonstrado uma perda nas funções olfatórias em decorrência de tratamentos que diminuem a neurotransmissão dopaminérgica, como 6-OHDA e MPTP (PREDIGER et al., 2006).

No presente estudo foi observado que não houve diferença estatística significativa entre os grupos tratados com 6-OHDA no tempo de permanência no sepilho familiar nem tão pouco no sepilho novo, entretanto de acordo com o tempo médio de permanência nos ambientes, os ratos tenderam a ficar mais no sepilho familiar.

GRÁFICO 14 - TEMPO DE PERMANÊNCIA NO SEPILHO NOVO DOS GRUPOS SHAM E 6-OHDA TRATADOS COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE EBC E FCHCl₃ DE *L. exaltata*



FONTE: A autora (2016). **Gráficos 14A e 14B** mostram o tempo de permanência dos animais no sepilho novo dos grupos SHAM e 6-OHDA tratados com diferentes concentrações do ECB. (veículo, 150, 300 e 600 mg/kg) e FCHCl₃ (veículo, 50 e 150 mg/kg), respectivamente, 11 dias após a cirurgia. Não houve diferença estatística entre os grupos $p=0,31$ para ECB e $p=0,95$ para FCHCl₃ (ANOVA de uma via, seguido de test post hoc de Newman-Keuls).

De acordo com a literatura a neurotoxina 6-OHDA não causa disfunção olfatória nos animais e eles permanecem com a capacidade de sentir odores, não causando prejuízo na discriminação olfatória (FERNANDEZ-RUIZ et al., 1993; TADAIESKY et al., 2008).

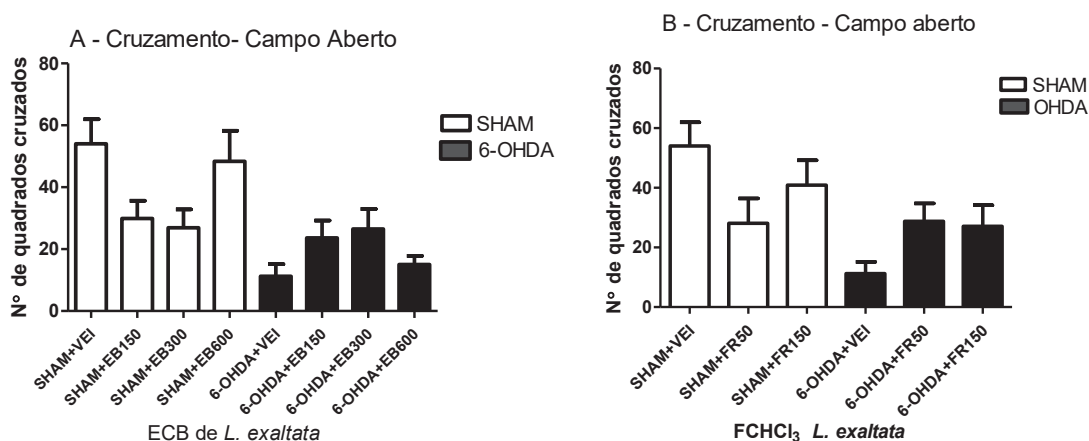
5.5.5 Teste de Campo Aberto

Na avaliação do teste comportamental do campo aberto, foi analisado o índice de quadrados cruzados pelo animal com as patas traseiras (atividade motora) (GRÁFICO 15A e 15B) e número de levantadas (atividade ansiolítica) (GRÁFICO 16A e 16B).

Os resultados obtidos com o teste de campo aberto não apresentaram diferenças estatisticamente significantes que demonstrassem algum efeito da *L. exaltata* tanto para o ECB como para a FCHCl₃. Observa-se que o comportamento dos animais no teste aplicado não houve um aumento no número de cruzamentos do grupo 6-OHDA quando comparado com o grupo SHAM e também não houve melhora

entre os animais do grupo 6-OHDA quando comparado ao grupo 6-OHDA+veículo. Isto ocorreu porque este modelo utilizado representa um estado inicial da doença. Ou seja, um estado em que os animais ainda não apresentam sintomas motores.

GRÁFICO 15 - AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE MOTORA DOS EXTRATOS DE *L. exaltata* NO TESTE DE CAMPO ABERTO



FONTE: A autora (2016). **Gráficos 15A e 15B** mostram avaliação da atividade motora no teste de Campo Aberto dos grupos SHAM e 6-OHDA tratados com diferentes concentrações do ECB. (veículo, 150, 300 e 600 mg/kg) e FCHCl₃ (veículo, 50 e 150 mg/kg), respectivamente, 14 dias após a cirurgia. Não houve diferença estatística entre os grupos para ECB e para FCHCl₃ (ANOVA de uma via, seguido de test post hoc de Newman-Keuls).

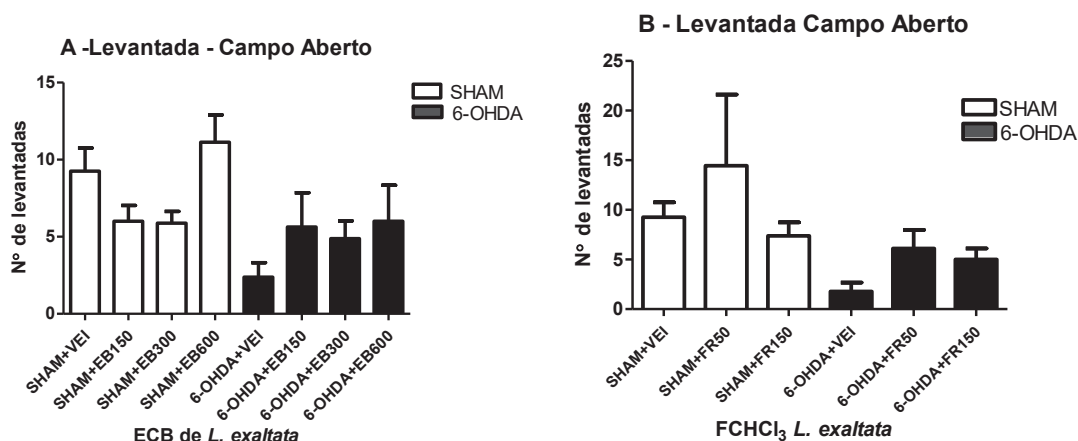
Na análise do número de levantadas foi encontrado resultado semelhante ao do teste de cruzamento dos quadrados, sendo que no pré-tratamento e tratamento não houve diferença estatística significativa como mostra o (GRÁFICO 16A e 16B).

Os dados demonstram que o pré-tratamento com as 3 concentrações de ECB e as duas concentrações de FCHCl₃ de *L. exaltata* não causaram problemas motores nem tão pouco ansiedade nos animais, entretanto o tratamento com 6-OHDA causou um dano motor no veículo.

L. exaltata apresenta em sua composição vários alcaloides piperidínicos, de acordo com os resultados expostos podemos sugerir que o ECB de *L. exalta* apresentou uma potencial atividade neuroprotetora evidenciadas principalmente nos testes de Preferência à Sacarose, Natação Forçada, Reconhecimento Social e Campo Aberto, melhorando sintomas depressivos e de memória, sem ter causado prejuízo motor. Constatou-se também que a espécie em estudo é rica em alcaloides e que a FCHCl₃ também apresentou as mesmas atividades do ECB, o que leva a propor que

a atividade do ECB se deve a presença dos alcaloides piperidínicos presentes no mesmo.

GRÁFICO 16 - AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANSIOLÍTICA DOS EXTRATOS DE *L. exaltata* NO TESTE DE CAMPO ABERTO



FONTE: A autora (2016). **Gráficos 16A e 16B** mostram avaliação da atividade ansiolítica no teste de Campo Aberto dos grupos SHAM e 6-OHDA tratados com diferentes concentrações do ECB. (veículo, 150, 300 e 600 mg/kg) e FCHCl₃ (veículo, 50 e 150 mg/kg), respectivamente, 14 dias após a cirurgia. Não houve diferença estatística entre os grupos para ECB e para FCHCl₃ (ANOVA de uma via, seguido de test post hoc de Newman-Keuls).

Os alcaloides derivados de plantas apresentam potencial efeito de contra várias doenças degenerativas do SNC, incluindo a Doença de Parkinson. Funcionam como receptores agonistas muscarínicos e de adenosina, inibidores da MAO, inibidores de acetilcolinestrerase, agonistas dopaminérgicos e de nicotina e antagonista de receptor N-metil-D-aspartato, exibindo efeitos neuroprotetores (FELPIN; LEBRETON, 2004, HUSSAIN et al., 2018).

O alcaloide piperidínico, lobelina, da *L. inflata* exerceu efeito neuroprotetor *in vivo*, pela indução da neurotoxina 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridine (MPTP). A lobelina foi capaz de proteger os neurônios dopaminérgicos dos animais contar toxinas extracelulares, bloqueando a captação pelo transportador de dopamina e aumentando a concentração de dopamina na fenda sináptica, inibindo a receptação da dopamina. Essas propriedades sugerem que a lobelina é um potencial agente preventivo ou terapêutico para o tratamento de Doença de Parkinson (LI et al., 2014).

Muitas pesquisas com plantas tem sido realizadas na busca de novos tratamentos de distúrbio nervosos. Huerta-Reyes et al., (2013) avaliaram os efeitos ansiolíticos, depressivos e sedativos do extrato metanólico espécie de *Heteropterys*

brachiata L. (DC.) em camundongos utilizando os testes de labirinto em cruz elevado, natação forçada, teste de convulsões induzidas pelo PTZ e teste de campo aberto. Como resultados obtiveram, que o extrato produziu um efeito antidepressivo significativo em doses de 500 e 750 mg/kg no teste de natação forçada, enquanto que nas doses de 500 a 1500 mg/kg exibiram uma atividade ansiolítica dependente no teste de Campo Aberto. Na dose de 500 mg/kg apresentou atividade anticonvulsivante significativa no teste do PTZ. Os autores concluíram que *H. brachiata* possui propriedades antidepressivas, ansiolíticas e anticonvulsivas.

Bi et al. (2015), investigaram os efeitos neuroprotetores dos alcaloides *Piper longum* L. (Piperaceae) em um modelo de camundongo induzido por MPTP na Doença de Parkinson. Os alcaloides foram extraídos a partir a semente seca de *P. longum* usando etanol a 85%. Os alcaloides apresentaram efeitos neuroproteores como aumento nos níveis de dopamina, glutathione (GSH) e superóxido dismutase (SOD), diminuição da peroxidação lipídica de malondialdeído (MDA) além de melhoria no desempenho no teste de Campo Aberto.

Os resultados encontrados no presente estudo corroboram com os obtidos por Brown et al. (2016), onde foi isolado um alcaloide piperidínico, a lobinalina, de *L. cardinalis*. A lobinalina aplicada no corpo estriado de ratos apresentou um efeito de inibição do transportador de dopamina por ligação com receptores nicotínicos da acetilcolina (nicAChR) provocando um aumento no clearance de dopamina tornando a lobinalina uma substância interessante para para o desenvolvimento de terapias para Doença de Parkinson.

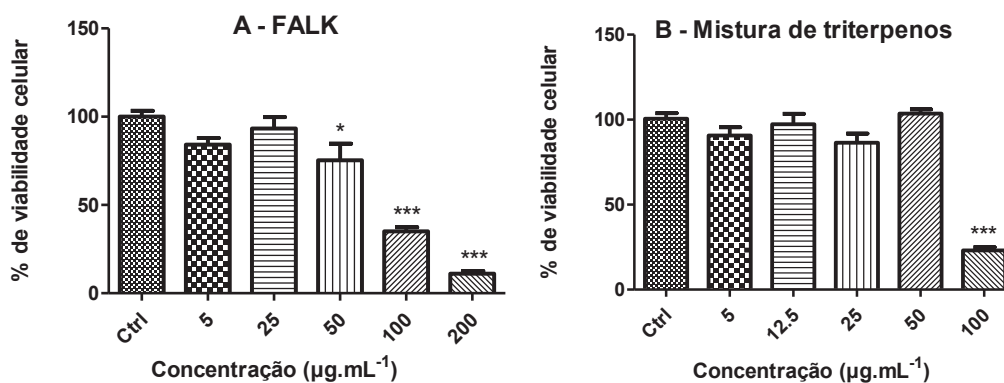
5.6 AVALIAÇÃO DO EFEITO DA FRAÇÃO ALCALOIDAL E FRAÇÃO TRITERPENOS DE *Lobelia exaltata* Pohl SOBRE CÉLULAS TUMORAIS.

5.6.1 Ensaio de viabilidade celular pelo método de redução do MTT das células Jurkat com a fração alcaloidal (FALK) e mistura de triterpenos.

Os resultados de viabilidade celular no ensaio de citotoxicidade por redução do MTT para as células JURKAT estão demonstrados nos (GRÁFICOS 17A e 17B). A FALK nas concentrações de 100 e 200 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, foram capazes de reduzir em 35 e 11,09% a viabilidade celular e a mistura de triterpenos nas concentração de 200

$\mu\text{g.mL}^{-1}$ foi capaz de reduzir em 23,02%, tendo em vista que as viabilidades celulares dos ensaios foram inferiores a 50%, podemos dizer que as frações citadas apresentaram atividade citotóxica para as células Jurkat.

GRÁFICO 17 - EFEITO DE FALK E MISTURA DE TRITERPENOS DE *L. exaltata* SOBRE A VIABILIDADE DAS CÉLULAS JURKAT

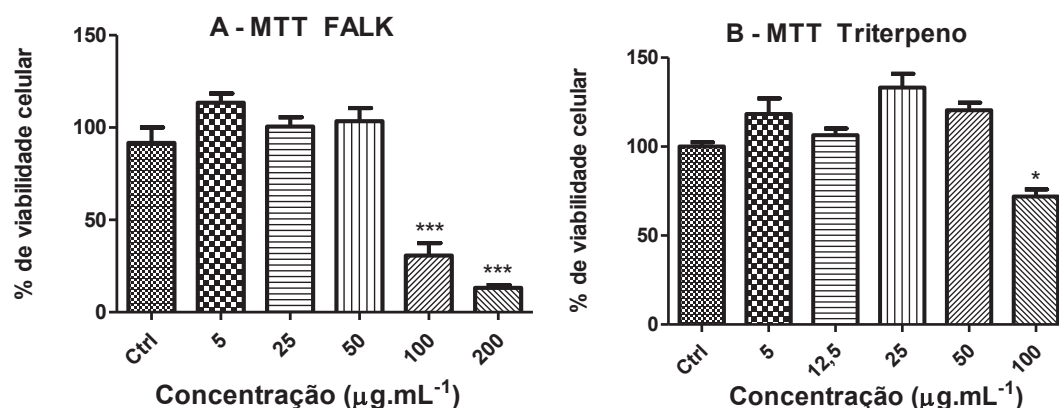


FONTE: A autora (2016). Tempo de cultura: 72 h: Gráficos 17A e 17B mostram a % de viabilidade celular de FALK e mistura de triterpenos respectivamente. * $p < 0,05$ quando comparado ao controle; *** $p < 0,001$ quando comparado com o controle. Ctrl: controle negativo (ANOVA de uma via, seguido de test post hoc de Tukey).

