



UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
MESTRADO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

LUCAS APOLINÁRIO CHIBLI

CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA E ATIVIDADES
BIOLÓGICAS DE *Bryophyllum pinnatum* (Lam.) Oken

JUIZ DE FORA - MG

2013

LUCAS APOLINÁRIO CHIBLI

**CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA E ATIVIDADES
BIOLÓGICAS DE *Bryophyllum pinnatum* (Lam.) Oken**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Juiz de Fora para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas, área de concentração em Produtos Naturais Bioativos.

Orientador: Prof. Dr. Orlando Vieira de Sousa

Coorientador: Prof. Dr. José de Jesus Ribeiro Gomes de Pinho

JUIZ DE FORA – MG

2013

Chibli, Lucas Apolinário.

Caracterização química e atividades biológicas de *Bryophyllum pinnatum* (Lam.) Oken / Lucas Apolinário Chibli. -- 2013.

161 p. : il.

Orientador: Orlando Vieira de Sousa

Coorientador: José de Jesus Ribeiro Gomes de Pinho

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Faculdade de Farmácia e Bioquímica. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, 2013.

1. *Bryophyllum pinnatum*. 2. Flavonoides. 3. Atividade anti-inflamatória tópica. 4. Atividade antioxidante. 5. Atividade antibacteriana. I. Sousa, Orlando Vieira de, orient. II. Pinho, José de Jesus Ribeiro Gomes de, coorient. III. Título.

LUCAS APOLINÁRIO CHIBLI

CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA E ATIVIDADES BIOLÓGICAS DE *Bryophyllum pinnatum* (Lam.) Oken

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Juiz de Fora para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas

Aprovada em ____ de _____ de 2013.

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Orlando Vieira de Sousa – Orientador
Universidade Federal de Juiz de Fora

Prof. Dr. Marcelo Silva Silvério
Universidade Federal de Juiz de Fora

Profa. Dra. Tânia Toledo de Oliveira
Universidade Federal de Viçosa

JUIZ DE FORA – MG

2013

Dedico
Ao desenvolvimento e disseminação do conhecimento a cerca desses encantos que são as Plantas Medicinais, obras-primas da Natureza, que perfeitas como são, traduzem a Luz do Sol em fonte inesgotável de Vida, Saúde e Cura.

Ao Duraed (in memoriam), amado vô, pai e mestre. Pois os laços familiares permeiam a nossa existência, deixando no coração a certeza do reencontro.

A meu ver, a gratidão se traduz em atitudes bem mais do que palavras. Porém, palavras que trazem em si sinceridade, têm força e valia!

Sendo assim, sou grato primeiramente ao Pai, que é a Vida!

À Clareana pelo carinho, amizade, interesse mútuo na área e pela certeza de um futuro próspero e feliz. Desejo que se realize e encontre cada dia mais, conte comigo sempre!

À minha Família (Omar, Vivette, Pedro, Anuar, avós, tias e primos), porto seguro e base sólida que me permite seguir navegando e atravessando o grande mar que é a Vida.

Ao Prof. Dr. José de Jesus Ribeiro Gomes de Pinho, que mesmo às vésperas da aposentadoria, se dispôs a auxiliar e concedeu-me a honra de ser o co-orientador.

À Profa Dra. Maria Silvana, vice-coordenadora do programa de pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, pela participação e colaboração efetiva.

À Kamilla Coelho, mestrande e parceira nos trabalhos realizados, pela amizade e essencial participação na execução nos experimentos laboratoriais. Pessoa de bom coração a quem sou muito grato e desejo que se realize profissionalmente e tudo de bom sempre!

Aos amigos do Laboratório de Farmacologia de Produtos Naturais: Carolina Gasparetto, pela amizade, apoio técnico e auxílios prestados; Jésus e Éder, também pelo auxílio nos trabalhos, mas principalmente pela amizade, pessoas boas a quem desejo saúde e prosperidade; Muiara, Pedro, Dalyara, Laura, Bruna e Carol, pela amizade e disposição em me auxiliar sempre que precisei.

À Vanessa e Jucélia, pela amizade, interesse e disposição em auxiliar. Sou grato a vocês e desejo que alcancem seus objetivos na vida e continuem sendo as pessoas boas que são.

Ao grupo de pesquisa da Profa. Dra. Elita Scio Fontes, especialmente ao Prof. Dr. Rodrigo Fabri e ao doutorando Nicolás de Castro, pela grande colaboração e conhecimentos transmitidos que foram essenciais para a realização do trabalho. Desejo prosperidade a vocês.

Ao Programa de pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Farmácia da UFJF, pelo amparo e oportunidade de dar mais esse passo. Extendo aqui os agradecimentos à solicitude e serviços prestados pelo secretário do programa, Arlem.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudos e financiamento de projetos.

À Universidade Federal de Juiz de Fora, pela oportunidade e infraestrutura para realização dos trabalhos.

E a todas as demais pessoas (p. ex.: colegas de mestrado) que, direta ou indiretamente, deram sua colaboração e amizade, tornando assim “mais fácil a caminhada”, principalmente pela UNIÃO.

“O Senhor fez a terra produzir medicamentos: o homem sensato não os despreza”.

Eclesiástico (38, 4-8)

“Conhece-te a ti mesmo e conhecerás o Universo e os Deuses”.

Inscrição do Templo de Delfos

“Basta apenas mudares teu olhar e encontrarás um mundo sempre novo”.

Walter da Rosa Borges

“Sob as aparências do Universo, do Tempo, do Espaço e da Mobilidade, está sempre encoberta a Realidade Substancial: a Verdade Fundamental”.

O Caibalion (Hermes Trismegisto)

“A esperança adiada deixa doente o coração, mas o desejo realizado é como a árvore da Vida”.

Provérbios 13:12 (Salomão)

RESUMO

Bryophyllum pinnatum (Lam.) Oken (Crassulaceae), conhecida como “folha-da-fortuna”, tem sido largamente utilizada na medicina tradicional, principalmente para o tratamento de inflamações, infecções, feridas, ulcerações e gastrite. O objetivo do presente estudo foi identificar e quantificar constituintes bioativos, bem como avaliar as atividades antioxidante, antibacteriana e anti-inflamatória tópica das folhas de *B. pinnatum*. O material vegetal seco e pulverizado foi submetido à maceração com etanol seguida de obtenção, por partição, das frações hexânica, diclorometânica, em acetato de etila e butanólica. Constituintes do extrato etanólico e das frações foram identificados por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a detector de ultravioleta e cromatografia com fase gasosa acoplada à espectrometria de massas. Os teores de fenóis e flavonoides totais foram determinados por espectrofotometria e a atividade antioxidante avaliada pelos ensaios com radical DPPH, de poder de redução, sistema de cooxidação β -caroteno/ácido linoleico e bioautografia. A atividade antibacteriana foi investigada pelos métodos de difusão e microdiluição. A atividade anti-inflamatória tópica foi avaliada usando modelos de edema de orelha induzidos por óleo de cróton, ácido araquidônico, fenol, capsaicina, etil-fenil-propiolato e por análise histológica. Os resultados foram demonstrados como média \pm erro padrão. Análise de variância seguida do teste de Tukey ou Student-Newman-Keuls foi usada para medir o grau de significância para $p < 0,05$. Quercetina, rutina, canferol, apigenina 7-O- β -D-glicosídeo e luteolina 7-O- β -D-glicosídeo foram identificados por CLAE-UV, enquanto β -amirina por CG-EM. Os teores de fenóis totais variaram de 3,45 a 25,34 g/100 g, enquanto os flavonoides foram de 0,66 a 23,31 g/100 g. Utilizando o método do DPPH, os valores de CE_{50} variaram entre $9,44 \pm 0,01$ a $57,29 \pm 0,11$ μ g/mL e o método do poder de redução produziu CE_{50} de $234,22 \pm 0,61$ e $1235,17 \pm 1,39$. Os valores de inibição da peroxidação lipídica foram entre 39,4 e 58,3% e o método de bioautografia detectou substâncias com atividade antioxidante. O extrato etanólico e as frações inibiram o crescimento das bactérias testadas, produzindo atividades bactericida e bacteriostática. Concentrações de 0,5 e 1,0 mg/orelha do extrato etanólico reduziram o edema de orelha induzido pelo óleo de cróton em 54,85 e 57,11%, enquanto o edema de orelha induzido pelo ácido araquidônico foi de 41,67, 53,82 e 67,01% nas concentrações de 0,1, 0,5 e 1,0 mg/orelha, respectivamente. O edema induzido pelo fenol foi inibido em 79,73, 33,14 e 33,71% nas concentrações de 0,1, 0,5 e 1,0 mg/orelha, respectivamente. Após tratamento, 0,1 (43,22%), 0,5 (72,53%) e 1,0 mg/orelha (35,16%) do extrato etanólico reduziu o edema de orelha induzido por capsaicina. O edema induzido pelo etil-fenil-propiolato, nas concentrações de 0,1 (75,00%), 0,5 (69,77%) e 1,0 mg/orelha (43,60%) foi inibido. Os resultados do teste crônico de edema de orelha e a análise histológica confirmaram o efeito do extrato etanólico na inibição do processo inflamatório induzido pelo óleo de cróton. Os resultados indicaram que *B. pinnatum* possui efeitos antioxidante, antibacteriano e anti-inflamatório tópico, justificando o uso popular e destacando a espécie como potencial alvo para a descoberta de novos agentes terapêuticos.

Palavras-chave: *Bryophyllum pinnatum*, flavonoides, atividade anti-inflamatória tópica, atividade antioxidante, atividade antibacteriana.

ABSTRACT

Bryophyllum pinnatum (Lam.) Oken (Crassulaceae), known as "folha-da-fortuna" (leaves-of-fortune), has been widely used in traditional medicine, mainly for the treatment of inflammation, infection, wound, ulcer and gastritis. The aim of the present study was to identify and quantify bioactive constituents, as well as evaluating the antioxidant, antibacterial and topical anti-inflammatory activities of *B. pinnatum* leaves. Dried and pulverized plant material was subjected to maceration with ethanol followed by partition to obtain the hexanic, dichloromethanic, in ethyl acetate and butanolic fractions. Constituents of the ethanol extract and fractions were identified by high performance liquid chromatography coupled to ultraviolet detector and gas chromatography coupled to mass spectrometry. The total phenols and flavonoids contents were determined by spectrophotometry and the antioxidant activity was evaluated using DPPH, reducing power, β -carotene/linoleic acid co-oxidation system and bioautography assays. The antibacterial activity was investigated by diffusion and microdilution methods. The topical anti-inflammatory activity was evaluated through ear oedema models induced by croton oil, arachidonic acid, phenol, capsaicin, ethyl phenyl propiolate and histological analysis. The results were demonstrated as mean \pm standard error. Analysis of variance followed by Tukey or Student-Newman-Keuls test was used to measure the degree of significance of $p < 0.05$. Quercetin, rutin, kaempferol, apigenin 7-*O*- β -D-glucoside and luteolin 7-*O*- β -D-glucoside were identified by HPLC-UV DAD, while β -amyrin by GC-MS. The total phenolic content ranged from 3.45 to 25.34 g/100 g, while flavonoids were 0.66 to 23.31 g/100 g. Using the DPPH assay, the values of EC_{50} ranged from 9.44 ± 0.01 to 57.29 ± 0.11 μ g/mL and the reducing power assay produced EC_{50} of $234,22 \pm 0,61$ and $\pm 1235.17 \pm 1.39$. The values of inhibition of lipid peroxidation were between 39,4 and 58,3% and the bioautography assay detected substances with antioxidant activity. The ethanol extract and fractions inhibited the growing of bacteria tested producing bactericidal and bacteriostatic activities. Concentrations of 0.5 and 1.0 mg/ear of the ethanol extract reduced the ear oedema induced by croton oil in 54.85 and 57.11%, while the ear oedema induced by arachidonic acid was inhibited by 41.67, 53.82 and 67.01% at concentrations of 0.1, 0.5 and 1.0 mg/ear, respectively. The phenol-induced oedema was inhibited by 79.73, 33.14 and 33.71% in 0.1, 0.5 and 1.0 mg/ear, respectively. After treatment, 0.1 (43.22%), 0.5 (72.53%) and 1.0 mg/ear (35.16%) of the ethanol extract reduced the ear oedema induced by capsaicin. The phenyl-ethyl propiolato-induced oedema at concentrations of 0.1 (75.00%) 0.5 (69.77%) and 1.0 mg/ear (43.60%) was inhibited. Results from chronic ear oedema test and histological analysis confirmed the effect of the ethanol extract on inhibition of oedema induced by croton oil. The results indicated that *B. pinnatum* possesses antioxidant, antibacterial and topical anti-inflammatory effects justifying the popular use and highlighting the species as a potential target for the discovery of new therapeutic agents.

Keywords: *Bryophyllum pinnatum*, flavonoids, topical anti-inflammatory activity, antioxidant activity, antibacterial activity.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

		P
FIGURA 1	Principais vias biossintéticas dos metabólitos especiais.....	7
FIGURA 2	Estrutura básica das principais classes de substâncias fenólicas.....	8
FIGURA 3	Reação do ácido gálico (derivado do ácido benzóico), em meio levemente alcalino, com molibdênio do reagente de Folin-Ciocalteu...	10
FIGURA 4	Estruturas básicas dos flavonoides e suas subclasses.....	11
FIGURA 5	Esquema simplificado da biossíntese de flavonoides.....	12
FIGURA 6	Formação do complexo entre flavonoide (luteolina) e Al.....	15
FIGURA 7	Fluxograma do processo de partição líquido-líquido em batelada partindo inicialmente do extrato bruto.....	17
FIGURA 8	Fatores que podem influenciar o metabolismo vegetal.....	19
FIGURA 9	Morfologia externa das folhas de <i>Bryophyllum pinnatum</i> (Lam.) Oken cultivada no Horto da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Juiz de Fora.....	27
FIGURA 10	Deslocalização do elétron desemparelhado pelo radical flavonoila.....	35
FIGURA 11	Reação química entre o radical DPPH [•] e quercetina (flavonoide antioxidante).....	37
FIGURA 12	Sistema de cooxidação β-caroteno/ácido linoléico na presença de um antioxidante.....	38
FIGURA 13	Fluxograma do processo de extração e fracionamento.....	48
FIGURA 14	Perfis cromatográficos do extrato etanólico das folhas de <i>B. pinnatum</i> por CLAE-UV DAD obtidos em diferentes comprimentos de ondas.....	67
FIGURA 15	Perfis cromatográficos da fração hexânica das folhas de <i>B. pinnatum</i> por CLAE-UV DAD obtidos em diferentes comprimentos de ondas.....	68
FIGURA 16	Espectros de UV do pico 1 do cromatograma da fração hexânica e dos padrões quercetina e rutina.....	68
FIGURA 17	Perfis cromatográficos da fração diclorometânica das folhas de <i>B. pinnatum</i> por CLAE-UV DAD obtidos em diferentes comprimentos de ondas.....	69

FIGURA 18	Perfis cromatográficos da fração em acetato de etila das folhas de <i>B. pinnatum</i> por CLAE-UV DAD obtidos em diferentes comprimentos de ondas.....	70
FIGURA 19	Espectros de UV dos picos 1 e 2 do cromatograma da fração em acetato de etila e dos padrões canferol e apigenina 7- <i>O</i> - β -D-glicosídeo.....	70
FIGURA 20	Perfis cromatográficos da fração butanólica das folhas de <i>B. pinnatum</i> por CLAE-UV DAD obtidos em diferentes comprimentos de ondas.....	72
FIGURA 21	Espectros de UV do pico 1 e 2 do cromatograma da fração butanólica e dos padrões químicos luteolina 7- <i>O</i> - β -D-glicosídeo e apigenina 7- <i>O</i> - β -D-glicosídeo.....	72
FIGURA 22	Espectros de UV de dois picos encontrados na faixa de t_r 3 do cromatograma da FB e dos padrões químicos quercetina e rutina.....	73
FIGURA 23	Perfil cromatográfico da fração hexânica das folhas de <i>B. pinnatum</i> obtido por cromatografia com fase gasosa acoplada à espectrometria de massas.....	74
FIGURA 24	Espectros de massas da β -amirina (banco de dados) e do pico no qual ela foi identificada na fração hexânica das folhas de <i>B. pinnatum</i>	76
FIGURA 25	Fórmulas estruturais da α -amirina e β -amirina.....	76
FIGURA 26	Curva de calibração do padrão ácido gálico.....	77
FIGURA 27	Curva de calibração do padrão rutina.....	77
FIGURA 28	Atividade antioxidante do extrato etanólico e das frações de <i>B. pinnatum</i> pelo método do sequestro do radical DPPH.....	80
FIGURA 29	Atividade antioxidante do extrato etanólico e das frações de <i>B. pinnatum</i> pelo método do poder de redução.....	81
FIGURA 30	Decaimento da absorvância em função do tempo para o extrato etanólico e frações de <i>B. pinnatum</i> pelo método da cooxidação do β -caroteno/ácido linoléico.....	82
FIGURA 31	Bioautografia em CCD do extrato etanólico e frações reveladas com cloreto férrico e DPPH.	85

FIGURA 32	Bioautografia em CCD do extrato etanólico e frações reveladas com NP/PEG (365 nm), cloreto de alumínio e DPPH.....	86
FIGURA 33	Bioautografia em CCD do extrato etanólico e frações reveladas com reagente de Liebermann-Burchard e DPPH.....	87
FIGURA 34	Efeito do extrato etanólico de <i>B. pinnatum</i> sobre o tamanho do edema de orelha induzido por aplicação múltipla de óleo de cróton durante os nove dias de experimento.....	95
FIGURA 35	Fotomicrografia de seções transversais de tecido da orelha de camundongos submetidos à aplicação única de óleo de cróton: efeito do EE de <i>B. pinnatum</i> sobre o tamanho do edema (espessamento da derme).....	97
FIGURA 36	Fotomicrografia de seções transversais de tecido da orelha de camundongos submetidos à aplicação única de óleo de cróton: efeito do EE de <i>B. pinnatum</i> sobre vasodilatação e infiltração de leucócitos.....	98
FIGURA 37	Fotomicrografia de seções transversais de tecido da orelha de camundongos submetidos à aplicação múltipla de óleo de cróton: efeito do EE de <i>B. pinnatum</i> sobre o tamanho do edema (espessamento da derme).....	100
FIGURA 38	Fotomicrografia de seções transversais de tecido da orelha de camundongos submetidos à aplicação única de óleo de cróton: efeito do EE de <i>B. pinnatum</i> sobre tamanho do edema (espessamento da derme e epiderme), vasodilatação e infiltração de leucócitos.....	101

LISTA DE TABELAS

		P
TABELA 1	Exemplos de fármacos obtidos de matérias-primas vegetais.....	4
TABELA 2	Classificação das substâncias fenólicas de acordo com estrutura básica.....	8
TABELA 3	Principais metabólitos especiais extraídos por diferentes solventes de acordo com a polaridade.....	16
TABELA 4	Espécies vegetais com atividade biológica usadas na obtenção de fitoterápicos.....	22
TABELA 5	Exemplos de metabólitos especiais bioativos isolados de <i>Bryophyllum pinnatum</i>	29
TABELA 6	Marcadores químicos utilizados para padronização do extrato etanólico das folhas de <i>Bryophyllum pinnatum</i> em CLAE-UV.....	50
TABELA 7	Diluições apartir da solução estoque de ácido gálico (1 mg/mL) e amostras (extrato e frações – 2 mg/mL).....	52
TABELA 8	Alíquotas das soluções de ácido gálico/amostras e reagentes utilizados para quantificação de fenóis totais.....	53
TABELA 9	Diluições da solução estoque de rutina, extrato etanólico e frações para quantificação de flavonoides totais.....	54
TABELA 10	Diluições das soluções estoques para o método do DPPH.....	55
TABELA 11	Diluições das soluções estoque para o método do poder de redução.....	57
TABELA 12	Rendimento das frações obtidas por partição do extrato etanólico de <i>B. pinnatum</i>	66
TABELA 13	Constituintes químicos da fração hexânica obtidos das folhas de <i>B. pinnatum</i> por CG-EM.....	75
TABELA 14	Teores de fenóis e flavonoides totais, em equivalência de ácido gálico e rutina, respectivamente, em <i>B. pinnatum</i>	78
TABELA 15	Atividade antioxidante do extrato etanólico e frações das folhas de <i>B. pinnatum</i> pelo método do sequestro do radical DPPH.....	79
TABELA 16	Atividade antioxidante do extrato etanólico e frações das folhas de <i>B. pinnatum</i> pelo método do poder de redução.....	81

TABELA 17	Atividade antioxidante do extrato etanólico e frações das folhas de <i>B. pinnatum</i> pelo método de cooxidação do β -caroteno/ácido linoleico.....	83
TABELA 18	Atividade antibacteriana do extrato etanólico e frações de <i>B. pinnatum</i> pelo método de difusão em ágar.....	88
TABELA 19	Concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM) do extrato etanólico e frações das folhas de <i>B. pinnatum</i>	90
TABELA 20	Efeito do extrato etanólico de <i>B. pinnatum</i> sobre o edema de orelha induzido por óleo de cróton.....	91
TABELA 21	Efeito do extrato etanólico de <i>B. pinnatum</i> sobre o edema de orelha induzido por ácido araquidônico.....	92
TABELA 22	Efeito do extrato etanólico de <i>B. pinnatum</i> sobre o edema de orelha induzido por fenol.....	93
TABELA 23	Efeito do extrato etanólico de <i>B. pinnatum</i> sobre o edema de orelha induzido por capsaicina.....	93
TABELA 24	Efeito do extrato etanólico de <i>B. pinnatum</i> sobre o edema de orelha induzido por EEP.....	94
TABELA 25	Efeito do extrato etanólico das folhas de <i>B. pinnatum</i> sobre o tamanho do edema de orelha induzido por aplicação múltipla de óleo de cróton no nono dia de experimento.	95
TABELA 26	Efeito do extrato etanólico de <i>B. pinnatum</i> sobre a massa do edema de orelha induzido por aplicação múltipla de óleo de cróton no nono dia de experimento.....	96
TABELA 27	Efeito do extrato etanólico das folhas de <i>B. pinnatum</i> sobre o tamanho do edema de orelha induzido pela aplicação única óleo de cróton nos cortes histológicos analisados através do programa IMAGEPRO-PLUS®	99

LISTA DE ABREVIATURAS

AA	Ácido araquidônico
ABTS	2,2'-Azinobis-(3-etilbenzotiazole-6-sulfonato)
AcOEt	Acetato de etila
AINE	Anti-inflamatório não esteroide
ANOVA	Análise de variância
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AP-1	Proteína ativadora-1
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
BHT	Butil hidroxitolueno
ButOH	Butanol
CAT	Catalase
CCD	Cromatografia em camada delgada
CE ₅₀	Concentração efetiva média
CG	Cromatografia gasosa/Cromatógrafo a gás
CGRP	Peptídeo relacionado ao gene da calcitonina
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
CMB	Concentração mínima bactericida
CMI	Concentração mínima inibitória
CN	Controle negativo
CP	Controle positivo
COEEA	Comitê de ética em experimentação animal
COX	Cicloxygenase
DAD	<i>Diode array detector</i>

DCM	Diclorometano
DPPH	2,2-Difenil-1-picrilhidrazila
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EE	Extrato etanólico
EM	Espectrometria de Massas
E.P.M.	Erro padrão médio
EPP	Etil-fenil-propiolato
ERC	Espécies reativas de carbono
ERN	Espécies reativas de nitrogênio
ERO	Espécies reativas de oxigênio
ERN	Espécies reativas de nitrogênio
EtOH	Etanol
FA	Fração em acetato de etila
FB	Fração butanólica
FD	Fração diclorometânica
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FH	Fração hexânica
FM	Fase móvel
FRAP	<i>Ferric reduction antioxidant power</i>
GPX	Glutathione peroxidase
Hex	Hexano
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i>
HTAB	Hexadeciltrimetilamônio
ICAM-1	Molécula intracelular de adesão
iNOS	Enzima óxido nítrico sintase induzida

IL	Interleucina
INT	Iodonitrotetrazolium
IV	Infravermelho
LOX	Lipoxigenase
5-LOX	5-lipoxigenase
L-Phe	L-fenilalanina
LPO	Lipoperoxidação
LT	Leucotrienos
L-Trp	L-triptofano
L-Tyr	L-tirosina
MAPK	Proteínas quinases ativadas por mitógenos
MEP	Metileritritol 4-fosfato
MHB	Caldo Müeler-Hinton
MHC	Complexo de histocompatibilidade
MRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente a meticilina
MVA	Ácido mevalônico
NF-kB	Fator de Transcrição Nuclear- Kappa B
NO	Óxido nítrico
NP-PEG	Produto Natural-Polietilenoglicol
OMS	Organização Mundial de Saúde
OSC	Oxidoesqualeno ciclase
P.A.	Pró-análise
PAL	Fenilalanina amônia liase
PBS	Tampão fosfato salino
PG	Prostaglandinas
PGE ₂	Prostaglandina E ₂
PLA ₂	Fosfolipase A ₂

PN	Produtos Naturais
PNPIC	Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares
PMF	Plantas medicinais e Fitoterápicos
PKC	Proteína quinase C
PSM	<i>Mixed amyrin synthase from P. sativum</i>
RDC	Resolução do conselho
RENISUS	Relação Nacional de Plantas Mediciniais e Relação Nacional de Fitoterápicos
Rf	Fator de retenção
RMN-C	Ressonância Magnética Nuclear de Carbono
RMN-H	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio
RNA	Ácido ribonucleico
ROS's	Espécies reativas de oxigênio
SOD	Superóxido desmutase
SP	Substância P
SUS	Sistema Único de Saúde
TBA	Ácido tiobarbitúrico
TMB	Tetrametilbenzidina
TNF	Fator de necrose tumoral
TPA	Acetato de 13-forbol-12-O-tetradecanoila
t _r	Tempo de retenção
TRAP	<i>Total peroxy radical-trapping antioxidant parameter assay</i>
TRPV-1	Receptores vaniloides de potencial de receptor transitório
TSA	Teste de suscetibilidade aos antimicrobianos
TSLP	<i>Thymic stromal lymphopoietin</i>
UFC	Unidades formadoras de colônia
UV	Ultravioleta
UV-VIS	Ultravioleta-Visível

VRE *Enterococcus* resistente à vancomicina
WHO World Health Organization

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	P 1
2	REVISÃO DA LITERATURA	3
2.1	USO POPULAR E BIODIVERSIDADE DAS PLANTAS MEDICINAIS.....	3
2.2	METABOLISMO VEGETAL.....	5
2.2.1	Substâncias fenólicas.....	7
2.2.2	Flavonoides.....	11
2.3	EXTRAÇÃO, FRACIONAMENTO E CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA.....	15
2.4	DETERMINAÇÃO DO TEOR DE METABÓLITOS ESPECIAIS.....	19
2.5	PLANTAS MEDICINAIS NO DESENVOLVIMENTO DE FITOTERÁPICOS.....	21
2.6	FAMÍLIA CRASSULACEAE.....	24
2.7	<i>BRYOPHYLLUM PINNATUM</i> (LAM.) OKEN.....	26
2.8	ASPECTOS GERAIS DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE.....	32
2.9	ASPECTOS GERAIS DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA.....	38
2.10	PROCESSOS INFLAMATÓRIOS E PRODUTOS NATURAIS.....	41
2.11	POLÍTICAS DE PLANTAS MEDICINAIS E FITOTERÁPICOS NO CONTEXTO DA PESQUISA CIENTÍFICA.....	45
3	OBJETIVOS	47
4	MATERIAL E METODOS	48
4.1	MATERIAL VEGETAL.....	48
4.2	PROCESSO DE EXTRAÇÃO E FRACIONAMENTO.....	49
4.3	PERFIL CROMATOGRÁFICO E CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA.....	49
4.4	DETERMINAÇÃO DOS TEORES DE FENÓIS TOTAIS.....	51
4.5	DETERMINAÇÃO DOS TEORES DE FLAVONOIDES TOTAIS.....	53
4.6	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE.....	55
4.6.1	Método do sequestro do radical DPPH.....	55
4.6.2	Método do poder de redução.....	56
4.6.3	Método de cooxidação do β -caroteno/ácido linoléico.....	58
4.6.4	Método da bioautografia.....	59
4.7	ATIVIDADE ANTIBACTERIANA.....	59
4.7.1	Teste de difusão em Ágar.....	60
4.7.2	Determinação da concentração inibitória mínima.....	60
4.7.3	Determinação da concentração bactericida mínima.....	61
4.8	ANIMAIS.....	61
4.9	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA TÓPICA.....	62
4.9.1	Edema de orelha induzido pela aplicação tópica de óleo de cróton.....	62
4.9.2	Edema de orelha induzido pela aplicação tópica de ácido araquidônico.....	63
4.9.3	Edema de orelha induzido pela aplicação tópica de fenol.....	63
4.9.4	Edema de orelha induzido pela aplicação tópica de capsaicina.....	64
4.9.5	Edema de orelha induzido pela aplicação tópica de etil-fenil-propriolato.....	64
4.9.6	Edema de orelha induzido pela aplicação múltipla de óleo de cróton.....	64
4.9.7	Análise histológica.....	65
4.10	ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	65

5	RESULTADOS	66
5.1	EXTRAÇÃO E FRACIONAMENTO.....	66
5.2	PERFIL CROMATOGRÁFICO E CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA.....	66
5.2.1	Perfis cromatográficos e caracterização química por cromatografia líquida de alta eficiência com detector de ultravioleta.....	66
5.2.2	Perfil cromatográfico e caracterização química por cromatografia com fase gasosa acoplada a espectrometria de massas.....	73
5.3	TEORES DE FENÓIS E FLAVONOIDES TOTAIS.....	76
5.4	ATIVIDADE ANTIOXIDANTE.....	78
5.4.1	Atividade antioxidante pelo método do sequestro do radical DPPH.....	78
5.4.2	Atividade antioxidante pelo método do poder de redução.....	80
5.4.3	Atividade antioxidante pelo método da cooxidação do β -caroteno/ácido linoléico.....	82
5.4.4	Atividade antioxidante pelo método de bioautografia.....	83
5.5	ATIVIDADE ANTIMICROBIANA.....	88
5.5.1	Atividade antibacteriana pelo método de difusão em ágar.....	88
5.5.2	Concentração inibitória mínima e concentração bactericida mínima.....	89
5.6	ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA TÓPICA.....	91
5.6.1	Efeito do extrato etanólico das folhas de <i>B. pinnatum</i> sobre o edema de orelha induzido por óleo de cróton.....	91
5.6.2	Efeito do extrato etanólico de <i>B. pinnatum</i> sobre o edema de orelha induzido por ácido araquidônico.....	92
5.6.3	Efeito do extrato etanólico de <i>B. pinnatum</i> no edema de orelha induzido por fenol.....	92
5.6.4	Efeito do extrato etanólico de <i>B. pinnatum</i> sobre o edema de orelha induzido por capsaicina.....	93
5.6.5	Efeito do extrato etanólico de <i>B. pinnatum</i> no edema de orelha induzido por etil-fenil-propriolato.....	94
5.6.6	Efeito do extrato etanólico das folhas de <i>B. pinnatum</i> sobre o edema de orelha induzido pela aplicação múltipla óleo de cróton.....	94
5.6.7	Análise histológica.....	96
6	DISCUSSÃO	102
7	CONCLUSÃO	115
	REFERÊNCIAS	116

1 INTRODUÇÃO

Em Eclesiástico (38, 4-8) encontramos: “O Senhor fez a terra produzir medicamentos: o homem sensato não os despreza”. De fato, a utilização de plantas como recurso para a melhoria das condições de vida, seja para fins medicinais ou como alimento, é uma prática que nos remete a um passado muito remoto (LORENZI; MATOS, 2008). Assim sendo, desde as antigas civilizações, como a Egípcia e Chinesa, já se conheciam e aplicavam os potenciais medicinais das plantas. Registros, como o papiro de Ebers encontrado no Egito, continham mais de 800 fórmulas e prescrições e mais de 700 substâncias de origem vegetal, mostrando a importância das plantas medicinais desde a Antiguidade (ALLEN JR et al., 2007).

Os Produtos Naturais sempre tiveram papel central na descoberta de novos fármacos e medicamentos. Newman et al. (2003) afirmam que 60% das drogas anti-carcinogênicas e 75% das drogas antimicrobianas são baseadas em produtos naturais, enquanto que Calixto (2005) relata que 25-30% dos fármacos efetivamente utilizados na terapêutica de doenças são de origem natural. Neste contexto, o conhecimento da biodiversidade e a utilização consciente dos recursos naturais constituem uma estratégia para auxiliar no desenvolvimento de um país e na melhoria da qualidade de vida da população.

O Brasil é um país privilegiado no que se refere à biodiversidade, pois possui aproximadamente 55.000 espécies catalogadas de um total estimado entre 350.000 e 550.000, correspondendo mundialmente a 22% de todas as plantas e microrganismos conhecidos. No entanto, cerca de 25.000 espécies de vegetais não foram estudadas cientificamente, demonstrando que a magnitude da biodiversidade brasileira ainda é muito pouco aproveitada (CALIXTO, 2005; GUERRA et al., 2003).

O uso das plantas medicinais no tratamento de doenças, baseado no conhecimento popular acumulado com o passar do tempo e transmitida de geração para geração, constitui a Medicina Tradicional (MUTHUIRULAPPAN; RAJENDREN, 2013). Este ramo do conhecimento deu origem a Fitoterapia que é definida como a prática do uso de plantas ou suas partes com finalidade terapêutica (FELTROW; AVILA, 2000). Na realidade, 80% da população mundial dependem das práticas tradicionais e, desta, 85% utilizam plantas ou preparações vegetais, especialmente na atenção primária à saúde (BRASIL, 2006c; SOUSA et al., 2008).

A busca da população pela fitoterapia aumentou o interesse dos pesquisadores e da indústria farmacêutica em investir em pesquisa, desenvolvimento e inovação tecnológica.

Partindo desse princípio, diversas áreas estão envolvidas na pesquisa com plantas medicinais, visando evidenciar cientificamente o uso tradicional das plantas e seus derivados. Para isto, equipes multidisciplinares de pesquisadores, com apoio da Organização Mundial da Saúde (OMS), têm se empenhado em gerar conhecimento para manter a qualidade, eficácia e segurança dos fitoterápicos (ALBUQUERQUE; HANAZAKI, 2006; SOUSA et al., 2008).

Para iniciar um estudo sobre plantas medicinais, os pesquisadores podem considerar as seguintes abordagens: etnobotânica e/ou quimiosistemática e/ou ao acaso (ALBUQUERQUE; HANAZAKI, 2006). Normalmente, a abordagem etnobotânica que visa, principalmente, avaliar e caracterizar os aspectos químicos e farmacológicos das plantas tem sido utilizada para fundamentar os usos tradicionais. Por exemplo, Okwu e Nnamdi (2011b), partindo do uso popular de *Bryophyllum pinnatum* (Crassulaceae) no tratamento de infecções em feridas, isolaram dois flavonoides do extrato etanólico das folhas com atividade antimicrobiana, evidenciando o uso popular da espécie e abrindo perspectivas para obtenção de novos fármacos e medicamentos.

Bryophyllum pinnatum (Lam.) Oken, popularmente conhecida como “folha-da-fortuna”, pertencente à família Crassulaceae, é nativa em diferentes regiões temperadas do mundo, sendo encontrada na América do Sul, como Brasil, e em regiões da África (EL ABDELLAOUI et al., 2010). Popularmente, é utilizada no tratamento de inflamações, infecções, contusões, ferimentos, queimaduras, processos alérgicos, gastrite, problemas de fígado, diabetes, verminoses, dentre outras (BISWAS et al., 2011; LORENZI; MATOS, 2008; MAJAZ et al., 2011). Com base no uso popular e em estudos fitoquímicos e farmacológicos, que evidenciam o potencial terapêutico da espécie, a presente proposta teve como objetivo caracterizar quimicamente os derivados vegetais obtidos das folhas de *B. pinnatum* e avaliar as atividades anti-inflamatória tópica, antioxidante e antibacteriana.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 USO POPULAR E BIODIVERSIDADE DAS PLANTAS MEDICINAIS

A utilização de plantas medicinais, aromáticas e condimentares acompanha a história evolutiva da humanidade e, os produtos derivados têm sido aplicados na terapêutica, alimentação e cosmética, constituindo fatores cruciais para a sobrevivência e melhoria da qualidade de vida do homem. A Medicina Tradicional Chinesa, desde seu início, por volta de 1027 a.C., tem acumulado conhecimento a cerca da Farmácia e Medicina, constituindo assim um exemplo vivo do uso ancestral de plantas medicinais na terapêutica (SAMPAIO, 2002).

O uso das plantas medicinais no tratamento de doenças encontra-se apoiado no Sistema Tradicional de Medicina ou Medicina Tradicional, cuja prática é transmitida através das gerações, dando origem a Fitoterapia (MUTHUIRULAPPAN; RAJENDREN, 2013). A Fitoterapia, uma das terapias complementares e alternativas, difundiu-se mundialmente e é definida como a prática do uso de plantas ou suas partes com finalidade terapêutica (FELTROW; AVILA, 2000). Essa prática tem sido frequentemente utilizada na atenção primária à saúde, pois 80% da população mundial dependem de terapias alternativas, especialmente de plantas ou preparações de origem vegetal (BRASIL, 2006c).

Considerando o comércio de fitoterápicos, o mercado mundial movimentava cerca de US\$ 12,4 bilhões por ano e, em países desenvolvidos, 25% do receituário médico referem-se aos fitoterápicos e fitofármacos, enquanto nos países em desenvolvimento atinge aproximadamente 80% (GUERRA et al., 2003). Esses números refletem a importância do uso popular de plantas medicinais e como o conhecimento tradicional é difundido através da pesquisa científica (ABRÃO, 2010). Exemplos de fármacos obtidos a partir de espécies vegetais que têm sido utilizados pela medicina moderna estão listados na Tabela 1. No entanto, não constam no Formulário de Fitoterápicos da Farmacopeia Brasileira.

Quando os primeiros europeus chegaram ao Brasil se depararam com o extenso uso de inúmeras plantas medicinais pelos índios (LORENZI; MATOS, 2008). Dentro do contexto da importância econômica e social das plantas medicinais na obtenção de fitofármacos e fitoterápicos, o Brasil é um país com imenso potencial para gerar inovação na área de Produtos Naturais, uma vez que possui uma abundante biodiversidade. Do ponto de vista mundial, aproximadamente 22% de todas as plantas e microrganismos conhecidos são encontrados em território nacional. Além disso, cerca de 25.000 espécies de plantas ainda não

foram estudadas, demonstrando o potencial obsoleto da magnitude da biodiversidade brasileira (CALIXTO, 2005).

Tabela 1. Exemplos de fármacos obtidos de matérias-primas vegetais.

Fármaco	Classe fitoquímica/Classe terapêutica	Espécie vegetal
Artemisina	Terpenoide/Antimalárico	<i>Artemisia annua</i>
Aspirina	Salicilato/Analgésico, Anti-inflamatório	<i>Salix alba</i>
Atropina	Alcaloide/Anticolinérgico	<i>Atropa beladonna</i>
Capsaicina	Alcaloide/Anestésico tópico	<i>Capsicum</i> spp.
Cafeína	Alcaloide/Estimulante do SNC	<i>Cammelia sinensis</i>
Cocaína	Alcaloide/Anestésico	<i>Erythroxylum coca</i>
Colchicina	Alcaloide/Antirreumático	<i>Colchicum autumnale</i>
Dicumarol	Cumarina/Anticoagulante	<i>Melilotus officinalis</i>
Digoxina	Glicosídeo esteroidal/Cardiotônico	<i>Digitalis purpúrea</i>
Escopolamina	Alcaloide/Anticolinérgico	<i>Datura stramonim</i>
Morfina	Alcaloide/Analgésico	<i>Papaver somniferum</i>
Pilocarpina	Alcaloide/Antiglaucomatoso	<i>Pilocarpus jaborandi</i>
Quinina	Alcaloide/Antimalárico	<i>Cinchona</i> spp.
Taxol	Terpenoide/Antitumoral	<i>Taxus brevifolia</i>
Vimblastina	Alcaloide/Aantineoplásico	<i>Catharanthus roseus</i>
Vincristina	Alcaloide/Antineoplásico	<i>Catharanthus roseus</i>

Fonte: Adaptado de Schenkel; Gosman; Petrovick (2003).

Gottlieb e outros (1998, p. 98) definem com rara clareza a importância da biodiversidade e mais, como devemos buscar entendê-la:

Biodiversidade hoje no Brasil – uma das últimas fronteiras biológicas do mundo – constitui importante fonte de riqueza. No entanto, seu impacto para a garantia do bem-estar e da saúde do povo somente será atingido por meio do conhecimento das interações recíprocas dos organismos. Essa meta exige o discernimento da linguagem da natureza a fim de que se possa entender, participar e interferir no seu funcionamento. Que não haja dúvida a respeito: a maior parte dessa forma de comunicação é constituída por vocábulos químicos.

2.2 METABOLISMO VEGETAL

O termo metabolismo, em todos os seres vivos, refere-se ao conjunto de reações químicas vitais que ininterruptamente ocorrem nas células. As reações do metabolismo compõem as vias metabólicas, visam fornecer energia na forma de ATP e moléculas precursoras essenciais para a manutenção da vida e podem ser anabólicas, catabólicas ou de biotransformação. Todas estas reações são catalisadas por enzimas e envolvem, respectivamente, formação, degradação e transformação de biomoléculas, denominadas de metabólitos (SANTOS, 2003; UDAYAKUMAR et al., 2012).

As vias metabólicas que dão origem às macromoléculas (carboidratos, proteínas, lipídeos e ácidos nucléicos) compõem o metabolismo primário e os produtos de suas reações são classificados como metabólitos primários, os quais são essenciais para o desenvolvimento e sobrevivência dos organismos (DEWICK, 2009). No reino vegetal, as vias do metabolismo primário, além de fornecer as bases moleculares dos organismos, também geram precursores químicos para as vias do metabolismo secundário, responsável por prover às espécies vegetais os metabólitos secundários ou especiais (produtos naturais – PN), substâncias funcionais na adaptação, diferenciação e especialização (DEWICK, 2009; SANTOS, 2003).

O conjunto de todos os metabólitos vegetais, primários e especiais, é denominado de metaboloma e à sua análise qualitativa e quantitativa atribui-se o termo Metabolômica. Os metabólitos primários são comuns a todas as plantas, porém os metabólitos especiais são espécie-específicos e variam de acordo com o material genético do vegetal e com a expressão de enzimas específicas. Dessa forma, o metaboloma varia entre as espécies vegetais, porém estudos quimiosistemáticos demonstram que entre espécies de um mesmo gênero e/ou uma mesma família existem semelhança na biossíntese de constituintes (GOTTLIEB, 1990; LARSSON, 2007; UDAYAKUMAR et al., 2012; VERPOORTE; CHOI; KIM, 2007).

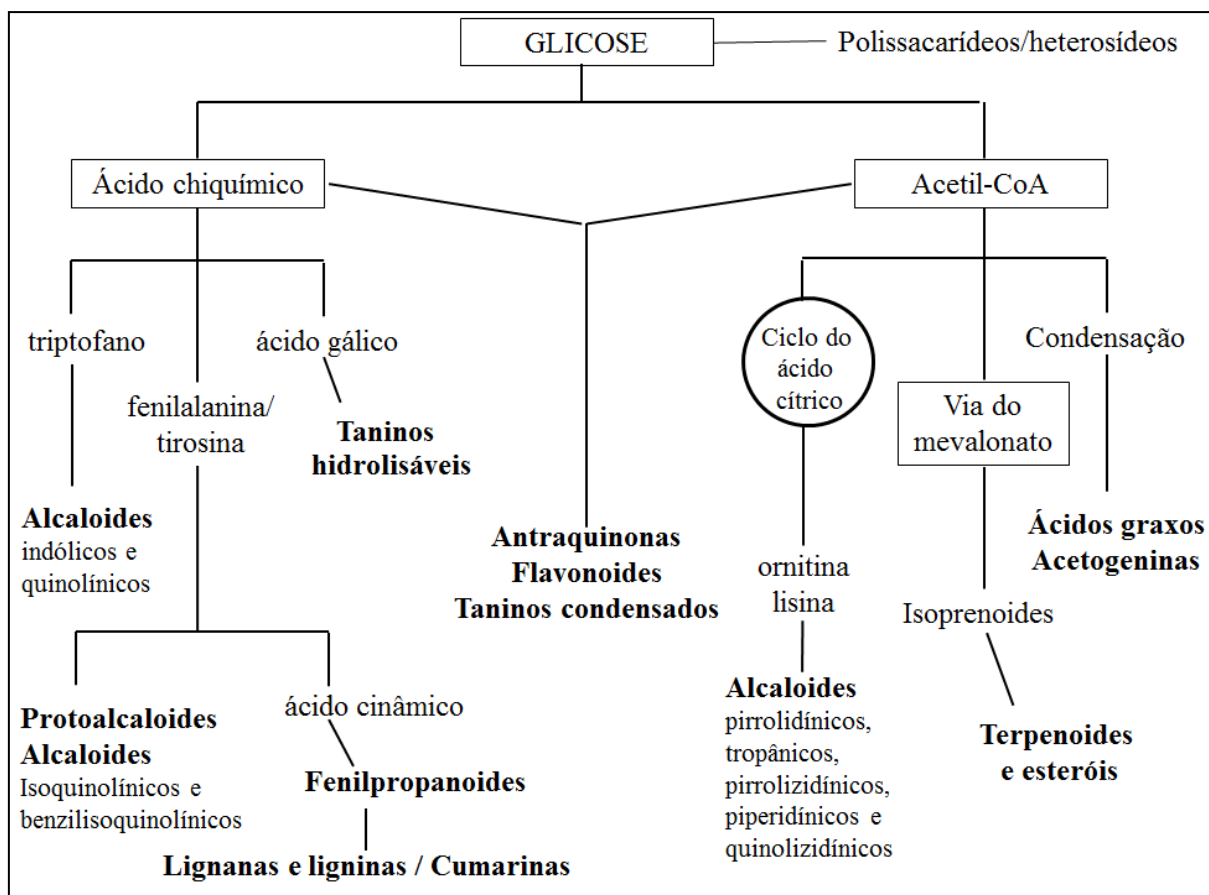
O metabolismo secundário vegetal e seus metabólitos por muito tempo foram considerados produtos de excreção dos vegetais e dessa forma, cientificamente irrelevantes (SANTOS, 2003; VERPOORTE, 1998). As plantas colonizaram a maior parte da superfície do planeta, perfazendo por si só a maior porcentagem de biomassa terrestre, superando todas as outras formas de vida juntas. Isso se deve basicamente ao elevado nível de especialização e interrelação com o ambiente biótico e abiótico, e gradualmente, a importância dos metabólitos especiais para adaptação, diferenciação e especialização dos vegetais foi reconhecida e comprovada por diversos estudos. Prova da importância dessas substâncias para os vegetais é o fato de que a energia gasta para sua síntese é geralmente muito maior do que a energia

necessária para a síntese dos metabólitos primários (JIRSCHITZKA et al., 2013; KENNEDY; WIGHTMAN, 2011; NEILSON et al., 2013; SANTOS, 2003; VERPOORTE, 1998).

Os metabólitos especiais são um grupo diversificado com mais de 200.000 substâncias e sua produção e concentração nos vegetais varia por diversos fatores como estágio de desenvolvimento, tipo de tecido e fatores ambientais diversos (GOBBO-NETO, LOPES, 2006; NEILSON et al., 2013). Esses fitoconstituintes podem ser produzidos, bioquimicamente induzidos e/ou ativados; atuam na proteção contra herbívoros e microorganismos, contra radiação UV, radicais livres, agentes antiproliferativos, na atração de polinizadores e animais dispersores de sementes, além de efeito alelopático e outras interações ecológicas (KENNEDY; WIGHTMAN, 2011; SANTOS, 2003; VERPOORTE, 1998).

Através da origem biossintética, usando como precursores o ácido chiquímico e o acetil-CoA, os metabólitos especiais podem ser divididos em três grupos principais: terpenoides, alcaloides e os fenilpropanoides e demais derivados fenólicos (Figura 1) (CROTEAU; KUTCHAN; LEWIS, 2000). Esses grupos de substâncias podem constituir potenciais alvos terapêuticos para o isolamento e a síntese de novos fármacos com diferentes atividades biológicas (DA CRUZ et al., 2013; HOSSAIN et al., 2011; HUANG et al., 2012; LIU et al., 2012; PRONIN; SHENVI, 2012; SINGH; SHARMA, 2013).

Figura 1. Principais vias biossintéticas dos metabólitos especiais.



Fonte: Adaptado de Santos (2003).

2.2.1 Substâncias fenólicas

Substâncias fenólicas constituem uma classe de metabólitos especiais heterogêneas e abundantes nos vegetais com aproximadamente 8.000 substâncias identificadas. A presença de um anel aromático com, no mínimo, uma hidroxila ligada caracteriza unidade fenólica (DAI; MUMPER, 2010; SOTO-VACA et al., 2012). Considerando o número de unidades fenólicas, essas substâncias são divididas em fenóis simples e polifenóis com estruturas básicas de fenóis simples, ácidos fenólicos (derivados do ácido benzóico e do ácido cinâmico), cumarinas, estilbenos, chalconas, flavonoides, taninos (hidrolisáveis e condensados), lignanas e ligninas (Tabela 2 e Figura 2) (STALIKAS, 2007; TSAO, 2010).

A via do ácido chiquímico dá origem aos principais fenólicos, porém os flavonoides, taninos e antraquinonas são biossintetizados pela via mista acetato-chiquimato (Figura 1). Fenólicos provenientes da via do chiquimato possuem grupos hidroxilas em posição *orto*,

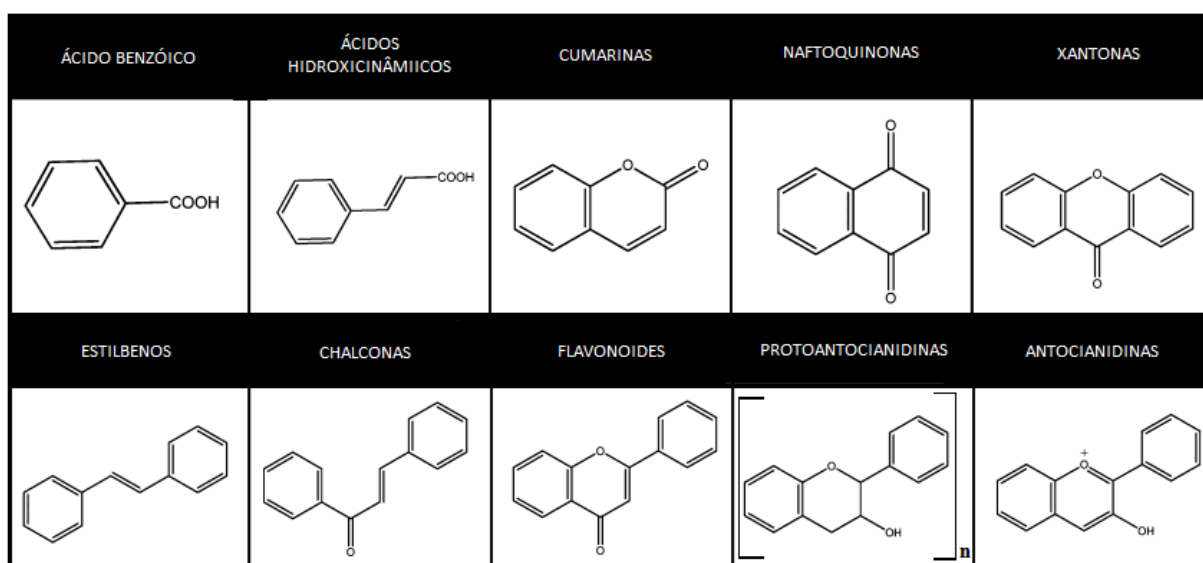
enquanto a via acetato-chiquimato produz substâncias com hidroxila na posição *meta* (CARVALHO; GOSMANN; SCHENKEL, 2003; DEWICK, 2009).

Tabela 2. Classificação das substâncias fenólicas de acordo com estrutura básica.

Estrutura básica	Classes de substâncias fenólicas
C6	Fenóis simples, benzoquinonas
C6-C1	Ácidos fenólicos
C6-C2	Acetofenonas e ácidos fenilacéticos
C6-C3	Fenilpropanoides: ácidos cinâmicos e derivados, fenilpropenos, cumarinas, isocumarinas e cromonas
C6-C4	Naftoquinonas
C6-C1-C6	Xantonas
C6-C2-C6	Estilbenos, antraquinonas
C6-C3-C6	Flavonoides e isoflavonoides
(C6-C3) ₂	Lignan
(C6-C3-C6) ₂	Diflavonoides
(C6) _n	Melaninas vegetais
(C6-C3) _n	Ligninas
(C6-C1) _n	Taninos hidrolisáveis
(C6-C3-C6) _n	Taninos condensados

Fonte: Carvalho; Gosmann; Schenkel (2003).

Figura 2. Estrutura básica das principais classes de substâncias fenólicas.



Fonte: Adaptado de Soto-Vaca e outros (2012).

A via do ácido chiquímico é responsável por consumir aproximadamente 20% do carbono fixado pelos vegetais, gerando entre outros produtos, os aminoácidos aromáticos L-fenilalanina (L-Phe), L-tirosina (L-Tyr) e L-triptofano (L-Trp) usados na síntese de proteínas, derivados fenólicos e alguns alcaloides. Entre o metabolismo primário e secundário encontra-se a fenilalanina amônia liase (PAL) que catalisa a eliminação de amônia da L-Phe, sintetizando os derivados fenólicos, mais especificamente fenilpropanoides e seus derivados (HERRMANN; ENTUS, 2001; IBRAHIM, 2001a).

Nas plantas, a maior taxa de substâncias fenólicas ocorre durante o seu desenvolvimento e em condições adversas (p.ex.: excesso de radiação UV, infecções microbianas e danos teciduais), onde a atividade da PAL é aumentada devido à supra-expressão (DAI; MUMPER, 2010; IBRAHIM, 2001; STALIKAS, 2007). Desta forma, através de suas propriedades biológicas, como ação antioxidante e antimicrobiana, os derivados fenólicos atuam na defesa das plantas e são responsáveis pelas características organolépticas de espécies vegetais, conferindo sabor, odor e cor (KHODDAMI; WILKES; ROBERTS, 2013; SOTO-VACA et al., 2012; STALIKAS, 2007).

Diversos potenciais farmacológicos dos fenólicos, como antineoplásico, antioxidante e anti-inflamatório, já foram evidenciados que justificam suas ações na prevenção de doenças degenerativas (câncer), cardiovasculares, neuro-degenerativas e outras (BONOLI et al., 2004; HOSSAIN et al., 2011; PEDRESCHI; CISNEROS-ZEVALLOS, 2006; TSAO, 2010; ZHANG et al., 2011;). De acordo com Dai; Mumper (2010), o potencial antioxidante desses constituintes é maior que o das vitaminas C e E, e carotenóides e os principais mecanismos envolvem o sequestro de radicais livres (ERO/ERN), inibição da formação de radicais livres e suprarregulação ou proteção da defesa antioxidante intrínseca das células.

Na natureza, os fenóis simples e os polifenóis são geralmente encontrados na forma de ésteres ou heterosídeos, sendo solúveis em água e solventes polares. São altamente reativos, as hidroxilas fenólicas possuem características ácidas, conferindo elevada solubilidade em meio levemente alcalino, o que facilita o isolamento. Formam ligação de hidrogênio intra e intermolecular que permite a complexação com proteínas e metais. Devido à aromaticidade, com sistema π (π) conjugado, absorvem radiação na região do ultravioleta (UV) (CARVALHO; GOSMANN; SCHENKEL, 2003; DAI; MUMPER, 2010; STALIKAS, 2007).

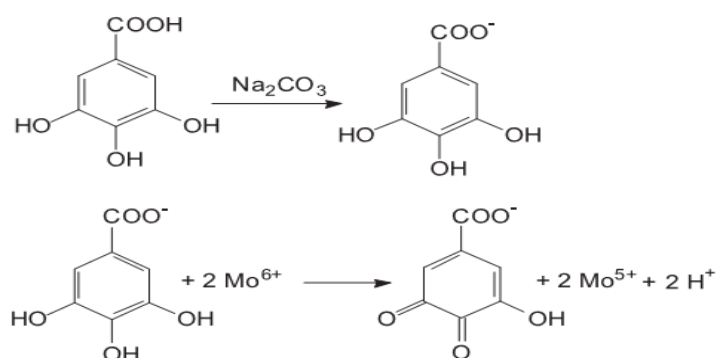
Devido à diversidade estrutural, os fenólicos variam significativamente em relação às propriedades fitoquímicas, tornando ainda a extração, isolamento e identificação um grande desafio. Podem ser obtidos a partir de extrato etanólico ou hidroalcoólico e sua detecção é

realizada por reações colorimétricas e por cromatografia em camada delgada (CCD) com revelação através de radiação UV e/ou reagentes cromogênicos como o cloreto férrico (FeCl_3) (CARVALHO; GOSMANN; SCHENKEL, 2003; WAGNER; BLADT, 1995).

O isolamento e a identificação de substâncias fenólicas podem ser realizados por CCD (preparativa), cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e cromatografia gasosa (CG), e confirmados por métodos espectroscópicos como espectrometria no ultravioleta e visível (UV-Vis), infravermelho (IV), massas (EM) e ressonância magnética nuclear de carbono e hidrogênio (RMN-C e H) (CARVALHO; GOSMANN; SCHENKEL, 2003; DAI; MUMPER, 2010; TSAO, 2010). Para a quantificação de polifenóis, CLAE acoplada a detector UV com arranjo de diodos (UV-DAD) e/ou de EM é o método mais adequado, porém métodos de espectrofotometria no UV-Vis, devido à sua simplicidade, têm sido muito utilizado (KOMAROVA et al., 2009; STALIKAS, 2007).

O ensaio de Folin-Ciocalteu é um dos métodos mais utilizados para a determinação de fenóis totais através de espectrofotometria na região do UV-Vis (DAI; MUMPER, 2010; STALIKAS, 2007). Esse reagente consiste da mistura dos ácidos fosfomolibdico e fosfotúngstico, no qual o molibdênio e o tungstênio encontram-se no estado de oxidação 6^+ . Na presença de agentes redutores, como as substâncias fenólicas, formam-se os chamados molibdênio azul e tungstênio azul, nos quais a média do estado de oxidação dos metais está entre 5 e 6 (Figura 3) e cuja coloração, com espectro de absorção de luz próximo de 760 nm, permite a determinação dos teores das substâncias redutoras. O ensaio possui baixa seletividade e não detecta todos os grupos de substâncias fenólicas do extrato, além de haver a possibilidade de outros constituintes com potencial redutor interferirem (OLIVEIRA et al., 2009; KHODDAMI; WILKES; ROBERTS, 2013; SOUSA et al., 2007; STALIKAS, 2007).

Figura 3. Reação do ácido gálico (derivado do ácido benzóico), em meio levemente alcalino, com molibdênio do reagente de Folin-Ciocalteu.



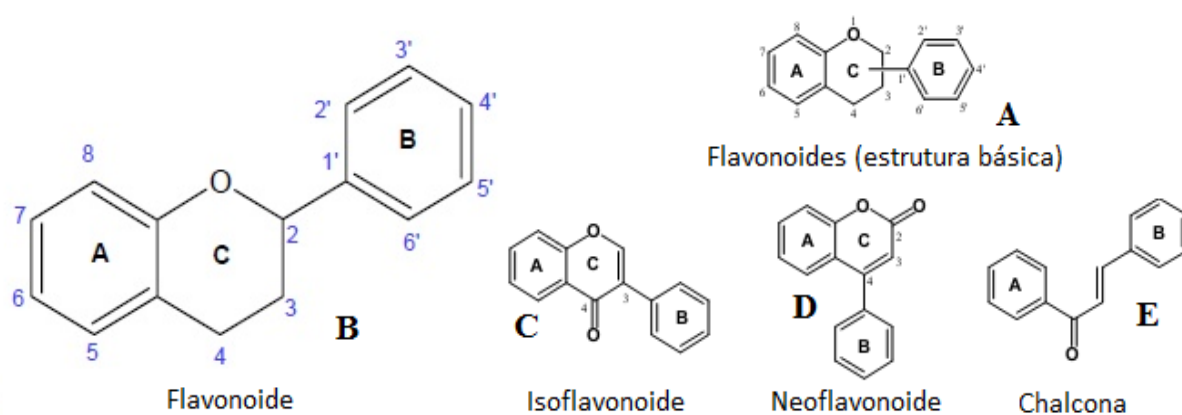
Fonte: Oliveira e outros (2009).

2.2.2 Flavonoides

Os flavonoides constituem o maior, mais diversificado e importante grupo de polifenóis, com mais de 5.000 substâncias identificadas. Na natureza, essas substâncias são geralmente encontradas na forma de heterosídeos ligadas a moléculas de açúcar ou, menos freqüente, na forma livre ou aglicona (IBRAHIM, 2001b; SOTO-VACA et al., 2012; ZUANAZZI; MONTANHA, 2003). Possuem estrutura molecular básica de 15 carbonos (C_{15}), representada na Figura 4A e B, do tipo fenilbenzopirano ($C_6-C_3-C_6$), que consiste em dois anéis aromáticos A e B (C_6), ambos de natureza fenólica, e um anel heterocíclico C (C_3) contendo um oxigênio como heteroátomo (IBRAHIM, 2001b; TSAO, 2010).

O termo “flavonoides” é amplo e agrega diferentes subclasses e grupos. De acordo com a posição do anel aromático B na porção benzopirano (anéis A e C fundidos), os flavonoides podem ser divididos em três subclasses: flavonoides (Figura 4B), cujo anel B está ligado ao C2; isoflavonoides (Figura 4C), cujo anel B está ligado ao C3 e neoflavonoides (Figura 4D), cujo anel B está ligado ao C4. Existem outras poucas variações que ocorrem em flavonoides minoritários (ARON; KENNEDY, 2008; PEREIRA et al., 2009).

Figura 4. Estruturas básicas dos flavonoides e suas subclasses.

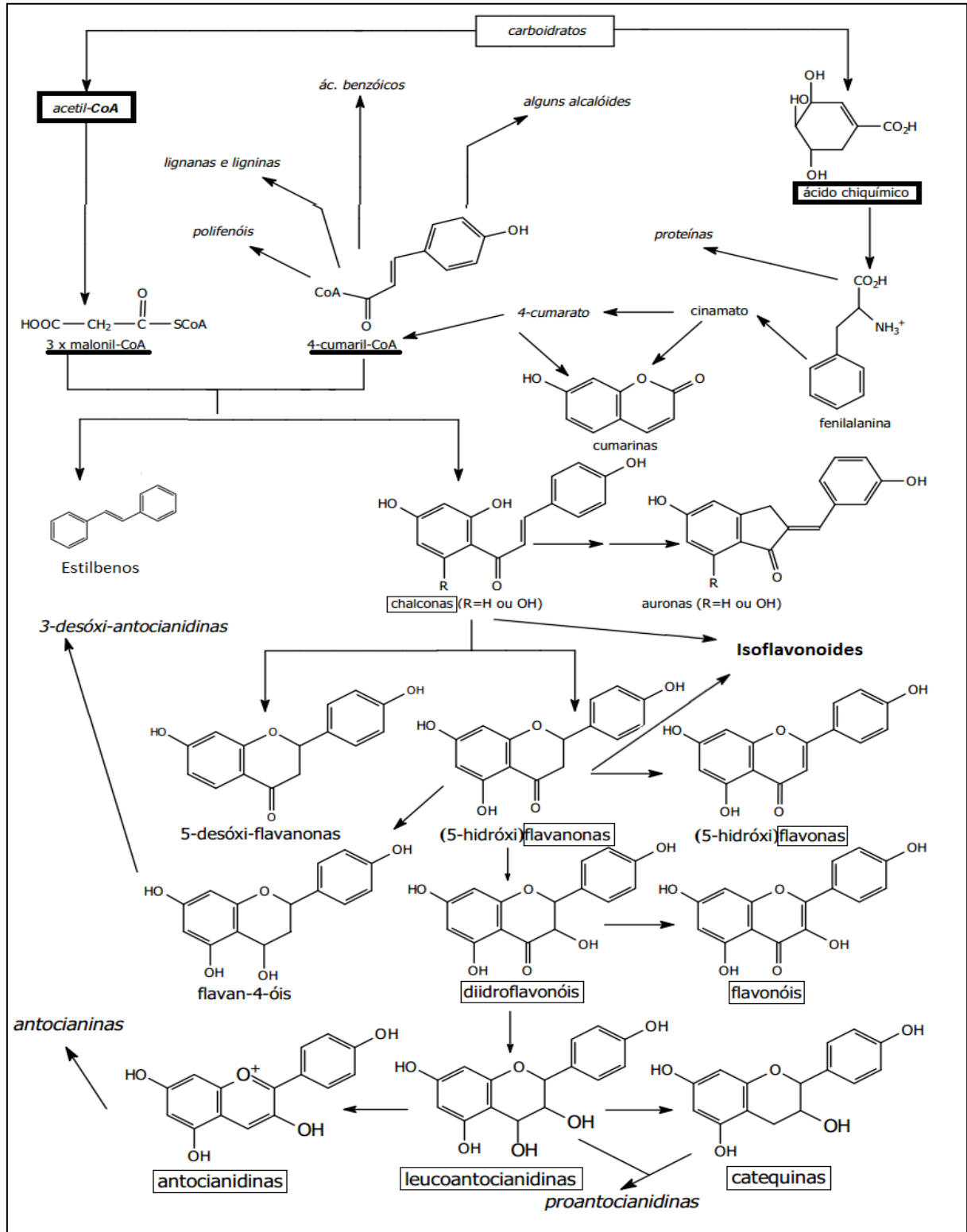


Fonte: Adaptado de Tsao (2010).

Os flavonoides são classificados em diferentes grupos (Figura 5) baseando-se no estado de oxidação do anel C, os principais são: flavanonas, flavonas, diidroflavonóis (flavanonóis), flavonóis, flavan-3,4-dióis (leucoantocianidinas), antocianidinas e flavan-3-óis (catequinas). As chalconas (Figura 4E), apesar de não possuir o anel C também integram essa

classe, assim como as auronas (Figura 5), cujo anel C é pentacíclico sem heteroátomo (DEWICK, 2009; IBRAHIM, 2001b; TSAO, 2010).

Figura 5. Esquema simplificado da biossíntese de flavonoides.



Fonte: Adaptado de Zuanazzi; Montanha (2003).

A biossíntese dos derivados flavonoídicos C_{15} ($C_6-C_3-C_6$) ocorre pela via mista acetato-chiquimato, tendo como precursores uma unidade cinamoil-SCoA e três moléculas de malonil-SCoA, em reações catalisadas pela enzima chalcona sintase (CHS), uma policetídeo sintase (PKS III). Na Figura 5 é mostrado o esquema simplificado da biossíntese de flavonoides. A unidade cinamoil-SCoA (p.ex.: 4-cumaroil-SCoA) é um fenilpropanoide (C_6-C_3), derivado do ácido cinâmico a partir da L-Phe, pela via do ácido chiquímico e, na molécula do flavonoide, corresponde ao anel B e sua cadeia adjacente de três carbonos (C_6-C_3). As moléculas de malonil-SCoA provêm da via do acetato e são adicionadas sequencialmente à unidade cinamoil-SCoA pela CHS, correspondendo na molécula do flavonoide ao anel A (C_6) (DEWICK, 2009; IBRAHIM, 2001b).

A condensação cabeça-cauda das três moléculas de malonil-SCoA à unidade cinamoil-SCoA forma inicialmente um policetídeo, que pode ser dobrado de duas formas diferentes, levando à formação de estilbenos ou chalconas, sendo que a última da origem aos demais derivados flavonoídicos (DEWICK, 2009). Os flavonoides podem sofrer posteriormente reações enzimáticas de hidroxilação, metilação, glicosilação, sulfonação, acilação e prenilação, resultando na grande diversidade estrutural dessa classe, com mais de 5.000 substâncias naturais já identificadas (IBRAHIM, 2001b). Alguns dos flavonoides mais comuns são a naringenina (flavanona), luteolina e apigenina (flavonas), quercetina e canferol (flavonóis) e catequina (flavan-3-ol) (DAI; MUMPER, 2010).

Nos vegetais, os flavonoides estão presentes em praticamente todos os tecidos, principalmente nos vacúolos. Suas atividades biológicas dependem das características estruturais e do padrão de glicosilação (TSAO, 2010). Os flavonoides são os principais responsáveis pela pigmentação (coloração) das folhas, flores, frutos e sementes, influenciando dessa forma na atração de polinizadores e outras formas de interação vegetal-ambiente. As antocianidinas são a principal classe de pigmentos, juntamente com clorofila e carotenoides, conferindo coloração de vermelho a azul. Outros grupos de derivados flavonoídicos, como flavonas e flavonóis possuem coloração amarela e participam na copigmentação (IBRAHIM, 2001b; STALIKAS, 2007; WINKEL-SHIRLEY, 2001).

Além de conferir pigmentação às plantas, os flavonoides exercem diversas outras funções comuns às substâncias fenólicas em geral, como na sinalização planta-microrganismos, atividade antimicrobiana, proteção UV (ação antioxidante), alelopatia e deterrentes alimentares (STALIKAS, 2007; WINKEL-SHIRLEY, 2001). Os flavonoides também têm sido estudados extensivamente a partir das perspectivas de proteção da saúde e atividades farmacológicas. Estudos sugerem que diferentes derivados flavonoídicos possuem

diversas atividades farmacológicas, dentre as quais se destacam atividade antitumoral, antiviral, anti-hemorrágica, hormonal, anti-inflamatória, antioxidante e antimicrobiana (BUER; IMIN; DJORDJEVIC, 2010; CHOI, 2012; COUTINHO; MUZITANO; COSTA, 2009; HAM et al., 2012; WU et al., 2011; ZHANG et al., 2011; ZUANAZZI; MONTANHA, 2003).

Os flavonoides possuem as características químicas comuns aos derivados fenólicos, descritas no item 2.2.1. A posição da porção açúcar, grau de insaturação e substituição e natureza dos substituintes determinam as características de solubilidade e capacidade de precipitação com proteínas e metais (ZUANAZZI; MONTANHA, 2003). A extração de flavonoides é geralmente realizada em material vegetal seco, sendo que os heterosídeos (e algumas agliconas mais polares) são mais solúveis em álcoois, água e misturas hidroalcoólicas, enquanto as agliconas são mais solúveis em solventes orgânicos (p.ex.: diclorometano e acetato de etila), bem como em soluções aquosas alcalinas, devido ao caráter fenólico. O risco de hidrólise dos heterosídeos, resultando na forma livre, é um fator limitante na escolha das condições (p.ex.: temperatura e pH) de extração e isolamento de flavonoides (FERREIRA; PINHO, 2012; ZUANAZZI; MONTANHA, 2003).

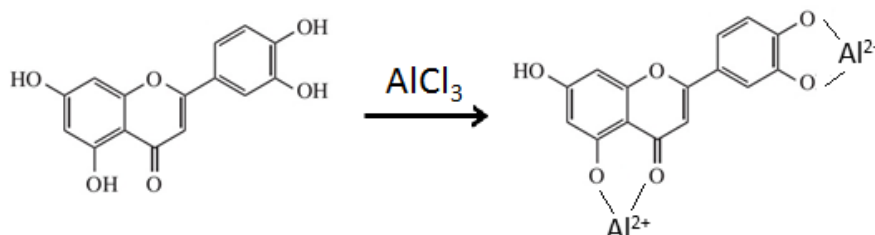
A detecção de flavonoides, no material vegetal e/ou derivados, é realizada classicamente por reações colorimétricas de prospecção fitoquímica e por CCD com revelação através de radiação UV e/ou reveladores químicos como o cloreto de alumínio ($AlCl_3$) e NP-PEG (WAGNER; BLADT, 1995; ZUANAZZI; MONTANHA, 2003). O isolamento e identificação dessas substâncias podem ser realizados por cromatografia (CCD, CLAE e CG) e confirmada por métodos espectroscópicos (UV-Vis, IV, EM e RMN) (DAI; MUMPER, 2010; TSAO, 2010; ZUANAZZI; MONTANHA, 2003).