5.6.2 Ensaio de viabilidade celular pelo método de redução do MTT das células Calu-3 com a fração alcaloide e mistura de triterpenos.

Os resultados de viabilidade celular no ensaio de citotoxicidade por redução do MTT para as células Calu-3 estão demonstrados nos (GRÁFICOS 18A e 18B). A FALK nas concentrações de 100 e 200 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, foram capazes de reduzir em 30,7 e 13,24% a viabilidade celular e a mistura de triterpenos nas não foi capaz de reduzir a viabilidade celular em nenhuma das concentrações testadas em valores menores que 50%, portanto apenas a FALK apresentou um efeito citotóxico sobre as células Calu-3.

GRÁFICO 18 - EFEITO DE FALK E MISTURA DE TRITERPENOS DE *L. exaltata* SOBRE A VIABILIDADE DAS CÉLULAS Calu-3 PELO MÉTODO DO MTT



FONTE:

A autora (2016). Tempo de cultura: 72 h: Gráficos 18A e 18B mostram a % de viabilidade celular de FALK e mistura de triterpenos respectivamente. *** $p < 0,001$ quando comparado ao controle; * $p < 0,05$ quando comparado com o controle. Ctrl: controle negativo (ANOVA de uma via, seguido de test post hoc de Tukey).

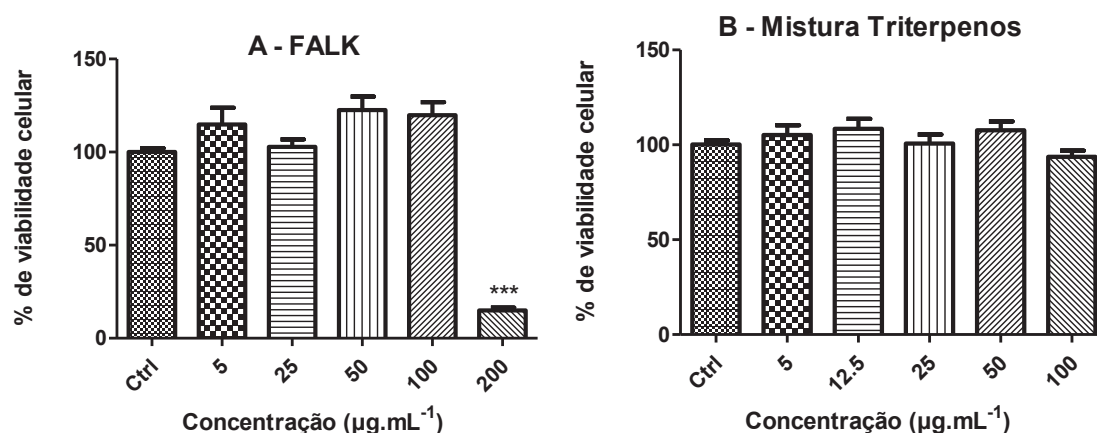
5.6.3 Ensaio de viabilidade celular pelo método de redução do MTT das células Hela com a fração alcaloidal (FALK) e mistura de triterpenos

Os resultados de viabilidade celular no ensaio de citotoxicidade por redução do MTT para as células HeLa estão demonstrados nos (GRÁFICOS 19A e 19B). A FALK na concentrações de 200 µg.mL⁻¹, foi capaz de reduzir em 14,95% a viabilidade celular e a mistura de triterpenos nas não foi capaz de reduzir a viabilidade celular em nenhuma das concentrações testadas em valores abaixo de 50%, portanto apenas a FALK apresentou um efeito citotóxico sobre as células Calu-3.

5.6.4 Ensaio de viabilidade celular pelo método de redução do MTT das células HRT com a fração alcaloidal (FALK) e mistura de triterpenos

A mistura de triterpenos e FALK de *L. exaltata* não demonstraram efeito citotóxico sobre a linhagem celular HRT como ilustra o (GRÁFICO 20A e 20B).

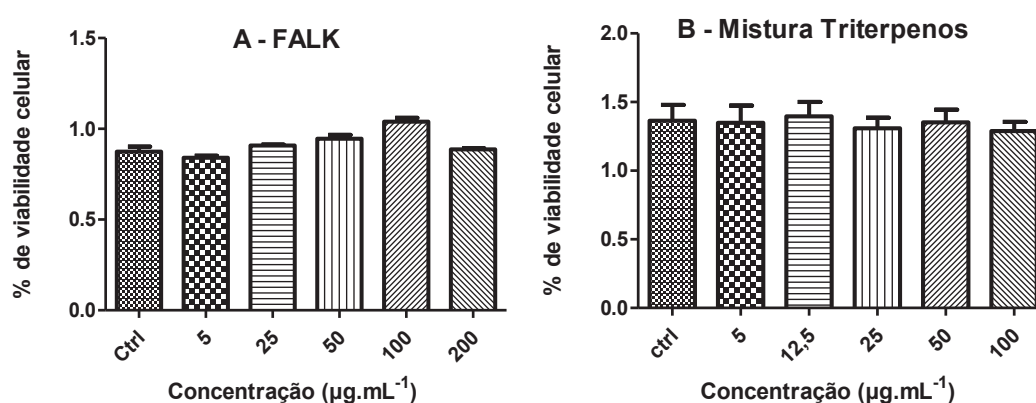
GRÁFICO 19 - EFEITO DE FALK E MISTURA DE TRITERPENOS DE *L. exaltata* SOBRE A VIABILIDADE DAS CÉLULAS HeLa PELO MÉTODO DO MTT



FONTE: A autora (2016). Tempo de cultura: 72 h: Gráficos **19A** e **19B** mostram a % de viabilidade celular de FALK e mistura de triterpenos respectivamente. *** $p < 0,001$ quando comparado ao controle. Ctrl: controle negativo (ANOVA de uma via, seguido de test post hoc de Tukey).

O ensaio de toxicidade foi realizado considerando que o gênero *Lobelia* apresenta relatos na literatura sobre sua ação citotóxica sobre linhagens de células tumorais (KUO et al., 2011; CHEN et al., 2014).

GRÁFICO 20 - EFEITO DE FALK E MISTURA DE TRITERPENOS DE *L. exaltata* SOBRE A VIABILIDADE DAS CÉLULAS HRT PELO MÉTODO DO MTT



FONTE: A autora (2016). Tempo de cultura: 72 h: Gráficos **20A** e **20B** mostram a % de viabilidade celular de FALK e mistura de triterpenos respectivamente. Ctrl: controle negativo. Os valores não são significativamente diferentes em $p < 0,05$ (ANOVA de uma via, seguido de test post hoc de Tukey).

L. exaltata é uma espécie rica em alcaloides e triterpenos como já relatado anteriormente (FOLQUITTO, 2014). Os alcaloides são compostos químicos importantes que servem como um rico reservatório para a descoberta de drogas. Vários alcaloides isolados de plantas exibem efeitos antiproliferativos e

antimetastáticos em vários tipos de câncer *in vitro* e *in vivo*. Alcaloides, como camptotecina e vinblastina, já foram desenvolvidos com sucesso para terapias anticâncer, sendo agentes promissores para descoberta de novos tratamentos anticâncer (LU et al., 2012).

Os triterpenos pentacíclicos, principalmente ácido ursólico e ácido oleanoico estão distribuídos amplamente em plantas e várias pesquisas têm sido realizadas com estes compostos devido a seu potencial antitumoral (LI et al., 2002; PATOLA; RAO, 2012).

Com relação à outras plantas do gênero *Lobelia*, poucos estudos foram realizados para atividade citotóxica. Yang et al. (2014), testaram 12 compostos, isolados de *L. chinensis*, entre eles alcaloides e poliacetilenos, contra duas linhagens celulares de câncer de pulmão (NCI-H292 e MSTO-211H). Como resultado obtiveram uma ação citotóxica moderada dos poliacetilenos.

Diante de seu potencial pouco explorado, sugere-se que novos estudos sejam realizados em relação à atividade citotóxica de *L. exaltata*.

5.7 ATIVIDADE INSETICIDA DO EXTRATO CETÔNICO BRUTO E FRAÇÕES DAS PARTES AÉREAS E SEMENTES DE *Lobelia exaltata* POHL (CAMPANULACEAE) SOBRE A TRAÇA-DAS-CRUCÍFERAS

O resultado da avaliação da mortalidade das larvas de *P. xylostella* dos extratos brutos e frações das partes aéreas e sementes de *L. exaltata*, a 5% (p/v), em discos de *Brassica oleracea* por pulverização nos extratos está representado no (GRÁFICO 21).

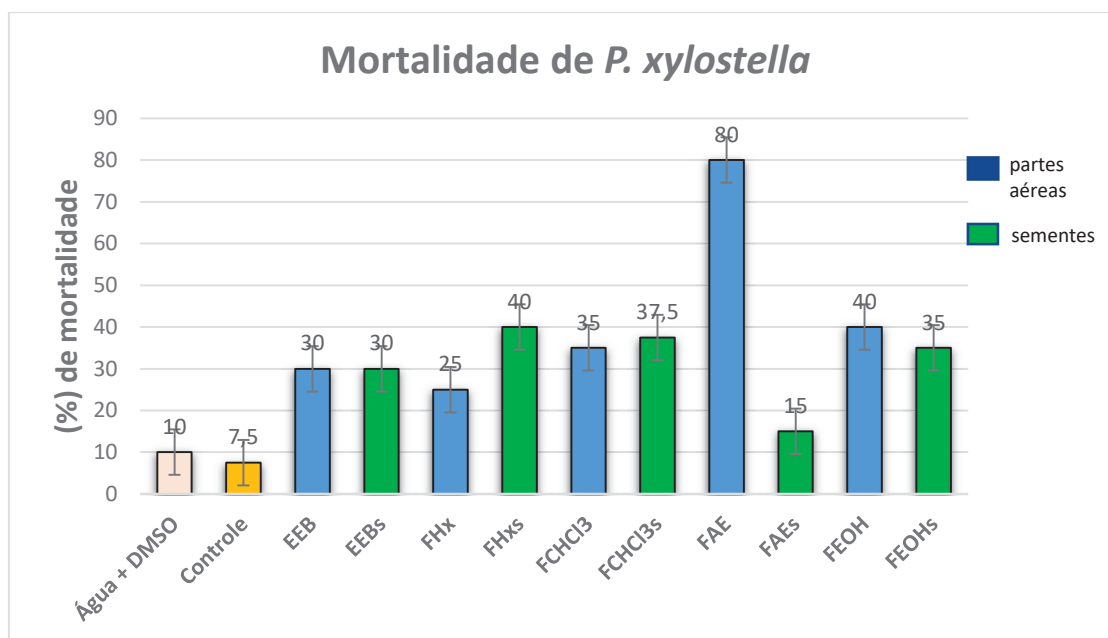
A maioria das frações testadas causaram entre 30 e 40% de mortalidade das larvas. A FHxs (das sementes) e a FEOH (das partes aéreas) causaram mortalidade de 40 % enquanto que FAE (das partes aéreas) foi a que mais afetou a sobrevivência da traça das crucíferas com 80 % de mortalidade. Um produto é considerado eficiente para o controle populacional de uma espécie quando alcança uma redução $\geq 80\%$ dos indivíduos (GARCIA, 2002).

As plantas são importantes fontes de descobertas de novas substâncias bioativas com atividades contra insetos (HOLLINGWORTH, 1976). A busca de

alternativas utilizando produtos naturais extraídos de diferentes espécies de plantas, pode contribuir de forma relevante no manejo de *P. xylostella*.

Trindade et al. (2008) avaliaram os efeitos dos extratos de planta, *Aspidosperma pyrifolium*, sobre *Plutella xylostella*. Obtiveram extratos etanólicos da casca do caule, do fruto e da raiz de *A. pyrifolium*. O extrato bruto etanólico da casca do caule foi o mais letal dos três. A subfração aquosa rica em alcaloides, derivada do extrato da casca do caule, causou 100% de mortalidade larval a 4 mg L⁻¹. A excelente atividade inseticida contra *P. xylostella* foi associada à presença dos alcaloides indólicos: aspidofractinina, 15-demetoxipirifolina e N-formilaspidofractinin.

GRÁFICO 21 - MORTALIDADE DE *Plutella xylostella* FRENTE AOS EXTRATOS BRUTOS E FRAÇÕES DAS PARTES AÉREAS E SEMENTES DE *L. exaltata*



FONTE: A autora (2017).

Boiça Junior et al. (2005) avaliaram o efeito de extratos aquosos de plantas no desenvolvimento de *P. xylostella*, utilizando os mesmos na concentração de 10% sobre discos de folha de couve. Concluíram que os extratos de *Sapindus saponaria* L. (frutos), *Trichilia pallida* SW (ramos), *Enterolobium contortisiliquum* (Vell.) Morong (frutos) e *Nicotiana tabacum* L. (folhas), proporcionaram 100% de mortalidade das larvas dessa praga.

O efeito de diferentes concentrações do extrato acetato de etila de folhas e ramos de *Trichilia pallida* Sw. foi avaliado frente à lagarta-do-cartucho *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) onde verificou-se que o extrato causou mortalidade larval de 100% (em concentração igual ou superior a 0,05%) e afetou a sobrevivência e o desenvolvimento do inseto na concentração de 0,006% (ROEL et al., 2000).

Com base no exposto acima deve-se observar que o efeito inseticida na fração acetato de etila de *L. exaltata* é um resultado promissor e abre caminhos para novos estudos focados no isolamento e teste de compostos bioativos dessa espécie.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os objetivos propostos para o estudo da espécie *L. exaltata* foram atingidos e as considerações estabelecidas estão listadas a seguir:

As amostras analisadas com relação aos parâmetros farmacopeicos, teor de água e cinzas totais pelo método gravimétrico e por decomposição térmica, estão de acordo com o estabelecido na Farmacopeia Brasileira.

A partir dos extratos brutos e as frações das partes aéreas de *L. exaltata* foram obtidas frações: hexano (FHx), clorofórmio (FCHCl₃), acetato de etila (FAE), e etanólica (FEOH).

No presente estudo foram identificados 40 compostos provenientes da fração (FCHCl₃) e FALK, sendo ácidos graxos, aldeídos, cetonas, açúcares, ésteres, alcaloides piperidínicos, ácido ursólico e *myo*-inositol.

Nos ensaios da atividade ansiolítica e anticonvulsivante no modelo zebrafish foi observado que ECB e *myo*-inositol apresentaram uma boa atividade ansiolítica e um forte potencial como agentes de terapia anticonvulsiva.

O ECB e a FALK mostraram uma atividade neuroprotetora com base modelo de Doença de Parkinson de acordo com os testes de Preferência à Sacarose, Natação Forçada, Reconhecimento Social e Campo Aberto, podendo sugerir que os alcaloides presentes na fração são os responsáveis pela atividade.

Em relação a Atividade Citotóxica realizada nas Linhagens celulares Jurkat, Calu-3, HeLa e HRT foi possível observar que a fração alcaloide apresentou uma melhor atividade que a mistura de triterpenos, em particular as células Jurkat apresentaram uma maior inibição na proliferação celular comparada às outras linhagens.

Atividade inseticida do ECB das partes aéreas e ECB e frações das sementes de *L. exaltata* sobre a traça-das-crucíferas foi baixa na maioria dos extratos utilizados com exceção da FAE das partes aéreas que apresentou uma boa atividade inseticida (80% de mortalidade).

REFERÊNCIAS

- AARSLAND, D.; PÅHLHAGEN, S.; BALLAR, C. G.; EHRT, U.; SVENNINGSSON, P. Depression in Parkinson disease - epidemiology, mechanisms and management. **Nature Reviews Neurology**, v.8, p. 35–47, 2012. doi:10.1038/nrneurol.2011.189.
- ABDEL RAHMAN, E. H.; ABDEL MONEM, R. A. Cholinesterase inhibiting activity and a new piperidine alkaloid from *Lobelia laxiflora* L. roots (Campanulaceae). **Records of Natural Products**, v.8, p.199-202, 2014.
- AFRIKANOVA T; SERRUYS, A-S. K.; BUENAFE, O.E.M.; CLINCKERS, R.; SMOLDERS, I.; WITTE, P. A. M.; CRAWFORD, A. D.; ESGUERRA, C. V. Validation of the zebrafish pentyleneetetrazol seizure model: locomotor versus electrographic responses to antiepileptic drugs. **PLoS One**. v.8, e54166, 2013. doi:10.1371/journal.pone.0054166.
- AGORAMOORTHY, G., CHANDRASEKARAN, M., VENKATESALU, V.; HSU, M. J. Antibacterial and antifungal activities of fatty acid methyl esters of the blind-your-eye mangrove from India. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.38, p. 739–742, 2007. doi:10.1590/s1517-83822007000400028.
- AHMED, Y.; RAHMAN, S.; AKHTAR, P.; ISLAM, F.; RAHMAM, M.; YAAKOB, Z. Isolation of steroids from n-hexane extract of the leaves of *Saurauia roxburghii* **International Food Research Journal**, v. 20, p. 2939-2943, 2013.
- ALMEIDA, R. N.; FALCÃO, A. C. G.M; DINIZ, R. S. T.; QUINTANS-JÚNIOR, L. J; POLARI, R. M.; BARBOSA-FILHO J. M.; AGRA, M. F.; DUARTE, J. C.; FERREIRA, C. D.; ANTONIOLLI, A. R.; ARAÚJO, C. C. Metodologia para avaliação de plantas com atividade no Sistema Nervoso Central e alguns dados experimentais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**; v. 80, p. 72-76, 1999.
- AKANMU, M.; ADEOSUN, S.; ILESANMI, O. Neuropharmacological effects of oleamide in male and female mice. **Behavioural Brain Research**, v. 182, p. 88–94, 2007. doi:10.1016/j.bbr.2007.05.006.
- AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION. **The diagnostic and statistical manual of mental disorders**. 5ª Edição. Washington, DC: Author; 2013.
- AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIALS. Annual Book of ASTM Standards: Metals **Test Methods and Analytical Procedures**, v. 3, 754 p., 1993.
- AMMAR, N. M.; EL-HAWARY, S. S.; MAHDY, A. A.; HUSSEIN, R. A.; OKINO, T. Phytochemical Study of the Biologically Active Fractions of the Oleo-gum-resins of *Boswellia carteri* and *Commiphora myrrha*. **Advances in Environmental Biology**, v. 7, p. 2573-2583, 2013.
- AMRO, M. S.; TEOH, S. L.; NORZANA, A. G.; SRIJIT, D. The potential role of herbal products in the treatment of Parkinson's disease. **La Clinica Terapeutica**, [S.l.], v. 169, n. 1, p. e23 - e33, 2018. ISSN 1972-6007. Disponível em:

<<http://www.clinicaterapeutica.it/ojs/index.php/ClinicaTerapeutica/article/view/126>>. Acesso em: 27 setembro. 2018.

ANEKONDA, T.S.; WADSWORTH, T.L.; SABIN, R.; FRAHLER, K.; HARRIS, C.; PETRIKO, B.; RALLE, M.; WOLTJE, R.; QUINN, J.F. Phytic acid as a potential treatment for Alzheimer's pathology: evidence from animal and in vitro models. **Journal of Alzheimers Disease**. v. 23, p. 21–35, 2011. doi:10.3233/JAD-2010-101287.

ANTONELLI, A. Higher level phylogeny and evolutionary trends in Campanulaceae subfam. Lobelioideae: Molecular signal overshadows morphology. **Molecular Phylogenetics and Evolution**; v. 46, p 1-18, 2008.

ANVISA. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária**. Farmacopeia Brasileira, v. 1, 5ª ed., Brasília, 2010.

ANXIETY AND DEPRESSION ASSOCIATION OF AMERICA (ADAA) (2016), <https://ourworldindata.org/mental-health#anxiety-disorders> acesso 24/09/2018.

APARNA, V.; DILEEP, K. V.; MANDAL, P. K.; KARTHE, P.; SADASIVAN, C., HARIDAS, M. Anti-Inflammatory Property of n-Hexadecanoic Acid: Structural Evidence and Kinetic Assessment. **Chemical Biology & Drug Design**, v. 80, p. 434–439, 2012. doi:10.1111/j.1747-0285.2012.01418.x.

ARAÚJO, A. A. S.; MERCURI, L. P.; SEIXAS, S. R. S.; STORPIRTIS, S.; MATOS, J. R. Determinação dos teores de umidade e cinzas de amostras comerciais de guaraná utilizando métodos convencionais e análise térmica. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 42, p. 269-276, 2006.

ASADI-SAMANI, M.; KOOTI, W.; ASLANI, E.; SHIRZAD, H. A Systematic Review of Iran's Medicinal Plants With Anticancer Effects. **Journal of Evidence-Based Complementary & Alternative Medicine**, v. 21, p. 143-153, 2016.

AZEVEDO, P. A.; ALÓE, F.; HASAN, R. Hipnóticos. **REVISTA NEUROCIÊNCIAS**, v. 12, 2004.

BALVANYOS, I.; KURSINSZKI, L.; BANYAI, P.; SZOKE, E. Analysis of polyacetylenes by HPLC in hairy root cultures of *Lobelia inflata* cultivated in bioreactor. **Chromatographia**, v. 60, p. 235-238, 2004.

BAXTER, A. J.; VOS, T.; SCOTT, K. M.; FERRARI, A. J. E WHITEFORD, H. A. The global burden of anxiety disorders in 2010, **Psychological Medicine**, v. 44, p. 2363–2374, 2014.

BEIRITH, A.; SANTOS, A. R. S.; CALIXTO, J. B. Mechanisms underlying the nociception and paw oedema caused by injection of glutamate into the mouse paw. **Brain Research**, v. 924, p. 219-228, 2002.

BEITZ, J. M. Parkinson's disease: a review. **Frontiers in Bioscience**, v. S6, p. 65-74, 2014.

BELMAKER, R. H.; BERSUDSKY, Y. Review Lithium–pilocarpine seizures as a model for lithium action in mania. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 31, p. 843–849, 2007. doi:10.1016/j.neubiorev.2007.05.001.

BENCAN, Z.; SLEDGE, D.; LEVIN, E. D. Buspirone, chlordiazepoxide and diazepam effects in a zebrafish model of anxiety. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v.94. p. 75-80, 2009. doi: 10.1016/j.pbb.2009.07.009.

BENÍCIO, D. A.; QUEIROGA NETO, V.; SOUSA, J. G. **Avaliação das propriedades físico-químicas e da composição química parcial do óleo de sementes de nim indiano (*Azadirachta indica* A. Juss), cultivado no município de Patos - Paraíba**. Anais eletrônicos do VI congresso de iniciação científica da Universidade Federal de Campina Grande. Paraíba, 2009.

BENTLEY, R. K.; JONES, E. R. H.; ROSS, R. A. M.; THALLER, V. Natural Acetylenes. Part XXXVI. Polyacetylenes from the Lobeliaceae Plant Family. A C₁₄ Eneidyne TrioL from *Lobelia cardinalis* L. **Journal of the Chemical Society**, 830 p., 1969. doi:10.1039/P19730000140

BERGHMANS, S.; HUNT, J.; ROACH, A.; GOLDSMITH, P. Zebrafish offer the potential for a primary screen to identify a wide variety of potential anticonvulsants. **Epilepsy Research**. v. 75, p. 18-28, 2007. doi.org/10.1016/j.epilepsyres.2007.03.015.

BERTIN, M. J., ZIMBA, P. V., BEAUCHESNE, K. R., HUNCIK, K. M.; MOELLER, P. D. R. Identification of toxic fatty acid amides isolated from the harmful alga *Prymnesium parvum* carter. **Harmful Algae**, v. 20, p. 111–116, 2012. doi:10.1016/j.hal.2012.08.005.

BEZARD, E.; DOVERO, S.; PRUNIER, C.; RAVENSCROFT, P.; CHALON, S.; GUILLOTEAU, D; CROSSMAN, A. R.; BIOULAC, B.; BROTCHE, J. M.; GROSS, C. E. Relationship between the appearance of symptoms and the level of nigrostriatal degeneration in a progressive 1- methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-lesioned macaque model of Parkinson's disease. **Journal of Neuroscience**, v. 21, p. 6853-6861, 2001. doi.org/10.1016/S0006-2952(97)00031-2.

BI, Y.; QU, P. C.; WANG, Q. S.; ZHENG, L.; LIU, H. L.; LUO, R.; YANG, H. Neuroprotective effects of alkaloids from *Piper longum* in a MPTP-induced mouse model of Parkinson's disease. **Pharmaceutical Biology**, v. 53, p. 1516–1524, 2015. doi:10.3109/13880209.2014.991835.

BISOGNO, T.; KATAYAMA, K.; MELCK, D.; UEDA, N.; DE PETROCELLIS, L.; YAMAMOTO, S.; DI MARZO, V. Biosynthesis and degradation of bioactive fatty acid amides in human breast cancer and rat pheochromocytoma cells. Implications for cell proliferation and differentiation. **European Journal of Biochemistry**, v. 254, p. 634–642, 1998. doi:10.1046/j.1432-1327.1998.2540634.x.

BISOGNO, T.; SEPE, N.; DE PETROCELLIS, L.; MECHOULAM, R.; MARZO, V. D. The Sleep Inducing Factor Oleamide Is Produced by Mouse Neuroblastoma Cells.

Biochemical and Biophysical Research Communications, v. 239, p. 473–479, 1997. doi:10.1006/bbrc.1997.7431.

BLANK, M.; GUERIM, L. D.; CORDEIRO, R. F.; VIANNA, M. R. A one-trial inhibitory avoidance task to zebrafish: rapid acquisition of an NMDA-dependent long-term memory. **Neurobiol Learn Mem**, v. 92, p. 529–34, 2009. doi: 10.1016/j.nlm.2009.07.001.

BOIÇA JÚNIOR, A. L.; MEDEIROS, C. A. M.; TORRES, A. L.; CHAGAS FILHO, N. R. Efeito de extratos aquosos de plantas no desenvolvimento de *Plutella xylostella* (L.) (Lepidoptera: Plutellidae) em couve. **Arquivos do Instituto de Biologia**, v. 72, p. 45-50, 2005.

BORIO, E. B. L. ***Lobelia langeana* Dusén: Contribuição para o estudo farmacognóstico**. Tese para concurso à docência livre da cadeira de farmacognosia, da Faculdade de Farmácia da Universidade do Paraná. Brasil. 86p., 1959.

BOURIN, M.; HASCOËT, M. The mouse light/dark box test. **European Journal Pharmacology**, v. 463, p. 55- 65, 2003. doi.org/10.1016/S0014-2999(03)01274-3.

BOYSEN, R. I.; HEARN, M. T. W. High performance liquid chromatographic separation methods. **Journal Natural. Products**. v. II, p.5–49, 2010. doi.org/10.1016/b978-008045382-8.00183-0.

BRAGA, R. E. Lobelias do Brasil. Contribuição para o seu estudo. **Tribuna Farmacêutica**; v 22, 1956.

BRANDÃO, H. N.; DAVID, J. P.; COUTO, R. D.; NASCIMENTO, J. A. P.; DAVID, J. M. Química e farmacologia de quimioterápicos antineoplásicos derivados de plantas. **Química Nova**, v. 33, p. 1359-1369, 2010.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento de Assistência Farmacêutica e Insumos Farmacêuticos. A fitoterapia no SUS e o Programa de Pesquisas de plantas medicinais da Central de Medicamentos. Brasília: **Ministério da Saúde**, 2006.

_____. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos. Brasília: **Ministério da Saúde**, 2007.

_____. Farmacopeia Brasileira. 5ª Edição. Brasília: **Agência Nacional de Vigilância Sanitária**, 546 p., 2010.

BRESOLIN, T. M. B.; CECHINEL FILHO, V. **Ciências Farmacêuticas: Contribuição ao Desenvolvimento de Novos Fármacos e Medicamentos**. Itajaí, UNIVALI, 2003.

BROWN, D. P.; ROGERS, D. T.; POMERLEAU, F.; SIRIPURAPU, K. B.; KULSHRESTHA, M.; GERHARDT, G. A.; LITTLETON, J. M. Novel multifunctional

pharmacology of lobinaline, the major alkaloid from *Lobelia cardinalis*. **Fitoterapia**, v. 111, p. 109-123, 2016. doi 10.1016/j.fitote.2016.04.013.

BUBOLS, G. B.; VIANNA, D. R.; MEDINA-REMON, A.; VON POSER, G.; LAMUELA-RAVENTOS, R. M.; EIFLER-LIMA, V. L.; GARCIA, S. C. The antioxidant activity of coumarins and flavonoids. **Mini-Reviews in Medicinal Chemistry**, v. 13, p. 318-34, 2013. doi:10.2174/1389557511313030002.

BUTLER, M. S. The role of natural product chemistry in drug discovery. **Journal of Natural Products**, v. 67, p. 2141-2153, 2004.

CACHAT, J.; STEWART, A.; GROSSMAN, L.; GAIKWAD, S.; KADRI, F.; CHUNG, K. M.; WU, N.; WONG, K.; ROY, S.; SUCIU, C.; GOODSPEED, J.; ELEGANTE, M.; BARTELS, B.; ELKHAYAT, S.; TIEN, D.; TAN, J.; DENMARK, A.; GILDER, T.; KYZAR, E.; DILEO, J.; FRANK, K.; CHANG, K.; UTTERBACK, E.; HART, P.; KALUEFF, A. V. Measuring behavioral and endocrine responses to novelty stress in adult zebrafish. **Nature protocols** v. 5, p 1786- 1799, 2010.