A determinação de flavonoides em amostras de origem vegetal é realizada da forma mais eficiente através de CLAE com coluna de fase reversa (p. ex.: C18) acoplada a detector UV com arranjo de diodos (UV-DAD) e/ou de EM. Porém, a análise quantitativa de flavonoides totais por espectrofotometria na região do UV-Vis, devido à sua simplicidade, é o método colorimétrico com cloreto de alumínio ($AlCl_3$) mais utilizado (KOMAROVA et al., 2009; MARQUES et al., 2012, 2013; STALIKAS, 2007).

O método colorimétrico com cloreto de alumínio tem sua utilização também descrita para ácido caféico e taninos, porém apresenta boa seletividade para flavonoides, pois se baseia na formação de um complexo estável entre o flavonoide e Al(III) (Figura 6), provindo da ionização do $AlCl_3$, que interage com os grupos carbonila e hidroxila livres das moléculas, gerando extensão do sistema conjugado e conseqüentemente um deslocamento batocrômico

(desloca a faixa de absorção para um comprimento de onda maior) e um efeito hiperacrômico (aumenta a intensidade da absorção), de modo que o espectro de absorção do complexo encontra-se entre 410 e 423 nm (FERNANDES et al., 2012; KHODDAMI; WILKES; ROBERTS, 2013; MARQUES et al., 2012; STALIKAS, 2007).

Figura 6. Formação do complexo entre o flavonoide (luteolina) e Al.



Fonte: Adaptado de Markham (1982).

2.3 EXTRAÇÃO, FRACIONAMENTO E CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA

Na investigação química e farmacológica de plantas medicinais, a coleta adequada, incluindo o registro de todos os dados, é a primeira etapa que fornece a matéria-prima para o processo de extração e análises fitoquímicas (FALKENBERG; SANTOS; SIMÕES, 2003; AZMIR et al., 2013). Dependendo de quais constituintes químicos pretende-se obter, a extração pode ser feita na matéria-prima vegetal fresca ou seca. A extração da droga vegetal fresca (rasurada) é realizada principalmente para obtenção de óleos essenciais e outros constituintes voláteis que exigem imediata utilização ou conservação em baixas temperaturas (FALKENBERG; SANTOS; SIMÕES, 2003). Quando se trabalha com droga vegetal seca, anteriormente à extração, realiza-se a moagem para a redução granulométrica, visando facilitar o manuseio e armazenamento, bem como a extração dos constituintes químicos, pois aumenta a superfície de contato da droga com o solvente extrator (FALKENBERG; SANTOS; SIMÕES, 2003; ZYGMUNT; NAMIESNIK, 2003).

A extração é o processo de obtenção, da maneira mais seletiva e eficiente, das substâncias ou frações ativas da droga vegetal, e para isso é utilizado um solvente ou mistura de solventes tecnologicamente apropriados (SONAGLIO et al., 2003). Existem diversas metodologias para o preparo de extratos vegetais, porém, antes de se iniciar uma extração, é necessário considerar diversos fatores que compõem e influenciam esta operação, dentre eles destacam-se: as características da droga vegetal (p.ex: tipo de tecido e granulometria),

características físico-químicas dos constituintes, propriedades extrativas e adequação do(s) solvente(s) e características dos métodos (FALKENBERG; SANTOS; SIMÕES, 2003).

O(s) solvente(s) extrator(es) é(são) escolhido(s) de acordo com: suas propriedades extrativas, ou seja, a eficiência e seletividade com que ele solubiliza, à temperatura ambiente, as substâncias de interesse; adequação tecnológica e nível de toxicidade (SONAGLIO et al., 2003). Quando a extração é direcionada visando extrair seletivamente determinada classe de metabólitos especiais, a escolha do solvente é feita baseando-se principalmente na polaridade das substâncias de interesse (Tabela 3).

Tabela 3. Principais metabólitos especiais extraídos por diferentes solventes de acordo com a polaridade.

Solventes	Metabólitos especiais extraídos
Éter de petróleo e hexano	Lipídeos, ceras, pigmentos e furanocumarinas
Tolueno, diclorometano e clorofórmio	Bases livres de alcaloides, antraquinonas livres, óleos voláteis e glicosídeos cardiotônicos
Acetato de etila e <i>n</i> -butanol	Flavonoides e cumarinas simples
Etanol e metanol	Heterosídeos em geral
Misturas hidroalcoólicas e água	Saponinas e taninos
Água acidificada	Alcaloides
Água alcalinizada	Saponinas

Fonte: Falkenberg; Santos; Simões (2003).

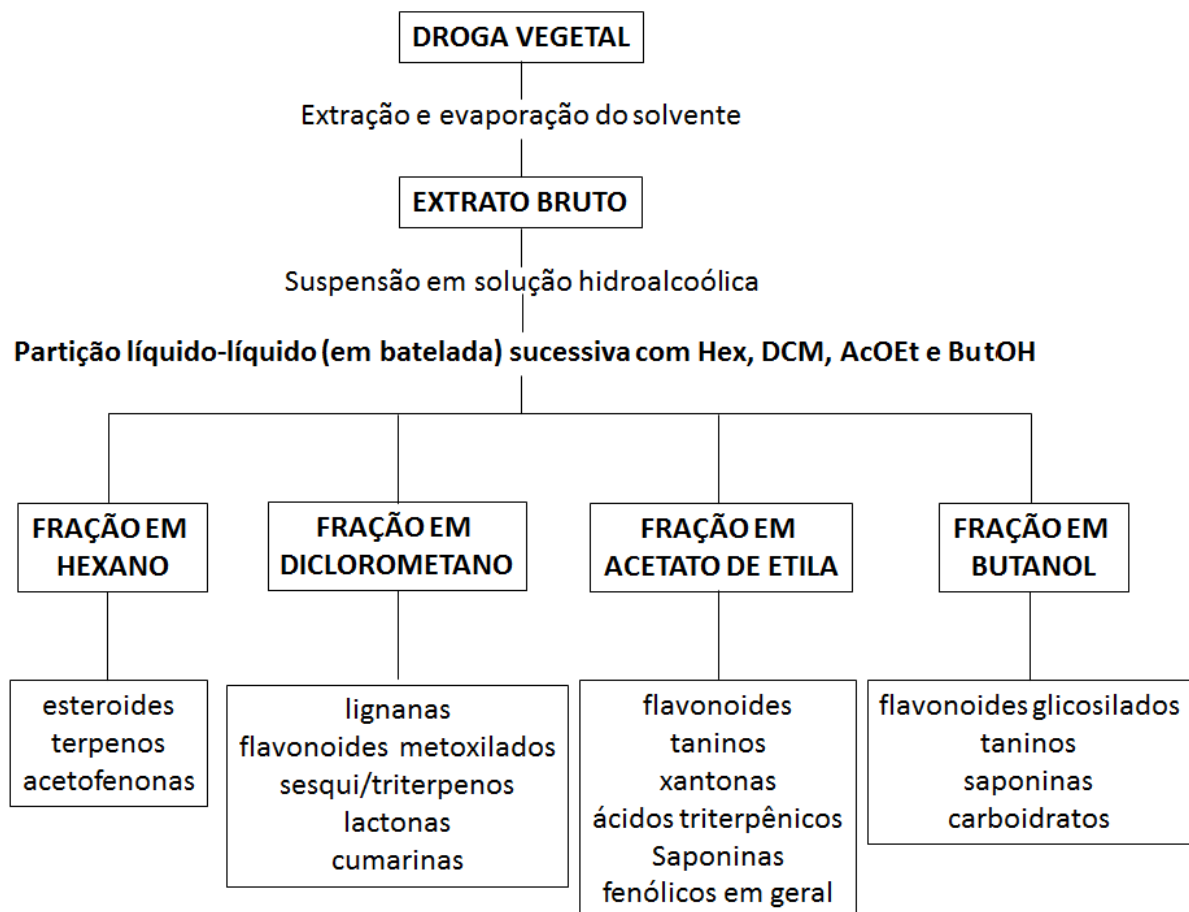
Quando o objetivo é extrair o máximo de constituintes possíveis a extração é feita com solvente(s) de propriedades extrativas menos seletivas, como misturas hidroalcoólicas, etanol ou metanol, obtendo assim extratos de constituição complexa denominados extratos brutos (FALKENBERG; SANTOS; SIMÕES, 2003; FILHO; YUNES, 1997). A partir do extrato bruto pode-se realizar um método sistemático de estudo, visando a semi-purificação do extrato, através de seu fracionamento, ou seja, pela separação de seus constituintes em diferentes frações com solventes de polaridade crescente (Figura 7) (FILHO; YUNES, 1997).

As metodologias mais empregadas para semi-purificação são a partição líquido-líquido e as técnicas cromatográficas (FILHO; YUNES, 1997). A extração em batelada é uma técnica de partição líquido-líquido em que o extrato bruto concentrado é solubilizado em solução hidroalcoólica seguida da adição de um segundo solvente orgânico imiscível, em um funil de separação, estabelecendo duas fases. Após repouso, as fases são separadas

mecanicamente e a fração contendo o soluto de interesse é direcionada para outras operações. O processo pode ser repetido com o mesmo solvente e, após esgotamento da extração, é colocado outros solventes de polaridade crescente (LANÇAS, 2009).

Os principais fatores intrínsecos aos métodos de extração de drogas vegetais (sólido-líquido) e que os diferenciam tecnicamente e com relação ao rendimento extrativo são: agitação, temperatura, pressão e tempo de duração. Dentre os métodos convencionais mais utilizados estão os de extração à temperatura ambiente (maceração e percolação), extração com aquecimento em sistemas abertos (infusão e decocção) e com aquecimento em sistemas fechados (sob refluxo e em aparelho de Soxhlet) (AZMIR et al., 2013; FALKENBERG; SANTOS; SIMÕES, 2003; ZYGMUNT; NAMIESNIK, 2003).

Figura 7. Fluxograma do processo de partição líquido-líquido em batelada partindo inicialmente do extrato bruto.



Hex: hexano; DCM: diclorometano; AcOEt: acetato de etila; ButOH: butanol.
Fonte: Filho; Yunes (1997).

Com a modernização dos métodos de extração, surgiram os procedimentos não convencionais, como a microextração em fase sólida, extração com fluidos pressurizados, extração com ultrassom e por sonificação. Esses métodos reduzem o consumo de solventes orgânicos, degradação das amostras, tornam desnecessárias as etapas de *clean-up* e concentração da amostra, aumentam a eficiência, seletividade e a cinética do processo (AZMIR et al., 2013; HUIE, 2002; LANÇAS, 2009).

A caracterização e padronização química dos extratos constituem etapas fundamentais para realização de atividades envolvendo a pesquisa e o desenvolvimento de formulações fitofarmacêuticas (BONATI, 1991; VIERLING et al., 2003). Estas etapas consistem na determinação qualitativa e quantitativa de substâncias químicas presentes nos extratos vegetais, responsáveis ou não pela bioatividade e que podem ser os marcadores químicos da espécie vegetal. Além disso, garantem a uniformidade do perfil fitoquímico do extrato que, conseqüentemente, permite a reprodutibilidade das atividades farmacológica (eficácia) e toxicológica (segurança) (BONATI, 1991; SONAGLIO et al., 2003; VIERLING et al., 2003).

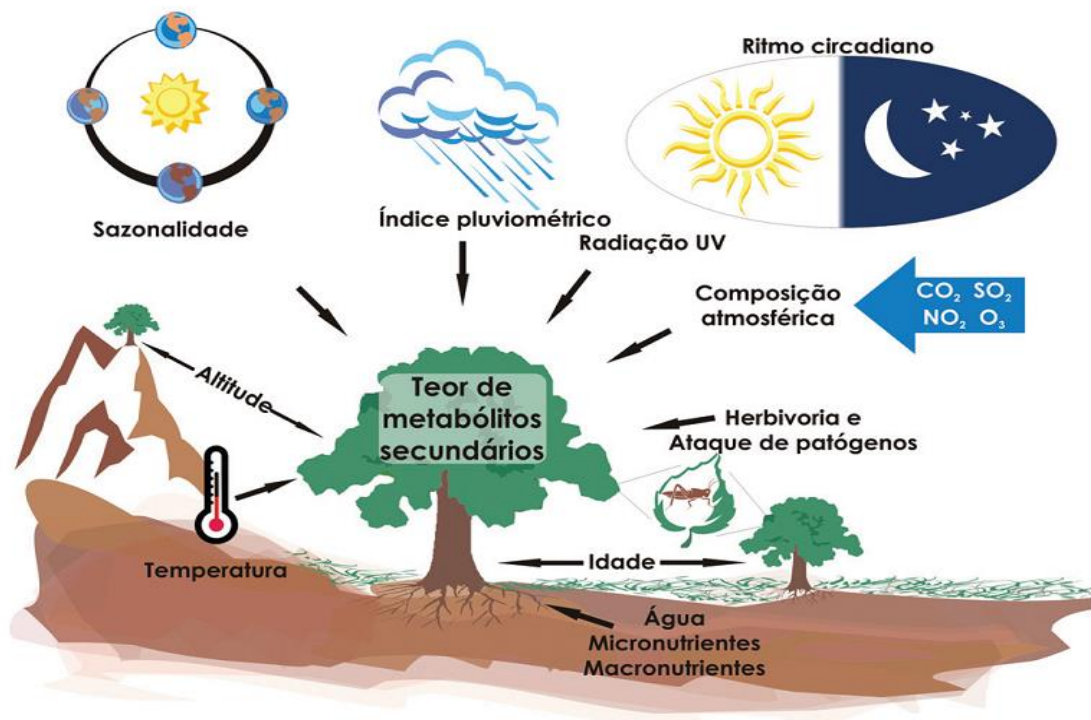
A caracterização e a padronização de derivados vegetais têm sido realizadas preferencialmente por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), uma das mais importantes técnicas analíticas de separação, identificação e quantificação de substâncias químicas, sendo capaz de analisar misturas complexas. A CLAE é uma técnica de cromatografia líquida (CL) moderna, cujos princípios convergem com os da CL clássica (JARDIM; COLLINS; GUIMARÃES, 2006; LANÇAS, 2009; ONG, 2004). Também, é um método de análise instrumental, parcial ou totalmente automatizado, que emprega colunas recheadas, com elevado grau de empacotamento, e uma fase móvel, eluída sob pressão (LANÇAS, 2009). Normalmente, as análises de extratos têm sido realizadas com eluição isocrática ou em gradiente, com coluna de fase reversa (C18) e detector na região do UV (ONG, 2004).

A análise qualitativa tem por objetivo determinar a presença de determinada(s) substância(s) ou classe(s) de substância(s), enquanto a análise quantitativa visa determinar os seus teores (LANÇAS, 2009). A caracterização qualitativa é feita pelos dados cromatográficos, principalmente o tempo de retenção (t_r), juntamente com os métodos espectroscópicos de detecção. Para aumentar a confiabilidade da identificação por t_r , utiliza-se, por exemplo, a técnica de fortificação (*spike*), que consiste na coinjeção de um padrão analítico (HOLLER; SKOOG; CROUCH, 2009; LANÇAS, 2009). A caracterização quantitativa é feita principalmente por técnicas de integração que correlacionam a área do

pico com a concentração da(s) substância(s) na amostra e por calibração com padrão externo (LANÇAS, 2009).

Um dos principais desafios na obtenção de derivados vegetais padronizados é o fato de constituírem misturas complexas somadas à capacidade que diversos fatores têm de provocar variações na composição química das plantas (metaboloma), influenciando as ações farmacológicas (SONAGLIO et al., 2003; YULIANA et al., 2011). Dentre os fatores que podem influenciar a composição química tem-se: sazonalidade, ritmo circadiano, estágios de desenvolvimento da planta, disponibilidade hídrica, radiação ultravioleta (Figura 8) (GOBBONETO; LOPES, 2007).

Figura 8. Fatores que podem influenciar o metabolismo vegetal.



Fonte: Gobbo-Neto; Lopes (2007).

2.4 DETERMINAÇÃO DO TEOR DE METABÓLITOS ESPECIAIS

A detecção, identificação e quantificação de metabólitos especiais em amostras vegetais são realizadas da forma mais eficiente através de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) acoplada a detectores de UV, IV, EM e RMN. Porém, a determinação do teor de fitoconstituintes por espectrometria na região do ultravioleta e visível (UV-Vis) do

espectro eletromagnético é o método mais utilizado para materiais vegetais, devido à robustez, baixo custo e ampla aplicabilidade (MARQUES et al., 2012, 2013; ROCHA; TEIXEIRA, 2004). Apesar das vantagens apresentadas pelo método, este apresenta baixa seletividade frente aos extratos vegetais, por estes tratarem-se de misturas complexas, o que ocasiona sobreposição das bandas, impedindo que somente o metabólito de interesse absorva (KHODDAMI; WILKES; ROBERTS, 2013; MARQUES et al., 2012).

A espectrometria na região UV-Vis do espectro eletromagnético é fundamentada na lei de Lambert-Beer, base matemática para medidas de absorção de radiação por amostras na região UV-Vis (190 a 800 nm) e IV próximo (800 a 2500 nm) do espectro eletromagnético. Baseia-se na medida da transmitância (T) ou da absorvância (A) de soluções em células transparentes com caminho óptico de b cm e, geralmente, a concentração de um analito capaz de absorver a radiação está linearmente relacionada com a absorvância, tendo-se que: $A = \log(I_0/I) = \mathcal{E}.b.c$, em que A é a absorvância, I_0 é a intensidade da radiação monocromática que incide na amostra, I é a intensidade da radiação monocromática residual, \mathcal{E} é a absortividade molar, b é o caminho óptico e c a concentração do analito (HOLLER; SKOOG; CROUCH, 2009, ROCHA; TEIXEIRA, 2004).

Os instrumentos utilizados nos métodos de análise por absorção de radiação eletromagnética na região do UV-Vis (190 a 400 nm e 400 a 800 nm, respectivamente) e também no IV próximo (800 a 2500 nm) são denominados de espectrofotômetros e constituídos basicamente por fonte, seletor de comprimento de onda, recipiente da amostra, transdutor de radiação, processador de sinal e dispositivo de leitura. Além disso, existem três tipos gerais de instrumentos espectroscópicos: de feixe único, de feixe duplo (espacial e temporal) e multicanal (HARRIS, 2008; HOLLER; SKOOG; CROUCH, 2009).

Praticamente todos os métodos analíticos requerem algum tipo de calibração com padrões químicos, para determinar a relação entre a resposta analítica (sinal) e a concentração do analito (HOLLER; SKOOG; CROUCH, 2009). O método de padrões externos é muito utilizado para calibração, através do preparo, separadamente da amostra, de soluções de substâncias padrão dentro do intervalo de concentração esperado para as amostras. Após leitura e obtenção dos dados do padrão, tem-se o sinal (absorvância) como uma função da concentração do analito. Uma vez obtida a curva de calibração, realiza-se análise de regressão linear (métodos dos quadrados mínimos) para traçar a melhor reta entre os pontos e com os valores de coeficiente angular (a) e linear (b) determinar a equação da reta ($y = ax + b$) (HARRIS, 2008; HOLLER; SKOOG; CROUCH, 2009, ROCHA; TEIXEIRA, 2004).

Na determinação do teor de metabólitos especiais em amostras vegetais, devido à complexidade química presente, por exemplo, nos extratos vegetais, não é possível ter padrões de todos os fitoconstituintes, dessa forma utiliza-se como padrão alguma substância que represente a classe de metabólitos a ser quantificada e os resultados são expressos em função desta substância. Por exemplo, na quantificação de fenóis totais o resultado pode ser expresso em equivalência de ácido gálico (ácido fenolcarboxílico) e na quantificação de flavonoides, em equivalência de rutina (flavonoide glicosilado) (STALIKAS, 2007).

Na análise da amostra, após a leitura e obtenção dos valores de absorvância, a concentração do analito é calculada por substituição de y na equação da reta, considerando os fatores de diluição das etapas de preparo da amostra (HARRIS, 2008; HOLLER; SKOOG; CROUCH, 2009). Para que uma metodologia analítica possa ser oficialmente adotada na rotina laboratorial é necessário a validação do método, ou seja, uma série de experimentos capazes de avaliar a capacidade de detectar e quantificar um determinado analito (MARQUES et al., 2012). A validação envolve uma série de parâmetros, como seletividade, precisão, exatidão, linearidade, robustez, limite de detecção e de quantificação (FDA, 2001; LANÇAS, 2009).

2.5 PLANTAS MEDICINAIS NO DESENVOLVIMENTO DE FITOTERÁPICOS

Os medicamentos fitoterápicos de acordo com a definição da OMS (1998) são preparações medicamentosas contendo como ingredientes ativos exclusivamente partes de plantas (matéria-prima vegetal) em estado natural ou processadas, mais excipientes como solventes, conservantes e espessantes. Entretanto, dependendo da legislação do país, os fitoterápicos são classificados como medicamentos ou como suplementos alimentares e podem ser compostos por uma, duas ou mais espécies de plantas medicinais (FERREIRA et al., 1998; ONG, 2004).

Na Tabela 4 são expostos exemplos de plantas medicinais que têm sido utilizadas na forma de fitoterápicos. Informações a respeito de plantas medicinais e fitoterápicos são encontradas em monografias da Farmacopeia Brasileira (BRASIL, 2010) e no Formulário de Fitoterápicos da Farmacopeia Brasileira (BRASIL, 2011). O uso de fitoterápicos com fins profilático, curativo, paliativo ou para diagnóstico e a difusão mundial dos conhecimentos referentes à fitoterapia são reconhecidos e recomendados pela OMS (1978).

Tabela 4. Espécies vegetais com atividade biológica usadas na obtenção de fitoterápicos.

Espécie	Apresentações	Substâncias ativas /marcadores	Atividade terapêutica
<i>Aloe vera</i> ^{1,2}	Pomada/gel/creme	Aloína A e B	Hidratante/cicatrizante
<i>Arnica montana</i> ¹	Extrato/gel/pomada	Ácido cinâmico	Anti-inflamatório
<i>Baccharis trimera</i> ^{1,2}	Chá	Terpenoides	Antidispéptico
<i>Bryophyllum pinnatum</i>	Suco/sumo/extrato	Briofilina A/flavon.	Antiácido/cicatrizante
<i>Cordia verbenácea</i> ^{1,2}	Chá/pomada/creme	Artemetina	Anti-inflamatório
<i>Cymbopogon citratus</i> ¹	Chá	Terpenoides (Citral)	Ansiolítico/antiespasmódico
<i>Eucalyptus globulos</i> ²	Tintura/OE ³	Eucaliptol (OE ³)	Expectorante
<i>Maytenus ilicifolia</i> ^{1,2}	Chá/extrato/tintura	Taninos/terpenoides	Antidispéptico/antiácido
<i>Mikania glomerata</i> ^{1,2}	Xárope/chá/tintura	Guacina/guacosídeo	Expectorante
<i>Passiflora incarnata</i> ^{1,2}	Chá/extrato/tintura	Vitexina/umbeliferona	Ansiolítico/sedativo leve
<i>Pilocarpus jaborandi</i>	Pó/OE/extrato/tintura	Pilocarpina	Agonista muscarínico ⁴
<i>Salix alba</i> ^{1,2}	Chá	Ácido salicílico	Anti-inflamatório/antitérmico
<i>Tabebuia impetiginosa</i>	Chá/extr/pomada/pó	Lapachol/ β -lapachona	Antineoplásico
<i>Taxus brevifolia</i>	Extrato/pomada/pó	Taxol	Antineoplásico
<i>Uncaria tomentosa</i> ²	Pó/extrato/chá	Alcaloides oxindóis	Imunoestimulante
<i>Vernonia polyanthes</i> ^{1,2}	Chá	Flavonoides	Expectorante
<i>Zingiber officinale</i> ^{1,2}	Raiz/Chá/pó/extrato	Gingerióis/zingiberol	Antiemético/anti-inflam/antidispéptico

¹Espécies que constam no Formulário de Fitoterápicos da Farmacopeia Brasileira; ² Espécies que constam na RENISUS; ³OE – óleo essencial, ⁴Uso no tratamento de glaucoma.

Fonte: Brasil (2011); Fetrow; Avila (2000).

Mundialmente, os medicamentos fitoterápicos ou fitomedicamentos correspondem a 25% da produção farmacêutica. Na Alemanha, país pioneiro na difusão do uso de fitoterápicos e onde o consumo desses produtos é alto, o mercado fitofarmacêutico atinge a cerca de 50% do mercado europeu e os usos mais comuns pela população são para gripes e resfriados, doenças de pele, doenças gastrointestinais, distúrbios circulatórios, dor de cabeça, insônia, bronquite e cansaço (CALIXTO, 2000).

De acordo com a RDC n°48/2004, os medicamentos fitoterápicos são caracterizados pelo conhecimento da eficácia e dos riscos de seu uso, bem como pela reprodutibilidade e constância de sua qualidade (BRASIL, 2004). No Brasil, os fitoterápicos são regulamentados pela ANVISA como medicamentos utilizados no diagnóstico, cura, tratamento e prevenção de doenças ou na melhora da qualidade de vida. Entretanto, para ser prescrito e comercializado, a trajetória percorrida pelos medicamentos fitoterápicos é árdua e longa, sendo necessário o registro do produto (MORAES et al., 2006). O registro de fitoterápicos junto à ANVISA segue disposto na Lei n° 6.360/73 regulamentado pelo Decreto n° 79.094/77.

O desenvolvimento de fitomedicamentos preferencialmente é realizado com espécies vegetais que, através da etnobotânica e etnofarmacologia, foram selecionadas e cujos aspectos botânicos, perfil fitoquímico, atividades farmacológicas já foram cientificamente evidenciados (LAPA et al., 2003; SONAGLIO et al., 2003). A etapa farmacêutica constitui uma fase importante nesse processo, pois é entendida como a etapa em que se realiza o desenvolvimento/delineamento das formas farmacêuticas e sistemas de liberação dos fármacos (metabólitos especiais), com a garantia da qualidade e uniformidade da amostra, assim como com sua estabilidade durante os testes pré-clínicos e clínicos. Sendo assim, também é possível considerar como aspectos dessa etapa, a etapa fitoquímica (obtenção dos derivados vegetais) e o controle de qualidade da droga vegetal, derivados vegetais e produto acabado (LAPA et al., 2003; SONAGLIO et al., 2003).

Os fármacos sintéticos geralmente são fornecidos como parte de uma formulação e não isoladamente. Coerentemente, também os fitofármacos e derivados vegetais (extratos, tinturas, etc.), na obtenção dos medicamentos fitoterápicos, são associados a excipientes, que possuem funções farmacêuticas diversas. As formas farmacêuticas são diferentes quanto às características físicas e farmacêuticas. O estudo e a escolha da forma farmacêutica, desenvolvimento, formulação, estabilidade e eficácia terapêutica são chamados de desenvolvimento farmacotécnico de medicamentos e dependem do conhecimento das características físicas, químicas e biológicas de seus componentes (ALLEN JR; POPOVICH; ANSEL, 2007).

Diretrizes internacionais para realização do controle de qualidade de matéria-prima vegetal e seus derivados, bem como de medicamentos fitoterápicos, foram estabelecidas pela OMS e enfatizam a necessidade de assegurar a qualidade físico-química e microbiológica de produtos de origem vegetal através do uso de técnicas modernas de controle e aplicação de padrões (OMS, 1998). No entanto, a fonte e a qualidade da matéria-prima vegetal empregada no desenvolvimento dos produtos exercem papel fundamental na garantia da qualidade e estabilidade das preparações vegetais (CALIXTO, 2000).

As análises que compõem as diretrizes estabelecidas pela OMS para o controle de qualidade de matéria-prima vegetal são: determinação de matéria estranha; exame macroscópico e microscópico; cromatografia em camada delgada (CCD); determinação de cinzas totais; determinação de matéria extraível; determinação de água e matéria volátil; determinação de óleos essenciais; determinação do valor de amargura; determinação da atividade hemolítica; determinação de taninos; determinação de índice de inchamento; determinação do índice de formação de espuma; determinação de resíduos de pesticidas;

determinação de arsênio e metais pesados; determinação de microrganismos e contaminação radioativa (OMS, 1998).

2.6 FAMÍLIA CRASSULACEAE

A família Crassulaceae, pertencente às Angiospermas, é um grupo morfológicamente diverso e sistematicamente complexo, uma vez que contempla seis subfamílias, que se distribuem entre duas linhagens, *Crassula* e *Sedum* (MORT et al., 2001; STEVENS et al., 1995). A família é composta de 35 gêneros e 1.500 espécies, distribuídas nas regiões temperada e tropical do planeta, como Madagascar, África do Sul, Nigéria, México, Macaronesia, Brasil e outros países da América do Sul (EL ABDELLAOUI et al., 2010; MORT et al., 2001). *Crassula peduncularis* e *Kalanchoe brasiliensis* são exemplos de plantas nativas do Brasil, sendo que diversas outras espécies subspontâneas de Crassulaceae são ocasionalmente consideradas nativas (CRUZ et al., 2011; SOUZA; LORENZI, 2005).

Espécies desta família são geralmente herbáceas ou sublenhosas, com pouca ramificação e podem atingir até um metro de altura (LORENZI; MATOS, 2008). As folhas são carnosas e suculentas, ovaladas ou obovadas, com margem geralmente ondulada, mas pode ocorrer como subcrenada em *Kalanchoe brasiliensis* ou crenada em *Bryophyllum pinnatum*, extensamente referida também na literatura com *Kalanchoe pinnata*. Possuem inflorescência cimosa ou flores radialmente simétricas, com duas voltas de cinco estames (LORENZI; MATOS, 2008; MORT et al., 2001; SOUZA; LORENZI, 2005).

Extensamente considerada um grupo natural, a família Crassulaceae é facilmente reconhecida e estudos a indicam como grupo monofilético, apesar de que a determinação de grupos monofiléticos dentro da família e a visualização de relações entre os gêneros sejam difíceis. Essa complexidade sistemática, em parte, se deve à grande diversidade morfológica e de habitat dentro da família (MORT et al., 2001). Plantas dessa família apresentam característica xeromórfica de adaptação à luminosidade intensa e escassez de água (HERRERA, 2008).

Plantas da família Crassulaceae assimilam o CO₂ atmosférico através de ácidos C₄ (ácido das crassuláceas) predominantemente durante a noite, convertendo esse CO₂ em carboidratos durante o dia seguinte (CUSHMAN; BOHNERT, 1997; MOREIRA et al., 2012). Isso as diferencia da maioria das plantas superiores que assimilam o CO₂ atmosférico através da fotossíntese durante o dia, seja pela via C₃, utilizando ribulose-1,5-difosfato

carboxilase/oxigenase; ou pela via C₄, que ocorre como via alternativa para a assimilação do CO₂ fotossintético em situações em que a disponibilidade de CO₂ é reduzida por estresse ambiental (excesso de luz e calor ou escassez de água), causando fotorrespiração, um processo que reduz a eficiência da via C₃ (CUSHMAN; BOHNERT, 1997; MOREIRA et al., 2012).

Espécies de Crassulaceae são cultivadas para fins medicinais e ornamentais. *Kalanchoe brasiliensis*, espécie nativa do Brasil, conhecida como “saião” ou “courama-branca” no nordeste do país, é cultivada em jardins e quintais pela sua beleza exótica. É utilizada popularmente no tratamento local de furúnculos, tosse, anexite, gastrite, além de outras ações (AMABEOKU; GREEN; KABATENDE, 2007; ANISIMOV et al., 2009; LORENZI; MATOS, 2008; CRUZ et al., 2011).

O gênero *Bryophyllum*, pertencente à linhagem *Crassula* e subfamília Kalanchoideae da família Crassulaceae (MORT et al., 2001; SOUZA; LORENZI, 2005), é composto por cerca de 1.000 espécies nativas em regiões tropicais, sendo muitas delas originárias de Madagascar, porém endêmicas em diversas outras localidades do mundo, como Brasil e África do Sul (ALMEIDA; MUZITANO; COSTA, 2006; SINGAB et al., 2011). Uma das espécies pertencente ao gênero *Bryophyllum* mais citada na literatura é *Bryophyllum pinnatum* (Lam.) Oken, que apresenta sinônimas de *Kalanchoe pinnata* (Lam.) Pers. e *Bryophyllum calycinum* Salisb. (SINGAB et al., 2011).

Plantas desse gênero possuem folhas carnosas e suculentas, reproduzem sexuadamente ou assexuadamente por plântulas que se desenvolvem a partir de primórdios localizados nas folhas, sendo essa uma das características das espécies do gênero *Bryophyllum*. Em situações ambientais desfavoráveis para a planta, os primórdios foliares se desenvolvem em plântulas por organogênese direta, assegurando a sobrevivência e perpetuação da espécie. Em algumas espécies do gênero, a ativação dos primórdios foliares ocorre em folhas ainda presas à planta, porém em outras acontecem em folhas separadas da planta (ALMEIDA; MUZITANO; COSTA, 2006; KULKA, 2006).

No Brasil e em outros países, como Trinidad e Tobago, espécies do gênero *Bryophyllum* são utilizadas popularmente no tratamento de feridas, queimaduras, ulcerações, inflamações, artrite, febre, resfriado, dor de cabeça, cólera, desordens urinárias e disenteria. Em decorrência dessa ampla utilização, o gênero tem sido alvo de diversos estudos que têm comprovado o potencial anti-inflamatório, antimicrobiano, cicatrizante, analgésico, anti-úlceros, anti-hipertensivo, entre outros (NAYAK; MARSHALL; ISITOR, 2010; OKWU; NNAMDI, 2011a, 2011b; SINGAB et al., 2011).

O potencial medicinal das plantas do gênero é o principal motivo para que essas plantas sejam cultivadas domesticamente em diversos países e o que as configuram como alvo de pesquisas (ANISIMOV et al., 2009; SILVA, J. et al., 2009). Porém, muitas espécies, em decorrência da beleza exótica, são cultivadas para fins ornamentais. *Bryophyllum blossfeldiana* é uma planta popularmente cultivada em vasos no ambiente doméstico e em jardins, tendo importância econômica na Europa. *Bryophyllum pinnatum* e *B. daigremontianum* são outros exemplos de espécies ornamentais (NAZ et al., 2009).

2.7 *BRYOPHYLLUM PINNATUM* (LAM.) OKEN

Bryophyllum pinnatum (Lam.) Oken, com sinonímia de *Kalanchoe pinnata* Lam., popularmente conhecida como folha-da-fortuna, courama ou fortuna, é nativa de Madagascar, ocorrendo subespontaneamente em diversas regiões temperadas e tropicais do planeta, como Brasil, Austrália, África do Sul e Nigéria (LORENZI; MATOS, 2008; NAYAK; MARSHALL; ISITOR, 2010; MAJAZ et al., 2011). É uma planta herbácea, ereta e perene que pode alcançar até 1,5m, principalmente na época de floração (OKWU; NNAMDI, 2011b). Apresenta caule avermelhado com manchas brancas quando jovem e levemente colorido quando mais velho; folhas glabras, verde escuras, carnosas e suculentas, dispostas de forma oposta cruzada, ovaladas ou elípticas, com 8-12 cm de comprimento e 6-8 cm de largura, crenadas ou serradas. Possui inflorescências cimosas púrpuras avermelhadas, com robustos ramos opostos, pedicelos delgados que partem de um mesmo pedúnculo ramificado (Figura 9) (BISWAS et al., 2011; MAJAZ et al., 2011; SOUZA; LORENZI, 2005).

Reproduz-se sexuadamente por sementes ou vegetativamente através de primórdios celulares dormentes nas bordas do limbo foliar que têm a capacidade de gerar plântulas. Essa capacidade de regeneração e crescimento das folhas por organogênese direta é utilizada para desenvolver protocolos para multiplicação rápida de *B. pinnatum*, através de explantes foliares em diferentes meios de cultura. Além disso, a propagação por cultura de tecido é uma alternativa factível comercialmente, por fornecer material vegetal uniforme e consistente (BISWAS et al., 2011; NAZ et al., 2009).

Figura 9. Morfologia externa das folhas de *Bryophyllum pinnatum* (Lam.) Oken cultivada no Horto da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Juiz de Fora.



Fonte: O autor (2012).

Devido a diversos aspectos semelhantes, como os usos populares e características morfológicas, *B. pinnatum* (“folha-da-fortuna”) e *Kalanchoe brasiliensis* (saião), também denominada por *Kalanchoe crenata*, são comumente confundidas e erroneamente identificadas. Moreira e outros (2012) investigaram a existência de características anatômicas que permitem a correta identificação das duas espécies. Também observaram hidatódios em ambas as espécies. As espécies demonstraram diferenças anatômicas em relação à presença de idioblastos epidérmicos (somente *K. crenata*), distribuição dos idioblastos subepidérmicos e a presença de rebentos foliares (somente *B. pinnatum*).

B. pinnatum é extensamente utilizada na medicina tradicional do Brasil e em diversos países, principalmente através do suco, sumo e emplastos de suas folhas (ABRÃO, 2010; GUPTA et al., 2010). Popularmente, a espécie é usada no tratamento de inflamações, infecções, feridas, contusões, queimaduras, picadas de insetos, furúnculos e ulcerações (LORENZI; MATOS, 2008; NAYAK; MARSHALL; ISITOR, 2010; OJEWOLE, 2005). É utilizada também para o tratamento de anexite e gastrite, auxilia na eliminação de cálculos

renais, abscessos, alergia, erisipela, frieira, dores de cabeça e nas juntas, reumatismo, hemorroidas, diarreia, disenteria e vômitos (ABRÃO, 2010; LORENZI; MATOS, 2008).

Estudos farmacológicos relacionados à *B. pinnatum* têm confirmado as atividades anti-inflamatória (AFZAL et al., 2012; GUPTA; LOHANI; ARORA, 2010; OJEWOLE, 2005); antioxidante (BISWAS et al., 2011); antimicrobiana (AKINPELU et al., 2000; AKINSULIRE et al., 2007; OKWU; NNAMDI, 2011); cicatrizante (NAYAK; MARSHALL; ISITOR, 2010); antinociceptiva (IGWE; AKUNYILI, 2005; NGUELEFACK et al., 2006; OJEWOLE, 2005); antidiabética (OJEWOLE, 2005); imunossupressora e antialérgica (CRUZ et al., 2008; CRUZ et al., 2012) e atividade leishmanicida (MUZITANO et al., 2006, 2011). Além disso, atividades anticancerígena, neurológica (sedativa e relaxante muscular), hipoglicemiante e hipolipidêmica têm sido citadas na literatura (MAHATTA et al., 2012; OGBONNIA; ODIMEGWU; ENWURU, 2008; SALAHDEEN; YEMIATAN, 2006; YEMIATAN; SALAHDEEN, 2005).

O potencial anti-inflamatório de *B. pinnatum* foi descrito por Gupta; Lohandi; Arora (2010) que avaliaram diferentes extratos (aquoso, em éter de petróleo, clorofórmico, em acetona e metanólico) das folhas e frações enriquecidas de alcaloides e flavonoides, através do modelo de inflamação por edema de pata induzido por formaldeído, e demonstraram um significativo efeito do extrato metanólico. O extrato aquoso também reduziu significativamente o edema de pata induzido por albumina com efeito dependente da dose e do tempo (OJEWOLE, 2005).

B. pinnatum tem sido alvo de estudo da atividade antioxidante *in vitro* (GUPTA; BANERJEE, 2011; HARLALKA; PATIL; PATIL, 2007; JAIN et al., 2010). Gupta; Banerjee (2011) aperfeiçoaram o processo de extração de substâncias fenólicas e avaliaram a atividade antioxidante pelos métodos do DPPH (2,2-Difenil-1-picrilhidrazila), FRAP (poder antioxidante de redução do ferro) e ABTS (2,2'-Azinobis-3-etilbenzotiazole-6-sulfonato), demonstrando uma significativa correlação com os teores de fenóis totais. Harlalka; Patil; Patil (2007) relataram que a ação protetora do extrato aquoso contra nefrotoxicidade induzida por gentamicina estava relacionada com a atividade antioxidante (sequestro de radicais livres).

Akinsulire e outros (2007) investigaram a atividade antimicrobiana nas folhas de *B. pinnatum*, utilizando como solvente extrator água, metanol e bebidas alcoólicas e o sumo das folhas obtido por processo mecânico. Os extratos foram ativos contra bactérias Gram-negativas (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Shigella flexneri*, *Salmonella paratyphi* e *Citrobacter spp*) e Gram-positivas (*Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis* e *Bacillus subtilis*). Akinpelu (2000) comprovou a atividade

antimicrobiana utilizando o extrato metanólico 60% das folhas que inibiu o crescimento de *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Proteus vulgaris*, *Shigella dysenteriae* e *Staphylococcus aureus* na concentração de 25mg/mL.

Diversas substâncias já foram isoladas e identificadas em diferentes extratos e frações e apresentaram potenciais farmacológicos (AFZAL et al., 2012; CHOI, 2012; HAM et al., 2012 MEDEIROS et al., 2007; TATSIMO et al., 2012; OKWU; NNAMDI, 2009, 2011; OTUKI et al., 2005). Algumas das substâncias ativas presentes na espécie estão apresentadas na Tabela 5.

Tabela 5. Exemplos de metabólitos especiais bioativos isolados de *Bryophyllum pinnatum*.

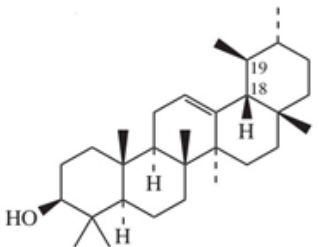
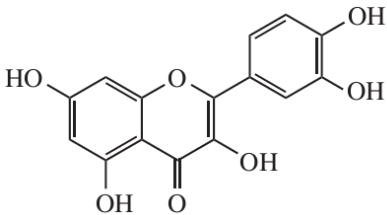
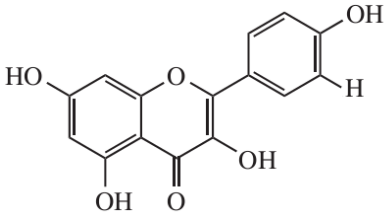
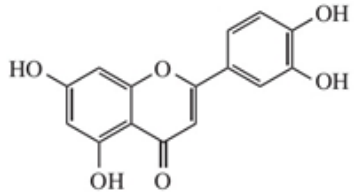
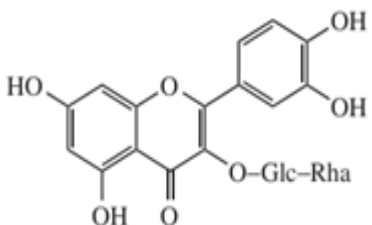
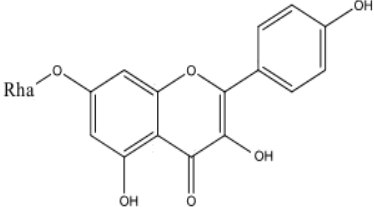
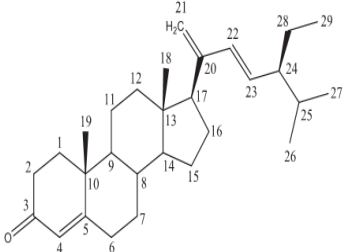
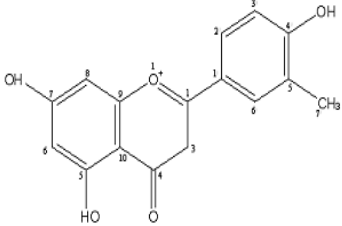
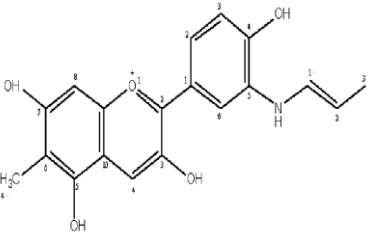
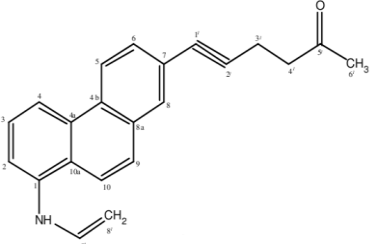
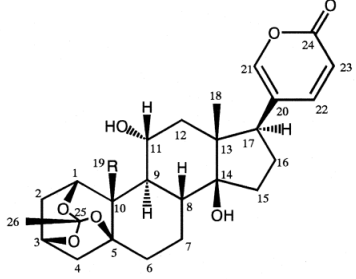
Substância (estrutura)	Nome / Classe / Atividade biológica	Referências bibliográficas
	α-Amirina Triterpeno pentacíclico Anti-inflamatória	OTUKI et al., 2005 SIDDIQUI et al., 1989
	Quercetina Flavonoide (flavonol) Anti-inflamatória Antioxidante Antimicrobiana	GOKBULUT et al., 2013 GARCÍA-MEDIAVILLA et al., 2007 MUZITANO et al., 2006
	Canferol Flavonoide (flavonol) Anti-inflamatória Antioxidante Antimicrobiana	GARCÍA-MEDIAVILLA et al., 2007 GOKBULUT et al., 2013 MUZITANO et al., 2006
	Luteolina Flavonoide (flavona) Anti-inflamatória Antioxidante Antimicrobiana	MAJAZ et al., 2011 GOKBULUT et al., 2013 BALAMURUGAN; KARTHIKEYAN, 2012
	Rutina Flavonoide (flavonol) glicosilado Anti-inflamatória Antioxidante Antimicrobiana	MAJAZ et al., 2011 GOKBULUT et al., 2013 LEE et al., 2013

Tabela 5 (continuação). Exemplos de metabólitos especiais bioativos isolados de *Bryophyllum pinnatum*.

Substância (estrutura)	Nome / Classe / Atividade biológica	Referências bibliográficas
	<p>α-Rhamnoisorobina Flavonoide (flavonol) glicosilado Antioxidante Antimicrobiano</p>	TATSIMO et al., 2012
	<p>Stigmast-4, 20 (21), 23-trieno-3-ona Derivado esteroidal Anti-inflamatória Analgésica</p>	AFZAL et al., 2012
	<p>5'-Metil 4',5,7-trihidroxi flavona Flavonoide Antimicrobiana</p>	OKWU; NNAMDI, 2011b
	<p>4', 3, 5, 7-tetrahidroxi 5-metil 5'-propenamina antocianidina Flavonoide Antimicrobiana</p>	OKWU; NNAMDI, 2011b
	<p>1 - Etenoamina 7 – hex – 1 – ino – 5 - ona fenantreno Alcaloide Antimicrobiana</p>	OKWU; NNAMDI, 2011a
	<p>Bufadienolídeo-1, 3, 5-ortoacetato (Bryophyllina A) Heterosídeo esteroidal (bufadienolídeo) Cicatrizante</p>	<p>BISWAS et al., 2011 NAYAK; MARSHALL; ISITOR, 2010</p>

Com relação às folhas de *B. pinnatum* já foi relatada a presença majoritária de flavonoides (livres e glicosilados), saponinas e alcaloides, sendo os flavonoides a principal classe química do gênero *Bryophyllum* (CRUZ et al., 2011; OKWU; JOSIAH, 2006). Muzitano e outros (2011) avaliaram a influência das condições de cultivo, estação do ano e método de extração sobre a concentração de flavonoides encontrada em extratos aquosos de *B. pinnatum* e demonstraram que o conteúdo flavonoídico é potencializado quando a planta é mantida sobre maior exposição à luz solar e coletada nos períodos do ano em que há maior incidência de radiação solar (verão e primavera).

Outros metabólitos e substâncias diversas estão presentes na espécie: bufadienolídeos, que são heterosídeos esteroidais; esteroides e heterosídeos/glicosídeos; triterpenoides; derivados fenólicos além dos flavonoides, como fenilpropanoides, ácidos fenolcarbônicos, antocianidinas e taninos; policetídeos/hidrocarbonetos; alcoóis simples; ácidos orgânicos, macroelementos (Mg, Ca, P, Na, K), microelementos (Fe e Zn), além de vitaminas, riboflavinas, tiaminas e niacinas (ALMEIDA; MUZITANO; COSTA, 2006; LORENZI; MATOS, 2008; MAJAZ et al., 2011; OKWU; JOSIAH, 2006).

Afzal e outros (2012) isolaram cinco substâncias das folhas de *B. pinnatum*, sendo o derivado esteroidal estigmast-4,20(21),23-trien-3-ona inédito (Tabela 5). Essa substância (300 mg/kg) e o extrato aquoso (400 mg/kg) demonstraram atividade anti-inflamatória em modelo de inflamação aguda de edema de pata induzido por carragenina. A atividade anti-inflamatória de *B. pinnatum* pode ser atribuída à presença deste derivado esteroidal e de outros constituintes químicos, como o triterpeno α -amirina e os flavonoides quercetina, canferol, rutina e luteolina (COUTINHO; MUZITANO; COSTA, 2009; OTUKI et al., 2005).

Diversos flavonoides presentes em *B. pinnatum* (KAMBOJ; SALUJA, 2009; MAJAZ et al., 2011) possuem atividade antioxidante, por exemplo, quercetina, quercitrina, canferol, luteolina e rutina (Tabela 5) (CHOI, 2012; CORREIA et al., 2013; GOKBULUT et al., 2013; HAM et al., 2011; NIMALA; RAMANATHAN, 2011; SUN et al., 2011). Tatsimo e outros (2012) obtiveram sete derivados canferóis ramnosídeos com atividades antioxidante e antimicrobiana que foram isolados do extrato de acetato de etila: canferitrina, canferol 3-O- α -L-(2-acetil)-ramnopiranosídeo-7-O- α -L-ramnopiranosídeo, canferol 3-O- α -L-(3-acetil)-ramnopiranosídeo-7-O- α -L-ramno-piranosídeo, canferol 3-O- α -L-(4-acetil)-ramnopiranosídeo-7-O- α -L-ramnopiranosídeo, canferol 3-O- α -D-glicopiranosídeo-7-O- α -L-ramnopiranosídeo, afzelina e α -ramnoisorobina (Tabela 5).

O potencial antimicrobiano foi demonstrado em diversas substâncias isoladas de *B. pinnatum*, sendo esta ação atribuída principalmente aos constituintes fenólicos, especialmente

a flavonoides como quercetina, canferol, rutina e luteolina, principal classe química do gênero *Bryophyllum* (CRUZ et al., 2011; GOKBULUT et al., 2013; KUETE et al., 2008; OKWU; JOSIAH, 2006). Okwu; Nnamdi (2011b) isolaram dois novos flavonoides de *B. pinnatum* com potencial antimicrobiano: 5'-metil 4',5,7-trihidroxi-flavona e 4',3,5,7-tetrahidroxi 5-metil 5'-propenammina antocianidina (Tabela 5) que demonstraram inibição sobre *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Candida albicans* e *Aspergillus niger*. Okwu; Nnamdi (2011a) isolaram um alcaloide fenantreno, com potencial antimicrobiano, identificado como 1-etanamino 7 hex-1-ino-5-ona fenantreno (Tabela 5) que foi ativo contra os microrganismos descritos anteriormente.

Constituintes de *B. pinnatum*, tais como kapinnatosídeo, um canferol diglicosídico, identificado como canferol 3-O- α -L-arabinopiranosil (1 \rightarrow 2) α -L-ramnopiranosídeo, o flavonol glicosilado quercetina 3-O- α -L-arabinopiranosil (1 \rightarrow 2) α -L-ramnopiranosídeo, a flavona glicosilada 4'-5-dihidroxi-3',8-dimetoxiflavona 7-O- β -D-glicopiranosídeo, quercetina e quercitrina foram descritos por ação leishmanicida (Muzitano et al., 2006, 2011). Além disso, foram isoladas e identificadas substâncias triterpênicas como briofilol, briofolona, briofolenona, briofinol e dois derivados fenantrenos das folhas frescas de *B. pinnatum* (BISWAS et al., 2011, SIDIQQUI et al., 1989). Almeida; Muzitano; Costa (2006) isolaram do extrato etanólico um álcool vinílico diglicosilado, 1-octeno-3-O- α -L-arabinopiranosil-(1 \rightarrow 6)- β -glicopiranosídeo, substância que atua como atrativo para polinizadores e como sinalizador de defesa contra herbivoria.

2.8 ASPECTOS GERAIS DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

A produção de energia nas mitocôndrias de células eucarióticas, através da respiração aeróbica, gera, além de energia, diversos outros compostos, dentre eles destacam-se os radicais livres, moléculas ou fragmentos de moléculas com um ou mais elétrons desemparelhados em orbitais atômicos ou moleculares, derivados do metabolismo oxidativo, altamente reativas e instáveis, com meia-vida que pode variar de nano-segundos a horas (SOSA et al., 2013; VALKO et al., 2007).

A presença das espécies reativas em material biológico foi detectada pela primeira vez na década de 1950 e foram associadas aos danos do organismo (DRÖGE, 2002). No entanto, sabe-se que, em situações fisiológicas, os radicais livres, através do seu efeito oxidativo, também exercem funções vitais em eventos fisiológicos (p.ex.: controle do tônus vascular e da

pressão de oxigênio) e eventos celulares (p.ex.: autofagia, transdução de sinais, ativação enzimática, tradução e transcrição). Os radicais livres também são gerados através de fontes externas ao organismo, como a radiação UV, substâncias químicas e exercício físico (DRÖGE, 2002; LI; ISHDORJ; GIBSON, 2012; SOSA et al., 2013).

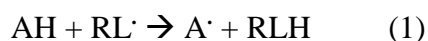
Os radicais livres podem ser classificados em quatro grupos, de acordo com o principal átomo envolvido: espécies reativas de oxigênio (ERO), espécies reativas de nitrogênio (ERN), espécies reativas de enxofre (ERS) e espécies reativas de cloreto (ERC). As ERO são as mais abundantes e podem ser do tipo radicalar, como o superóxido ($O_2^{\cdot-}$), hidroxila (OH^{\cdot}), peroxila (ROO^{\cdot}) e alcoxila (RO^{\cdot}); e não-radicalar, como o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e oxigênio (O_2). O dano gerado pelos radicais livres (estresse oxidativo) depende de suas concentrações intracelulares, as quais são determinadas pelo balanço entre suas taxas de produção e eliminação (equilíbrio redox) (BARREIROS; DAVID; DAVID, 2005; LI; ISHDORJ; GIBSON, 2012; SOSA et al., 2013).

O estresse oxidativo ocorre quando o equilíbrio redox, ou seja, o balanço entre espécies químicas “pró-oxidantes” e “antioxidantes” é alterado. Através de mecanismos complexos, o estresse oxidativo causa danos diversos, principalmente em moléculas de DNA, RNA, lipídeos e proteínas, culminando em patologias, como doenças neurodegenerativas (p.ex.: Alzheimer e Parkinson), doenças inflamatórias (p.ex.: artrite), doenças cardiovasculares, alergias, disfunções imunológicas, hemorragias, catarata, envelhecimento acelerado e câncer (BARREIROS; DAVID; DAVID, 2005; DRÖGE, 2002; SOSA et al., 2013; VALKO et al., 2007).

Os organismos vivos se adaptaram à presença e ação dos radicais livres desenvolvendo complexos mecanismos, enzimáticos e não enzimáticos, contra o estresse oxidativo: de prevenção, de reparo dos danos, de defesa física e antioxidantes. Substâncias antioxidantes, por exemplo, desempenham papel tanto por ação direta como na manutenção do equilíbrio redox (LI; ISHDORJ; GIBSON, 2012; VALKO et al., 2007). De acordo com Halliwell (2001), os antioxidantes são “qualquer substância que, quando presente em baixa concentração comparada à do substrato oxidável, regenera o substrato ou previne significativamente a oxidação do mesmo” (BARREIROS; DAVID; DAVID, 2005; LI; ISHDORJ; GIBSON, 2012; SOSA et al., 2013).

O mecanismo clássico de ação antioxidante consiste em neutralizar os radicais livres já formados, impedindo assim que exerçam seu efeito oxidativo. Essa neutralização, ou sequestro de radicais livres, pode ser realizado de diferentes formas, como através da doação

de elétrons, sendo representada pela reação (1) que não abrange todos os fatores que determinam a atividade antioxidante de uma substância, dentre os quais a reatividade do antioxidante frente o radical, a estequiometria da reação, a lipossolubilidade da substância e a ocorrência de reações secundárias (LÓPEZ-ALARCÓN; DENICOLA, 2013; OLIVEIRA et al., 2009). Além disso, os antioxidantes atuam contra o estresse oxidativo através da prevenção da formação de radicais livres e das cadeias de autoxidação, do poder redutor, da capacidade de complexar com metais, do sinergismo com outros agentes antioxidantes, da inibição de enzimas pró-oxidantes e no reparo dos danos causados (LI; ISHDORJ; GIBSON, 2012; MAGALHÃES et al., 2008; VALKO et al., 2007).



Onde, AH representa o antioxidante e RL o radical livre.

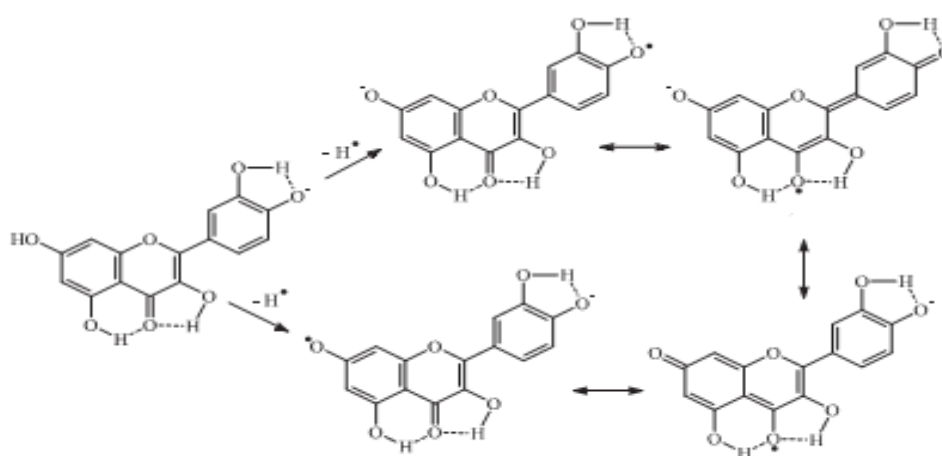
Os antioxidantes podem ser endógenos, naturais e sintéticos. Os antioxidantes endógenos podem ser enzimas (p.ex.: superóxido desmutase/SOD, catalase/CAT e glutathione peroxidase/GPX) ou micromoléculas (p.ex.: glutathione, ácido úrico e diversos aminoácidos), enquanto os naturais podem ser encontrados em espécies vegetais (p.ex.: carotenoides, flavonoides, resveratrol e outras substâncias fenólicas; ácido ascórbico e tocoferóis). N-acetilcisteína, selenium e butil hidroxitolueno são exemplos de antioxidantes sintéticos (BARREIROS; DAVID; DAVID, 2005; SOSA et al, 2013; VALKO et al, 2007).

As vitaminas são conhecidamente substâncias antioxidantes e tem sido sugerido que a ingestão diária de doses consideráveis para o combate e prevenção de várias doenças, como cardiovasculares e alguns tipos de câncer. O ácido ascórbico ou vitamina C é mais encontrado no nosso organismo na forma de ascorbato, desempenha papéis metabólicos fundamentais e atua como agente redutor. O β -caroteno, dentre os carotenoides, é a principal fonte de vitamina A e também possui características lipofílicas com sistema de ligações duplas conjugadas, atua principalmente como desativador de oxigênio singleto ou como sequestrador de radicais peroxila (BARREIROS; DAVID; DAVID, 2005; FUCHS-TARLOVSKY, 2013).

A atividade antioxidante de plantas medicinais geralmente está associada à presença de substâncias fenólicas devido à sua capacidade de complexar com metais e à sua reatividade como doador de H ou elétrons, levando à formação de radicais estáveis (CHOUHAN; SINGH, 2011; CORREIA et al., 2013). Os flavonoides, por exemplo, possuem estrutura ideal para o sequestro de radicais livres, com potencial antioxidante maior do que as vitaminas C e

E. Existem cinco fatores principais que determinam e influenciam a atividade antioxidante dos flavonoides: reatividade como doador de H e elétrons (hidroxilas); estabilidade do radical flavonoila formado (ressonância) (Figura 10); capacidade de complexar com metais (grupos *orto*-difenólicos); reatividade frente a outros antioxidantes e afinidade com as membranas biológicas (BARREIROS; DAVID; DAVID, 2005). Além disso, os flavonoides exercem inibição sobre enzimas pró-oxidantes, como xantina oxidase, mieloperoxidase e lipoxigenases (SADIK; SIES; SCHEWE, 2003).

Figura 10. Deslocalização do elétron desemparelhado pelo radical flavonoila.



Fonte: Barreiros; David; David (2005).

Diversos tipos de flavonoides possuem atividade antioxidante: estilbenos (p.ex.: resveratrol); chalconas (p.ex.: naringenina-chalcona); flavanonas (p.ex.: naringenina); flavonas (p.ex.: apigenina e luteolina); flavonóis (p.ex.: canferol e quercetina); flavonoides heterosídeos (p.ex.: rutina e naringina); biflavonoides; isoflavonoides; além de antocianidinas (p.ex.: cianidina e sua forma 3-glicosilada), catequinas, antraquinonas e antranas (BARREIROS; DAVID; DAVID, 2005; CAO; SOFIC; PRIOR, 1997; CORREIA et al., 2013; DEWICK, 2009; GONTIJO et al., 2012; SADIK; SIES; SCHEWE, 2003; SUN et al., 2012; YEN; DUH; CHUANG, 2000).

Diversos métodos para avaliar a atividade antioxidante de produtos naturais, ou substâncias sintéticas têm sido usados em pesquisa. O mecanismo de reação, as espécies-alvo, as condições reacionais e a forma de expressão dos resultados variam entre os diferentes ensaios, de modo que não existe um procedimento universal e a comparação dos resultados entre os métodos não pode ser feita em valores absolutos (OLIVEIRA et al., 2009). Na

escolha do(s) ensaio(s) a ser(em) realizado(s) é crucial o conhecimento da amostra a ser analisada e dos fundamentos químicos e/ou biológicos envolvidos no ensaio (MAGALHÃES et al., 2008; MOON; SHIBAMOTO, 2009).

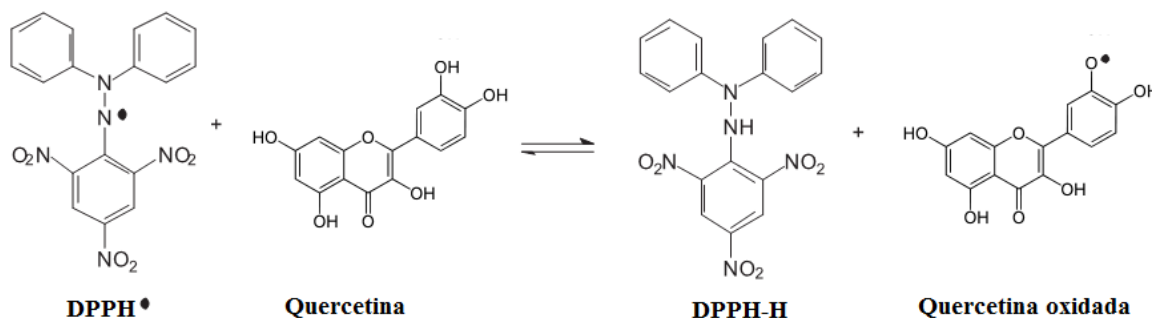
As metodologias para avaliação do potencial antioxidante podem ser divididas em ensaios químicos (*in vitro*) e biológicos (cultura de célula e *in vivo*). Os ensaios químicos podem ser separados em quatro tipos principais, de acordo com o mecanismo antioxidante avaliado: a) Sequestro de radicais livres estáveis, como DPPH \cdot (2,2-Difenil-1-picrilhidrazila) e ABTS $^{+\cdot}$ [2,2'-Azinobis-(3-etilbenzotiazole-6-sulfonato)]; b) Poder de redução de íons metálicos, como Fe $^{3+}$ e Cu $^{2+}$; c) Métodos competitivos (utilização de sondas), como o ensaio “TRAP – total peroxy radical-trapping antioxidante parameter assay”; d) Inibição da oxidação lipídica, como o método com ácido tiobarbitúrico (TBA) e o da cooxidação do β -caroteno/ácido linoleico (ALVES et al., 2010; HUANG; OU; PRIOR, 2005; LÓPEZ-ALARCÓN; DENICOLA, 2013; MOON; SHIBAMOTO, 2009).

Os resultados obtidos através de ensaios *in vitro* não podem ser extrapolados para situações *in vivo*, uma vez que a ação dos antioxidantes não se limita ao sequestro de radicais livres, mas também envolve outros mecanismos como a suprarregulação de enzimas antioxidantes e modulação de sinalização redox nas células. Desse modo, são necessários testes *in vivo* e celulares. Diversos estudos têm comparado os diferentes ensaios de atividade antioxidante e discutido a complexidade, padronização, relevância e condições para estrapolação dos resultados, deixando evidente que o uso impróprio de técnicas tem gerado resultados questionáveis (CAROCHO; FERREIRA, 2013; HUANG; OU; PRIOR, 2005; LÓPEZ-ALARCÓN; DENICOLA, 2013; MAGALHÃES et al., 2008; PINCHUK et al., 2012).

O método de avaliação da atividade antioxidante frente ao radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazila (DPPH \cdot) tem sido muito utilizado preliminarmente na pesquisa com produtos naturais por ser um método simples e altamente sensível. Este ensaio avalia a capacidade de sequestro de radicais livres, tendo como mecanismo reacional a transferência de elétrons do antioxidante para o radical, acompanhada pela abstração de um átomo de hidrogênio (Figura 11) (OLIVEIRA et al., 2009). É um método colorimétrico no qual, na presença do antioxidante, o DPPH \cdot , cuja coloração é violeta devido à sua capacidade de deslocalização eletrônica, é reduzido gerando sua forma estável DPPH-H (2,2-difenilpicril-hidrazina), cuja coloração é amarela. O DPPH \cdot absorve a radiação próximo a 520 nm e sua redução pelo antioxidante, que resulta na alteração da coloração da solução, é monitorada

espectrofotometricamente pelo decaimento da absorvância (ALVES et al., 2010; CAROCHO; FERREIRA, 2013; MOON; SHIBAMOTO, 2009).

Figura 11. Reação química entre o radical DPPH e quercetina (flavonoide antioxidante).



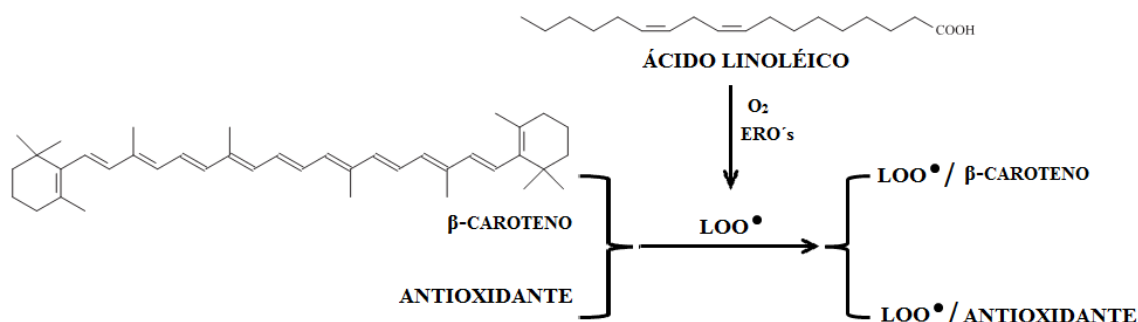
Fonte: Adaptado de Oliveira e outros (2009).

Existem algumas metodologias para avaliação do poder antioxidante de redução de ferro (FRAP) ou poder de redução, em que se mede a capacidade da amostra de doar elétrons ao ferro e assim, transformar Fe^{3+} em Fe^{2+} (LIM; LIM; TEE, 2007). O poder de redução de uma amostra é um forte indicativo de potencial antioxidante (GÜLÇİN et al., 2007). Oyaizu (1986) propõe um ensaio para avaliação do FRAP em que o ferro da reação é proveniente do ferrocianeto de potássio [$\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$]. Nesse ensaio, a coloração amarela inicial da solução muda para diferentes tons de verde e azul, dependendo do poder redutor da amostra. Essa alteração na coloração ocorre à medida que o complexo férrico/ferrocianeto [$\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$] é reduzido à forma ferrosa [$\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$] que, ao sofrer a adição de Fe^{3+} (proveniente do FeCl_3) forma o complexo azul prussiano de Perl, $\text{Fe}[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{-}$, que possui forte absorção em 700 nm, permitindo que a reação seja monitorada espectrofotometricamente. Quanto maior o FRAP, maior será a absorvância da solução (CHUNG et al., 2002; GÜLÇİN, 2006; GÜLÇİN et al., 2007; PHOSRITHONG et al., 2012).

O método de avaliação da atividade antioxidante utilizando o sistema de cooxidação β -caroteno/ácido linoléico foi originalmente descrito por Marco (1968) e modificado por Miller (1970). Outras modificações foram realizadas para transferência do ensaio para microplacas (DUARTE-ALMEIDA et al., 2006; KOLEVA et al., 2002; PRIETO et al., 2012). Esse método permite avaliar a capacidade de determinada substância de inibir a formação e/ou sequestrar os radicais livres gerados na oxidação do ácido linoléico (peroxidação lipídica). Consiste na formação de uma emulsão entre a água e o ácido linoléico, emulsionada pelo Tween (polisorbato), que contém o β -caroteno. O ácido linoléico, na presença de ERO e

O₂, forma radicais peroxila (LOO[•]) que, por sua vez, reagem com o β-caroteno, oxidando-o e reduzindo sua quantidade no meio, resultando na perda gradual da coloração alaranjada característica e queda na absorvância. A presença de um antioxidante na solução inibe a peroxidação lipídica e/ou compete com o β-caroteno pela redução dos radicais peroxila, consequentemente inibe ou reduz o clareamento da solução (Figura 12) (ALVES et al., 2010; MOON; SHIBAMOTO, 2009).

Figura 12. Sistema de cooxidação β-caroteno/ácido linoléico na presença de um antioxidante.



Fonte: Adaptado de Moon; Shibamoto (2009).

A Bioautografia é uma técnica empregada na avaliação de diferentes atividades biológicas (p.ex.: antibacteriana e antifúngica). Com relação à atividade antioxidante, pode-se utilizar o radical livre DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazila) como reagente em cromatografia em camada delgada (CCD). Os fitoconstituintes são separados nas placas de CCD e em seguida é realizada a aplicação do reagente. Paralelamente, placas com as mesmas amostras podem ser reveladas com reagentes específicos para relacionar a presença de determinados metabólitos especiais com a atividade antioxidante (COLEGATE; MOLYNEUX, 2007).

2.9 ASPECTOS GERAIS DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

As infecções podem ser causadas por bactérias, fungos, vírus e parasitas, e o quadro infeccioso se instala devido a uma interação complexa entre microrganismo patogênico, hospedeiro e o ambiente (HEMAISWARYA, 2008). Em todo o mundo, principalmente nos países em desenvolvimento, os microrganismos são problemas sérios para a atenção à saúde. Por exemplo, as bactérias Gram-positivas (*Staphylococci* e *Streptococci*) são consideradas

como as principais causas de morbidade e mortalidade, ocasionando infecção respiratória e sepse (APPELBAUM; JACOBS, 2005; COELHO DE SOUZA et al., 2004).

A descoberta dos agentes antimicrobianos foi de suma importância para a humanidade, erradicando diversas infecções que acometiam a população no passado. As sulfonamidas e a penicilina revolucionaram a prática médica, reduzindo drasticamente a taxa de mortalidade em decorrência de infecções bacterianas (BUTLER; BUSS, 2006; HEMAISWARYA, 2008). Apesar da disponibilidade dos agentes antimicrobianos, o surgimento de cepas resistentes aos antibióticos dificulta o tratamento das infecções microbianas e constitui um problema de saúde pública (BUMANN, 2010). Neste sentido, a descoberta de novas fontes de antimicrobianos constitui uma estratégia para o controle de infecções por microrganismos resistentes (APPELBAUM; JACOBS, 2005).

Desde a antiguidade, as plantas têm utilizadas para tratar doenças infecciosas comuns. Por exemplo, o eucalipto (*Eucalyptus spp.*) é usado como antisséptico e em afecções das vias respiratórias, o ipê-roxo (*Handroanthus impetiginosus*) para afecções da pele e como bactericida e a romanzeira (*Punica granatum*) no tratamento de diarreias de origem bacteriana e parasitária. Outras plantas com amplos espectros de ação, como erva-cidreira-verdadeira (*Melissa officinalis*) e alho (*Allium sativum*) constituem opções na terapêutica das infecções (ABRÃO, 2010; RIOS; RECIO, 2005).