CAIXETA, L.; VIEIRA, R. T. Demência na doença de Parkinson. **Revista Brasileira de Psiquiatria**, v. 30, p. 375-83, 2008.

CALIXTO, J. B.; SIQUEIRA Jr., J. M. Desenvolvimento de medicamentos no Brasil: Desafios. *Gazeta Médica da Bahia*; v 78, p. 98-106, 2008.

CAMARGO, L. S. **As hortaliças e seu cultivo**. São Paulo: Fundação Cargill, 252 p., 1992.

CALIXTO, J. B. Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytotherapeutic agents). **Brasilian Journal of Medical and Biological Reserch**; v. 33, p.179-189, 2000.

CALIXTO, J. B. Biodiversidade como fonte de medicamentos. **Ciências e Cultura**, v. 55, 2003.

CALIXTO, J. B. Twenty-five years of research on medicinal plants in Latin America A personal view. **Journal of Ethnopharmacology**, v.100, p. 131-134, 2005.

CALIXTO, J. B.; SIQUEIRA Jr., J. M. Desenvolvimento de medicamentos no Brasil: Desafios. **Gazeta Médica da Bahia**; v 78, p. 98-106, 2008.

CAMPOS, E. G. **“Zebrafish como organismo-modelo para análises de efeitos comportamentais e toxicológicas da cetamina empregando cromatografia em fase gasosa e estatística multivariada”**. Dissertação (Mestrado em Química) - Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 72 p., 2016.

CAMPANULACEAE in **Flora do Brasil 2020 em construção**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro.Disponível em:
<<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB6634>>. Acesso em: 19 Set. 2018.

CAO, G.; SOFIC, E.; PRIOR, R. L. Antioxidant and Prooxidant Behavior of Flavonoids: Structure-Activity Relationships. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 22, p. 749–760, 1997. doi:10.1016/s0891-5849(96)00351-6.

CARDILE, V. A.; RUSSO, C.; FORMISANO, C.; RIGANO, D.; SENATORE, F.; ARNOLD, N. A.; PIOZZI, F. Essential oils of *Salvia bracteata* and *Salvia rubifolia* from lebanon: chemical composition, antimicrobial activity and inhibitory effect on human melanoma cells. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 126, p. 265–272, 2009.

CARLINI, E. Plants and the central nervous system. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v.75, p. 501–512, 2003. doi:10.1016/s0091-3057(03)00112-6.

CARR, W. J.; YEE, L.; GABLE, D.; MARASCO, E. Olfactory recognition of conspecifics by domestic Norway rats. **Journal of Comparative and Physiological Psychology**, v.90, p. 821–828, 1976.

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

CASTAGNÉ, V.; PORSOLT, R. D.; MOSER, P. Use of latency to immobility improves detection of antidepressant-like activity in the behavioral despair test in the mouse. **European Journal Pharmacology**, v. 15; p. 128-33, 2009. doi: 10.1016/j.ejphar.2009.06.018.

CASTELLANO, C.; CABIB, S.; PUGLISI-ALLEGRA, S. Psychopharmacology of memory modulation: Evidence for multiple interaction among neurotransmitters and hormones. **Behavioural Brain Research**, v. 77, p. 1–21, 1996. doi:10.1016/0166-4328(96)00200-8.

CECCATELLI, S. Mechanisms of neurotoxicity and implications for neurological disorders. **Journal of Internal Medicine**, v. 273; p. 426–428, 2013.

CECHINEL FILHO, V. Principais avanços e perspectivas na área de produtos naturais ativos: estudos desenvolvidos no NIQFAR. **Química Nova**, v. 23, 2000.

CECHINEL FILHO, V. **Medicamentos de Origem Vegetal: Atualidades, Desafios, Perspectivas**. Editora Univali; 1ª Edição, 192 p., Itajaí- SC, 2015.

CHANDRASEKARAN, M.; SENTHILKUMAR, A.; VENKATESALU, V. Antibacterial and antifungal efficacy of fatty acid methyl esters from the leaves of *Sesuvium portulacastrum* L. **European Review for Medical and Pharmacological Sciences**, v. 15, p. 775-780, 2011.

CHARLIER, R.; TONDEUR, R. Alcaloides de lobelia-suavibracteata (haumann) xtraction et etude pharmacologique. **Archives Internationales De Pharmacodynamie Et De Therapie**, v. 83, 193-195, 1950.

CHAUBAL, M. G.; WALKER, G. C.; BAXTER, R. M. Paper chromatography of alkaloidal extracts of *Lobelia* species. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 51, p. 885, 1962, doi:10.1002/jps.2600510916.

CHEN, P. H.; CHENG, S. J. Depression in Parkinson Disease: Current Understanding and Treatment. **International Journal of Gerontology**, v. 2, p. 172–182, 2008. doi:10.1016/s1873-9598(09)70006-7.

CHEN, M. W.; CHEN, W. R.; ZHANG, J. M.; LONG, X. Y.; WANG, Y. T. *Lobelia chinensis*: chemical constituents and anticancer activity perspective. **Chinese Journal of Natural Medicines**, v. 12, p. 0103 – 0107, 2014.

CHEN, Y.; ZHOU, Y.; ZENG, L.; DONG, F.; TU, Y. & YANG, Z. Occurrence of Functional Molecules in the Flowers of Tea (*Camellia sinensis*) Plants: Evidence for a Second Resource. **Molecules**, v. 23, p. 790, 2018. doi:10.3390/molecules23040790.

CIOLI, V.; PUTZOLU, S.; ROSSI, V.; BARCELLONA, P. S.; CORRADINO, C. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v 50, 283–289, 1979.

CLUGSTON, D. M.; MACLEAN, D. B. MANSKE, R. H. F. The examination of lobinaline and some degradation products by mass spectrometry. **Canadian Journal of Chemistry**, v.45, p. 39-47, 1967.

COLLIER, H. O. J.; DINNEEN, L. C.; JOHNSON, C. A.; SCHNEIDER, C. The abdominal constriction response and its suppression by analgesic drugs in mice. **British Journal of Pharmacology**, v. 32, p. 285-310, 1968.

CORDIOLI, V. A.; KIELING, C.; SILVA, C. T. B.; PAASOS, I. C.; BARCELLOS, M. T. Manual diagnóstico e estatístico de transtornos mentais: DSM-5. **American Psychiatric Association**, 5ª Edição. Porto Alegre: Artmed, 948 p., 2014.

CÔRTEZ, C.; DAMASCENO, J. C.; FUKUMOTO, N. M.; SAKAGUTI, E. S.; BRANCO, A. F.; CECATO, U. Perfil de *n*-alcanos em cinco espécies de plantas forrageiras tropicais. **Acta Scientiarum. Animal. Sciences**. Maringá, v. 27, p. 309-317, 2005.

COSTA, D. A.; CHAVEZ, M. H.; SILVA, W. C. S.; COST, C. L. S. Constituintes químicos, fenóis totais e atividade antioxidante de *Sterculia striata* St. Hil. et Naudin. **Acta Amazonica**, v. 40, p. 207-212, 2010.

COSTA, H. N. R. **Estudos químicos e biológicos de fitoconstituintes isolados de *Peltodon radicans***. Tese apresentada ao Programa MultilInstitucional de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Amazonas, Instituto de Ciências Biológicas, Manaus, 2007.

COSTA, M. D. **Desenvolvimento e avaliação de sistemas incrementadores de dissolução de efavirens**. Dissertação apresentada ao Programa de Mestrado em Ciências Farmacêuticas. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 143 p. 2011.

COSTA, H. N. R.; SANTOS, M. C.; ALCANTARA, A. F. C.; SILVA, M. C.; FRANÇA, R. C.; PILÓ-VELOSO, D. Constituintes químicos e atividade antiedematogênica de *Peltodon radicans* (lamiaceae). **Química Nova**, v. 31, p. 744-750, 2008.

COSTALL, B.; JONES, B. J.; KELLY, M. E.; NAYLOR, R. J. TOMKINS, D. M. Exploration of mice in a black and white test box: validation as a model of anxiety. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 32, p. 777-785, 1989. doi.org/10.1007/BF00175204.

CRAFT, T. K.; DEVRIES, A. C. Role of IL-1 in poststroke depressive-like behavior in mice. **Biological Psychiatry**, v.60, p.812-8, 2006.

CRONQUIST. **Sistemática de Angiospermas do Brasil, classificação Segundo Cronquist**, v. 2, 1984.

CRUSIO, W. E.; SCHWEGLER, H.; VAN-ABEELLEN, J. H. Behavior responses to novelty and structural variation of the hippocampus in mice – Quantitative-genetic analysis of behavior in the Open-Field. **Behavioural Brain Research**, v. 32, p. 74-80, 1989.

CZOBOR, P.; SKOLNICK, P.; BEER, B.; LIPPA, A. A multicenter, placebo-controlled, double-blind, randomized study of efficacy and safety of ocinaplon in generalized anxiety disorder. **CNS Neuroscience & Therapeutics**, v.16, p. 63–75, 2010.

DA CUNHA, C.; WIETZIKOSKI S, WIETZIKOSKI E.; SILVA, M.H.C.; CHANDLER, J.; FERRO, M. M.; ANDREATINA, R.; CANTERAS, N. S. Pre-training to find a hidden platform in the Morris water maze can compensate for a deficit to find a cued platform in a rat model of Parkinson's disease. **Neurobiology of Learning and Memory**, v. 87, p. 451-63, 2007.

DANTZER, R.; BLUTHE R. M.; KOOB G. F.; MOAL M. Modulation of social memory in male rats by neurohypophyseal peptides. **Psychopharmacology (Berl)** v.91, n.3, p.363-8. 1987.

DAVILA, N.G.; BLAKEMORE, L.J.; TROMBLEY, P.Q. Dopamine modulates synaptic transmission between rat olfactory bulb neurons in culture. **Journal of Neurophysiology**, v. 90, p. 395–404, 2003.

DEVINSKY, O.; VEZZANI, A.; O'BRIEN, T. J.; JETTE, N.; SCHEFFER, I. E.; DE CURTIS, M.; PERUCCA, P. Epilepsy. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 3, p. 1-24, 2018. doi:10.1038/nrdp.2018.24

DHARMAPPA, K. K.; KUMAR, R. V.; NATARAJU, A.; MOHAMED, R.; SHIVAPRASAD, H. V.; VISHWANATH, B. S. Anti-Inflammatory Activity of Oleanolic Acid by Inhibition of Secretory Phospholipase A2. **Planta Médica**, v. 75, p. 211-215, 2009.

DIXON, R. A. Phytochemistry in the genomics and post-genomics eras. **Phytochemistry**, v. 57, p. 145-148, 2001.

DOSHI, G. M.; NALAWADE, V. V.; MUKADAM, A. S.; CHASKAR, P. K.; ZINE, S. P.; SOMANI, R. R.; UNE, H. D. Structural elucidation of chemical constituents from *Benincasa hispida* seeds and *Carissa congesta* roots by gas chromatography: Mass spectroscopy. **Pharmacognosy Research**, v.7, p. 282-293, 2015. doi:10.4103/0974-8490.157179.

DOTY, R.L.; DEEMS, D.; STELLAR, S. Olfactory dysfunction in Parkinson's disease: A general deficit unrelated to neurologic signs, disease state, or disease duration. **Neurology**, v.38, p. 1237–1244, 1988.

DOUKKALI, Z.; TAGHZOUTI, K.; BOUIDIDA, E. H.; NADJMOUDDINE, M.; CHERRAH, Y.; ALAOUI, K. Evaluation of anxiolytic activity of methanolic extract of *Urtica urens* in a mice model. **Behavioral and Brain Functions**, v. 11, p. 19, 2015. doi:10.1186/s12993-015-0063-y

DWOSKIN, L. P.; PETER CROOKS. A novel mechanism of action and potential use for lobeline as a treatment for psychostimulant abuse. **Biochemical Pharmacology**, v. 63, p. 89-98.

EL MAY, Y.; JEGUIRIM, M.; DORGE, S.; TROUVÉ, G.; SAID, R. Study on the thermal behavior of different date palm residues: Characterization and devolatilization kinetics under inert and oxidative atmospheres. **Energy**, v. 44, p. 702-709, 2012.

EMRE, M. Dementia associated with Parkinson's disease. The Lancet **Neurology**, v. 2, p. 229–237, 2003. doi:10.1016/s1474-4422(03)00351-x

FABRI, R. L. ***Mitracapus frigidus* (Rubiaceae): Potencial farmacológico, avaliação toxicológica e identificação de substâncias bioativas.** Tese apresentada ao programa de Pós-graduação em Ciências biológicas, Área de concentração Genética e Biotecnologia da Universidade de Juiz de Fora, 2013. 241p.

FARRELL, E. K.; MERKLER, D. J. Biosynthesis, degradation and pharmacological importance of the fatty acid amides. **Drug Discovery Today**, v. 13, p. 558–568, 2008. doi:10.1016/j.drudis.2008.02.006.

FAUSTINO, T. T.; ALMEIDA, R. B.de; ANDREATINI, R. Medicinal plants for the treatment of generalized anxiety disorder: a review of controlled clinical studies. **Revista. Brasileira. Psiquiatria**, v.32, p. 429-436, 2010. doi.org/10.1590/S1516-44462010005000026.

FELPIN, F. X.; LEBETRON, J. History, chemistry and biology of alkaloids from *Lobelia inflata*. **Tetrahedron**, v. 60, p. 10127-10153, 2004.

FERNANDES, F. H. A.; SANTANA, C. P.; SANTOS, R. L.; CORREIA, L. P.; CONCEIÇÃO, M. M.; MACÊDO, R. O.; MEDEIROS, A. C. D. Thermal characterization of dried extract of medicinal plant by DSC and analytical techniques. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 113, p. 443–447, 2012. doi:10.1007/s10973-012-2807-3.

FERRO, M. M.; BELLISSIMO, M. Y.; ANSELMO-FRANCI, J. A.; ANGELLUCCI, M. E. M.; CANTERAS, N. S.; DA CUNHA, C. Comparison of bilaterally 6-OHDA- and MPTP-lesioned rats as models of the early phase of Parkinson's disease: histological, neurochemical, motor and memory alterations. **Journal of Neuroscience Methods**, v.148, p.78-87, 2005.

FISHER, R. S.; ACEVEDO, C.; ARZIMANOGLU, A.; BOGACZ, A.; CROSS, J. H.; ELGER, C. E.; WIEBE, S. ILAE Official Report: A practical clinical definition of epilepsy. **Epilepsia**, v. 55, p. 475–482, 2014. doi:10.1111/epi.12550,

FOGLIO, M. A.; QUEIROGA, C. L.; SOUSA, I. M. O.; RODRIGUES, R. A. F. Plantas medicinais como fonte de recursos terapêuticos: um modelo multidisciplinar. **Multiciência: construindo a história dos produtos naturais**, v. 7, p. 1-8, 2006.

FOLQUITTO, D.G. **Investigação Fitoquímica, análise morfológica e atividades biológicas de *Lobelia exaltata* Pohl (Campanulaceae)**. Curitiba, 2014. 129f. Dissertação de Mestrado em Ciências Farmacêuticas – Setor de Ciências da Saúde – Universidade Federal do Paraná.

FOLQUITTO, D.G.; BUDEL, J. M.; PEREIRA, C. B; BROJAN, L. E. F.; FOLQUITTO, G. G.; MIGUEL, M. D.; SILVA, R. Z.; MIGUEL, O. G. Analytical Micrography and Preliminary Phytochemistry of the Leaves and Stems of *Lobelia exaltata* Pohl. (Campanulaceae). **Latin American Journal of Pharmacy**, v 33, p. 245-50, 2014.

FRANCIS, L.; FRANCIS, G. Sedum alkaloids. **Planta Medica**, v. 32, p. 268–274, 1977. doi:10.1055/s-0028-1097599.

GALANOPOULOU, A. S.; KOKAIA, M.; LOEB, J. A.; NEHLIG, A.; PITKANEN, A.; ROGAWSKI, M. A.; STALEY, K. J.; WHITTEMORE, V. H.; DUDEK, F. E.. Epilepsy therapy development: Technical and methodologic issues in studies with animal models. **Epilepsia**, v. 54, p. 13-23, 2013.

GARCIA-MARAVER, A.; PEREZ-JIMENEZ, J. A.; SERRANO-BERNARDO, F.; ZAMORANO, M. Determination and comparison of combustion kinetics parameters of agricultural biomass from olive trees. **Renewable Energy**, v. 83, p. 897-904, 2015.

GASPARYAN, N. K.; VARDEVANYAN, L. A.; EGI AZARYAN, D. É.; MALAKYAN, M. N.; BADZHINYAN, S. A.; AVAKIMYAN, D. A.; GEVORGYAN, G. A. Synthesis and biological properties of 1-(4-substituted phenyl)-1-alkyl(aryl)-2-phenyl-3-piperidinopropan-1-ols. **Pharmaceutical Chemistry Journal**, v. 45, p. 224–227, 2011. doi:10.1007/s11094-011-0600-4.

GEBAUER, D. L.; PAGNUSSAT, N.; PIATO, A. L.; SCHAEFER, I. C.; BONAN, C. D.; LARA, D. R. Effects of anxiolytics in zebrafish: similarities and differences between benzodiazepines, buspirone and ethanol. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v.99, p. 480-486, 2011.

GEDEON, J.; S. GEDEON. Alkaloids of *Lobelia nicotianaefolia* Heyne. **Pharmaceutica Acta Helvetiae**, v. 29, p. 49-52, 1954.

GHOSH, S. Biosynthesis of Structurally Diverse Triterpenes in Plants: The Role of Oxidosqualene Cyclases. **Proceedings of the Indian National Science Academy**, v.82, p. 1189-1210, 2016. doi: 10.16943/ptinsa/2016/48578.

GOLDBERG, A. S. **The Alkaloids of *Lobelia yucoide* Hillebr.** Thesis submitted to the graduateschool of the University of Hawaii in partial fulfillment of the requeriments of the degree of Doctor of Philosophy in Chemistry, 99 p., 1966.

GROVER, S.; SOMAIYA, M.; KUMAR, S.; AVASTHI, A. Psychiatric aspects of Parkinson's disease. **Journal of Neurosciences in Rural Practice**, v.6, p. 65, 2015. doi:10.4103/0976-3147.143197.

GRUPE, D. W., NITSCHKE, J. B. Uncertainty and anticipation in anxiety: an integrated neurobiological and psychological perspective. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 14, p. 488–501, 2013. doi:10.1038/nrn3524.

HAMILTON-AMACHREE, H.; UZOEKWE, S. A. GC-MS analysis of oil rich in polyenoic fatty acid methyl esters from leaves of *Justicia secunda* Vahl growing abundantly in the lowland rain forests of the Niger Delta region of Nigeria. **American Journal of Essential Oils and Natural Products**, v.5, p. 01-04, 2017.

HE, F.; WANG, M.; GAO M.; ZHAO, M.; BAI, Y.; ZHAO, C. Chemical Composition and Biological Activities of *Gerbera anandria*. **Molecules**, v. 19, p. 4046-4057, 2014. doi:10.3390/molecules19044046.

HEIM, K. E.; TAGLIAFERRO, A. R.; BOBILYA, D. J. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v.13, p. 572–584, 2002. doi:10.1016/s0955-2863(02)00208-5.

HENDERSON, G.; WELLS, J. D.; JEANNE, R. L. Methyl Palmitate and Methyl Myristate Repel Flies. **The Florida Entomologist**, v. 74, p. 365, 1991. doi:10.2307/3495321.

HERRERA-CALDERON, O.; SANTIVÁÑEZ-ACOSTA, R.; PARI-OLARTE, B.; ENCISO-ROCA, E.; MONTES, V. M. C.; ACEVEDO, J. L. A. Anticonvulsant effect of ethanolic extract of *Cyperus articulatus* L. leaves on pentylenetetrazol induced seizure in mice, **Journal of Traditional and Complementary Medicine**, v. 8, p. 95–99, 2017. doi:10.1016/j.jtcme.2017.03.001.

HILL, R. A.; CONNOLLY, J. D. Triterpenoids, **Natural Product Reports**. v. 32, p. 273–327, 2015. doi.org/10.1039/c4np00101j.

HOLANDA NETO, M. A. **Aplicação termogravimétrica e análise térmica diferencial de uma droga vegetal.** Trabalho de Conclusão de Curso de graduação em Farmácia da Universidade Estadual da Paraíba, 2013.

HOLLINGWORTH, R. M.; Chemistry, biological activity, and uses of formamidine pesticides. **Environmental Health Perspectives**, v.14, p. 57–69, 1976.
doi:10.1289/ehp.761457.

HUERTA-REYES, M; HERRERA-RUIZ, M; GONZÁLEZ-CORTAZAR, M; ZAMILPA, A; LEÓN, E; AGUILAR-ROJAS, A; TORTORIELLO, J. Neuropharmacological in vivo effects and phytochemical profile of the extract from the aerial parts of *Heteropterys brachiata* (L.) DC. (Malpighiaceae). **Journal Ethnopharmacology**, v. 146, p. 311-7, 2013. doi: 10.1016/j.jep.2012.12.049.

HUSSAIN, G.; RASUL, A.; ANWAR, H.; AZIZ, N.; RAZZAQ, A.; WEI, W.; LI, X. Role of Plant Derived Alkaloids and Their Mechanism in Neurodegenerative Disorders. **International Journal of Biological Sciences**, v. 14, p. 341–357, 2018.
doi:10.7150/ijbs.23247.

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

IKEDA, K.; TAKAHASHI, M.; NISHIDA, M.; MIYAUCHI, M.; KIZU, H.; KAMEDA, Y.; ARISAWA, M.; WATSON, A. A.; NASH, R. J.; FLEET, G. W.; ASANO, N. Homonojirimycin analogues and their glucosides from *Lobelia sessilifolia* and *Adenophora* spp. (Campanulaceae). **Carbohydrate research**, v. 323, p. 73-80, 2000.

ISHIMARU, K.; YONEMITSU, H.; SHIMOMURA, K. Lobetyolin and lobetyol from hairy root culture of *Lobelia inflata*. **Phytochemistry**, v. 30, p. 2255-2257, 1991. doi: 10.1016/0031-9422(91)83624-T.
JÄGER, S.; TROJAN, H.; KOPP, T.; LASZCZYK, M. & SCHEFFLER, A. Pentacyclic Triterpene Distribution in Various Plants – Rich Sources for a New Group of Multi-Potent Plant Extracts. **Molecules**, v.14, p. 2016–2031, 2009.
doi:10.3390/molecules14062016.

JANKOVIC, J. Parkinson's disease: clinical features and diagnosis. **Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry**, v.79, p. 368–376, 2008.
doi:10.1136/jnnp.2007.131045.

JEGUIRIM, M.; DORGE, S.; TROUVÉ, G. Thermogravimetric analysis and emission characteristics of two energy crops in air atmosphere: *Arundo donax* and *Miscanthus giganteus*. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 788-793, 2010.

JIANG, Y.; SHI, R.; LIU, B.; WANG, Q.; DAI, Y. Studies on chemical components of *Lobelia chinensis*. **Zhongguo Zhong Yao Za Zhi**, v. 34, p. 294-297, 2009.

JOSHI S.; MISHRA, D.; BISHT, G.; KHETWAL, K. S. Essential oil composition and antimicrobial activity of *Lobelia pyramidalis* Wall. **EXCLI Journal**, v.10, p. 274-279, 2011.

KACZMAREK, F.; STEINEGGER E. Investigations of the alkaloids of *Lobelia tupa* L. **Pharmaceutica Acta Helvetica**, v. 33, p. 257-262, 1958.

KALUEFF, A. V.; STEWART, A. M.; GERLAI, R. Zebrafish as an emerging model for studying complex brain disorders. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 35, p. 63–75, 2014. doi: 10.1016/j.tips.2013.12.002.

KAPOOR, S. The anti-neoplastic effects of coumarin: an emerging concept. **Cytotechnology**, v. 65, p. 787-788, 2013. doi:10.1007/s10616-013-9538-6.

KESTING, J. R.; TOLERLUND, I. L.; PEDERSEN, A. F.; WITT, M.; JAROSZEWSKI, J. W.; STAERK, D. Piperidine and Tetrahydropyridine Alkaloids from *Lobelia siphilitica* and *Hippobroma longiflora*. **Journal of Natural Products**, v 72, p. 312 – 315, 2009.

KHADEM, S.; MARLES, R.J. Monocyclic Phenolic Acids; Hydroxy- and Polyhydroxybenzoic Acids: Occurrence and Recent Bioactivity Studies. **Molecules**, v. 15, p. 7985-8005, 2010. doi:10.3390/molecules15117985.

KLEIN, H.; GARNEAU, L.; COADY, M.; LEMAY, G.; LAPOINT, J.Y.; SAUVÉ, R. Molecular characterization of an inwardly rectifying K⁺ channel from HeLa cells. **Journal of Membrane Biology**, v. 167, p. 43-52, 1999.

KOKATE, C. K.; PUROHIT, A. P.; GOKHALE, S. B. **Pharmacognosy- Alkaloidal Drugs**. India. Ed. Nirali Prakashan, 1367 p., 2008.

KOTARIA, N.; KILADZE, M.; ZHVANIA, M.G.; JAPARIDZE, N.J.; BIKASHVILI, T. SOLOMONIA, R.O.; BOLKVADZE, T. The Protective Effect of Myo-inositol on Hippocampal Cell Loss and Structural Alterations in Neurons and Synapses Triggered by Kainic Acid-Induced Status Epilepticus. **Cellular and Molecular Neurobiology**, v. 33, p. 659–671, 2013. doi 10.1007/s10571-013-9930-y.

KRALIC, J. E.; O'BUCKLEY, T. K.; KHISTI, R. T.; HODGE, C. W.; HOMANICS, G. E.; MORROW, A. L. GABAA receptor alpha-1 subunit deletion alters receptor subtype assembly, pharmacological and behavioral responses to benzodiazepines and zolpidem. **Neuropharmacology**, v. 43, p. 685–694, 2002. doi:10.1016/s0028-3908(02)00174-0.

KUETE, V.; NANA, F.; NGAMENI, B.; MBAVENG, A. T.; KEUMEDJIO, F.; NGADJUI, B. T. Antimicrobial activity of the crude extract, fractions and compounds from stem bark of *Ficus ovata* (Moraceae). **Journal of Ethnopharmacology**, v 124, p 556 - 561, 2009.

KULESHOVA, E. F.; ANISIMOVA, O. S.; SHEINKER, Y. N.; MASTAFANOVA, L. I.; EVSTRATOVA, M. I.; YAKHONTOV, L. N. Mass spectra of piperidine dicarboxylic acids and their esters. **Chemistry of Heterocyclic Compounds**, v. 22, p. 1203–1207, 1986. doi:10.1007/bf00471803.

KUMAR, S.; PANDEY, A. K. Antioxidant, Lipo-Protective and Antibacterial Activities of Phytoconstituents Present in *Solanum xanthocarpum* Root. **International Review of Biophysical Chemistry (I.RE.BI.C.)**, v. 3, 2012.

KUMAR, S.; PANDEY, A. K. Chemistry and Biological Activities of Flavonoids: An Overview. **The Scientific World Journal**, v. 2013, p. 1–16, 2013. doi:10.1155/2013/162750

KUNLE, O. F.; EGHAREVBA, H. O.; AHMADU, P. O. Standardization of herbal medicines - A review. **International Journal of Biodiversity and Conservation**, v. 4, p. 101-112, 2012.

KUO, P. C.; HWUANG, T.-L.; LIN, Y. T.; KUO, Y. C.; LEU, Y.-L. Chemical constituents from *Lobelia chinensis* and their anti-virus and anti-inflammatory bioactivities. **Archives of Pharmaceutical Research**, v. 34, p. 715-22, 2011.

KURAISHI, Y.; HARADA, Y.; ARATANI, S.; SATOH, M.; TAKAGI, H. Involvement of the spinal noradrenergic and serotonergic systems in morphine analgesia: the differences in mechanical and thermal algesic tests. **Brain Research**, v. 273, p. 245-252, 1983.

KURDEKAR, R. R.; HEGDE, G. R.; HEGDE, G.; HEBBAR, S. S. Antimicrobial screening of medicinal plants against human pathogens- a comparative account of two different methods of extraction. **International Journal of Drug Development and Research**, v. 4, p. 82-89, 2012.

KURSINSZKI, L.; LUDANYI, K.; SZOKE, E. LC-DAD and LC-MS-MS Analysis of Piperidine Alkaloids of *Lobelia inflata* L. (In Vitro and In Vivo). **Chromatographia**, v. 68, p. 27-33, 2008. doi: 10.1365/s10337-008-0628-0.

KURSINSZKI, L.; SZŐKE, É. HPLC-ESI-MS/MS of brain neurotransmitter modulator lobeline and related piperidine alkaloids in *Lobelia inflata* L. **Journal of Mass Spectrometry**, v.50, p. 727–733, 2015. doi:10.1002/jms.3581.

KUSHWAHA, N.; SAINI, R.K.; KUSHWAHA, S.K.S. Synthesis of some Amide derivatives and their biological activity, **International. Journal of ChemTech Research**, v. 3, p. 203–209, 2011.

LAMMERS, T.G. **Campanulaceae Flowering Eudicot plants The families and Genera of Vascular Plants**, v. 8, p. 26-56, 2007.

LASZCZYK, M. Pentacyclic Triterpenes of the Lupane, Oleanane and Ursane Group as Tools in Cancer Therapy. **Planta Medica**, v. 75, p. 1549–1560, 2009. doi:10.1055/s-0029-1186102.

LEMES, G. F. L.; FERRI, P. H.; LOPES, M. N. Constituintes Químicos de *Hyptidendron canum* (Pohl ex Benth.) R. Harley (LAMIACEAE). **Química. Nova**, v. 34, p. 39-42, 2011.