Diversas espécies vegetais têm sido foco de estudos de prospecção de atividade antimicrobiana. Singh e outros (2006) estudaram *Plagiochasma appendiculatum* e confirmaram potencial antibacteriano contra *Streptococcus pneumoniae* e *Enterobacter aerogenes*; potencial antifúngico contra *Candida albicans* e *Cryptococcus albidus*; além de ação cicatrizante em feridas, por ser ativa contra bactérias comuns em infecções, como *Escherichia coli* e *Proteus mirabilis*. Kuete e outros (2009) investigaram atividade antimicrobiana em casca de *Ficus ovata* e os resultados obtidos indicaram atividade no extrato metanólico, em frações enriquecidas e substâncias isoladas, destacando-se inibição de *Streptococcus faecalis*, *Candida albicans* e *Microsporum audouinii*.

Machado e outros (2003) avaliaram a atividade antimicrobiana de 14 espécies de plantas brasileiras utilizadas no tratamento de doenças infecciosas na medicina tradicional. Os extratos de *Punica granatum* e *Tabebuia avellanadae* foram ativos contra *Staphylococcus aureus*. Na avaliação contra *Neisseria gonorrhoeae*, Shokeen e outros (2005) demonstraram que extratos de *Ocimum sanctum*, *Drynaria quercifolia* e *Annona squamosa* foram ativos. *Aloysia triphylla*, *Anthemis nobilis*, *Cymbopogon martini*, *Cymbopogon winterianus*, *Cyperus*

articulatus, *Lippia alba*, *Mentha arvensis* e *Mikania glomerata* são exemplos de plantas brasileiras que possuem atividade confirmada contra o fungo *Candida albicans*.

A prevalência de doenças infecciosas nas plantas em seu ambiente natural é muito baixa, deixando claro que possuem um mecanismo de defesa contra os microrganismos muito eficiente, exercido principalmente através dos produtos do seu metabolismo secundário (HEMAISWARYA, 2008). Os metabólitos especiais (e alguns primários) com potencial antimicrobiano, geralmente são denominados como fitoalexinas (COWAN, 1999), destacando óleos essenciais (SILVA et al., 2009), terpenoides como alguns diterpenos (EL-SEEDI et al., 2002), triterpenos (KATERERE et al., 2003; LASISI et al., 2012), lactonas sesquiterpênicas (LIN et al., 2003), estilbenos, flavonoides e polifenóis (KATERERE et al., 2012; OKWU; NNAMDI, 2011b; SOHN et al., 2004), naftoquinonas (MACHADO et al., 2003) e antraquinonas (LIU; SUN, 2007), que são derivados quinônicos. Além disso, atividade antimicrobiana tem sido atribuída aos taninos, saponinas, cumarinas e alcaloides (ALIYU et al., 2011; HEMAISWARYA, 2008; LASISI et al., 2012).

Extratos obtidos de diversas espécies da família *Crassulaceae*, bem como constituintes isolados têm demonstrado potencial antimicrobiano (AKINSULIRE et al., 2007; ANISIMOV et al., 2009; NWADINIGWE, 2011). Silva e outros (2009) relataram potencial antimicrobiano no óleo essencial obtido das partes aéreas de *Kalanchoe brasiliensis* Cambess frente a cepas de *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA). Flavonoides e alcaloides do gênero *Bryophyllum* apresentaram atividade antimicrobiana (OKWU; NNAMDI, 2011a, 2011b).

Os principais mecanismos pelos quais os constituintes antibacterianos agem contra microrganismos são: afetam a síntese da parede celular, causando lise e morte; danificam a membrana citoplasmática, afetando o seu funcionamento e causando o extravasamento de conteúdo intracelular; afetam síntese de ácidos nucléicos, por diferentes mecanismos, impedindo sua replicação; afetam a função ribossomal e a síntese proteica e a síntese de ácido fólico (APPELBAUM; JACOBS, 2005; BURT, 2004).

Os principais microrganismos utilizados em testes de suscetibilidade são: *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Chlamydia pneumonia*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* (resistente a meticilina), *Staphylococcus aureus* meticilina-resistente (MRSA), *Streptococcus pneumoniae*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterococcus* resistente à vancomicina (VRE), *Pseudomonas aeruginosa*, *Helicobacter pylori* e *Candida albicans* (DUARTE et al., 2005; MAHADY et al., 2008). Além disso, são avaliados microrganismos

relacionados a doenças sexualmente transmissíveis como *Neisseria gonorrhoeae* (SHOKEEN et al., 2005).

Os testes de atividade antimicrobiana são classificados como método de difusão, de diluição ou bioautográficos. A abordagem dos ensaios no teste de suscetibilidade aos antimicrobianos (TSA) é descrita nos itens abaixo:

1) de triagem ou *screening* utilizando o método de difusão em ágar possui como vantagens a rapidez, baixo custo e possibilidade de analisar diversas amostras; não é recomendado pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI), não tendo assim, muita importância científica; porém é exigido pelo *Food and Drug Administration* (FDA), sendo importante quando se tratar de desenvolvimento e inovação de produtos (BURT, 2004; OSTROSKY et al., 2007).

2) de determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM), empregando o teste de microdiluição é um ensaio exigido pelo CLSI e FDA (BURT, 2004).

A atividade antimicrobiana de extratos vegetais é determinada principalmente pela concentração inibitória mínima (CIM) que é definida como a menor concentração do extrato ou da substância que efetivamente inibe o crescimento do microrganismo, ou que mantém ou reduz a viabilidade do inóculo. Outro parâmetro utilizado é a concentração bactericida mínima (CBM), que é a concentração em que 99,9% ou mais do inóculo inicial é morto, de modo que o microrganismo não cresce, e não forma cultura quando o meio do teste de CIM é aplicado no ágar; caso o microrganismo não cresça, mas forme cultura quando aplicado no ágar a atividade é considerada bacteriostática (BURT, 2004; OSTROSKY et al., 2007).

2.10 PROCESSOS INFLAMATÓRIOS E PRODUTOS NATURAIS

Ao longo do tempo, o sistema imune dos mamíferos através dos processos de evolução e adaptação desenvolveu diversas ferramentas para se defender de agentes e processos danosos ao organismo (ALI et al., 1997). Neste sentido, a inflamação é um termo usado para descrever uma série de respostas de tecidos vascularizados, que podemos definir como um conjunto de manifestações hemodinâmicas, interações celulares e atividade de fatores solúveis, que constituem uma resposta protetora imediata do sistema imune a algum tipo de agressão ao organismo (LARSEN; HENSON, 1983).

O primeiro passo na cadeia integrada de reações mediadas pelo sistema imune envolve o reconhecimento do estímulo agressor como microrganismos e substâncias químicas que

desencadeiam as reações do processo inflamatório, através da produção e liberação de mediadores químicos: histamina; prostaglandinas, tromboxanas e leucotrienos; fator de ativação plaquetária; bradicinina; óxido nítrico; neuropeptídeos e citocininas (COUTINHO; MUZITANO; COSTA, 2009). Cada tipo de estímulo ativa um padrão característico de resposta por parte do sistema imune, dependendo dos componentes de reconhecimento e mediadores produzidos (ALI et al., 1997; SILVA; CARVALHO, 2004).

O processo inflamatório como um todo, passa por três fases distintas: Fase transitória aguda (vasodilatação local e aumento da permeabilidade vascular); Fase subaguda (infiltração dos leucócitos e células fagocitárias); Fase proliferativa crônica (degeneração tecidual e fibrose) (SILVA; CARVALHO, 2004). Os sinais cardinais da inflamação – calor, rubor, dor e edema – são consequência dos efeitos mediados sobre a circulação sanguínea no local, permeabilidade vascular, infiltração de leucócitos e liberação de agentes indutores de dor. A perda de função do tecido vascularizado afetado pela inflamação também é considerada um sinal cardinal adicional, porém como isso irá ocorrer depende muito do tipo de tecido em questão e do processo inflamatório em si (ALI et al., 1997; LARSEN; HENSON, 1983).

A pele tem como principal função proteger o organismo de estímulos nocivos, exercendo inclusive proteção imunológica. Os queratinócitos são células epidérmicas que produzem mediadores pro-inflamatórios (p.ex., IL e TNF) e constituem a primeira linha de defesa do sistema imune cutâneo, sendo ativados por diversos estímulos. Outras células, como fibroblastos e macrófagos, localizados nas camadas da pele, também exercem essa atividade de produção de mediadores da inflamação que direcionam as células de defesa, linfócitos e leucócitos fagocitários. Esse sistema permite respostas rápidas e efetivas a estímulos nocivos que acometam a pele (ALI et al., 1997; KUPPER, 1990; WILLIAMS; KUPPER, 1996).

As células de defesa fagocitam e liberam substâncias tóxicas (p.ex. ERO) e enzimas proteolíticas, destruindo assim o agente agressor bem como partes do tecido hospedeiro (ALI et al., 1997). A extensão e a gravidade dessas alterações são determinadas pelas condições fisiológicas do hospedeiro e pelo potencial patogênico do agente agressor. Em estado fisiológico o processo inflamatório é benéfico e não prejudicial, porém em algumas situações a resposta inflamatória pode ser exagerada e descontrolada, podendo configurar um quadro de inflamação crônica. Acredita-se que os processos de inflamação crônica constituem a base de diversas doenças, como a artrite reumatoide, câncer e doenças cutâneas como dermatites e psoríase, necessitando assim de intervenções terapêuticas (BANGERT et al., 2011; DEBENEDICTS et al., 2001; MUELLER, 2006; SILVA; CARVALHO, 2004).

O conhecimento dos mecanismos envolvidos nos processos inflamatórios promoveu o desenvolvimento de terapias anti-inflamatórias e diversos agentes terapêuticos estão disponíveis para o tratamento (SKINNER, 2005). Os fármacos anti-inflamatórios estão entre os mais utilizados pela medicina moderna e alguns tiveram origem de produtos naturais ou (semi-) sintéticos, como o ácido acetilsalicílico (A.A.S.), um AINE, proveniente do ácido salicílico obtido de *Salix spp* (SILVA; CARVALHO, 2004).

Diversas plantas são utilizadas na Medicina Tradicional para o tratamento de infecções e controle da inflamação da pele. Dentre elas podemos citar a arnica (*Arnica montana* e *Lychnophora passerina*), alecrim (*Rosmarinus officinalis*), bardana (*Arctium minus*) e sucupira (*Pterodon emarginatus*) (ABRÃO, 2010; CAPELARI-OLIVEIRA et al., 2011). Outras espécies, como *Rosa multiflora* (GUO et al., 2011), *Adiantum capillus* (HAIDER et al., 2011), *Cordyceps sinensis* (YANG et al., 2011) e *Handroanthus impetiginosus* (BYEON et al., 2008) também têm apresentado potencial anti-inflamatório.

As principais classes de metabólitos especiais que atuam sobre a inflamação são produzidas da via do chiquimato (e/ou via mista acetato-chiquimato): ácidos fenolcarboxílicos, fenóis simples, flavonoides, derivados fenilpropanoídicos, taninos e cumarinas; além de terpenos, saponinas, esteroides, lignanas e alcaloides (COUTINHO; MUZITANO; COSTA, 2009; SILVA; CARVALHO, 2004). Diversos derivados flavonoídicos têm sua atividade anti-inflamatória descrita na literatura (Figura 14): flavonóis (p.ex. quercetina, canferol e miricetina), flavonas (p. ex. apigenina, luteolina e crisina) e a isoflavona genisteína exercem efeito anti-inflamatório devido à inibição da PLA₂, COX, LOX e iNOS, inibindo a produção de NO (COUTINHO; MUZITANO; COSTA, 2009). Moon; Choi; Kim (2011) relatam a capacidade da naringenina de suprimir a expressão do RNAm responsável pela produção de TSLP em células MHC-1, uma linfopoiética que atua em processos inflamatórios e doenças alérgicas como asma e dermatite atópica.

Os medicamentos anti-inflamatórios tópicos vêm sendo estudados a mais de 30 anos. Na Alemanha, a Comissão E, entidade que regulamenta os medicamentos, já comprovou eficácia e validou o uso tradicional de aproximadamente 300 preparações fitoterápicas de uso anti-inflamatório tópico (MEYER et al., 2005). O creme de *Matricaria camomila* apresentou atividade anti-inflamatória semelhante à hidrocortisona. Outros exemplos de plantas medicinais veiculadas em formulações semi-sólidas de uso dermatológico foram *Arnica montana*, *Aesculus hippocastanum*, *Calendula officinalis*, *Hypericum perforatum* e *Salvia officinalis* (DATNER, 2004; MEYER et al., 2005).

No Brasil, recentemente foi lançado o Acheflan[®], fitoterápico anti-inflamatório de uso tópico, que contém 5,0 mg do óleo essencial de *Cordia verbenacea* (erva-baleeira) (COUTINHO; MUZITANO; COSTA, 2009). Cesca e outros (2012) desenvolveram uma formulação semi-sólida de uso tópico contendo 0,5 e 1,0% de extrato seco padronizado de *Aleurites moluccana* e avaliaram as ações analgésica, anti-inflamatória e cicatrizante. Os resultados foram significativos para as três atividades, condizendo com as informações etnofarmacológicas da espécie.

Os modelos de inflamação *in vivo*, como edema de pata e de orelha induzido por agentes flogísticos e pleurisia têm sido utilizados frequentemente nos estudos de atividade anti-inflamatória com produtos naturais e sintéticos (WILLOUGHBY, 2003). Especialmente, o modelo de edema de orelha é extremamente útil na avaliação da atividade anti-inflamatória tópica, pois é uma metodologia bastante simples e rápida, que requer pequena quantidade de amostra, apresenta boa reprodutibilidade, fornece resultados rápidos e com elevado grau de confiança, além de identificar substâncias que tenham a capacidade de penetrar na pele (GÁBOR, 2003).

O óleo de cróton é um potente agente irritante obtido da espécie *Croton tiglium* L. (Euphorbiaceae) conhecida por sua ação flogística. É constituído por uma mistura de lipídeos, onde o 13-acetato de 12-*O*-tetradecanoilforbol (TPA), agente irritante, é um dos principais ésteres de forbol presente no óleo. A aplicação tópica desse agente está associada à resposta inflamatória, estresse oxidativo, proliferação e ativação de oncogenes nucleares (GARG et al., 2008). A aplicação única de óleo de cróton gera resposta inflamatória aguda, apresentando vasodilatação, infiltração de leucócitos polimorfonucleares e edema (SARAIVA et al., 2011).

O ácido araquidônico (AA), um ácido graxo também utilizado como agente flogístico, é o substrato das enzimas cicloxigenases (COX) e lipoxigena (LOX), que origina mediadores da inflamação como prostaglandinas (PG) e leucotrienos (LT), respectivamente, promovendo a formação do edema. Nesse modelo, é possível identificar substâncias que inibem esse metabolismo (CRUMMEY et al., 1987; YOUNG et al., 1984). Outro modelo de edema de orelha é a dermatite induzida por fenol é um dos modelos animais de dermatite de contato utilizado para produzir irritação imediata. É um modelo de inflamação cutânea aguda que mimetiza a dermatite de contato que ocorre em humanos (LIM; PARK; KIM, 2004). Diversos mecanismos estão envolvidos na inflamação causada pelo fenol decorrentes principalmente da sua ação sobre os queratinócitos, como a liberação de mediadores pró-inflamatórios (p.ex.: IL-1 α), metabólitos do AA e espécies reativas de oxigênio (ERO) (MURRAY et al., 2007; WILMER et al., 1994).

A capsaicina (8-metil-N-vanilil-6-nonenemida), constituinte das pimentas do gênero *Capsicum*, promove uma resposta inflamatória neurogênica, agindo nos receptores vaniloides (TRPV1), e quando aplicada topicamente, induz a liberação de vários mediadores pró-inflamatórios que promovem vasodilatação e eritema como resposta imediata, seguido da formação de edema cujo pico máximo é atingido até 30 minutos após sua aplicação (GÀBOR; 2000; KWAK et al., 1998; SZOLCSÀNYI, 2004; ZEGARSKA et al., 2006). O EPP (etil-fenil-propiolato) é um éster que promove a liberação de mediadores como cininas, serotonina e prostaglandinas (PGs), causando aumento da permeabilidade vascular e do fluxo sanguíneo, e infiltração de leucócitos (KALE et al., 2007).

2.11 POLÍTICAS DE PLANTAS MEDICINAIS E FITOTERÁPICOS NO CONTEXTO DA PESQUISA CIENTÍFICA

No Brasil, a partir de 1980, foram criados diversos instrumentos normativos como resoluções e portarias, que tratam a respeito da fitoterapia como interesse popular e institucional. Em 2006 foram lançadas duas políticas nacionais, Política Nacional de Plantas Mediciniais e Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares no SUS, que vêm fortalecendo a geração de conhecimento acerca dos fitoterápicos. Apesar de possuírem diretrizes diferentes, visam de uma forma geral “garantir à população brasileira o acesso seguro e o uso racional de plantas medicinais e fitoterápicos”, além de “promover o uso sustentável da biodiversidade, o desenvolvimento da cadeia produtiva e da indústria nacional” (Brasil, 2006a, 2006b).

O Ministério da Saúde, no cumprimento de suas atribuições de coordenação do Sistema Único de Saúde (SUS) e de estabelecimento de políticas para garantir a integralidade na atenção à saúde, lançou a Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares (PNPIC) no SUS que busca atender à necessidade de se conhecer, apoiar, incorporar e implementar experiências que já vêm sendo desenvolvidas na rede pública de muitos municípios e estados, entre as quais destaca-se a Fitoterapia. Dentre as diretrizes do PNPIC para o segmento de “Plantas Mediciniais e Fitoterápicos” está a Diretriz PMF1 - Elaboração da Relação Nacional de Plantas Mediciniais e da Relação Nacional de Fitoterápicos (RENISUS). Essa relação de plantas medicinais foi elaborada e consta de 71 espécies com as quais o SUS tem focado seu atendimento e as diretrizes do PNPIC (BRASIL, 2006b).

A diretriz PMF 7 do PNPIC – “Incentivo à pesquisa e desenvolvimento de plantas medicinais e fitoterápicos, priorizando a biodiversidade do país.” – visa adotar medidas que dentre vários aspectos, possibilite: 1) Garantir linhas de financiamento nos Ministérios da Saúde, da Agricultura, do Meio Ambiente, da Ciência e Tecnologia, nas Fundações de Amparo à Pesquisa, na OMS/OPAS, para pesquisas com as espécies que constam na RENISUS e para estímulo à produção nacional, visando assegurar o fornecimento regular ao mercado interno; 2) Estimular linhas de pesquisa em fitoterapia nos cursos de pós-graduação *strictu sensu* junto às universidades e institutos de pesquisa; 3) Promover pesquisa e desenvolvimento tecnológico, com base no uso tradicional das plantas medicinais, priorizando as necessidades epidemiológicas da população, com ênfase nas espécies nativas e naquelas que estão sendo utilizadas no setor público e nas organizações dos movimentos sociais (BRASIL, 2006b).

Essa dissertação tem sua originalidade, viabilidade, importância e atualidade fundamentadas pelo PNPIC e suas diretrizes, pois, envolve a avaliação e confirmação de potenciais de ações farmacológicas de uma espécie medicinal que consta na RENISUS. A mesma está inserida nas diretrizes do PNPIC e assim irá contribuir com a concretização dessa política. *Bryophyllum pinnatum* (Lam.) Oken, espécie estudada, é utilizada popularmente no tratamento de inflamações, infecções, ferimentos e queimaduras. Diversos constituintes do metabolismo secundário com atividades anti-inflamatória, antioxidante e antimicrobiana têm sido identificados.

3 OBJETIVOS

OBJETIVO GERAL

Caracterizar e quantificar constituintes do metabolismo especial e avaliar as atividades antioxidante, antibacteriana e anti-inflamatória tópica do extrato etanólico e frações das folhas de *Bryophyllum pinnatum* (Lam.) Oken com intuito de evidenciar cientificamente o uso popular e contribuir com a melhoria da qualidade de vida da população, além de direcionar futuros estudos de desenvolvimento de medicamentos fitoterápicos.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Obter e fracionar o extrato etanólico das folhas de *Bryophyllum pinnatum*;
- Caracterizar quimicamente o extrato etanólico e frações utilizando marcadores químicos da espécie;
- Quantificar os teores de fenóis e flavonoides no extrato etanólico e frações das folhas de *Bryophyllum pinnatum*;
- Avaliar a atividade antioxidante *in vitro* do extrato etanólico e frações das folhas de *Bryophyllum pinnatum*;
- Avaliar a atividade antibacteriana do extrato etanólico e frações das folhas de *Bryophyllum pinnatum*;
- Avaliar a atividade anti-inflamatória tópica do extrato etanólico das folhas de *Bryophyllum pinnatum* em modelos de edema de orelha.

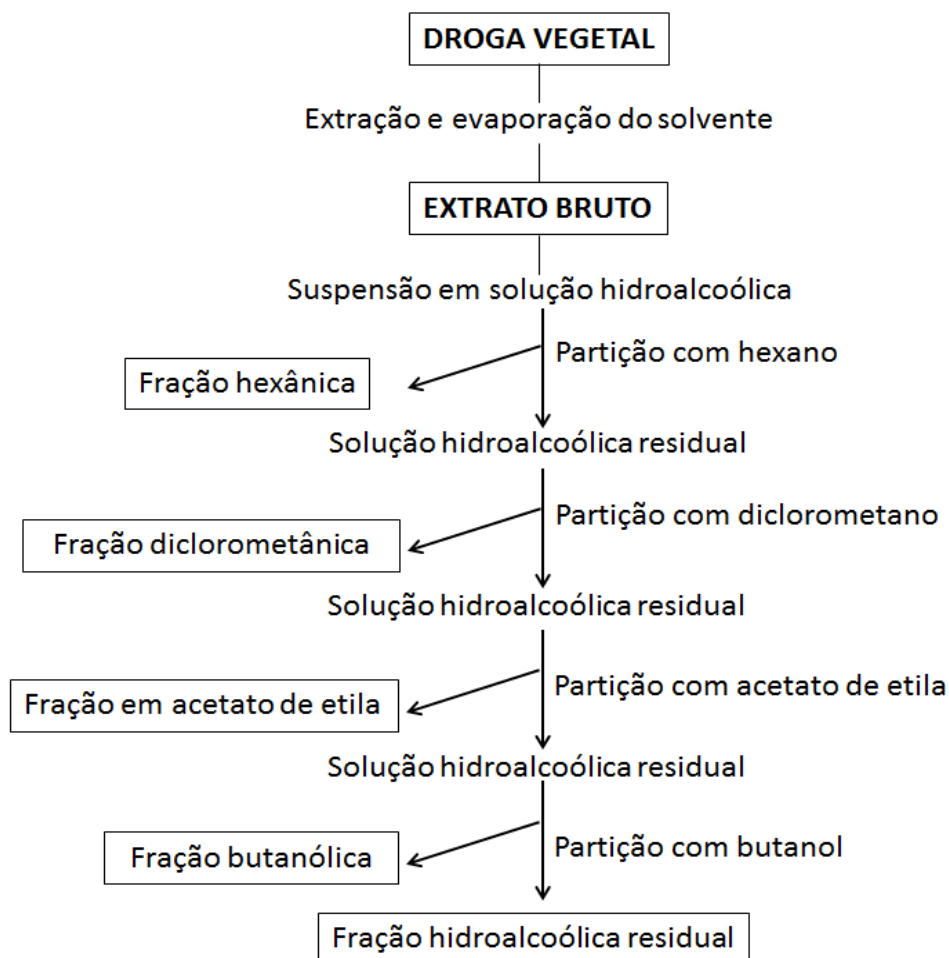
4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 MATERIAL VEGETAL

Bryophyllum pinnatum (Lam.) Oken foi coletada no Horto Medicinal da Faculdade de Farmácia da Universidade de Juiz de Fora, Juiz de Fora, Minas Gerais. Uma exsicata (CESJ nº 46.575) encontra-se depositada no Herbário do Departamento de Botânica da Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF).

Para preparo do extrato, coletou-se folhas de *B. pinnatum* que foram submetidas à secagem sob ventilação forçada até perda da umidade de 90 a 96%. Após secagem, o material foi pulverizado em moinho com granulação definida (tamise nº 20) para realização posterior de extração dos constituintes.

Figura 13. Fluxograma do processo de extração e fracionamento.



Fonte: O autor (2013).

4.2 PROCESSO DE EXTRAÇÃO E FRACIONAMENTO

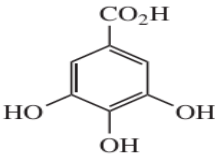
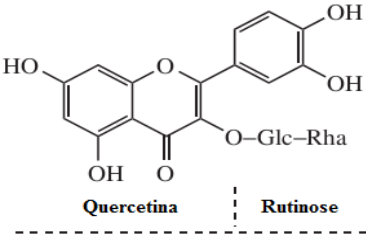
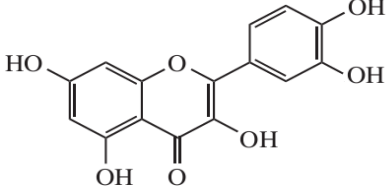
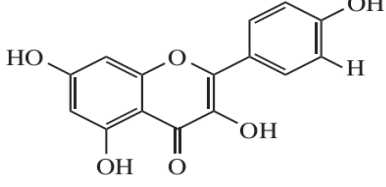
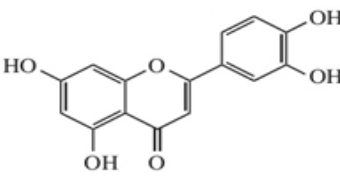
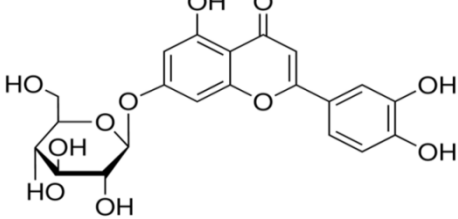
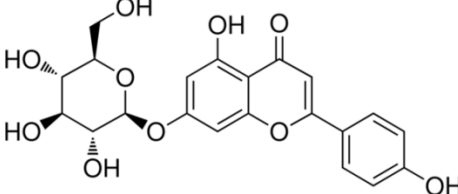
O material vegetal seco e pulverizado (droga vegetal) foi submetido à extração por maceração estática em etanol P.A., com renovação do solvente (remaceração), à temperatura ambiente, até seu esgotamento. Parte do extrato etanólico obtido, após rota-destilação para remoção do solvente, foi ressuspensionado em água:etanol (9:1) e submetido a um processo de semi-purificação ou fracionamento através de partição líquido-líquido (extração em batelada) em funil de separação, com solventes orgânicos de polaridade crescente: hexano, diclorometano, acetato de etila e butanol (Figura 13). O extrato etanólico e suas frações foram empregados na caracterização química e nos testes de avaliação das atividades biológicas.

4.3 PERFIL CROMATOGRÁFICO E CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA

O extrato etanólico e as frações hexânica, diclorometânica, em acetato de etila e butanólica das folhas de *B. pinnatum* foram avaliados por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) (Agilent[®], 1200 series) com detector UV DAD. As análises foram realizadas em coluna de fase reversa C₁₈ (25 cm x 4,6 cm x 5 µm); eluição em modo isocrático, fluxo de 0,6 mL/min, de fase móvel composta pela mistura de água:acetonitrila (8:2) acidificada com ácido fosfórico (H₃PO₄) 0,5%; concentração das amostras de 1 mg/mL, volume de injeção de 50 µL e temperatura da coluna de 25° C. A análise de cada amostra teve duração de 30 min, com *post time* de 2 min entre as amostras. Os cromatogramas foram obtidos nos comprimentos de onda de 210, 230, 254, 280 e 320 nm e os espectros UV foram obtidos por varredura no UV (190 a 400 nm).

Para obtenção do perfil cromatográfico e caracterização química do extrato etanólico e frações, foram utilizadas como marcadores químicos na CLAE as seguintes substâncias fenólicas padrão (Sigma-Aldrich[®]): ácido gálico, rutina, quercetina, canferol, luteolina, luteolina 7-O-β-D-glicosídeo e apigenina 7-O-β-D-glicosídeo (Tabela 6). Para as análises dos padrões foram empregadas as mesmas condições cromatográficas, incluindo a obtenção dos espectros por varredura no UV (190 a 400 nm). Após obtenção dos cromatogramas e espectros UV das amostras e marcadores químicos, a identificação das substâncias padrão nas amostras foi realizada por análise e comparação dos tempos de retenção dos picos nos cromatogramas e dos espectros UV.

Tabela 6. Marcadores químicos utilizados para padronização do extrato etanólico das folhas de *Bryophyllum pinnatum* em CLAE-UV.

Substância	Classe	Estrutura
Ácido gálico	Ácido fenólico	
Rutina	Flavonoide (flavonol glicosilado)	 <p style="text-align: center;">-----</p> <p style="text-align: center;">Quercetina Rutinose</p>
Quercetina	Flavonoide (Flavonol)	
Canferol	Flavonoide (Flavonol)	
Luteolina	Flavonoide (Flavona)	
Luteolina 7-O-β-D-glicosídeo	Flavonoide (Flavona glicosilada)	
Apigenina 7-O-β-D-glicosídeo	Flavonoide (Flavona glicosilada)	

A fração hexânica, por conter substâncias apolares, foi submetida à análise por Cromatografia com Fase Gasosa (CG) acoplada a Espectrometria de Massas (CG-EM). As análises foram realizadas na plataforma analítica da Farmanguinhos (FIOCRUZ – Rio de Janeiro, Brasil) utilizando cromatógrafo a gás (CG) (Hewlett-Packard® 6890) equipado com coluna capilar de sílica fundida (HP-5, espessura do filme: 30m x 0,25mm, 0,25 µm), 60 min de duração da corrida, tendo o hélio como gás carreador com fluxo de 10 mL/min; temperatura inicial de 300 °C e máxima de 350 °C. A detecção foi realizada através de espectrômetro de massa (EM) (Hewlett-Packard® 5972), acoplado ao CG, com ionização eletrônica (IE) (70 eV e fonte de ion de 250 °C).

4.4 DETERMINAÇÃO DOS TEORES DE FENÓIS TOTAIS

A quantificação dos teores de fenóis totais foi realizada por espectrometria na região do visível utilizando o método de Folin-Ciocalteu (SOUSA et al., 2007). O ácido gálico foi utilizado como padrão para obtenção da curva de calibração. A partir de uma solução estoque de 1 mg/mL de ácido gálico em etanol, foram preparadas, em triplicata, nove concentrações (200 a 840 µg/mL) em tubos de ensaio (Tabela 7). Alíquotas de 100 µL de solução de ácido gálico foram coletadas de cada tubo de ensaio e transferidas para tubos falcon. Em seguida, foram adicionados 500 µL de reagente de Folin-Ciocalteu e 6 mL de água destilada a cada tubo e homogeneizado em vórtex por 1 min. Aos tubos, foram colocados 2 mL de Na₂CO₃ 15% e agitados por mais 30 s. Finalmente, os tubos tiveram os volumes ajustados para 10 mL, adicionando-se 1,4 mL de água destilada (Tabela 8). Após 2 h de reação em temperatura ambiente, as absorvâncias das soluções de ácido gálico foram medidas através de espectrofotômetro (SHIMADZU®, UV-1800) em 783 nm. Para realizar o “auto-zero” do espectrofotômetro foi utilizado etanol e o branco das amostras foi composto por 100 µL de etanol e todos os reagentes, exceto as soluções de ácido gálico.

Tabela 7. Diluições apartir da solução estoque de ácido gálico (1 mg/mL) e amostras (extrato e frações – 2 mg/mL).

Tubo	Volume de S.E. (μL)		Volume de EtOH (μL)		Volume total (mL)		Concentração ($\mu\text{g/mL}$)	
	Ácido gálico	Amostras	Ácido gálico	Amostras	Ácido gálico	Amostras	Ácido gálico	Amostras
1	200	6000	800	4000	1	10	200	1200
2	280	7000	720	3000	1	10	280	1400
3	360	8000	640	2000	1	10	360	1600
4	440	9000	560	1000	1	10	440	1800
5	520	10000	480	0	1	10	520	2000
6	600	-----	400	-----	1	-----	600	-----
7	680	-----	320	-----	1	-----	680	-----
8	760	-----	240	-----	1	-----	760	-----
9	840	-----	160	-----	1	-----	840	-----

Fonte: O autor (2013).

Com as médias das absorvâncias de cada concentração de ácido gálico foi construída a curva de calibração e após, através de análise de regressão linear (método dos quadrados mínimos) foi traçada a reta entre os pontos e determinada a equação da reta, juntamente com o coeficiente de determinação (R^2) (SIGMAPLOT[®] 11.0). Para quantificação dos teores de fenóis totais nas amostras, foi preparada solução estoque do extrato etanólico e frações (em hexano, diclorometano, acetato de etila e butanol) a 2 mg/mL em etanol. A partir dessa solução estoque, foram preparadas, em triplicata, cinco concentrações diferentes (Tabela 7) em tubos de ensaio. Alíquotas de 100 μL das soluções das amostras foram coletadas de cada tubo de ensaio e transferidas para tubos falcon, a reação e leitura espectrofotométrica foi realizada da mesma forma descrita para o padrão (Tabela 8).

Tabela 8. Alíquotas das soluções de ácido gálico/amostras e reagentes utilizados para quantificação de fenóis totais.

Tubos	Concentração inicial ($\mu\text{g/mL}$)		Alíquotas (μL)	Reagente de Folin- Ciocalteu (μL)	H_2O (mL)	Na_2CO_3 (mL)	H_2O (mL)	Concentração final ($\mu\text{g/mL}$)	
	Solução ácido gálico	Solução amostra						Solução ácido gálico	Solução amostra
	1	200						1200	100
2	280	1400	100	500	6	2	1,4	2,8	14
3	360	1600	100	500	6	2	1,4	3,6	16
4	440	1800	100	500	6	2	1,4	4,4	18
5	520	2000	100	500	6	2	1,4	5,2	20
6	600	-----	100	500	6	2	1,4	6,0	-----
7	680	-----	100	500	6	2	1,4	6,8	-----
8	760	-----	100	500	6	2	1,4	7,6	-----
9	840	-----	100	500	6	2	1,4	8,4	-----

Fonte: O autor (2013).

4.5 DETERMINAÇÃO DOS TEORES DE FLAVONOIDES TOTAIS

A quantificação dos teores de flavonoides totais foi realizada por espectrofotometria na região do visível utilizando cloreto de alumínio (AlCl_3) (LEITE, 2002; SOBRINHO et al., 2008). Solução estoque de rutina a 0,5 mg/mL em etanol foi usada como padrão para a obtenção da curva de calibração, preparando diluições com concentrações entre 2 a 60 $\mu\text{g/mL}$ (Tabela 9). Para isto, foram transferido o volume necessário de solução-estoque (20 a 600 μL), 0,4 mL de etanol, 0,12 mL de ácido acético, 2 mL de solução de piridina a 20% em etanol, 0,5 mL de AlCl_3 a 8% em etanol e o volume necessário de água destilada para completar o volume dos tubos para 5 mL. Após 30 min em temperatura ambiente, as absorvâncias das soluções de rutina foram registrada em espectrofotômetro (SHIMADZU[®], UV-1800) a 407 nm. Para realizar o “auto-zero” do espectrofotômetro, foi utilizado etanol e o branco das amostras continha etanol e os reagentes, exceto soluções de rutina.

Tabela 9. Diluições da solução estoque de rutina, extrato etanólico e frações para quantificação de flavonoides totais.

TUBOS	Sol. Rutina	EtOH	Sol. amostra	Ácido acético	Sol. piridina	Sol. AlCl ₃	Água (μ L)	Concentração
1	20 μ L	400 μ L	-----	120 μ L	2 mL	0,5 mL	1960	2 μ g/mL
2	50 μ L	400 μ L	-----	120 μ L	2 mL	0,5 mL	1930	5 μ g/mL
3	100 μ L	400 μ L	-----	120 μ L	2 mL	0,5 mL	1880	10 μ g/mL
4	200 μ L	400 μ L	-----	120 μ L	2 mL	0,5 mL	1780	20 μ g/mL
5	300 μ L	400 μ L	-----	120 μ L	2 mL	0,5 mL	1680	30 μ g/mL
6	400 μ L	400 μ L	-----	120 μ L	2 mL	0,5 mL	1580	40 μ g/mL
7	500 μ L	400 μ L	-----	120 μ L	2 mL	0,5 mL	1480	50 μ g/mL
8	600 μ L	400 μ L	-----	120 μ L	2 mL	0,5 mL	1380	60 μ g/mL
Extrato	-----	-----	400 μ L	120 μ L	2 mL	0,5 mL	1980	0,8 mg/mL
FH	-----	-----	400 μ L	120 μ L	2 mL	0,5 mL	1980	4 mg/mL
FD	-----	-----	400 μ L	120 μ L	2 mL	0,5 mL	1980	0,4 mg/mL
FA	-----	-----	400 μ L	120 μ L	2 mL	0,5 mL	1980	0,12 mg/mL
FB	-----	-----	400 μ L	120 μ L	2 mL	0,5 mL	1980	0,8 mg/mL
Branco	-----	400 μ L	-----	120 μ L	2 mL	0,5 mL	1980	-----

EtOH – Extrato etanólico, FH – Fração hexânica, FD – Fração diclorometânica, FA – Fração em acetato de etila, FB – Fração butanólica. Fonte: O autor (2013).