LEVINE, J.; PANCHALINGAM, K; MCCLURE, R. J.; GERSHON, S.; PETTEGREW, J. W. Effects of Acetyl-L-Carnitine and Myo-Inositol on High-Energy Phosphate and Membrane Phospholipid Metabolism in Zebra Fish: A ³¹P-NMR-Spectroscopy Study. **Neurochemical Research**, v. 28, p. 687–690, 2003.

LI, J. Effects of ursolic acid and oleanolic acid on human colon carcinoma cell line HCT15. **World Journal of Gastroenterology**, v.8, p. 493, 2002. doi:10.3748/wjg.v8.i3.493.

LI, C.-Y.; ZHAO, L.-M.; SHI, X.-W.; ZHANG, J.-D. Lobeline shows protective effects against MPTP-induced dopaminergic neuron death and attenuates behavior deficits in animals. **Experimental and Therapeutic Medicine**, v. 7, p. 375–378, 2014. doi:10.3892/etm.2013.1413.

LI, K. C.; HO, Y. L.; HUANG, G. J.; CHANG, Y. S. Anti-oxidative and anti-inflammatory effects of *Lobelia chinensis* *in vitro* and *in vivo*. **The American Journal of Chinese Medicine**, v. 43, p. 269-287, 2015. doi:10.1142/s0192415x15500184.

LI, X. J.; BAO, W. R.; LEUNG, C. H.; MA, D. L.; ZHANG, G.; LU, A. P.; WANG, S. C.; HAN, Q. B. Chemical Structure and Immunomodulating Activities of an alpha-Glucan Purified from *Lobelia chinensis* Lour. **Molecules**, v. 21, p. 1-16 2016. doi:10.3390/molecules21060779.

LIU, J. Pharmacology of oleanolic acid and ursolic acid **Journal of Ethnopharmacology**, v. 49, p 57-68, 1995.

LIU, M.-Y.; YIN, C.-Y.; ZHU, L.-J.; ZHU, X.-H.; XU, C.; LUO, C.-X.; ZHOU, Q.-G. Sucrose preference test for measurement of stress-induced anhedonia in mice. **Nature Protocols**, v. 13, p. 1686–1698, 2018. doi:10.1038/s41596-018-0011-z.

LORENZI, H. **Plantas ornamentais no Brasil**: arbustivas, herbáceas e trepadeiras. 4ª Edição. Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum, 1088 p. 2008.

LU, J.-J.; BAO, J.-L.; CHEN, X.-P.; HUANG, M.; WANG, Y.-T. Alkaloids Isolated from Natural Herbs as the Anticancer Agents. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2012, p.1–12, 2012. doi:10.1155/2012/485042

MA, C. M.; CAI, S. Q.; CUI, J. R.; WANG, R. Q.; TU, P. F.; HATTORI, M.; DANESHTALAB, M. The cytotoxic activity of ursolic acid derivatives. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 40, p 582-589, 2005.

MA, Y.; WINK, M. Lobeline, a piperidine alkaloid from *Lobelia* can reverse P-gp dependent multidrug resistance in tumor cells. **Phytomedicine**, v. 15, p. 754-758, 2008.

MACHADO, K. C.; OLIVEIRA, G. L.; MACHADO, K. C.; ISLAM, M. T.; JUNIOR, A. L.; DE SOUSA, D. P.; FREITAS, R. M. Anticonvulsant and behavioral effects observed in mice following treatment with an ester derivative of ferulic acid: Isopentyl ferulate. **Chemico-Biological Interactions**, v. 242, p. 273–279, 2015.

MACÊDO, R. O.; ARAGÃO, C. F. S.; DO-NASCIMENTO, T. G.; MEDEIROS, A. C. D. Controle de qualidade da Menta x vilosa HUDS através de dados termoanalíticos. **Revista Brasileira de Alimentos**, v. 06, p. 5-11, 1998.

MACIEL, M. A. A. M.; PINTO, A. C.; VEIGA JR.; VEIGA, V.; GRYNBERG, N. F.; ECHVARRIA, A. Plantas medicinais: A necessidade de estudos multidisciplinares. **Química Nova**, v. 25, p.429-438, 2002.

MACKIE, K. Cannabinoid receptors as therapeutic targets. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v. 46, p. 01–122, 2006.
doi:10.1146/annurev.pharmtox.46.12060.

MACPHEE, G. J.; STEWART, D. A. Parkinson's disease. **Reviews in Clinical Gerontology**, v. 16, p. 1, 2006. doi:10.1017/s0959259806002073.

MAKHIIJA, D.T.; JAGTAP, A.G. Studies on sensitivity of zebrafish as a model organism for Parkinson's disease: Comparison with rat model. **Journal of Pharmacology and Pharmacotherapeutics** v. 5, p 39-46, 2014.

MANJUSHA, V.; SUNEEL, G. Antiepileptic activity of murraya koenigii leaf aqueous extract in pentylenetetrazole and strychnine induced convulsions in rats and mice. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 6, p. 172-176, 2016.

MANSUR, B.; DOS SANTOS, B; GOUVEIA Jr., A. Efeitos da substância de alarme no teste claro/escuro no Zebrafish, *Danio rerio*. **Biota Amazônia**, v.4, p. 87-93, 2014.

MARSH, L. Depression and Parkinson's Disease: Current Knowledge. **Current Neurology and Neuroscience Reports**, v.13, 2013.
doi:10.1007/s11910-013-0409-5.

MARTINDALE - **The Extra Pharmacopeia**; 29^a Edition.; Reynolds, J. E. F., Ed.; The Pharmaceutical Press: London, 1989.

MATOS, M. J.; VAZQUEZ-RODRIGUEZ, S.; SANTANA, L.; URIARTE, E.; FUENTES-EDFUF, C.; SANTOS, Y.; MUÑOS-CREGO, A. Synthesis and structure-activity relationships of novel amino/nitro substituted 3- arylcoumarins as antibacterial agents. **Molecules**, v. 18, p.1394-404, 2013.
doi:10.3390/ molecules18021394.

MAXIMINO, C.; BRITO, T.M.; DIAS, A.G. DE M.; GOUVEIA JR, A.; MORATO, S. Scototaxis as anxiety-like behavior in fish. **Nature Protocols**, v.5, 2010.
doi:10.1038/nprot.2009.225.

MEDEIROS, P. T.; DIAS, J. M. C. S.; DIAS; MONNERAT, R. G.; SOUZA, N. R. Instalação e Manutenção de Criação Massal da Traça-das-Crucíferas (*Putella xylostella*). Circular técnica 29. **Ministério da Agricultura e Abastecimento**. Brasília, DF, 2003.

MELECCHI, M. I. S. **Caracterização química de extratos de *Hibiscus tiliaceus* I: Estudo comparativo de métodos de extração**. Tese de doutorado do Programa de Pós-Graduação em Química da UFRGS, 218 p., 2005.

MELENDEZ, E. N.; CARRERAS, L.; GIJON, J. R. New alkaloid from *Lobelia portoricensis* Urban. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 56, p. 1677. doi:10.1002/jps.2600561234.

MENDELSON, W. B.; BASILE, A. S. The Hypnotic Actions of the Fatty Acid Amide, Oleamide. **Europsychopharmacology**, v. 25, 2001.

MERCHANT, D.; KAHN, R.; MURPHY, W. **Handbook of cell and organ culture**. Broken Arrow: Burgess Publishing, 1964.

MESQUITA, M.L; DE PAULA, J.E; PESSOA C.; DE MORAES, M.O.; COSTA-LOTUFO, L.V.; GROUGNET, R.; MICHEL S.; TILLEQUIN, F.; ESPINDOLA, L. S. Cytotoxic activity of Brazilian Cerrado plants used in traditional medicine against cancer cell lines. **Journal of Ethnopharmacology**, v.123, p. 439-445, 2009.

MIGUEL, O.G. **Estudo químico e farmacológico das espécies *Phyllanthus sellowianus*, *Phyllanthus fratemus* e *Siphocampylus verticillatus***. Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Química do Setor de Ciências Exatas da Universidade Federal de Santa Catarina, como requisito para a obtenção do grau de Doutor em Química. UFSC, Florianópolis, 1996.

MIGUEL, O. G.; PIZZOLATTI, M. G.; YUNES, R. A.; VENCATO, I. CALIXTO, J. B.; SANTOS, A. R. S.; CONTIN, A.; MOREIRA, E. A. cis-8,10-Di-n-propyllobelidiol Hydro- chloride Dihydrate. **Acta Crystallographica**, v.52, p. 1223-1225, 1996.

MIGUEL, M. D.; MIGUEL O. G. **Desenvolvimento de fitoterápicos**, 2ª Edição Editora Novo Conceito, p. 116, 2004.

MISHRA, A.; SHARMA, A. K.; KUMAR, S.; SAXENA, A. K.; PANDEY, A. K. *Bauhinia variegata* Leaf Extracts Exhibit Considerable Antibacterial, Antioxidant, and Anticancer Activities. **BioMed Research International**, v. 2013, p. 1–10, 2013. doi:10.1155/2013/915436.

MITSAKOS, V.; DOBSON, R. C. J.; PEARCE, F. G.; DEVENISH, S. R.; EVANS, G. L.; BURGESS, B. R.; HUTTON, C. A. INHIBITING Dihydrodipicolinate synthase across species: towards specificity for pathogens? **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 18, p. 842–844, 2008. doi:10.1016/j.bmcl.2007.11.026.

MOREIRA, E. L.; RIAL, D.; AGUIAR, A. S.; FIGUEIREDO, C. P.; SIQUEIRA, J. M.; DALBÓ, S.; HORST, H.; DE OLIVEIRA, J.; MANCINI, G.; DOS SANTOS, T. S.; VILLARINHO, J. G.; PINHEIRO, F. V.; MARINONETO, J.; DE BEM, A. F.; LATINI, A.; PIZZOLATTI, M. G.; RIBEIRO-DO-VALLE, R. M.; PREDIGER, R. D. Proanthocyanidin-rich fraction from *Croton celtidifolius* Baill confers neuroprotection in the intranasal 1-methyl-4- phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine rat model of Parkinson's disease. **Journal of. Neural. Transmission**, v.117, p.1337-1351, 2010.

MORLEY, J. F.; DUDA, J. E. Neuropsychological correlates of olfactory dysfunction in Parkinson's disease. **Journal of the Neurological Sciences**, v. 310, p. 228–230, 2011. doi:10.1016/j.jns. 05.030.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, p.55-63, 1983.

MOUNSEY, R.B.; TEISMANN, P. Chelators in the Treatment of Iron Accumulation in Parkinson's Disease. **International Journal of Cell Biology** v. 2012, p. 1-12, 2012. doi:10.1155/2012/983245.

MURILLO-RODRÍGUEZ, E.; GIORDANO, M.; CABEZA, R.; HENRIKSEN, S. J.; MÉNDEZ DÍAZ, M.; NAVARRO, L.; PROSPÉRO-GARCÍA, O. Oleamide modulates memory in rats. **Neuroscience Letters**, v. 313, p. 61–64, 2001. doi:10.1016/s0304-3940(01)02256-x.

MURPHY, G. P. Current Report on the Interferon Program at Roswell Park Memorial Institute. **Journal of Surgical Oncology**, v.17, p.99- 111, 1981. <https://doi.org/10.1002/jso.2930170203>

NAGANANDA, G. S.; KRISHNAMOORTHY, A.; DAS, A. BHATTACHARYA, S. Phytochemical screening and evaluation of antimicrobial activities of *in vitro* and *in vivo* grown plant extracts of *Lobelia inflata* L. **International Journal of Pharma and Bio Sciences**, v. 3, p. 433-442, 2012.

NEUGEBAUER, M. N.; HARROD, S. B.; STAIRS, D. J.; CROOKS, P. A.; DWOSKIN, L. P.; BARDO, M. T. Lobelane decreases methamphetamine self-administration in rats. **European Journal Pharmacology**, v.24, p. 33-38, 2007.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, J. M.; SNADER, K. M. Natural products as a source of new drugs over the period 1981-2002. **Journal of Natural Products**, v. 66, p. 1002-1037, 2003.

NICOLETTI, I.; MAGLIORATI, G.; PAGLIACCI, M. C.; GRIGNANI, F.; RICCARDI, C. A rapid and simple method for measuring thymocyte apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. **Journal of Immunological Methods**, v. 139, p. 271–279, 1997.

NOZADZE, M.; MIKAUTADZE, V; LEPSVERIDZE, E; MIKELADZE, E; KUCHIASHVILI, N; KIGURADZE, T; KIKVIDZE, M.; SOLOMONIA, R. Anticonvulsant activities of myo-inositol and scyllo-inositol on pentylenetetrazol induced seizures. **Seizure**, v. 20, p. 173–176, 2011. doi:10.1016/j.seizure.2010.10.008.

ORELLANA-PAUCAR, A. M; SERRUYS, A-S.K.; AFRIKANOVA, T.; MAES, J. T.; BORGGRAEVE, J. M. W; ALLEN, J.; LEÓN-TAMARIZ, F.; WILCHES-ARIZÁBALA, I. M.; CRAWFORD, A. D.; WITTE, PETER A. M.; ESGUERRA, C. V. Anticonvulsant activity of bisabolene sesquiterpenoids of *Curcuma longa* in zebrafish and mouse seizure models. **Epilepsy & Behavior**, v. 24, p. 14–22, 2012. doi.org/10.1016/j.yebeh.2012.02.020.

PACHER, P. The Endocannabinoid System as an Emerging Target of Pharmacotherapy. **Pharmacological Reviews**, v. 58, p. 389–462, 2006. doi:10.1124/pr.58.3.2

PÁDUA, T. A.; DE ABREU, B. S. S. C.; COSTA, T. E. M. M.; NAKAMURA, M. J.; VALENTE, L. M. M.; HENRIQUES, M. das G.; ROSAS, E. C. Anti-inflammatory effects of methyl ursolate obtained from a chemically derived crude extract of apple peels: potential use in rheumatoid arthritis. **Archives of Pharmacal Research**, v. 37, p. 1487–1495, 2014. doi:10.1007/s12272-014-0345-1.

PAPAZIS, K.T; GEROMICHALOS, G. D.; DIMITRIADIS, K. A.; KORTSARIS, A. H. Optimization of the sulforhodamine B colorimetric assay. **Journal of Immunological Methods**, v. 208, p. 151-158, 1997.

PAPP, M.; WILLNER, P.; MUSCAT, R. An animal model of anhedonia: attenuation of sucrose consumption and place preference conditioning by chronic unpredictable mild stress. **Psychopharmacology**, v.104, p. 255–259, 1991.doi:10.1007/bf02244188.

PARVIN, S.; KADER, M. A.; MUHIT, M. A.; HAQUE, M. E.; MOSADDIK, M. A.; WAHED, M. I. I. Triterpenoids and phytosteroids from stem bark of *Crataeva nurvala* buch ham. **Journal of Applied Pharmaceutical Science**, v.01, p. 47-50, 2011.

PATIL, S. B.; RAJPUT, A. P. Chemical constituents from petroleum ether extract of leaves of *Butea monosperma* and their antimicrobial, antifungal activity. **International Journal of PharmTech Research**. v.4, p 321-326, 2012.

PATLOLLA, J. M.R.; RAO, C. V. Triterpenoids for Cancer Prevention and Treatment: Current Status and Future Prospects. **Current Pharmaceutical Biotechnology**, v. 13, p.147–155, 2012. doi:10.2174/138920112798868719.

PAUL, R; CHOUDHURY, A; KUMAR, S; GIRI, A; SANDHIR, R; BORAH, A. Cholesterol contributes to dopamine-neuronal loss in MPTP mouse model of Parkinson's disease: Involvement of mitochondrial dysfunctions and oxidative stress. **PLOS ONE**, v. 12, e0171285, 2017. doi:10.1371/journal.pone.0171285

PAULA, C. S. **Estudo fitoquímico e propriedades biológicas das folhas de *Bauhinia ungulate* L., Fabaceae**. Tese apresentada apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de doutor em Ciências Farmacêuticas pelo Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas, Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, 227p. – Curitiba, 2014.

PAXINOS, G; WATSON, C. **The rat brain in stereotaxic coordinates**. 5th Edition. San Diego: Academic Press; 2005.

PEREIRA, J. C.; GUIMARÃES, H. R.; TANNOS, K. **Study of influence of atmosphere on thermal decomposition reaction of guarana seed residue aiming the torrefaction process**. In: 23º Congresso Internacional de Engenharia Mecânica, 2015. Rio de Janeiro, 2015.

PEREIRA, C. B. **Morfoanatomia, composição química e avaliação biológica do óleo essencial de *baccharis milleflora* dc., asteraceae**. Tese apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de doutor em Ciências Farmacêuticas pelo

Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas, Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, 2017.

PÉREZ, J.C.B.; BEST, C.R.; LLANES, F. Triterpenos pentacíclicos en propóleo. **Revista de la Sociedad Química del Perú**, v. 75, 2009.

PERFEITO, J. P.; SANTOS, M. L.; LÓPEZ, K. S. E.; PAULA, J. E., SILVEIRA, D. Characterization and biological properties of *Pouteria torta* extracts: a preliminary study. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 15, p. 183-186, 2005.

PETERSON, G. L. A Simplification of the Protein Assay Method of Lowry. Which is More Generally Applicable. **Analytical Biochemistry** v. 83, p. 346-356, 1977.

PICH, E. M.; SAMANIN, R. Disinhibitory effects of buspirone and low doses of sulpiride and haloperidol in two experimental anxiety models in rats: possible role of dopamine. **Psychopharmacology**, v. 89, p. 125-130, 1986.
doi.org/10.1007/BF00175204.

PHILLIPSON, J. D. Phytochemistry and medicinal plants. **Phytochemistry**, v. 56, p. 237-243, 2001.

PHILIPOV, S.; ISTATKOVA, R.; IVANOVSKA, N.; DENKOVA, P.; TOSHEVA, K.; NAVAS, H.; VILLEGAS, J. Phytochemical study and antiinflammatory properties of *Lobelia laxiflora* L. Zeitschrift Fur Naturforschung C-a **Journal of Biosciences**, v. 53, 311-317, 1998.

POEWE, W.; SEPPI, K.; TANNER, C. M.; HALLIDAY, G. M.; BRUNDIN, P.; VOLKMANN, J.; LANG, A. E. Parkinson disease. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 3, 17013, 2017. doi:10.1038/nrdp.2017.13.

POLATOĞLU, K.; SERVI, H.; ÖZÇINAR, Ö.; NALBANTSOY, A.; GÜCEL, S. Essential Oil Composition of Endemic *Arabis purpurea* Sm. & *Arabis cypria* Holmboe (Brassicaceae) from Cyprus. **Journal of Oleo Science**, v. 66, p. 65–70, 2017.
doi:10.5650/jos.ess16011.

PORSOLT, R. D.; BERTIN, A.; JALFRE, M. “Behavioural despair” in rats and mice: Strain differences and the effects of imipramine, **European Journal of Pharmacology**, v. 51, 1978.

PREDIGER, R. D.; TAKAHASHI R. N. Ethanol improves short-term social memory in rats. Involvement of opioid and muscarinic receptors. **European Journal of Pharmacology**, v.462, p.115 - 3. 2003.

PREDIGER, R. D. S.; DA CUNHA C.; TAKAHASHI R. N. Antagonistic interaction between adenosine A2A and dopamine D2 receptors modulates the social recognition memory in reserpine-treated rats. **Behavioural Pharmacology**, v.16, p.209-18. 2005.

PREDIGER, R. D. S.; FERNANDES, D.; TAKAHASHI, R.N. Blockade of adenosine A2A receptors reverses short-term social memory impairments in spontaneously hypertensive rats. **Behavioural Brain Research**, v. 159, p.197-205, 2005a.

PREDIGER, R. D. S.; BATISTA, L. C.; TAKAHASHI, R. N. Caffeine reverses age-related deficits in olfactory discrimination and social recognition memory in rats. Involvement of adenosine A1 and A2A receptors. **Neurobiology of Aging**, v. 26, p. 957-964, 2005b.

PREDIGER, R. D.; BATISTA L. C.; MEDEIROS R.; PANDOLFO P.; FLORIO J.; TAKAHASHI R. The risk is in the air: Intranasal administration of MPTP to rats reproducing clinical features of Parkinson's disease. **Experimental Neurology**, v. 202, p.391-403. 2006.

PRUT, L; BELZUNG, C. The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: a review. **European Journal of Pharmacology**, v. 463, p. 3–33, 2003. doi.org/10.1016/S0014-2999(03)01272-X.

QUAGLIATO, L. B.; VIAN, M. A.; QUAGLIATO E. M. A. B.; SIMIS, S. Alterações do olfato na doença de Parkinson. **Arquivos de Neuropsiquiatria**, v. 65, p. 647-652, 2007.

QUINTANS JÚNIOR, L. J.; ALMEIDA, J. R. G. S.; LIMA, J. T.; NUNES, X. P.; SIQUEIRA, J. S.; OLIVEIRA, L. E. G.; ALMEIDA, R. N.; ATHAYDE-FILHO, P. F.; BARBOSA-FILHO, J. M. Plants with anticonvulsant properties: a review. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, p. 798–819, 2008.

RAVI, L.; KRISHNAN, K. Cytotoxic Potential of N-hexadecanoic Acid Extracted from *Kigelia pinnata* Leaves. **Asian Journal of Cell Biology**, v. 12, p. 20-27, 2017. doi: 10.3923/ajcb.2017.20.27.

REBECCA, O. P. S.; BOYCE, A. N.; SOMASUNDRAM, C. Isolation and Identification of Myo-Inositol Crystals from Dragon Fruit (*Hylocereus polyrhizus*). **Molecules**, v. 17, p. 4583-4594, 2012. doi:10.3390/molecules17044583.

REKSIDLER, A. B.; LIMA, M. M. S.; DOMBROWSKI, P. A.; BARNABÉ, G. F.; ANDERSEN, M. L.; TUFIK, S.; VITAL, M. A. B. F. Distinct Effects of Intranasal L-DOPA Infusion in the MPTP Rat Model of Parkinson's Disease. **Birth, Life and Death of Dopaminergic Neurons in the Substantia Nigra**, v. 2009, p. 259–268, 2009. doi:10.1007/978-3-211-92660-4_21.

RUEDA-ORDÓÑEZ, Y. J.; TANNOUS, K. Thermal decomposition of sugarcane straw, kinetics and heat of reaction in synthetic air. **Bioresource Technology**, v. 211, p. 231- 239, 2016.

SAEED, N. M.; EL-DEMERDASH, E.; ABDEL-RAHMAN, H. M.; ALGANDABY, M. M.; AL-ABBASI, F. A.; ABDEL-NAIM, A. B. Anti-inflammatory activity of methyl palmitate and ethyl palmitate in different experimental rat models. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 264, p. 84–93, 2012. doi:10.1016/j.taap.2012.07.020.

SANTIAGO, R. M.; BARBIEIRO, J.; LIMA, M. M. S.; DOMBROWSKI, P. A.; ANDREATINI, R.; VITAL, M. A. B. S. Depressive-like behaviors alterations induced by intranigral MPTP, 6-OHDA, LPS and rotenone models of Parkinson's disease are predominantly associated with serotonin and dopamine. **Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry**, v.34, p. 1104–1114, 2010. doi:10.1016/j.pnpbp.2010.06.004.

SANTOS, A. R. S.; MIGUEL, O. G.; PIZZOLATTI, M. G.; YUNES, R. A.; VENCATO, I.; CONTIN, A.; MOREIRA, E. A.; CALIXTO, J. B. **Anais da X Reunião Anual da Federação da Sociedade de Biologia Experimental**, Serra Negra, SP. Brazil, 1995.

SCHRAG, A. Psychiatric aspects of Parkinson's disease. **Journal of Neurology**, v. 251, 2004. doi:10.1007/s00415-004-0483-3.

SEAMANS, J. K.; FLORESCO, S. B.; PHILLIPS, A. G. D1 receptor modulation of hippocampal-prefrontal cortical circuits integrating spatial memory with executive functions in the rat. **Journal of Neuroscience**, v. 18, p. 1613-1621, 1998.

SEKI, K.; TOMIHARI, T.; HAGA, K.; KANEKO, R. Iristectorenes A and C-G, monocyclic triterpene esters from *Iris tectorum*. **Phytochemistry**, v. 36, p. 425–431, 1994. doi:10.1016/s0031-9422(00)97089-4.

SELLITTI, D. F.; SUZUKI, K.; DOI, S. Q.; LAGRANHA, C.; MACHADO, M.; MATOS, T.; KOHN, L. D. Thyroglobulin increases cell proliferation and suppresses Pax-8 in mesangial cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 285, p. 795-799, 2001.

SEN, A.; SHUKLA, K. K.; DHAVAN, P.; SINGH, S. Analysis of IR, NMR and Antimicrobial Activity of β -Sitosterol Isolated from *Momordica charantia*. **Science Secure Journal of Biotechnology**, v. 1, p. 9-13, 2012.

SERRA, E. L.; MEDALHA, C. C.; MATTIOLI, R. Natural preference of zebrafish (*Danio rerio*) for a dark environment. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 32, p. 1551-1553, 1999.

SHAI, L. J. **Characterization of compounds from *Curtisia dentate* (Cornaceae) active against *Candida albicans***. Departament of Paraclinical Sciences, Faculty of Veterinary Sciences, University of Pretoria, 2007.

SHANKAR, J. C.; LIEU, C. A.; De MARIA, M.; LABERGE, R. M.; CAMPISI, J.; ANDERSEN, J. K. Environmental stress, ageing and glial cell senescence: a novel mechanistic link to Parkinson's disease? **Journal of Internal Medicine**, v. 273, p. 429–436, 2013. doi:10.1111/joim.12029.

SHIBANO, M.; TSUKAMOTO, D.; MASUDA, A.; TANAKA, Y.; KUSANO, G. Two new pyrrolidine alkaloids, radicamines A and B, as inhibitors of alpha-glucosidase from *Lobelia chinensis* Lour. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 49, p. 1362-1365, 2001. doi: 10.1248/cpb.49.1362.1.

SILVA JÚNIOR, J. O. C.; VIEIRA, J. L. F.; BARBOSA, W. L. R.; PEREIRA, N. L. P. Caracterização físico-química do extrato fluido e seco por nebulização de *Symphytum offi cinale* L. **Brasilian Journal of Pharmacognosy**, v. 16, p. 671-677, 2006.

SILVA, T.L. **Estudo químico de bowdichia virgilioides (fabaceae) na busca de inibidores seletivos de cisteíno peptidases**. Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de MESTRE EM QUÍMICA, área de concentração: QUÍMICA ORGÂNICA. Universidade Federal de São Carlos, 97 p., 2014.

SIMÕES, C. M. O. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6ª Edição. Florianópolis: UFSC, 2010.

SIMON, I. S.; SHOSTENKO, Y. V. Investigation of alkaloids of burning *Lobelia*. **Journal of General Chemistry**, Ussr, 1962, 32(3), 987-&.

SINGH, S. P.; BORA, T. C.; BEZBARUAH, R. L. Molecular Interaction of Novel Compound 2-Methylheptyl Isonicotinate Produced by Streptomyces sp. 201 with Dihydrodipicolinate Synthase (DHDPS) Enzyme of Mycobacterium tuberculosis for its Antibacterial Activity. **Indian Journal of Microbiology**, v. 52, p. 427–432, 2012. doi:10.1007/s12088-012-0252-4.

SLATTERY, D. A.; MARKOU A.; CRYAN J. F. Evaluation of reward processes in an animal model of depression. **Psychopharmacology** v.190, p. 555-68, 2007.

SMEYNE, R. J.; JACKSON-LEWIS, V. The MPTP model of Parkinson's disease. **Molecular Brain Research**, v. 134, p. 57–66, 2005. doi:10.1016/j.molbrainres.2004.09.017.

SOFFIÉ, M.; LAMBERTY, Y. Scopolamine effects on juvenile conspecific recognition in rats: possible interaction with olfactory sensitivity. **Behavioural Processes**, v. 17, p. 181-90, 1988.

SOUSA, F. C. F.; MELO, C. T. V.; CITÓ, M. C. O.; FELIX, F. H. C.; VASCONCELOS, S. M. M.; FONTELES, M. M. F.; FILHO, J. M. B.; VIANA, G. S. B. Plantas medicinais e seus constituintes bioativos: Uma revisão da bioatividade e potenciais benefícios nos distúrbios da ansiedade em modelos animais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, p. 642-654, 2008.

ST-PIERRE, A; LAJEUNESSE, A; DESGAGNÉ-PENIX, I. Determination of Piperidine Alkaloids from Indian Tobacco (*Lobelia inflata*) Plants and Plant-Derived Products. **Austin Biochemistry**; v. 2, p 1014, 2017.

STALEY, K. Molecular mechanisms of epilepsy. **Nature Neuroscience**, v. 18, p. 367–372, 2015. doi:10.1038/nn.3947.

STEAD, L. F.; HUGHES, J. R. Lobeline for smoking cessation. **Cochrane Database of Systematic Reviews**, 1997. doi:10.1002/14651858.cd000124.

STEINEGGER, E.; EGGER, F. Lophilin and lophilacrin, two new alkaloids from *Lobelia*. **Pharmaceutica Acta Helvetiae**, v. 27, 207-211, 1952.

STOLOM, S.; OYEMITAN, I. A.; MATEWU, R.; OYEDEJI, O. O.; OLUWAFEMI, S. O.; NKEH-CHUNGAG, B. N.; SONGCA, S. P.; OYEDEJI, A. O. Chemical and biological studies of *Lobelia flaccida* (C. Presl) A.DC leaf: a medicinal plant used by traditional healers in Eastern Cape, South Africa. **Tropical Journal of Pharmaceutical Research**, v. 15, p. 1715-1721, 2016. doi:10.4314/tjpr.v15i8.17.