Com as médias das absorvâncias de cada concentração de rutina foi construída a curva de calibração e, após análise de regressão linear (método dos quadrados mínimos), foi determinada a equação da reta e o coeficiente de determinação (R^2) (SIGMAPLOT[®] 11.0). Para quantificação das amostras, foi preparada solução-estoque em etanol do extrato etanólico (10 mg/mL), frações hexânica (50 mg/mL), diclorometânica (5 mg/mL), em acetato de etila (1,5 mg/mL) e butanólica (10 mg/mL). A partir de 5 mL dessas soluções foram realizadas semi-purificações, adicionando 2 mL de hexano e 3 mL de água destilada seguida de centrifugação a 3000 rpm durante 2 min. Em seguida, a parte superior da mistura foi removida com pipeta *Pasteur* e alíquotas de 0,4 mL, em triplicata, da fase hidroalcolica inferior foram coletadas e transferidas para tubos de ensaio, nos quais procedeu-se a reação e leitura da mesma forma descrita para o padrão (Tabela 9).

4.6 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

4.6.1 Método do sequestro do radical DPPH

A atividade antioxidante do extrato etanólico e frações das folhas de *B. pinnatum* foi determinada através do método espectrofotométrico utilizando o radical livre DPPH \cdot (2,2-difenil-1-picril-hidrazila) (Sigma-Aldrich[®]), conforme descrito por Mensor e outros (2001). Foram preparadas soluções estoque a 1 mg/mL em etanol das amostras (extrato e frações) e da rutina (controle positivo). A partir das soluções estoque, foram realizadas diluições em etanol, obtendo-se diferentes concentrações (Tabela 10).

Após as diluições das soluções estoque, alíquotas de 2,5 mL foram coletadas, em triplicata, e transferidas para tubos de ensaio seguida da adição de 1,0 mL da solução de DPPH 0,3 mM. Após 30 min de reação, a leitura foi realizada através de espectrofotômetro (SHIMADZU[®], UV-1800) em 515 nm. O branco das amostras e da rutina constituiu-se de 2,5 mL de suas respectivas soluções e 1,0 mL de etanol, sendo realizado para cada uma das concentrações utilizadas. O controle negativo foi constituído por 2,5 mL de etanol e 1,0 mL de solução de DPPH, seu branco é composto somente por etanol.

Tabela 10. Diluições das soluções estoques para o método do DPPH.

Tubos	Concentrações ($\mu\text{g/mL}$)					
	EE	FH	FD	FA	FB	Rutina
1	1	5	5	1	1	1
2	5	15	15	5	5	3
3	10	25	25	10	10	5
4	17,5	50	50	15	15	10
5	25	75	75	20	20	15
6	50	100	100	25	25	30
7	75	125	125	50	50	----
8	125	150	150	75	75	----
9	250	250	250	100	100	----
10	500	500	500	150	150	----
11	750	750	750	250	250	----

EE: Extrato etanólico, FH: Fração hexânica, FD: Fração diclorometânica, FA: Fração em acetato de etila e FB: Fração butanólica. Fonte: O autor (2013).

A partir das leituras obtidas no espectrofotômetro, determinou-se a porcentagem de atividade antioxidante (%AA) que corresponde à quantidade de DPPH reduzida pelas amostras, utilizando a seguinte fórmula:

$$\%AA = 100 - \left[\left(\frac{Abs\ amostra - Abs\ branco\ da\ amostra}{Abs\ controle - Abs\ branco\ do\ controle} \right) \times 100 \right]$$

Onde, *Abs amostra*: absorvância das amostras ou rutina para uma dada concentração; *Abs branco da amostra*: absorvância do branco das amostras ou rutina para uma dada concentração; *Abs controle*: absorvância do controle negativo; *Abs branco do controle*: absorvância do branco do controle negativo.

Após calcular as porcentagens de atividade antioxidante das amostras e da rutina, nas concentrações descritas na Tabela 10, os valores foram usados para montagem dos gráficos cuja abscissa corresponde à concentração da amostra/rutina e a ordenada à %AA. Através da análise de regressão linear pelo método dos mínimos quadrados foram determinadas as equações da reta (SIGMAPLOT[®] 11.0), as quais foram utilizadas para o cálculo da concentração efetiva 50% (CE₅₀), substituindo-se a variável y da equação por 50. Assim, quanto maior a redução do DPPH por uma amostra, menor será a CE₅₀ e maior será sua atividade antioxidante.

4.6.2 Método do poder de redução

O poder de redução ou poder antioxidante de redução de ferro (FRAP) do extrato etanólico e frações de *B. pinnatum* foi determinado pelo método descrito por Oyaizu (1986). Foram preparadas soluções estoque a 1 mg/mL das amostras (extrato etanólico e frações) e da rutina (controle positivo) utilizando metanol como diluente. A partir das soluções estoque, foram feitas diluições transferindo-se, em triplicata, diferentes alíquotas para tubos falcon e completou-se o volume para 1 mL com água, de modo a obter diferentes concentrações (Tabela 11). Foram adicionados, uma alíquotas de 1 mL das soluções das amostras e rutina, 2,5 mL de tampão fosfato de potássio 200 µM (pH 6,6) e 2,5 mL de solução de ferrocianeto de potássio [K₃Fe(CN)₆] 1% (Vetec[®]). A mistura foi incubada em estufa a 50 °C por 20 min, na sequência, foram adicionados 2,5 mL de uma solução de ácido tricloroacético (CCl₃CO₂H)

10% (Synth[®]) e a mistura foi submetida a centrifugação a 3000 rpm por 8 minutos. Após centrifugação, uma alíquota de 2,5 mL da camada superior da mistura foi transferida para tubo de ensaio e foram adicionados 2,5 mL de água destilada e 0,5 mL de cloreto férrico (FeCl₃) 0,1% (Synth[®]). O branco das amostras foi constituído por 1 mL de água e todos os demais reagentes, exceto as soluções das amostras e rotina.

As leituras espectrofotométricas foram realizadas a 700 nm (SHIMADZU[®], UV-1800), obtendo-se as curvas de concentrações *versus* absorvâncias. Através da análise de regressão linear pelo método dos mínimos quadrados foram determinadas as equações da reta (SIGMAPLOT[®] 11.0), as quais foram utilizadas para o cálculo da concentração efetiva 50% (CE₅₀) das amostras e rotina, substituindo-se a variável y da equação por 0,5, de modo que a CE₅₀ indica a concentração efetiva na qual a absorvância foi 0,5 para o poder de redução.

Tabela 11. Diluições das soluções estoque para o método do poder de redução.

Tubos	Concentrações (µg/mL)					
	Extrato	FH	FD	FA	FB	Rutina
1	25	100	100	50	100	10
2	50	200	200	100	200	25
3	100	300	300	150	300	50
4	150	400	400	200	350	75
5	200	500	500	300	400	100
6	250	600	600	400	450	125
7	300	700	700	500	500	150
8	400	800	800	-----	600	200
9	500	900	900	-----	700	250
10	600	1000	1000	-----	800	300
11	700	-----	-----	-----	900	350
12	800	-----	-----	-----	1000	400
13	900	-----	-----	-----	-----	500
14	1000	-----	-----	-----	-----	600
15	-----	-----	-----	-----	-----	700

EtOH – Extrato etanólico, FH – Fração hexânica, FD – Fração diclorometânica, FA – Fração em acetato de etila, FB – Fração butanólica.

Fonte: O autor (2013).

4.6.3 Método de cooxidação do β -caroteno/ácido linoléico

A atividade antioxidante do extrato etanólico e frações de *B. pinnatum* foram determinadas pelo método de cooxidação do β -caroteno/ácido linoléico descrito por Koleva e outros (2002). Preparou-se uma solução de β -caroteno (Sigma-Aldrich[®]) a 0,2 mg/mL em clorofórmio e, 1 mL dessa solução foi adicionado a um balão de rotaevaporação, contendo ácido linoléico (25 μ L) (Sigma-Aldrich[®]) e Tween 40 (200 mg) (Sigma-Aldrich[®]). O balão, então, foi submetido à rotaevaporação em banho de água a 40° C, durante 15 minutos, para remoção do clorofórmio. Em seguida, 50 mL de água destilada, oxigenada por borbulhamento através de uma bomba de ar, foram adicionados ao balão lentamente sob agitação constante, para formação de uma emulsão. Paralelamente, foram preparadas soluções das amostras a 250 μ g/mL e dos controles positivos (BHT, rutina e quercetina) a 25 μ g/mL. Alíquotas de 30 μ L das soluções foram colocadas em poços de microplaca, em triplicata, seguido de 250 μ L da emulsão. Esse procedimento foi realizado rapidamente, para evitar a evaporação do etanol e a oxidação prévia do β -caroteno. O controle negativo foi realizado em triplicata, adicionando-se aos poços 30 μ L de etanol e 250 μ L da emulsão. O branco constituiu-se de 280 μ L de etanol.

A primeira leitura (t_0) das absorvâncias foi feita imediatamente após a adição das alíquotas de emulsão na microplaca e, em seguida, a microplaca foi incubada por 15 minutos em estufa a 50° C. Após incubação, foi realizada a segunda leitura (t_{15}) e esse procedimento repetiu-se por mais seis vezes obtendo-se ao final, oito leituras (t_0 , t_{15} , t_{30} , t_{45} , t_{60} , t_{75} , t_{90} e t_{105}), para monitoramento do processo de oxidação do β -caroteno, que resultou no clareamento e conseqüentemente, na redução gradual da absorvância das soluções nos poços da microplaca. As medidas das absorvâncias foram realizadas em leitor de microplacas (THERMOPLATE[®], TP-READER) em comprimento de onda de 492 nm. A partir das leituras obtidas das absorvâncias em t_0 , t_{15} , t_{30} , t_{45} , t_{60} , t_{75} , t_{90} e t_{105} , montou-se o gráfico de decaimento da absorvância em função do tempo e determinou-se a porcentagem de inibição da peroxidação lipídica (%I), utilizando a seguinte fórmula:

$$\%I = \left(\frac{A \text{ controle} - A \text{ amostra}}{A \text{ controle}} \right) \times 100$$

Onde, $A \text{ controle} = Abs t_0 - Abs t_{105}$ e $A \text{ amostra} = Abs t_0 - Abs t_{105}$, sendo que $A \text{ controle}$: controle negativo e $A \text{ amostra}$: extrato, frações e controles positivos (BHT, rutina e quercetina).

4.6.4 Método da bioautografia

A atividade antioxidante do extrato etanólico e frações de *B. pinnatum* também foram avaliadas pelo método da bioautografia utilizando o radical livre DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazila) (Sigma-Aldrich[®]) (CAVIN et al.,1998). Foram preparadas soluções em metanol das amostras a 10 mg/mL. Essas soluções foram aplicadas (20 µL), separadamente, em placas de silicagel 60 com indicador de fluorescência (UV 254 nm) para CCD (MACHEREY-NAGEL[®]) e eluídas com as fases móveis (FM) pré-determinadas para cada amostra: a) fração hexânica: FM constituída por hexano:acetato de etila (7:3); b) fração diclorometânica: FM constituída por diclorometano:metanol (9,3:0,7); c) frações em acetato de etila e butanólica: FM constituída por butanol:água:ácido acético (6:3:1). O extrato etanólico foi aplicado juntamente com cada uma das frações. Após a eluição e secagem, as placas foram reveladas com solução de DPPH 2,5 mM. Após 30 min ao abrigo da luz, foi observado se houve aparecimento de manchas amarelas ou brancas indicativas da atividade antioxidante. Os Rfs das manchas foram calculados.

Réplicas das placas reveladas com DPPH foram usadas para identificar classes de metabólitos presentes nas amostras. Essas placas foram pulverizadas com reagente NP/PEG (flavonoides), solução de cloreto de alumínio (AlCl₃) 2% (flavonoides), solução de cloreto férrico (FeCl₃) 5% (substâncias fenólicas), solução de hidróxido de potássio (KOH) 10% (cumarinas), vanilina sulfúrica (reagente geral), reagente de Dragendorff (alcaloides) e reagente de Liebermann-Burchard (terpenoides). Os Rfs das manchas foram calculados e comparados com os Rfs das manchas reveladas com DPPH. Dessa forma, foi possível detectar classes dos metabólitos com atividade antioxidante presentes nas amostras.

4.7 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA

A atividade antibacteriana foi avaliada pelo teste de suscetibilidade aos antimicrobianos (TSA), utilizando os métodos de difusão em ágar e da concentração inibitória mínima (CIM) por microdiluição. Os procedimentos foram baseados nas recomendações dos documentos elaborados pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) (CLSI, 2009a, 2009b, 2012).

Para os experimentos microbiológicos, foram utilizadas amostras de referência, representativas de grupos bacterianos Gram-positivos e Gram-negativos: *Staphylococcus*

aureus (ATCC[®]29213), *Escherichia coli* (ATCC[®]10536), *Salmonella typhimurium* (ATCC[®]13311) e *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC[®]27853).

4.7.1 Teste de difusão em ágar

O extrato etanólico e as frações das folhas de *B. pinnatum* foram usados para avaliar a atividade antibacteriana. As soluções-teste foram preparadas a partir do extrato e frações, dissolvendo-as em dimetilsulfóxido (DMSO) (Synth[®]) até obter-se uma solução com concentração final de 500 mg/mL. Suspensões bacterianas das amostras de referência, previamente ativadas (cepas de bactérias cultivadas em ágar Müeller-Hinton, 16-18 horas, a $35 \pm 2^\circ\text{C}$, em aerobiose), foram preparadas a partir de cinco unidades formadoras de colônias (UFC) em 4 mL de solução salina esterilizada (0,9% de NaCl) comparadas e ajustadas à escala padrão 0,5 de McFarland. Em seguida, com auxílio de um *swab* esterilizado, foram semeadas em superfície de uma placa de Petri contendo ágar Müeller-Hinton (Himedia[®]). Após as sementeiras, foram confeccionados poços de 6 mm e aplicados 20 µL das soluções do extrato, frações, cloranfenicol (30 µg/mL - controle positivo) (Inlab[®]), ampicilina (10 µg/mL - controle positivo) (Sigma-Aldrich[®]) e dimetilssulfóxido (DMSO – controle negativo). As placas foram incubadas em estufa a $35 \pm 2^\circ\text{C}$ por 16-18 horas em aerobiose e as zonas de inibição de crescimento microbiano foram medidas em milímetros com auxílio de halômetro. Todos os testes foram realizados em triplicata.

4.7.2 Determinação da concentração inibitória mínima

A determinação da concentração inibitória mínima (CIM) em microdiluição usando caldo Müeller-Hinton (MHB) foi realizada conforme preconiza o CLSI (CLSI, 2009b). Suspensões bacterianas das amostras de referência, previamente ativadas (cepas de bactérias cultivadas em ágar Müeller-Hinton, 18 a 24 horas, a $35 \pm 2^\circ\text{C}$, em aerobiose), foram preparadas a partir de cinco unidades formadoras de colônias (UFC) em 4 mL de solução salina esterilizada (0,9% de NaCl) comparadas e ajustadas à escala padrão 0,5 de McFarland. Diluições sucessivas de 5,0 a 0,0025 mg/mL do extrato e frações foram preparadas em microplacas de 96 poços. Para isso, soluções estoque de 12,5 mg/mL em DMSO 1% foram

preparadas e 180µl desta foram transferidos para as microplacas que continham 200µL de MHB (poços A1 a A9), sendo acrescentados 20µL de inóculo bacteriano. As placas foram incubadas por 18 a 24 horas, a $35 \pm 2^\circ\text{C}$, em aerobiose. Os mesmos testes foram realizados simultaneamente com o crescimento do controle (MHB + microorganismo) e o controle negativo (MHB + extrato/frações/formulação). Cloranfenicol foi utilizado como referência com concentrações de 500 a 0,24 µg/mL. A CIM foi calculada como a menor diluição que apresenta completa inibição da cepa testada. Todos os testes foram realizados em triplicatas.

A leitura foi feita pela observação da presença ou ausência de turbidez indicativa de crescimento microbiano. Para melhor visualização dos resultados utilizou-se solução de iodonitrotetrazolium (INT) (Sigma-Aldrich[®]) na concentração de 2 mg/mL. 10µl dessa solução foram aplicados sobre cada poço das placas e, após incubação, observaram-se os poços com coloração avermelhada que é indicativo de crescimento bacteriano, e poços que mantiveram a cor original demonstraram ausência de crescimento.

4.7.3 Determinação de concentração bactericida mínima

A determinação da concentração bactericida mínima (CBM) foi realizada em placa de Petri contendo meio Müeller-Hinton. A placa de Petri foi previamente demarcada de acordo com as posições das diluições do extrato e frações na placa de microdiluição. Uma alíquota do conteúdo dos poços da placa de microdiluição em que não houve crescimento bacteriano foi transferida com o auxílio de um alça estéril para o respectivo local na placa de Petri. A placa foi incubada em estufa a $35 \pm 2^\circ\text{C}$ por 18 a 24 horas. Foi determinada como CBM a menor concentração do extrato e frações que não permitir o desenvolvimento dos microrganismos, indicando assim, atividade bactericida ou bacteriostática.

4.8 ANIMAIS

Foram utilizados camundongos Swiss (25-30 g), machos, com 45 dias de idade, provenientes do Centro de Biologia da Reprodução (CBR) da UFJF. Os animais foram mantidos em gaiolas plásticas com ração e água *ad libitum* a temperatura ambiente ($25 \pm 4^\circ\text{C}$). Os protocolos utilizados foram aprovados pelo Comitê de Ética na Experimentação Animal (CEEA) desta instituição (protocolo nº 105/2012).

4.9 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA TÓPICA

A atividade anti-inflamatória tópica do extrato etanólico das folhas de *B. pinnatum* foi avaliada pelo modelo de edema de orelha em camundongos. Os agentes flogísticos (Sigma-Aldrich[®]), extrato, dexametasona (Sigma-Aldrich[®]) e indometacina (Sigma-Aldrich[®]) foram dissolvidos em um volume de 20 µL de acetona (Synth[®]) e aplicados topicamente na face interna da orelha direita de cada camundongo. Na orelha esquerda de cada animal foi aplicado 20 µL de acetona (veículo). Cada ensaio foi constituído por cinco grupos, todos com seis indivíduos (n = 6): controle negativo (sem tratamento), controle positivo (dexametasona ou indometacina) e o extrato etanólico em três diferentes concentrações de 0,1 mg/orelha, 0,5 mg/orelha e 1,0 mg/orelha. Para minimizar variações referentes às técnicas, os experimentos foram realizados sempre pelo mesmo experimentador.

Nos ensaios com modelos de inflamação aguda (aplicação única do agente flogístico) o edema foi avaliado quanto ao aumento da massa das orelhas (mg). Para isso, após indução do processo inflamatório e tratamentos, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical e discos de 6 mm de diâmetro de ambas as orelhas foram coletados através de um *punch* (Richter[®]) e pesados em balança analítica (SHIMADZU[®], AY220). O aumento da massa da orelha foi obtido pela diferença entre a massa da orelha direita e da esquerda e os resultados expressos como média ± E.P.M. das diferenças dentro de cada grupo.

No ensaio com modelo de inflamação crônica (aplicação múltipla do agente flogístico) o edema também foi avaliado quanto ao aumento da espessura (µm) da orelha dos camundongos. Após indução do processo inflamatório, os animais foram anestesiados por via intraperitoneal (IP) com cetamina (80 mg/kg) e xilazina (15 mg/kg) e a espessura foi medida próxima à extremidade medial da orelha com o auxílio de um micrômetro externo digital (DIGIMESS[®], IP40). O aumento da espessura da orelha foi obtido pela diferença entre a medida após determinado tempo da indução do processo inflamatório e a medida basal, sendo os resultados expressos como média ± E.P.M. das diferenças dentro de cada grupo.

4.9.1 Edema de orelha induzido pela aplicação tópica de óleo de cróton

A atividade anti-inflamatória tópica do extrato etanólico (EE) foi avaliada pelo método do edema de orelha induzido por óleo de cróton descrito por Schiantarelli e outros (1982). Administrou-se topicamente 20 µL de solução de óleo de cróton 2,5% (v/v) em

acetona na face interna da orelha direita de cada camundongo. Em seguida, foram administrados os tratamentos com o EE (0,1, 0,5 e 1,0 mg em 20 μ L de acetona/orelha), dexametasona (0,1 mg em 20 μ L de acetona/orelha) e acetona (20 μ L/orelha). Seis horas após o desafio com o agente flogístico, os animais foram sacrificados e o edema avaliado quanto ao aumento da massa (mg) da orelha, conforme descrito no item 4.9. Amostras das orelhas (discos de 6 mm) foram conservadas em formol e submetidas a análise histológica.

4.9.2 Edema de orelha induzido pela aplicação tópica de ácido araquidônico

A atividade anti-inflamatória tópica do extrato etanólico (EE) foi avaliada pelo método do edema de orelha induzido por ácido araquidônico (AA) (GÁBOR, 2003). O AA (2 mg em 20 μ L de acetona/orelha) foi administrado topicamente na face interna da orelha direita de cada camundongo. Em seguida, foram administrados EE (0,1, 0,5 e 1,0 mg em 20 μ L de acetona/orelha), indometacina (2 mg em 20 μ L de acetona/orelha) e acetona (20 μ L/orelha). Uma hora após o desafio com o agente flogístico, os animais foram sacrificados e o edema avaliado quanto ao aumento da massa (mg) da orelha dos camundongos, conforme descrito no item 4.9 (CRUMMEY et al., 1987; YOUNG et al., 1984).

4.9.3 Edema de orelha induzido pela aplicação tópica de fenol

A atividade anti-inflamatória tópica do EE foi avaliada pelo método do edema de orelha induzido por fenol descrito por Lim; Park; Kim (2004). Administrou-se topicamente 20 μ L de solução de fenol 10% (v/v) em acetona na face interna da orelha direita de cada camundongo. Em seguida, foram administrados os tratamentos com o EE (0,1, 0,5 e 1,0 mg em 20 μ L de acetona/orelha), dexametasona (0,1 mg em 20 μ L de acetona/orelha) e acetona (20 μ L/orelha). Duas horas após o desafio com o agente flogístico, os animais foram sacrificados e o edema avaliado quanto ao aumento da massa (mg) da orelha dos camundongos, conforme descrito no item 4.9.

4.9.4 Edema de orelha induzido pela aplicação tópica de capsaicina

A atividade anti-inflamatória tópica do EE foi avaliada pelo método do edema de orelha induzido por capsaicina (8-metil-N-vanilil-6-nonenemida) descrito por Gábor; Rázga (1992). Nesse ensaio, diferentemente dos modelos de inflamação aguda descritos anteriormente, o desafio com o agente flogístico é feito após os tratamentos. A capsaicina (200 µg em 20 µL de acetona/orelha) foi administrada topicamente na face interna da orelha direita de cada camundongo, 30 min após a administração tópica dos tratamentos com o EE (0,1, 0,5 e 1,0 mg em 20 µL de acetona/orelha), dexametasona (0,1 mg em 20 µL de acetona/orelha) e acetona (20 µL/orelha). Após 30 min do desafio com o agente flogístico, ou seja, uma hora após a aplicação dos tratamentos, os animais foram sacrificados e o edema avaliado quanto ao aumento da massa (mg) da orelha dos camundongos, conforme descrito no item 4.9 (GÁBOR, 2003).

4.9.5 Edema de orelha induzido pela aplicação tópica de etil-fenil-propriolato

A atividade anti-inflamatória tópica do EE foi avaliada pelo método do edema de orelha induzido por EPP descrito por Kale e outros (2004). O EPP (1 mg em 20 µL de acetona/orelha) foi administrado topicamente na face interna da orelha direita de cada camundongo. Em seguida, foram administrados os tratamentos com o EE (0,1, 0,5 e 1,0 mg em 20 µL de acetona/orelha), dexametasona como CP (0,1 mg em 20 µL de acetona/orelha) e acetona como CN (20 µL/orelha). Uma hora após o desafio com o agente flogístico, os animais foram sacrificados e o edema avaliado quanto ao aumento da massa (mg) da orelha dos camundongos, conforme descrito no item 4.9.

4.9.6 Avaliação do edema de orelha induzido pela aplicação múltipla de óleo de cróton

A atividade anti-inflamatória tópica do extrato etanólico das folhas de *B. pinnatum* foi avaliada pelo método do edema de orelha induzido pela aplicação múltipla de óleo de cróton, um modelo de inflamação crônica descrito por Stanley e outros (1991). O processo inflamatório crônico foi induzido pela administração tópica de 20 µL de solução de óleo de cróton 5% (v/v) em acetona na face interna da orelha direita de cada camundongo em dias

alternados durante nove dias. Os tratamentos com o extrato (0,1, 0,5 e 1,0 mg/20 μ L de acetona/orelha), dexametasona (0,1 mg/20 μ L de acetona/orelha) e acetona (20 μ L/orelha) foram administrados a partir do quinto dia de experimento, durante 4 dias consecutivos. Os tratamentos foram realizados duas vezes ao dia, sendo o segundo seis horas após a aplicação do agente flogístico, e o edema foi avaliado quanto ao aumento da espessura (μ m) da orelha, conforme descrito no item 4.9, diariamente uma única vez, logo após o 2º tratamento. No 9º dia do experimento, os animais foram sacrificados e o edema foi avaliado quanto ao aumento da espessura (μ m) e da massa (mg) da orelha. Amostras das orelhas (discos de 6 mm) foram conservadas em formol e submetidas a análise histológica.

4.9.7 Análise histológica

As amostras de tecido das orelhas dos camundongos (discos de 6 mm) submetidos ao modelo de edema de orelha induzido pela aplicação única e múltipla de óleo de cróton foram obtidas conforme descrito no item 4.9 e conservadas conforme descrito nos subitens 4.9.1. Para o preparo das lâminas histológicas, as amostras foram fixadas em solução ALFAC (85 mL de álcool 80%, 10 mL de formol 40% e 5 mL de ácido acético glacial) em um período de 16 horas, e foram em seguida conservadas em álcool 70% até início do processo de desidratação. As orelhas foram posteriormente desidratadas, emblocadas em parafina, seccionadas em cortes de 5 μ m em um micrótomo e coradas com hematoxilina e eosina. O edema (espessura do corte histológico), infiltração de leucócitos e vasodilatação foram os parâmetros da inflamação avaliados em áreas representativas com aumento de 100x, 200x e 400x. Nesses mesmos aumentos, foram realizadas fotografias dos cortes histológicos utilizando microscópio acoplado a câmera fotográfica digital (OLYMPUS®, BX-41).

4.10 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os resultados dos testes foram demonstrados através da média \pm desvio padrão ou erro padrão médio (E.P.M.). Análise de variância (ANOVA) seguida do teste de Tukey ou Student–Newman–Keuls como *post-hoc* foi utilizada para medir o grau de significância para $p < 0,05$. Para as análises estatísticas foi utilizado o programa SigmaPlot® 11.0.

5 RESULTADOS

5.1 EXTRAÇÃO E FRACIONAMENTO

A partir de 800 g da droga vegetal seca de *B. pinnatum*, foram obtidos 138,46 g do extrato etanólico bruto, o que equivale a um rendimento de extração de 17,3%. 40,0 g do extrato etanólico bruto, após ressuspensão em solução hidroalcolica (9:1), produziram 9,11, 3,35, 4,37 e 10,0 g das frações hexânica, diclorometânica, em acetato de etila e butanólica, respectivamente (Tabela 12).

Tabela 12. Rendimento das frações obtidas por partição do extrato etanólico de *B. pinnatum*.

Fração	Massa (g)	Rendimento (%)
Hexânica	9,11	22,8
Diclorometânica	3,35	8,4
Em acetato de etila	4,37	10,9
Butanólica	10,0	25

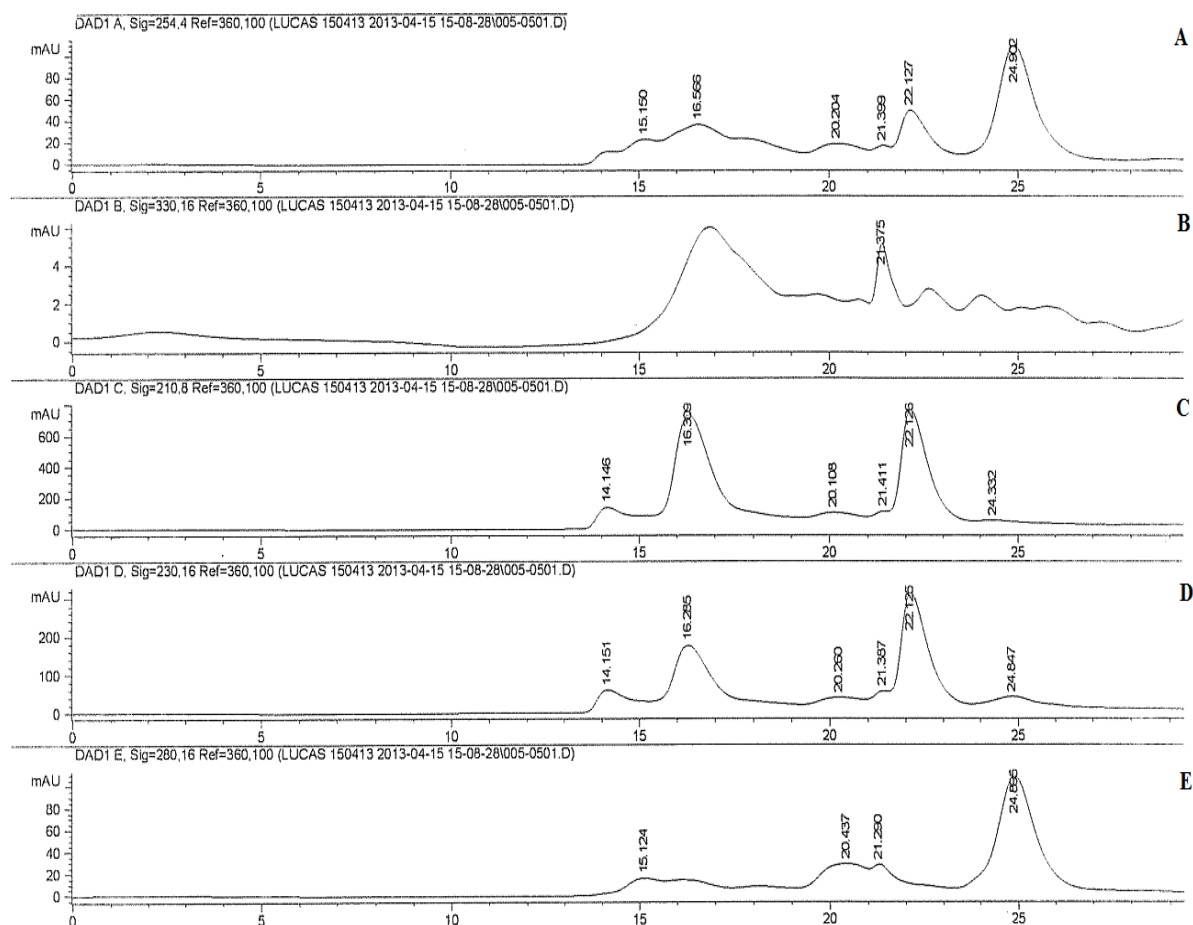
Fonte: O autor (2013).

5.2 PERFIL CROMATOGRÁFICO E CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA

5.2.1 Perfis cromatográficos e caracterização química por cromatografia líquida de alta aficiência com detector de ultravioleta

Na Figura 14 estão representados os cromatogramas do extrato etanólico em 254 (A), 330 (B), 210 (C), 230 (D) e 280 (E) nm. Nas condições cromatográficas empregadas, nenhum flavonoide foi detectado, devido, provavelmente, à baixa concentração dessas substâncias no extrato. No entanto, é importante já mencionar que espectros de ultravioleta com bandas características de flavonoides, bem como espectros de seus respectivos padrões, foram identificados em frações obtidas a partir do extrato etanólico. Dessa forma, pode-se afirmar que este extrato contém constituintes flavonoídicos.

Figura 14. Perfis cromatográficos do extrato etanólico das folhas de *B. pinnatum* por CLAE-UV DAD obtidos em diferentes comprimentos de ondas.



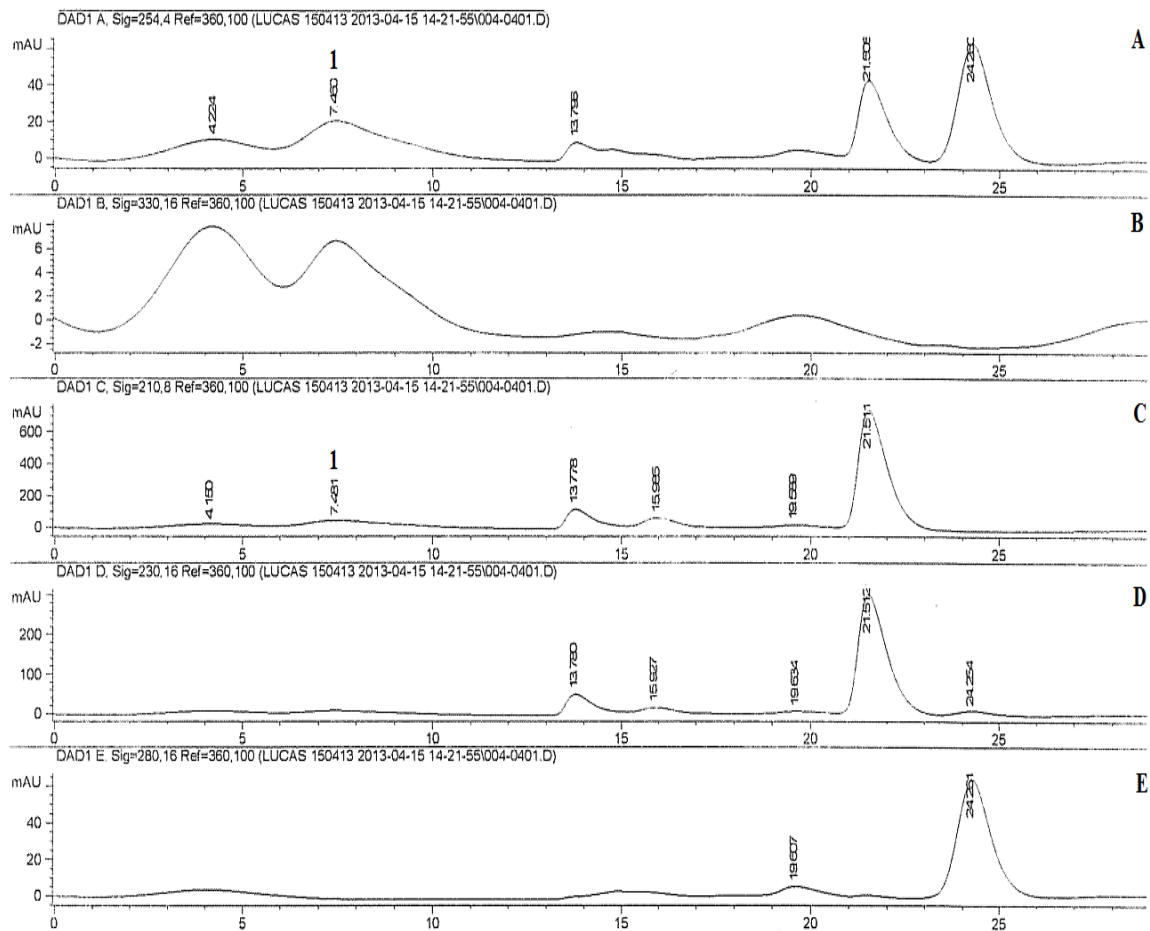
Cromatogramas obtidos em 254 (A), 330 (B), 210 (C), 230 (D) e 280 nm (E).

Fonte: O autor (2013).

Na Figura 15 estão representados os cromatogramas da fração hexânica em 254 (A), 330 (B), 210 (C), 230 (D) e 280 nm (E). O pico 1 do cromatograma (Figura 15A e B), com tempo de retenção (t_r) 7,48 min (em 254 e 210 nm), produziu espectro de ultravioleta com bandas características dos flavonoides quercetina ou rutina (Figura 16A), uma vez que essas substâncias produzem espectro de UV na região de comprimento de ondas com características próximas.

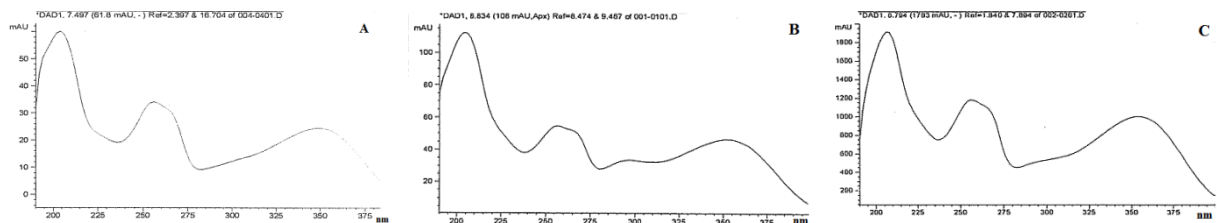
Para confirmar qual dos dois flavonoides corresponde ao pico 1 do cromatograma da fração hexânica (Figura 15A e B), foram utilizados os respectivos padrões que apresentaram espectros de ultravioleta com bandas características (Figura 16). Uma banda observada com pico de absorção máxima por volta de 290 nm no espectro UV do padrão quercetina (Figura 18B) mostra a diferença entre quercetina (t_r 8,83 min em 254 nm) e rutina (t_r 6,76 min em 210 nm). Dessa forma, foi possível identificar a rutina nas folhas de *B. pinnatum* (Figura 16C).

Figura 15. Perfis cromatográficos da fração hexânica das folhas de *B. pinnatum* por CLAE-UV DAD obtidos em diferentes comprimentos de ondas.



Cromatogramas obtidos em 254 (A), 330 (B), 210 (C), 230 (D) e 280 nm (E).
Fonte: O autor (2013).

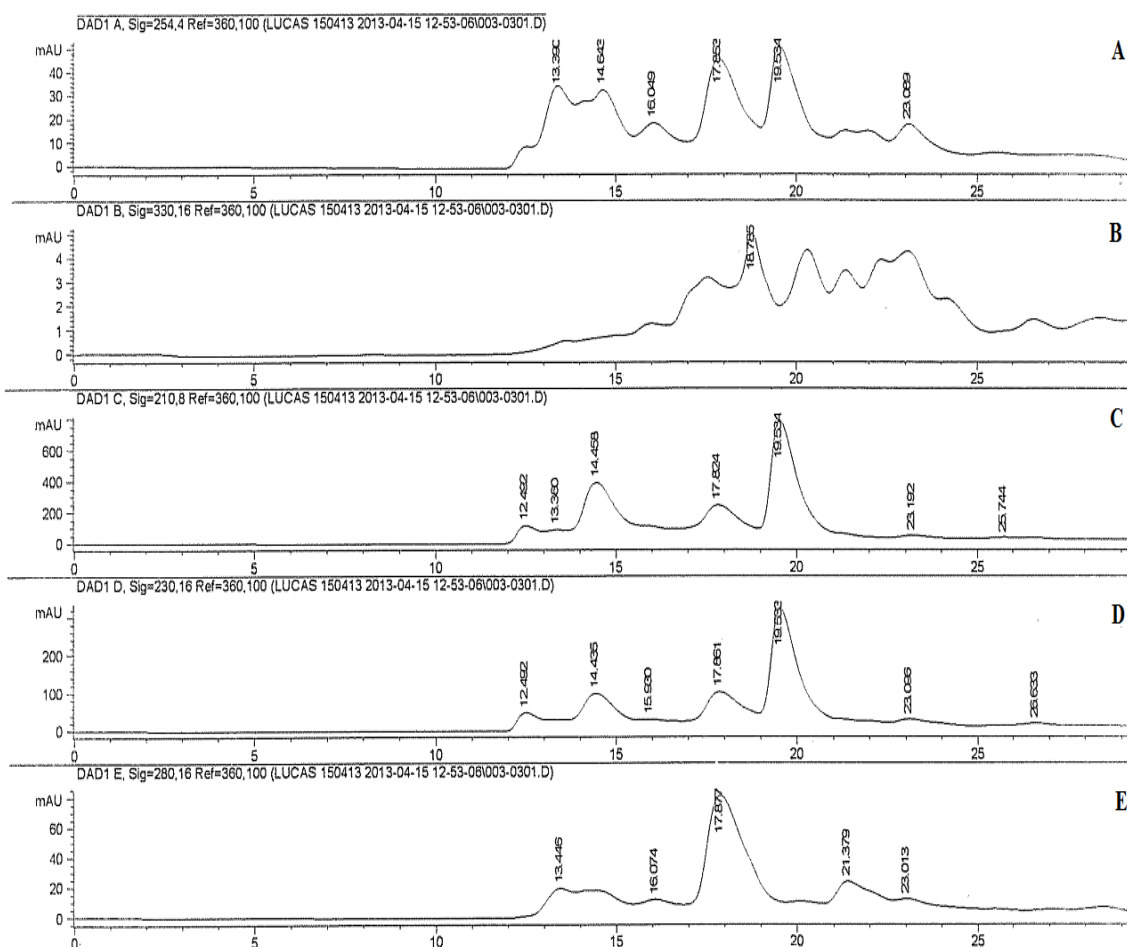
Figura 16. Espectros de UV do pico 1 do cromatograma da fração hexânica e dos padrões quercetina e rutina.



Pico 1 (A), quercetina (B) e rutina (C)
Fonte: O autor (2013).

Na Figura 17 estão representados os cromatogramas da fração diclorometânica das folhas de *B. pinnatum* em 254 (A), 330 (B), 210 (C), 230 (D) e 280 (E) nm. Nas condições cromatográficas empregadas, nenhum espectro característico de flavonoide foi detectado.

Figura 17. Perfis cromatográficos da fração diclorometânica das folhas de *B. pinnatum* por CLAE-UV DAD obtidos em diferentes comprimentos de ondas.

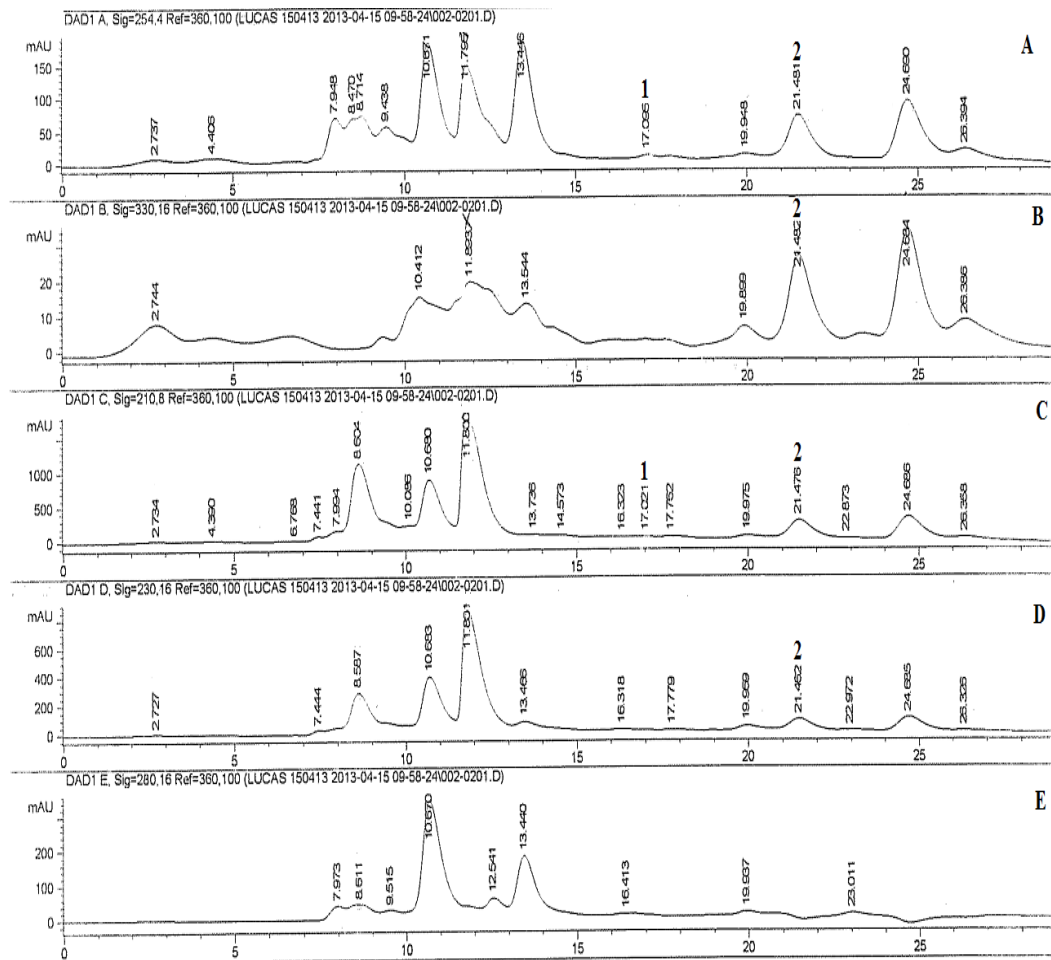


Cromatogramas obtidos em 254 (A), 330 (B), 210 (C), 230 (D) e 280 nm (E).
Fonte: O autor (2013).

Na Figura 18 são mostrados os cromatogramas da fração em acetato de etila das folhas de *B. pinnatum* em 254 (A), 330 (B), 210 (C), 230 (D) e 280 (E) nm. O pico 1 (Figura 18A e C), com t_r 17,09 min (em 254 nm), produziu espectros de ultravioleta com bandas características do flavonoide canferol (Figura 19A) e as bandas do pico 2 (Figura 18A-D), com t_r 21,48 min (em 330 nm), apresentaram características do flavonoide apigenina 7-*O*-β-D-glicosídeo (Figura 19C).

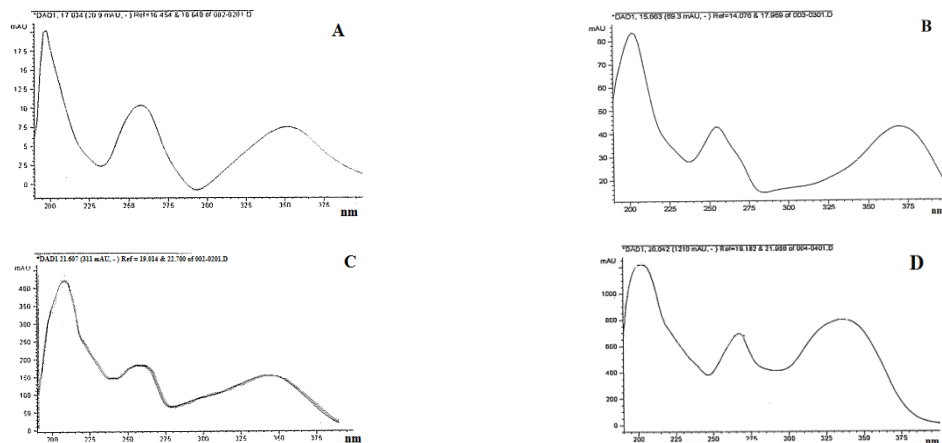
Após análise dos padrões para confirmação, nas mesmas condições, considerando o tempo de retenção e as características das bandas dos espectros de UV das substâncias padrão canferol (t_r 15,54 min em 254 nm) (Figura 19B) e apigenina 7-*O*-β-D-glicosídeo (t_r 20,00 min em 330 nm) (Figura 19D), foi possível identificá-las na fração em acetato de etila.

Figura 18. Perfis cromatográficos da fração em acetato de etila das folhas de *B. pinnatum* por CLAE-UV DAD obtidos em diferentes comprimentos de ondas.



Cromatogramas obtidos em 254 (A), 330 (B), 210 (C), 230 (D) e 280 nm (E).
Fonte: O autor (2013).

Figura 19. Espectros de UV dos picos 1 e 2 do cromatograma da fração em acetato de etila e dos padrões canferol e apigenina 7-O-β-D-glicosídeo.



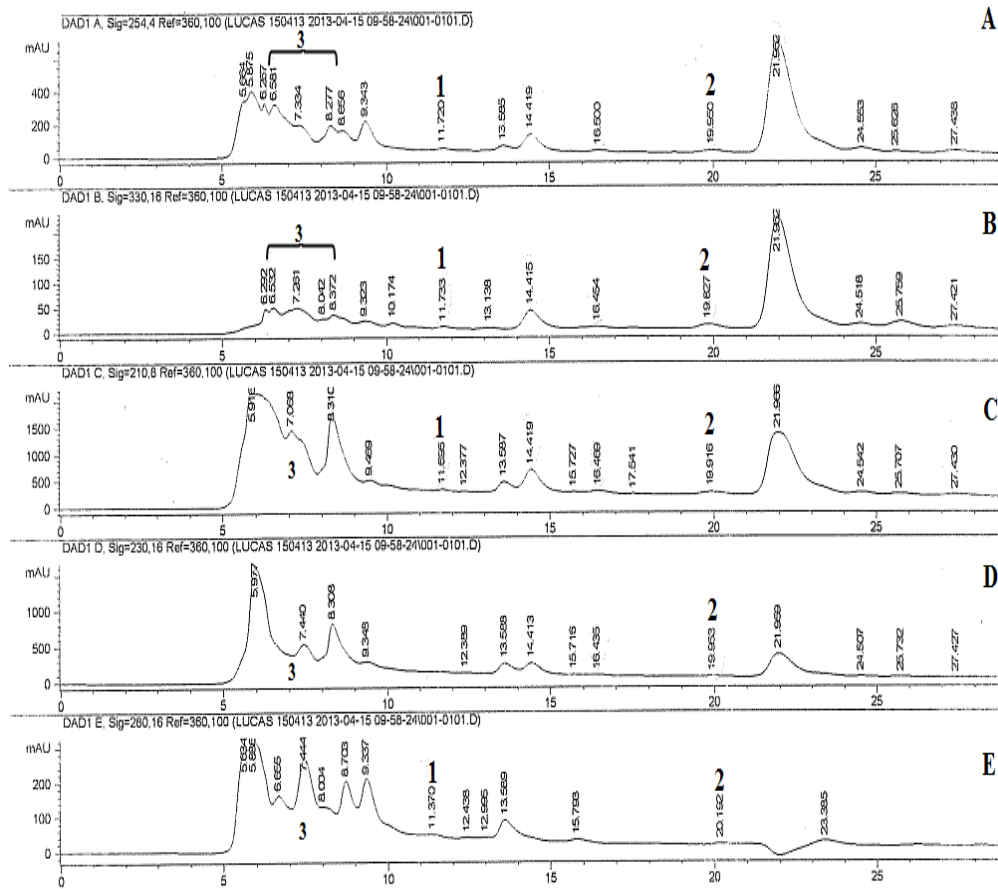
Pico 1 (A), canferol (B), pico 2 (C) e apigenina 7-O-β-D-glicosídeo (D).
Fonte: O autor (2013).

Cromatogramas da fração butanólica das folhas de *B. pinnatum* obtidos em 254 (A), 330 (B), 210 (C), 230 (D) e 280 (E) nm são mostrados na Figura 20. O espectro de ultravioleta obtido a partir do pico 1 (Figura 20A-C e E), com t_r 11,69 min (em 210 nm), apresentou bandas correspondentes ao flavonoide luteolina 7-*O*- β -D-glicosídeo (Figura 21A), enquanto o espectro de UV do pico 2 (todos comprimentos de onda), com t_r 19,83 min (em 330 nm), demonstrou características de bandas do flavonoide apigenina 7-*O*- β -D-glicosídeo (Figura 21C).

Para comprovar a presença dos flavonoides detectados com base no perfil cromatográfico, tempo de retenção e espectro de ultravioleta, padrões foram aplicados e analisados. Após avaliação, a luteolina 7-*O*- β -D-glicosídeo apresentou perfil cromatográfico com t_r 11,70 min (em 210 nm), muito semelhante ao detectado na fração butanólica (Figura 20). Além disso, o espectro de UV do pico 1 também produziu bandas características da luteolina 7-*O*- β -D-glicosídeo (Figura 21A e B). Da mesma forma, também foi confirmada a apigenina 7-*O*- β -D-glicosídeo, com t_r 20,00 min (em 330 nm) muito semelhante ao do pico 2 (Figura 20) e através do espectro de UV com bandas características (Figura 21C e D).

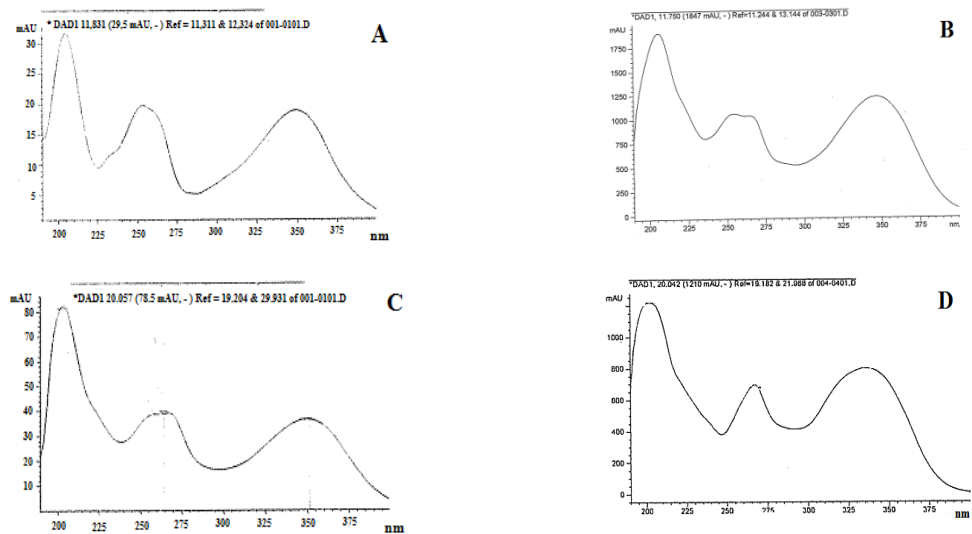
Analisando ainda os cromatogramas da fração butanólica, na faixa de t_r entre 6 e 9 min, identificada na Figura 20 pelo número 3, apesar da baixa resolução nessas condições cromatográficas, foram observados picos com t_r e características das bandas dos espectros UV semelhantes aos padrões dos flavonoides quercetina e rutina (Figura 22).

Figura 20. Perfis cromatográficos da fração butanólica das folhas de *B. pinnatum* por CLAE-UV DAD obtidos em diferentes comprimentos de ondas.



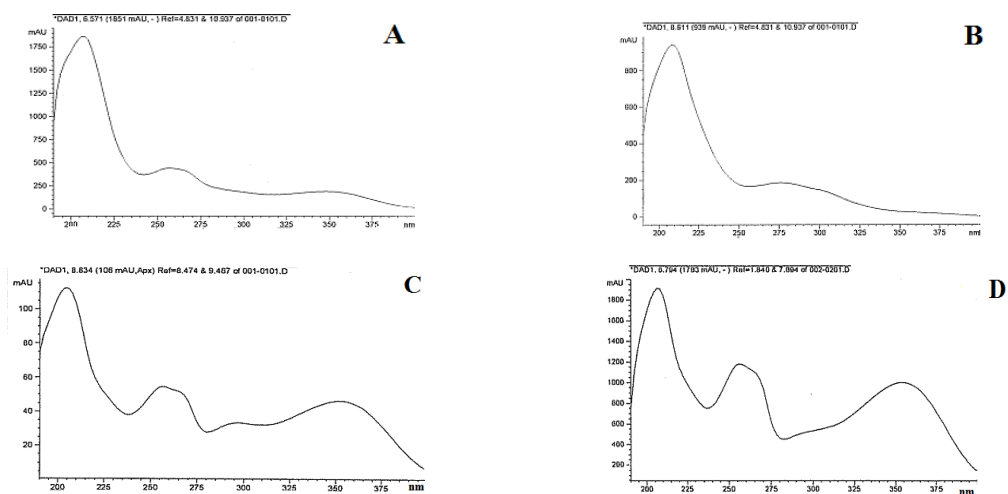
Cromatogramas obtidos em 254 (A), 330 (B), 210 (C), 230 (D) e 280 nm (E).
Fonte: O autor (2013).

Figura 21. Espectros de UV do pico 1 e 2 do cromatograma da fração butanólica e dos padrões químicos luteolina 7-*O*- β -D-glicosídeo e apigenina 7-*O*- β -D-glicosídeo.



Pico 1 (A), luteolina 7-*O*- β -D-glicosídeo (B), pico 2 (C) e apigenina 7-*O*- β -D-glicosídeo (D).
Fonte: O autor (2013).

Figura 22. Espectros de UV de dois picos encontrados na faixa de t_r 3 do cromatograma da FB e dos padrões químicos quercetina e rutina.

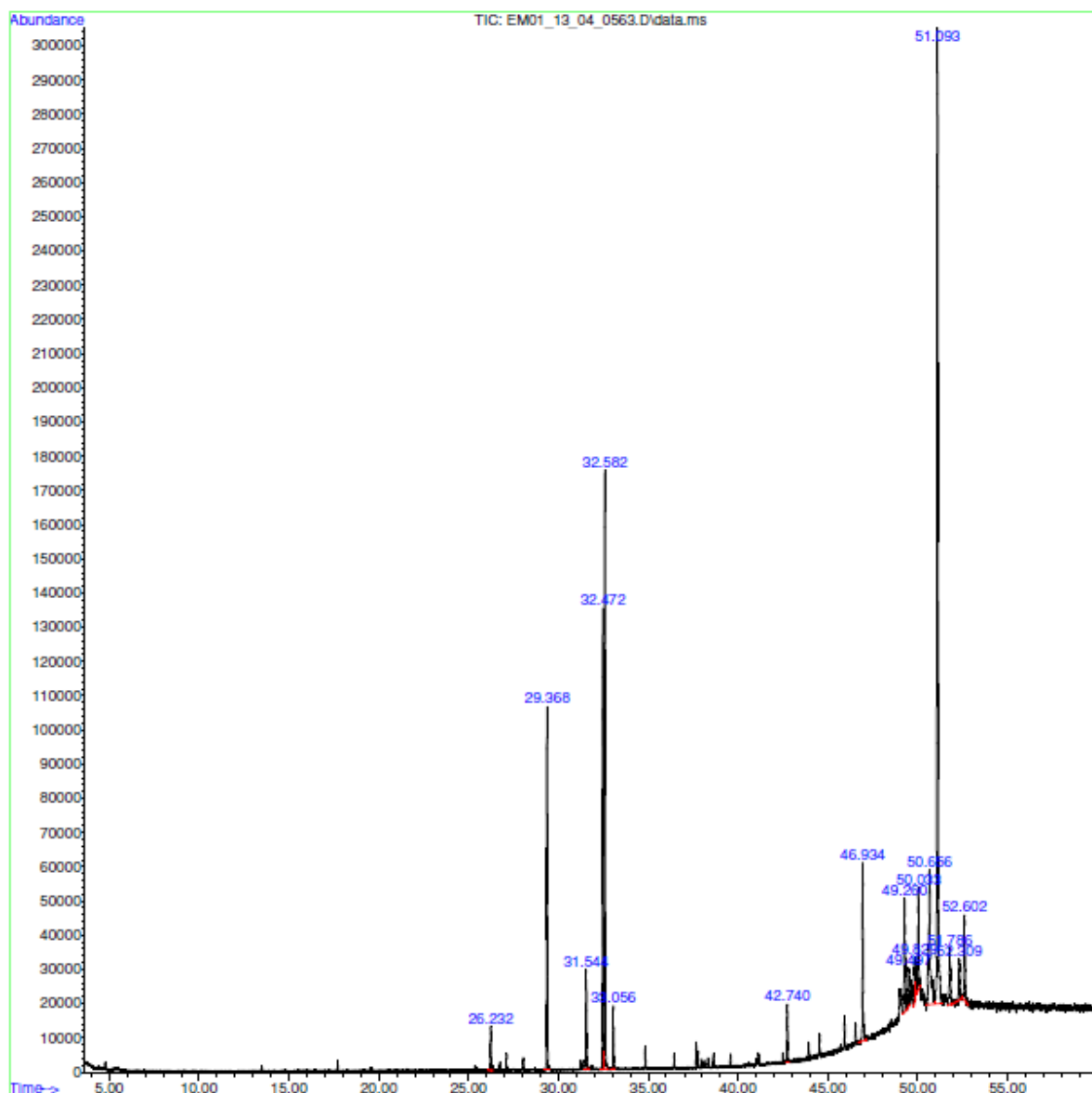


Pico em 6,571 min da região 3 (A), Pico em 8,611 min da região 3 (B), quercetina (C) e rutina (D).
Fonte: O autor (2013).

5.2.2 Perfil cromatográfico e caracterização química por cromatografia com fase gasosa acoplada à espectrometria de massas

Na Figura 23 é mostrado o perfil cromatográfico da fração hexânica das folhas de *B. pinnatum* obtido por cromatografia com fase gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM). Os picos majoritários foram observados nos tempos de retenção de 29,36, 32,47, 32,58 e 51,09 minutos.

Figura 23. Perfil cromatográfico da fração hexânica das folhas de *B. pinnatum* obtido por CG-EM.



Fonte: O autor (2013).

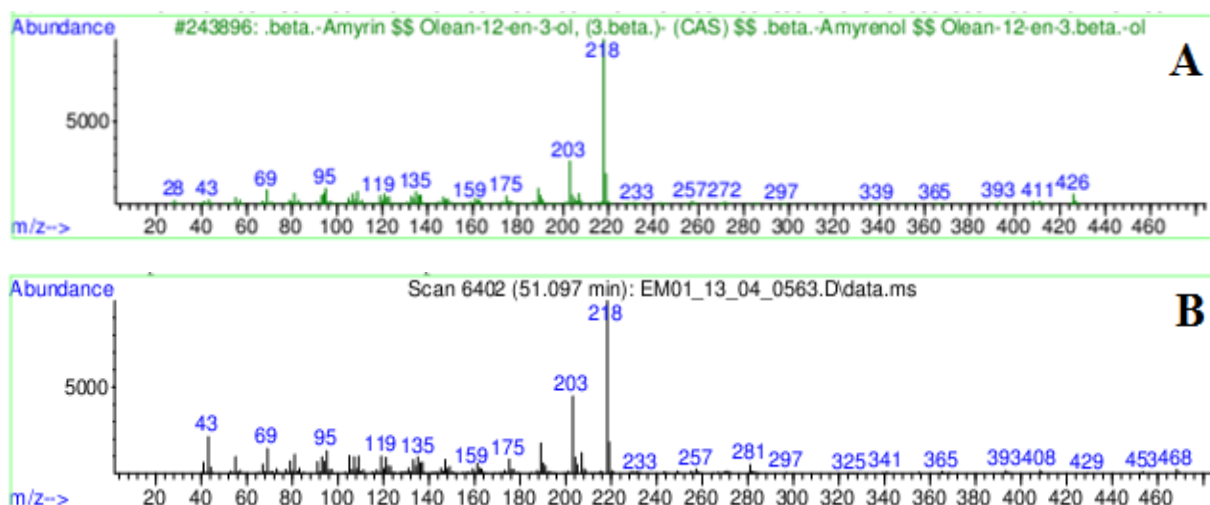
Os constituintes químicos com maior abundância encontrados na fração hexânica foram éster de etila do ácido hexadecanóico (palmitato de etila - 7,58%), éster de etila do ácido 9, 12-octadecadienóico (linoleato de etila - 9,54%), éster de etila do ácido 9,12,15-octadecatrienóico (linolenato de etila - 13,63%) e β -amirina (33,47%) (Tabela 13). Os componentes identificados totalizaram 84,09%, enquanto os não identificados foram 9,91%. Os espectros de massas da β -amirina (banco de dados) e do pico no qual ela foi identificada na fração hexânica estão representados na Figura 24 e as fórmulas estruturais da α -amirina (não identificada) e β -amirina são apresentadas na Figura 25.

Tabela 13. Constituintes químicos da fração hexânica obtidos das folhas de *B. pinnatum* por CG-EM.

Constituintes químicos	Tempo de retenção (min)	Concentração (%)
Pentadecanal	26,23	0,99
Éster de etila do ácido hexadecanóico	29,36	7,58
3,7,11,15-tetrametil-2-hexadecen-1-ol	31,55	2,45
Éster de etila do ácido 9, 12-octadecadienóico	32,47	9,54
Éster de etila do ácido 9,12,15-octadecatrienóico	32,58	13,63
Éster de etila do ácido octadecanóico	33,05	1,30
<i>Trans</i> -esqualeno	42,74	1,32
α -Tocoferol	46,93	4,48
2-Metil-7-fenilindol	49,26	4,61
3-[4-(1-metil-etil)-fenil]-1-fenil-2-propen-1-ona	49,49	1,22
2-Acetoximetil-3-(metoxicarbonil)-bifenileno	49,82	1,53
Não identificado	50,03	2,93
1- Metil-2 fenilindol	50,65	7,97
β -Amirina	51,09	33,47
Não identificado	51,79	2,16
Não identificado	52,31	1,57
Não identificado	52,60	3,25
Total		94,00

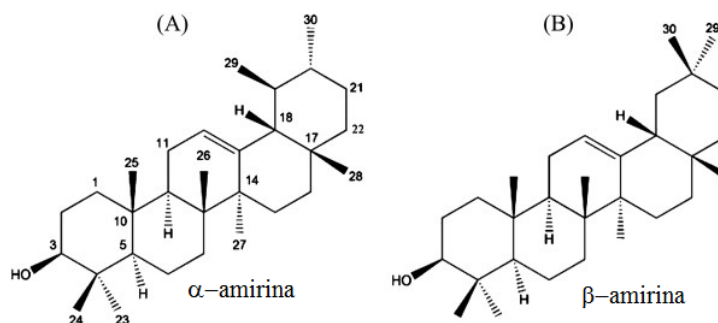
Fonte: O autor (2013).

Figura 24. Espectros de massas da β -amirina (banco de dados) e do pico no qual ela foi identificada na fração hexânica das folhas de *B. pinnatum*.



Espectros de massas da β -amirina do banco de dados (A) e do pico no qual ela foi identificada na amostra (B).
Fonte: O autor (2013).

Figura 25. Fórmulas estruturais da α -amirina e β -amirina.

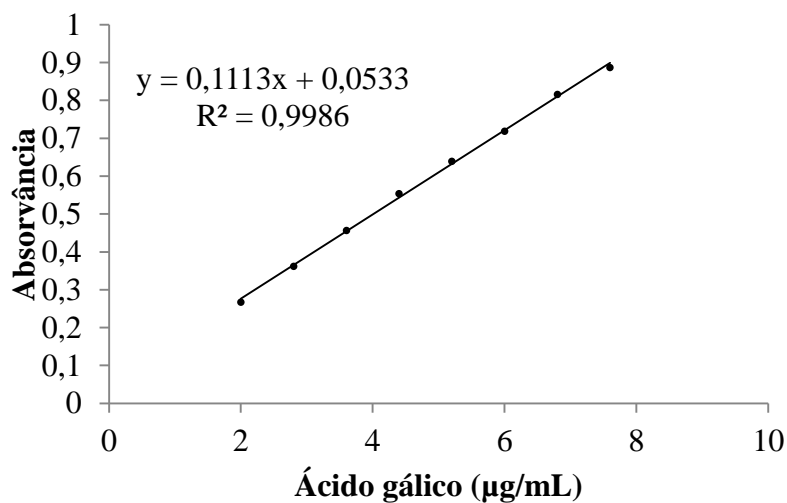


Fonte: O autor (2013).

5.3 TEORES DE FENÓIS E FLAVONOIDES TOTAIS

Os teores de fenóis totais no extrato etanólico e nas frações foram obtidos através da equação da reta de calibração do ácido gálico (Figura 26) (SOUSA et al., 2007). Após análise de regressão linear obteve-se a equação da reta $y = 0,1113x + 0,0533$, com coeficiente de determinação $R^2 = 0,9986$. As absorvâncias das amostras foram substituídas no y, obtendo uma concentração inicial com a obtenção do valor de x, considerando os fatores de diluição das etapas de preparo da amostra. A concentração foi ajustada em teor de fenóis totais (g/100g).

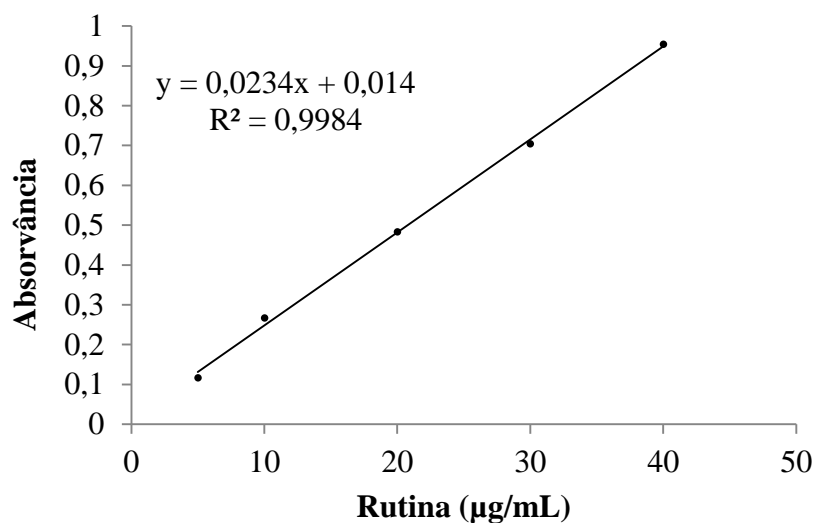
Figura 26. Curva de calibração do padrão ácido gálico.



Fonte: O autor (2013).

Os teores de flavonoides totais no extrato etanólico e frações foram obtidos através da equação da reta de calibração da rutina (Figura 27). Após análise de regressão linear obteve-se a equação da reta $y = 0,0234x + 0,014$, com coeficiente de determinação $R^2 = 0,9984$. As absorvâncias das amostras foram substituídas no y, obtendo uma concentração inicial com a obtenção do valor de x, considerando os fatores de diluição das etapas de preparo da amostra. A concentração foi ajustada em teor de flavonoides totais (g/100g).

Figura 27. Curva de calibração do padrão rutina.



Fonte: O autor (2013).

Os teores de fenóis totais variaram de 3,45 a 25,34 g/100 g no extrato etanólico e frações das folhas de *B. pinnatum* (Tabela 14). As frações em acetato de etila e diclorometânica apresentaram maiores teores de fenóis totais quando comparadas com os demais produtos testados. Na Tabela 14 também mostra que os teores de flavonoides totais variaram de 0,66 a 23,31 g/100 g no extrato e nas frações avaliadas. A fração em acetato de etila ($23,31 \pm 0,04$ g/100g) contém maior teor de flavonoides totais equivalentes à rutina em comparação com os demais produtos analisados.

Tabela 14. Teores de fenóis e flavonoides totais, em equivalência de ácido gálico e rutina, respectivamente, nas folhas de *B. pinnatum*.

Extrato/Frações	Teores (g/100 g)	
	Fenóis totais	Flavonoides totais
Extrato etanólico	$9,59 \pm 0,03$	$4,21 \pm 0,02$
Fração hexânica	$3,45 \pm 0,04$	$0,66 \pm 0,02$
Fração diclorometânica	$10,53 \pm 0,03$	$5,96 \pm 0,02$
Fração em acetato de etila	$25,34 \pm 0,03$	$23,31 \pm 0,04$
Fração em butanólica	$5,05 \pm 0,03$	$2,89 \pm 0,03$

Os valores correspondem à média \pm desvio padrão. As médias diferem entre si após análise de variância seguida do teste de Tukey para $p < 0,001$.

Fonte: O autor (2013).