SUN, J.; WANG, X.; ZHANG, H.; YANG, J. A new triterpenoid ester from *Lobelia sessilifolia*. **Chemistry of Natural Compounds**, v. 48, 2012. doi:10.1007/s10600-012-0263-8.

SZOKÉ, E.; NESZMELYI, A.; BALVANYOS, I.; KRAJEWSKA, A. NMR characterisation of lobeline from *Lobelia inflata* tissue cultures. **Medical Science Monitor**, 4, 15-19, 1998.

SYLVESTRE, M.; PICHETTE, A.; LONGTIN, A.; NAGAU, F.; LEGAULT, J. "Essential oil analysis and anticancer activity of leaf essential oil of *Croton flavens* L. from Guadeloupe," **Journal of Ethnopharmacology**, v. 103, p. 99–102, 2006.

TADAIESKY, M. T.; DOMBROWSKI, P. A.; FIGUEIREDO, C. P.; CARGNIN-FERREIRA, E.; DA CUNHA, C.; TAKAHASHI, R. N. Emotional, Cognitive and Neurochemical Alterations in a Premotor Stage Model of Parkinson's Disease. **Neuroscience**, v.156, p.830-840. 2008 doi:10.1016/j.neuroscience.2008.08.035.

TAKEDA, I. J. M.; FARAGO, P. V. **Vegetação do Parque Estadual de Vila Velha: Guia de campo**. Curitiba: Serzegrat, 419 p., 2001.

TAKEOKA, G.; DAO, L.; TERANISHI, R.; WONG, R.; FLESSA, S.; HARDEN, L.; EDWARDS, R. Identification of Three Triterpenoids in Almond Hulls. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, p. 3437–3439, 2000. doi:10.1021/jf9908289.

TAMBOLI, A. M.; RUB, R. A.; GHOSH, P.; BODHANKAR, S. L. Antiepileptic activity of lobeline isolated from the leaf of *Lobelia nicotianaefolia* and its effect on brain GABA level in mice. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 2, p. 537-542, 2012.

TAMOKOU, J. D. D.; MBAVENG, A. T.; KUETE, V. Antimicrobial activities of African medicinal spices and vegetables, **Medicinal Spices and Vegetables from Africa**, p. 207–237, 2017. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-809286-6.00008-x>.

TEPONNO, R. B.; KUSARI, S.; SPITELLER, M. Recent advances in research on lignans and neolignans, **Natural Products Report**, v. 33, p. 1044–1092, 2016. doi.org/10.1039/ c6np00021e.

TESTA, G.; OLIVEIRA, P. R. N.; SILVA, C. C.; SCHUQUEL, I. T. A.; SANTIN, S. M. O. Constituintes Químicos das folhas e avaliação da atividade anti-inflamatória das

raízes e folhas de *Guettarda pohliana* MÜLL. ARG. (RUBIACEAE). **Quimica. Nova**, v. 35, p. 527-529, 2012.

TOLEDO, A. C. O.; HIRATA, L. L.; BUFFON, M. C. M.; MIGUEL, M. D.; MIGUEL, O. G. Fitoterápicos: uma abordagem farmacotécnica. **Revista Lecta**, Bragança Paulista; v. 21, p. 7-13, 2003.

TOLOSA, E.; GAIG, C.; SANTAMARIA, J.; COMPTA, Y. Diagnosis and the premotor phase of Parkinson disease. **Neurology**, v. 72, p. S12–S20, 2009.
doi:10.1212/wnl.0b013e318198db11.

TORRES, A. L. **Efeito de cultivares de repolho e extratos aquosos vegetais na biologia de *Plutella xylostella* (L.) e no parasitóide *Oomyzus sokolowskii* (Kurdjumov)**. Tese apresentada para obtenção de Título de Doutor em Agronomia – Área de Concentração em Entomologia - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 106 f., 2004.

TORRES, A. L.; BOIÇA JÚNIOR, A. L.; MEDEIROS, C. A. M.; BARROS, R. Efeito de extratos aquosos de *Azadirachta indica*, *Melia azedarach* e *Aspidosperma pyrifolium* no desenvolvimento e oviposição de *Plutella xylostella*. **Bragantia**, v.65, p.447-457, 2006.

TORRES-SANTOS, E. C.; LOPES, D.; OLIVEIRA, R. R.; CARAUTA, J. P.; FALCÃO, C. A.; KAPLAN, M. A.; ROSSI-BERGMANN, B. Antileishmanial activity of isolated triterpenoids from *Pourouma guianensis*. **Phytomedicine**, v. 11, p. 114-120, 2004.

TRINDADE, R. C. P.; SILVA, P. P.; ARAÚJO-JÚNIOR, J. X.; LIMA, I. S.; PAULA, J. E.; SANT'ANA, A. E. G. **Pesquisa. Agropecuária. Brasileira**, v.43, p.1813-1816, 2008.

TRINDADE, R. C. P.; SILVA, P. P.; ARAÚJO-JÚNIOR, J. X.; LIMA, I. S.; PAULA, J. E.; SANT'ANA, A. E. G. Mortality of *Plutella xylostella* larvae treated with *Aspidosperma pyrifolium* ethanol extracts. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.43, p. 1813-1816, 2008.

TRINTA, E. F.; SANTOS, E. **Flora Ilustrada Catarinense – Campanulaceae**. Itajaí: Herbário Barbosa Rodrigues. 80 p. 1989.

UHLENHUTH, E. H.; BALTER, M. B.; BAN, I. T. A.; YANG, K. Trends in recommendations for the pharmacotherapy of anxiety disorders by an international expert panel, 1992–1997. **European Neuropsychopharmacology**, v. 9, p. 393–398, 1999.

VASCONCELOS, M. A. *In vivo* analgesic and anti-inflammatory activities of ursólico acid and oleanoic acid from *Miconia albicans* (Melastomataceae). Zeitschrift für Naturforschung. C, **Journal of Biosciences**, v. 61, p. 477-482, 2006.

VECCHIA, D. D.; SCHAMNE, M. G.; FERRO, M. M.; SANTOS, A. F. C.; LATYKI, C. L.; LARA, D. V.; MIYOSHI, E. Effects of *Hypericum perforatum* on turning behavior in

an animal model of Parkinson's disease. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 51, p. 111–115, 2015. doi:10.1590/s1984-82502015000100012.

VEIGAS Jr. C; BOLZANI, V. S.; BARREIRO, E. J. Os Produtos Naturais e a Química Medicinal Moderna. **Química Nova**; v. 29, p. 326-337, 2006.

VERPOORTE, R. In: **Metabolic Engineering of Plant Secondary Metabolism**, Kluwer Academic Publishers, Netherlands, 2000.

VIEIRA O. S. **Estudos taxonômicos das espécies de *Lobelia* L. (Campanulaceae Juss.) que ocorrem no Brasil**. Dissertação de Mestrado em Biologia Vegetal. Unicamp, Campinas, 1998.

VIEIRA, O. S. Campanulaceae: *Lobelia*. In: Rafaela Campostrini Forzza *et al.* (Org.). **Catálogo de Plantas e Fungos do Brasil**. 1ª Edição. Rio de Janeiro: Andrea Jakobsoon Estúdio: Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro, v. 1, p. 833-835, 2010.

VIEIRA, A. O. S. ***Lobelia* in Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2015. Disponível em:<<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB47627>>.

VILLEGAS, A.; ESPINOZA, J.; URZUA, A. Piperidine alkaloids from *Lobelia polyphylla* Hook. & Arn. (Campanulaceae). **Boletín Latinoamericano Y Del Caribe De Plantas Medicinales Y Aromaticas**, v. 13, p. 205-212, 2014.

VIGNESHWARAN, V.; SOMELOWDA, M.; PRAMOD, S. Pharmacological Evaluation of Analgesic and Antivenom Potential from the Leaves of Folk Medicinal Plant *Lobelia nicotianaefolia*. **American Journal of Phytomedicine and Clinical Therapeutics**, v. 2, p. 1404-1415, 2014.

VIRADOR, V. M.; KOBAYASHI, N.; MATSUNAGA, J.; HEARING, V. J. A standardized protocol for assessing regulators of pigmentation. **Analytical Biochemistry**, v. 270, p. 207–219, 1999.

VIRTUOSO, S.; DAVET, A.; DIAS, J. F. G.; CUNICO, M. M.; MIGUEL, M. D.; OLIVEIRA, A. B.; MIGUEL, O. G. Estudo preliminar da atividade antibacteriana das cascas de *Erythrina velutina* Willd., Fabaceae (Leguminosae) **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.15, p. 137-142, 2005.

WANG, S.; ZHANG, Z.; GUO, Y.; ZHOU, H.; TENG, G.; CHEN, B. Anhedonia and activity deficits in rats: impact of post-stroke depression. **Journal of Psychopharmacology**, v. 23, p. 295–304, 2008. doi:10.1177/0269881108089814.

WANG, Y. N.; WANG, H. X.; SHEN, Z. J.; ZHAO, L. L.; CLARKE, S. R.; SUN, J. H.; DU, Y. Y. e SHI, G. L. Methyl Palmitate, an Acaricidal Compound Occurring in Green Walnut Husks, **Journal of Economic Entomology**, v. 102, 2009.

WANG, H.; LU, X.; YAO, H.; FENG, J.; LIU, R. Research progress on application of coumarin and its derivatives. **Chemical Industry Times**, v. 23, p. 40-3, 2009.

WANG, P. P.; LUO, J.; YANG, M. H.; KONG, L. Y. Chemical constituents of *Lobelia chinensis*. **Chinese Traditional and Herbal Drugs**, v. 44, p. 794-797, 2013.

WEINGES, K.; BÄHR, W.; EBERT, W.; KLOSS, P. Norlobelanidine, the main alkaloid from *Lobelia polyphylla* Hook and Arn. **Justus Liebigs Annalen der Chemie**, v. 756, p. 177-180, 1972.

WILLIAMS, H. J.; RAY, A. C.; KIM, H. L. Δ^3 -Piperidine alkaloids from the toxic plant *Lobelia berlandieri*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 35, 19-22, 1987.

XIA, L.; WANG, Y.; HUANG, W.; QIAN, H. Research advance of anticancer drugs with cou- marin structures. **Chinese Journal of Nsantew Drugs**, v. 22, p. 2392-404, 2013.

XU Q.; KANTHASAMY. A.G.; REDDY, M.B. Neuroprotective effect of the natural iron chelator, phytic acid in a cell culture model of Parkinson's disease. **Toxicology**, v. 12; p 101-108, 2008. doi: 10.1016/j.tox.2007.12.017.

XU, Q.; KANTHASAMY, A. G.; REDDY, M.G. Phytic Acid Protects against 6-Hydroxydopamine-Induced Dopaminergic Neuron Apoptosis in Normal and Iron Excess Conditions in a Cell Culture Model. **Parkinson's Disease**, v. 2011, p 1-6. doi:10.4061/2011/431068.

XU, R.; FAZIO, G. C.; MATSUDA, S. P. T. On the origins of triterpenoid skeletal diversity. **Phytochemistry**, v. 65, p. 261–291, 2004. doi:10.1016/j.phytochem.2003.11.014.

YACOUBIAN, T. A. Neurodegenerative Disorders. **Drug Discovery Approaches for the Treatment of Neurodegenerative Disorders**, p. 1–16, 2017. doi:10.1016/b978-0-12-802810-0.00001-5.

YANG, Z.; ZHANG, D.; REN, J.; YANG, M.; LI, S. Acetylcholinesterase inhibitory activity of the total alkaloid from traditional Chinese herbal medicine for treating Alzheimer's disease. **Medicinal Chemistry Research**, v. 21, p. 734-738, 2012.

YANG, S.; SHEN, T.; ZHAO, L.; LI, C.; ZHANG, Y.; LOU, H.; REN, D. Chemical constituents of *Lobelia chinensis*. **Fitoterapia**, v. 93, p. 168-174, 2014. doi: 10.1016/j.fitote.2014.01.007.

YASUDA, T.; HAYAKAWA, H.; NIHIRA, T.; REN, Y.R.; NAKATA, Y.; NAGAI, M.; HATTORI, N.; MIYAKE, K.; TAKADA, M.; SHIMADA, T.; MIZUNO, Y.; MOCHIZUKI, H. Parkinmediated protection of dopaminergic neurons in a chronic MPTP-minipump mouse model of Parkinson disease. **Journal of. Neuropathology &. Experimental. Neurology**, v. 70, p. 686–697, 2011.

YUNES, R. A.; CHECHINEL FILHO, V. **Química de Produtos Naturais Novos Fármacos e a Moderna Farmacognosia**, 3ª Edição. Editora Univali, 384 p., 2012.

ZAMAI, L.; FALCIERI, E.; MARHEFKA, G.; VITALE, M. Supravital exposure to propidium iodide identifies apoptotic cells in the absence of nucleosomal DNA fragmentation. **Cytometry**, v. 23, p. 303-311, 1996.

ZHANG, M. Z.; WANG, J. C.; ZHOU, S. H. Alkaloids triterpenoids of *Lobelia davidii*. **Phytochemistry**, v. 29, p. 1353-1354, 1990.

ZANG, L.; WU B.; LIN, Y.; WANG, J.; FU, L.; TANG, Z. Research Progress of Ursolic Acid's Anti-Tumor Actions. **Chinese Journal of Integrative Medicine**, v. 20, p. 72-79, 2014.

ZHANG, Z.; HOU, L.; LI, X.; JU, C.; ZHANG, J.; LI, X.; WANG, X.; LIU, C.; LV, Y.; WANG, Y. Neuroprotection of inositol hexaphosphate and changes of mitochondrion mediated apoptotic pathway and α -synuclein aggregation in 6-OHDA induced parkinson's disease cell model. **Brain Research**, v. 15; p. 87-95, 2015. doi: 10.1016/j.brainres.2015.12.035.

ZHENG, G. Z.; HORTON, D. B.; PENTHALA, N. R.; NICKELL, J. R.; CULVER, J. P., DEACIUC, A.; DWOSKIN, L. P.; CROOKS, P. A. Exploring the effect of *N*-substitution in *nor*-lobelane on the interaction with VMAT2: discovery of a potential clinical candidate for treatment of methamphetamine abuse. **Medchemcomm**, v 4, p. 564-568, 2014.

ZHOU, Y.; WANG, Y.; WANG, R.; GUO, F.; YAN, C. Two-dimensional liquid chromatography coupled with mass spectrometry for the analysis of *Lobelia chinensis* Lour. using an ESI/APCI multimode ion source. **Journal of Separation Science**, v. 31, p. 2388-2394, 2008. doi: 10.1002/jssc.200700685.

ZON, L. I.; PETERSON, R. T. *In vivo* drug discovery in the zebrafish. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 4, p. 35-43, 2005. doi.org/10.1038/nrd1606.