5.4 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

Considerando a identificação dos constituintes flavonoídicos e os teores de fenóis e flavonoides totais nas amostras de *B. pinnatum* e na hipótese de estes constituintes serem conhecidos por suas propriedades antioxidantes, alguns ensaios *in vitro* foram realizados para corroborar com dados químicos apresentados.

5.4.1 Atividade antioxidante pelo método do sequestro do radical DPPH

O potencial antioxidante frente ao radical DPPH do extrato etanólico e frações das folhas de *B. pinnatum* e do controle positivo (rutina) estão apresentados na Tabela 15 na forma de CE_{50} . Os valores de CE_{50} das amostras variaram entre $9,44 \pm 0,01$ a $57,29 \pm 0,11$

$\mu\text{g/mL}$ e foram significativamente diferentes entre si ($p < 0,001$). A fração em acetato de etila apresentou menor CE_{50} ($9,44 \pm 0,002 \mu\text{g/mL}$) quando comparada as demais amostras avaliadas. Isto demonstra que esta fração possui maior atividade antioxidante, pois foi capaz de inibir o radical livre DPPH com uma menor concentração. Rutina, controle positivo, produziu CE_{50} igual a $8,66 \pm 0,01 \mu\text{g/mL}$.

Tabela 15. Atividade antioxidante do extrato etanólico e frações das folhas de *B. pinnatum* pelo método do sequestro do radical DPPH.

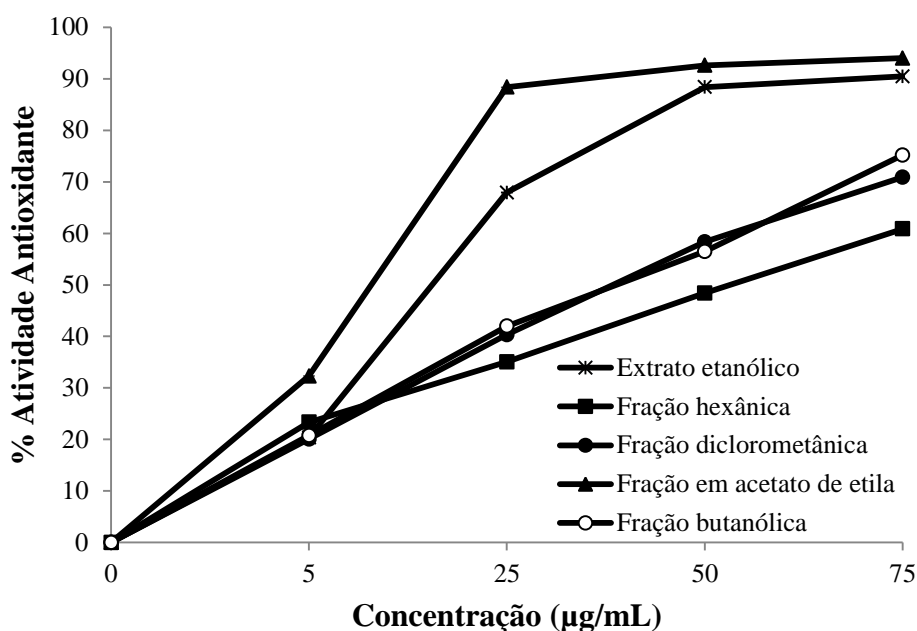
Amostras/Controles	CE_{50} ($\mu\text{g/mL}$)
Extrato etanólico	$16,43 \pm 0,09$
Fração hexânica	$57,29 \pm 0,11$
Fração diclorometânica	$44,75 \pm 0,06$
Fração em acetato de etila	$9,44 \pm 0,01$
Fração butanólica	$31,70 \pm 0,06$
Rutina	$8,66 \pm 0,01$

Os valores correspondem à média \pm E.P.M. As médias diferem entre si após análise de variância seguida do teste de Tukey para $p < 0,001$.

Fonte: O autor (2013).

Na Figura 28 são mostrados os valores da porcentagem de atividade antioxidante (%AA) em diferentes concentrações do extrato etanólico e frações de *B. pinnatum*. É observado que, a partir da concentração de $25 \mu\text{g/mL}$, a fração em acetato de etila foi capaz de inibir o DPPH acima de 80%, demonstrando possuir um potente efeito antioxidante.

Figura 28. Atividade antioxidante do extrato etanólico e frações das folhas de *B. pinnatum* pelo método do sequestro do radical DPPH.



Os valores correspondem à média \pm E.P.M. As médias diferem entre si após análise de variância seguida do teste de Tukey para $p < 0,001$.

Fonte: O autor (2013).

5.4.2 Atividade antioxidante pelo método do poder de redução

Os valores da concentração efetiva (CE_{50}) para o extrato etanólico e frações das folhas de *B. pinnatum* e rutina, estão apresentados na Tabela 16. Os valores das CE_{50} com absorvância em 0,5 para o poder de redução variaram entre $216,81 \pm 0,10$ e $1235,17 \pm 1,39$. No entanto, considerando os valores das amostras de *B. pinnatum*, a fração em acetato de etila apresentou menor CE_{50} ($234,22 \pm 0,61$ µg/mL), sendo a mais ativa ($p < 0,001$). Neste ensaio, a fração butanólica foi a menos ativa com valor de CE_{50} cerca de seis vezes menor que a rutina. Rutina, controle positivo, produziu CE_{50} igual a $216,81 \pm 0,10$ µg/mL, demonstrando sua potência como antioxidante.

Usando o método do poder de redução, valores das absorvâncias em função das concentrações do extrato etanólico e frações de *B. pinnatum* foram apresentados na Figura 29. É possível observar que a fração em acetato de etila atingiu o valor de absorvância 0,5 entre as concentrações de 200 e 300 µg/mL, demonstrando uma atividade antioxidante promissora. O extrato etanólico e demais frações, mesmo com a maior concentração testada (500 µg/mL),

não alcançaram a absorvância desejada (0,5). Isto significa que essas amostras possuem menor efeito antioxidante quando comparadas com a rutina e fração em acetato de etila.

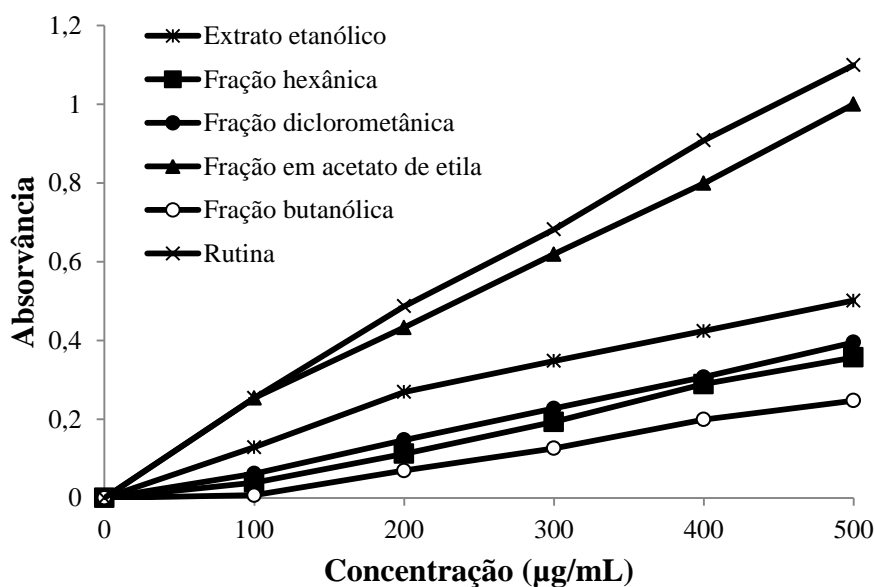
Tabela 16. Atividade antioxidante do extrato etanólico e frações das folhas de *B. pinnatum* pelo método do poder de redução.

Amostras/Controles	CE ₅₀ (µg/mL)
Extrato etanólico	532,714 ± 1,27
Fração hexânica	576,79 ± 1,18
Fração diclorometânica	589,96 ± 0,87
Fração em acetato de etila	234,22 ± 0,61
Fração butanólica	1235,17 ± 1,39
Rutina	216,81 ± 0,10

Os valores correspondem à média ± E.P.M. As médias diferem entre si após análise de variância seguida do teste de Tukey para $p < 0,001$.

Fonte: O autor (2013).

Figura 29. Atividade antioxidante do extrato etanólico e das frações das folhas de *B. pinnatum* pelo método do poder de redução.



Os valores correspondem à média ± desvio padrão. As médias diferem entre si após análise de variância seguida do teste de Tukey para $p < 0,001$.

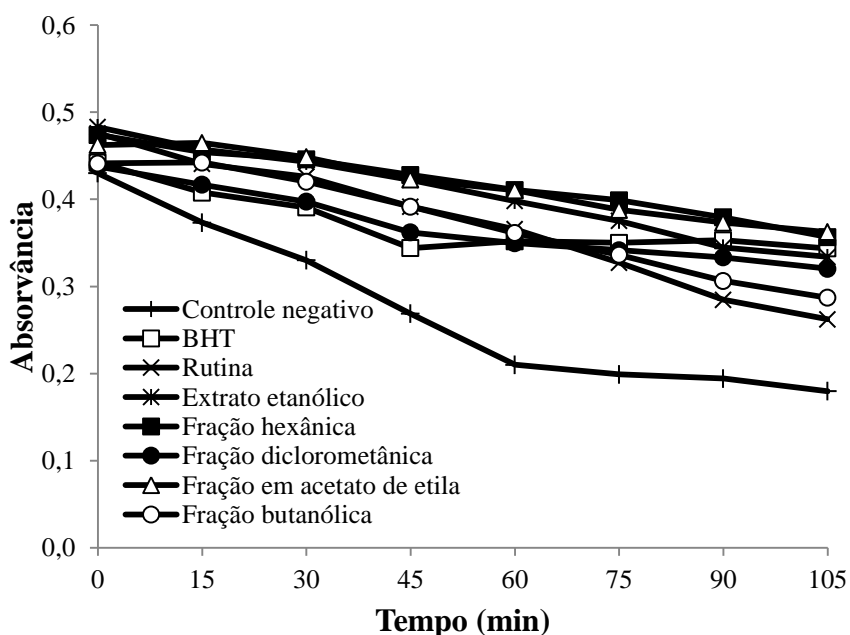
Fonte: O autor (2013).

5.4.3 Atividade antioxidante pelo método da cooxidação do β -caroteno/ácido linoléico

Na Figura 30 são mostradas as leituras obtidas das absorvâncias nos tempos (minutos) t_0 , t_{15} , t_{30} , t_{45} , t_{60} , t_{75} , t_{90} e t_{105} do extrato etanólico e frações e dos controles (BHT e rutina). É observado o decaimento das absorvâncias em função do tempo em decorrência da oxidação do β -caroteno. Quanto menor o decaimento, maior a inibição da peroxidação lipídica e conseqüentemente da oxidação do β -caroteno. O extrato etanólico e as frações hexânica e em acetato de etila apresentaram menor variação no decaimento, demonstrando maior inibição da peroxidação lipídica. Entre os controles positivos testados, o BHT foi mais ativo, produzindo um menor decaimento das absorvância.

Considerando a inibição da peroxidação lipídica (%I), o extrato etanólico e frações das folhas de *B. pinnatum* (250 $\mu\text{g/mL}$), bem como controles positivos (25 $\mu\text{g/mL}$), produziram valores entre 16,9 e 61,3% (Tabela 17). Nesta Tabela, fica evidenciado que a fração em acetato de etila, com inibição igual a 58,30%, foi a mais ativa seguida as frações hexânica e diclorometânica, ambas com 49,10% de inibição.

Figura 30. Decaimento da absorvância em função do tempo para o extrato etanólico e frações das folhas de *B. pinnatum* pelo método da cooxidação do β -caroteno/ácido linoléico.



Os valores correspondem à média \pm E.P.M. As médias diferem em relação ao controle negativo após análise de variância seguida do teste de Tukey para $p < 0,05$.

Fonte: O autor (2013).

Tabela 17. Atividade antioxidante do extrato etanólico e frações das folhas de *B. pinnatum* pelo método de cooxidação do β -caroteno/ácido linoleico.

Amostras /Controles	% Inibição da peroxidação lipídica
Extrato etanólico	43,50 \pm 1,64 ^{a,b}
Fração hexânica	49,10 \pm 2,81 ^a
Fração diclorometânica	49,10 \pm 1,31 ^a
Fração em acetato de etila	58,30 \pm 1,54 ^c
Fração butanólico	39,40 \pm 0,62 ^b
BHT	61,30 \pm 0,99 ^c
Rutina	16,90 \pm 1,32

Os valores correspondem à média \pm E.P.M. Letras iguais na mesma coluna associam amostras/controles cujas médias não foram diferentes entre si após análise de variância seguida do teste de Tukey para $p < 0,05$.
Fonte: O autor (2013).

5.4.4 Atividade antioxidante pelo método de bioautografia

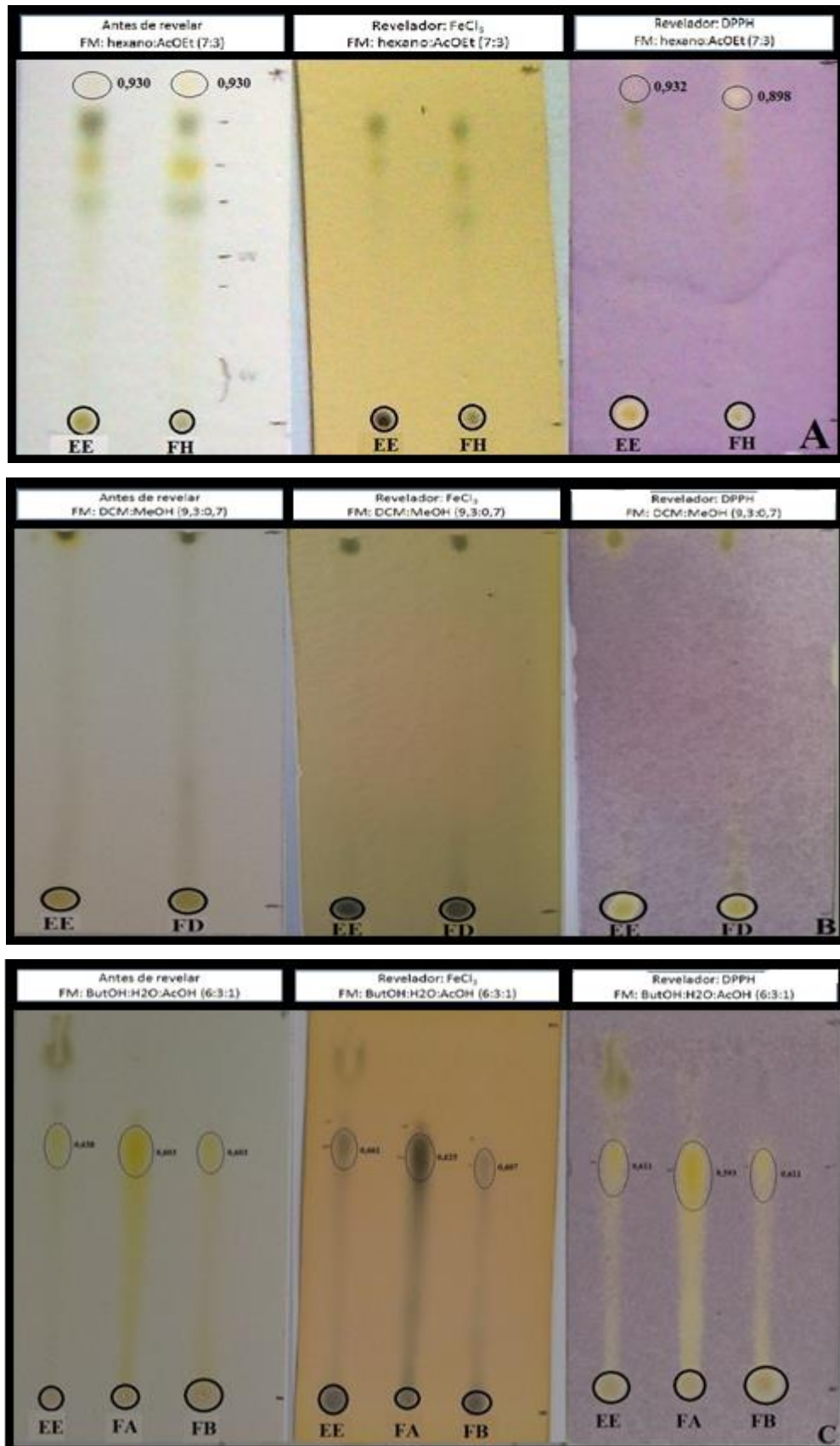
Extrato etanólico e frações de *B. pinnatum* foram aplicados em placas de CCD e revelados com cloreto férrico (FeCl_3) 5% e solução etanólica de DPPH 2,5 mM (Figura 31). As manchas escuras nas placas reveladas com FeCl_3 são indicativas da presença de substâncias fenólicas e nas placas reveladas com DPPH as manchas branco-amarelas são indicativas de substâncias sequestrantes de radicais livres com potencial antioxidante. Observa-se que as frações em acetato de etila (FA) e butanólica (FB) (Figura 31C) evidenciaram quantidades mais expressivas de constituintes fenólicos e atividade antioxidante. Na fração hexânica (FH) (Figura 31A) (bem como o extrato etanólico – EE – nas mesmas condições cromatográficas), observa-se que não foram reveladas substâncias fenólicas com Rf próximo ao da mancha revelada com DPPH, cujo Rf foi 0,898 (Rf EE 0,932). Porém, observa-se na placa antes da revelação química uma mancha com Rf 0,930 (Rf EE 0,930), valor próximo ao da mancha revelada com DPPH, o que pode ser outra classe de metabólito especial com atividade antioxidante. Na fração diclorometânica (FD) e no EE (Figura 31B), as manchas referentes a substâncias fenólicas e as reveladas com DPPH, em sua maioria permaneceram no ponto de aplicação da amostra, impossibilitando o cálculo e comparação dos Rfs. As FA e FB e o EE (Figura 31C) apresentaram manchas referentes a substâncias fenólicas com Rf 0,625 e 0,607 (Rf do EE 0,661), respectivamente. Manchas com

valores semelhantes, quando reveladas com DPPH, produziram Rfs iguais a 0,593, 0,611 e 0,611 para as FA e FB e EE, respectivamente.

Placas de CCD contendo as amostras de *B. pinnatum* reveladas com reagente NP/PEG frente à radiação UV em 365 nm, solução de cloreto de alumínio (AlCl_3) 2% e solução etanólica de DPPH 2,5 mM são apresentadas na Figura 32. As manchas com coloração amarela e/ou laranja nas placas reveladas com NP/PEG em 365 nm e nas placas reveladas com AlCl_3 são indicativas de flavonoides. As manchas das frações em acetato de etila e butanólicas (Figura 32C) foram mais acentuadas para flavonoides e atividade antioxidante. Na FH e no EE (Figura 32A), observa-se manchas referentes a flavonoides nas placas reveladas com NP/PEG em 365 nm e AlCl_3 com Rfs próximos ao da mancha da placa revelada com DPPH, 0,875 e 0,897, respectivamente. A FD e o EE (Figura 32B) apresentaram perfil semelhante ao descrito para a Figura 31, impossibilitando o cálculo e comparação dos Rfs. As FA, FB e EE (Figura 32C) apresentaram manchas características de flavonoides, com Rfs muito semelhantes aos da revelação com DPPH, ao serem reveladas com NP/PEG em 365 nm (Rf 0,618, 0,618 e 0,654, respectivamente) e com AlCl_3 (Rf 0,603, 0,603 e 0,655, respectivamente).

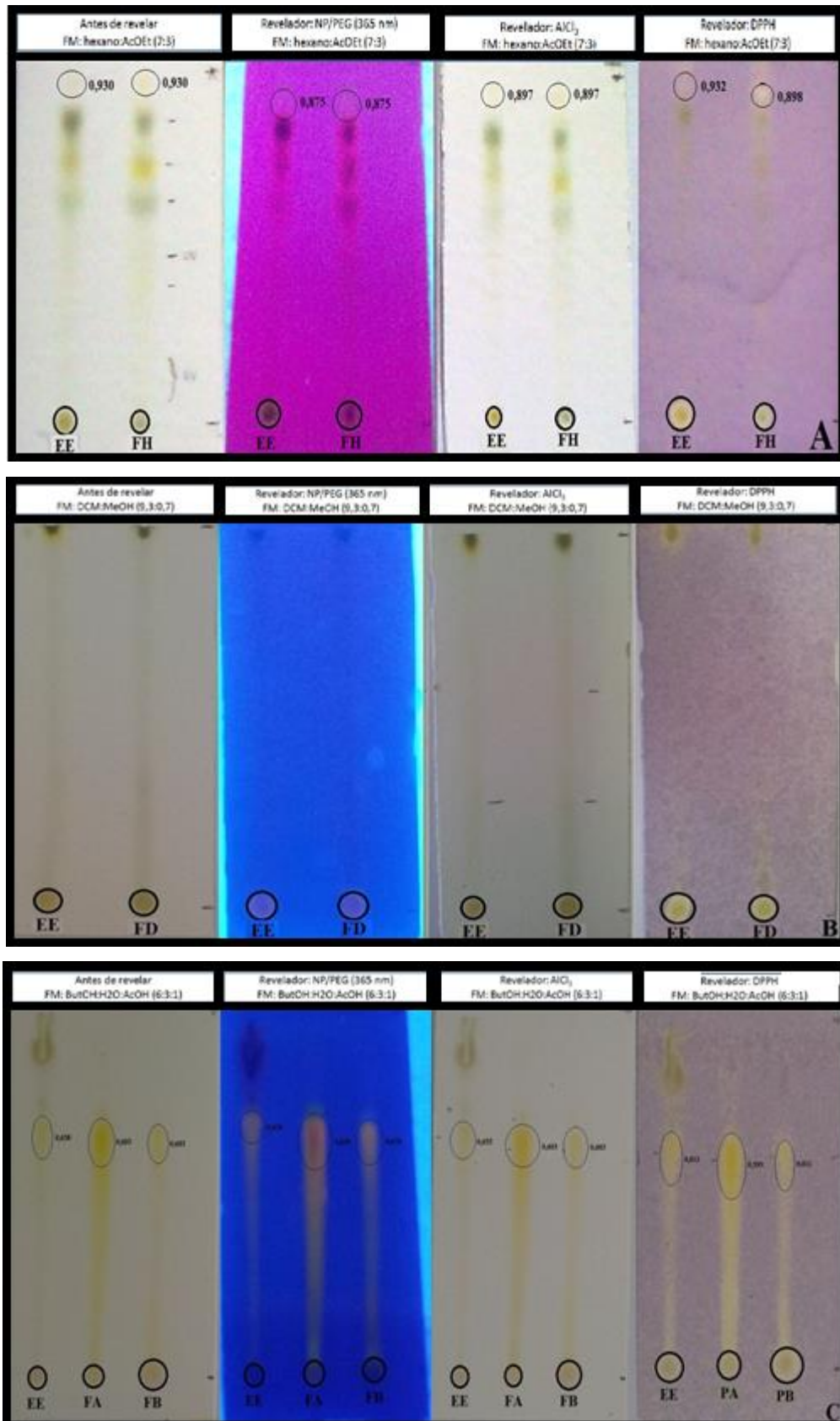
Na Figura 33 são mostradas as placas de CCD contendo as amostras de *B. pinnatum* que foram reveladas com reagente de Liebermann-Burchard e solução etanólica de DPPH 2,5 mM. As manchas com coloração marron e/ou cinza nas placas reveladas com Liebermann-Burchard, no visível e em 365nm (coloração mais clara e luminescente), são indicativas da presença de terpenoides, esteroides e/ou saponinas. Mais uma vez, as frações em acetato de etila e butanol (Figura 33C) evidenciaram quantidades mais expressivas de terpenoides, esteroides e/ou saponinas e atividade antioxidante. Na placa com FH e EE (Figura 35A) observa-se manchas referentes à terpenoides, esteroides e/ou saponinas após revelação com o reagente de Liebermann-Burchard (visível e 365 nm), produzindo Rf igual a 0,947 em ambas amostras que foi próximo ao da mancha da placa revelada com DPPH. As amostras da FD e do EE (Figura 33B), assim como observado nas Figuras 31 e 32, permaneceram no ponto de aplicação, impossibilitando o cálculo e comparação dos Rfs. As FA e FB e o EE (Figura 33C) apresentaram manchas características à terpenoides, esteroides e/ou saponinas após análise com reagente de Liebermann-Burchard (visível e 365 nm) com Rfs 0,661, 0,678 e 0,661, respectivamente. Estes valores foram próximos aos Rfs das manchas reveladas com DPPH.

Figura 31. Bioautografia em CCD do extrato etanólico e frações das folhas de *B. pinnatum* reveladas com cloreto férrico e DPPH.



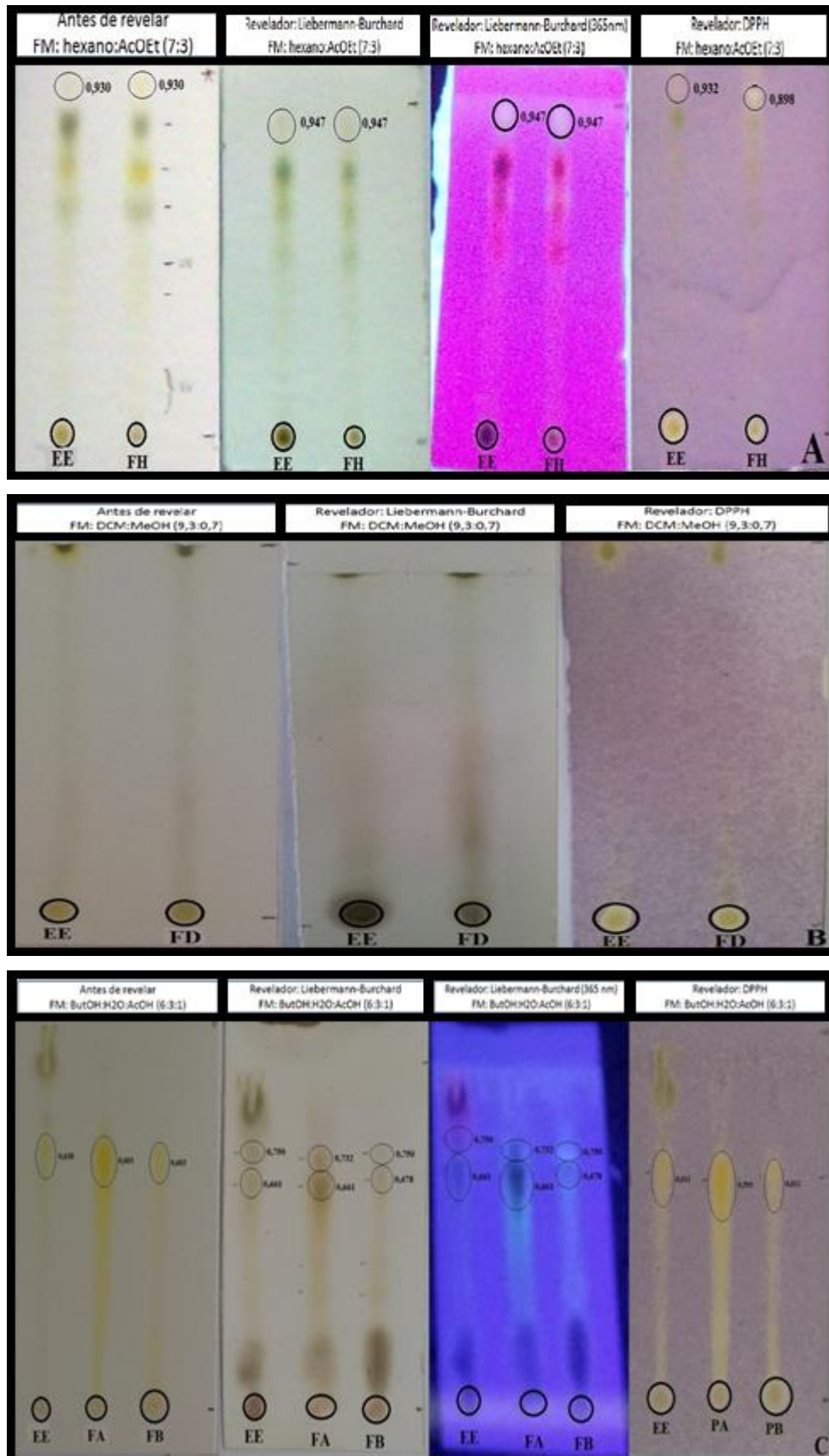
Fonte: O autor (2013).

Figura 32. Bioautografia em CCD do extrato etanólico e frações das folhas de *B. pinnatum* reveladas com NP/PEG (365 nm), cloreto de alumínio e DPPH.



Fonte: O autor (2013).

Figura 33. Bioautografia em CCD do extrato etanólico e frações das folhas de *B. pinnatum* reveladas com reagente de Liebermann-Burchard e DPPH.



Fonte: O autor (2013).

5.5 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

Com base nas ações antioxidante e antimicrobiana associadas aos flavonoides e substâncias fenólicas, foi testada a hipótese da possível atividade antibacteriana do extrato etanólico e frações das folhas de *B. pinnatum*.

5.5.1 Atividade antibacteriana pelo método de difusão em ágar

A atividade antibacteriana do extrato etanólico e frações de *B. pinnatum*, pelo método de difusão em ágar, medida pelo diâmetro do halo de inibição do crescimento bacteriano, está apresentada na Tabela 18. É observado que o extrato etanólico e as frações em acetato de etila e butanólica, na concentração de 500 mg/mL, inibiram o crescimento de *S. aureus*, produzindo halo de inibição de 9, 9,7 e 10,7 mm, respectivamente. Nas concentrações testadas, as amostras não foram ativas contra as cepas de *E. coli*, *S. typhimurium* e *P. aeruginosa*. Cloranfenicol e ampicilina, como esperado, também não inibiram o crescimento de *P. aeruginosa*, porém as outras cepas foram suscetíveis aos antibióticos (CLSI, 2012).

Tabela 18. Atividade antibacteriana do extrato etanólico e frações de *B. pinnatum* pelo método de difusão em ágar.

Amostras/Controles	Diâmetro do halo de inibição do crescimento (mm)			
	<i>S. aureus</i> ATCC® 29213	<i>E. coli</i> ATCC® 10536	<i>P. aeruginosa</i> ATCC® 27853	<i>S. typhimurium</i> ATCC® 13311
Extrato etanólico	9	0	0	0
Fração hexânica	0	0	0	0
Fração diclorometânica	0	0	0	0
Fração em acetato de etila	9,7	0	0	0
Fração butanólica	10,7	0	0	0
Cloranfenicol	22,7	30,7	0	30
Ampicilina	34	32	0	23
DMSO	0	0	0	0

Valores apresentados na forma de média obtidos de triplicatas.
Fonte: O autor (2013).

5.5.2 Concentração inibitória mínima e concentração bactericida mínima

Os resultados obtidos na determinação da concentração inibitória mínima (CIM) do extrato etanólico e das frações de *B. pinnatum* estão mostrados na Tabela 19. Os menores valores de CIM foram obtidos na fração hexânica frente a *S. aureus* e na fração butanólica frente a *P. aeruginosa*, ambos 0,625 mg/mL. Somente a fração diclorometânica não apresentou CIM menor ou igual a 2,5 mg/mL. Com relação ao controle (cloranfenicol), somente a cepa de *S. typhimurium* foi suscetível e *E. coli* apresentou valor intermediário, as demais cepas foram resistentes (CLSI, 2012).

A partir dos valores CIM, foi avaliada a concentração bactericida mínima (CBM) do extrato etanólico e frações de *B. pinnatum* que consiste na menor concentração em que a substância é capaz de impedir o desenvolvimento do microrganismo sendo descrita como atividades bactericida ou bacteriostática. Os resultados obtidos, encontrados na Tabela 19, mostram que o extrato etanólico e a fração butanólica apresentaram CBM bactericida para *S. aureus* e *P. aeruginosa* e bacteriostática para as demais cepas; a fração hexânica demonstrou CBM bactericida somente para *P. aeruginosa*, sendo bacteriostática frente às demais bactérias; as CBM da fração diclorometânica foram bactericidas para todas as cepas bacterianas testadas; e a fração em acetato de etila apresentou CBM do tipo bactericida para *E. coli* e *P. aeruginosa*, e bacteriostática para os outros dois microrganismos.

Tabela 19. Concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM) do extrato etanólico e frações das folhas de *B. pinnatum*.

Amostras/Controles	Microrganismo	CIM (mg/mL) ^a	CBM (mg/mL) ^a	Atividade
Extrato etanólico	<i>S. aureus</i>	2,5	2,5	Bacteriostático
			5,0	Bactericida
	<i>E. coli</i>	1,25	1,25	Bacteriostático
	<i>S. typhimurium</i>	1,25	1,25	Bacteriostático
	<i>P. aeruginosa</i>	1,25	1,25	Bacteriostático
Fração hexânica	<i>S. aureus</i>	0,625	0,625	Bacteriostático
			1,25	Bacteriostático
	<i>E. coli</i>	1,25	1,25	Bacteriostático
	<i>S. typhimurium</i>	1,25	1,25	Bacteriostático
	<i>P. aeruginosa</i>	1,25	1,25	Bacteriostático
Fração diclorometânica	<i>S. aureus</i>	5,0	5,0	Bactericida
			5,0	Bactericida
	<i>E. coli</i>	5,0	5,0	Bactericida
	<i>S. typhimurium</i>	5,0	5,0	Bactericida
	<i>P. aeruginosa</i>	5,0	5,0	Bactericida
Fração em acetato de etila	<i>S. aureus</i>	1,25	1,25	Bacteriostático
			1,25	Bacteriostático
	<i>E. coli</i>	1,25	1,25	Bacteriostático
	<i>S. typhimurium</i>	1,25	1,25	Bacteriostático
	<i>P. aeruginosa</i>	1,25	1,25	Bacteriostático
Fração butanólica	<i>S. aureus</i>	5	5	Bactericida
			1,25	Bacteriostático
	<i>E. coli</i>	1,25	1,25	Bacteriostático
	<i>S. typhimurium</i>	1,25	1,25	Bacteriostático
	<i>P. aeruginosa</i>	0,625	0,625	Bacteriostático
Cloranfenicol	<i>S. aureus</i>	0,0625	-	-
			0,0156	-
	<i>E. coli</i>	0,0156	-	-
	<i>S. typhimurium</i>	0,00098	-	-
	<i>P. aeruginosa</i>	0,0156	-	-

Fonte: O autor (2013).

5.6 ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA TÓPICA

A atividade anti-inflamatória de produtos naturais tem sido relacionada a substâncias fenólicas, especialmente aos flavonoides, bem como aos agentes antioxidantes que, através de diferentes mecanismos, inibem os processos inflamatórios. Neste sentido, a hipótese da atividade anti-inflamatória do extrato etanólico, rico em substâncias flavonoídicas, sobre diferentes modelos de inflamação tópica foi testada.

5.6.1 Efeito do extrato etanólico das folhas de *B. pinnatum* sobre o edema de orelha induzido por óleo de cróton

Após 6h da aplicação tópica de óleo de cróton, observa-se na Tabela 20 que houve formação efetiva de edema, demonstrado através do aumento da massa da orelha (massa do edema) do grupo controle (acetona). O extrato etanólico, aplicado topicamente na orelha dos camundongos após o agente flogístico, nas concentrações de 0,5 e 1,0 mg/orelha, inibiu significativamente ($p < 0,001$) a formação do edema em 54,85 e 57,11%, respectivamente, quando comparado ao grupo controle (Tabela 20). A dexametasona, um agente anti-inflamatório esteróide utilizado como controle positivo, como esperado, produziu 83,75% de inibição do edema.

Tabela 20. Efeito do extrato etanólico de *B. pinnatum* sobre o edema de orelha induzido por óleo de cróton.

Grupo	Concentração	Massa do edema (mg)	Inibição do edema (%)
Controle (acetona)	20 µL/orelha	4,43 ± 0,42	0
	0,1 mg/orelha	3,30 ± 0,48	25,51
Extrato etanólico	0,5 mg/orelha	2,00 ± 0,28***	54,85
	1,0 mg/orelha	1,90 ± 0,46***	57,11
Dexametasona	0,1 mg/orelha	0,72 ± 0,27***	83,75

Os valores correspondem à média ± E.P.M. de seis camundongos. *** $p < 0,001$, diferente do grupo controle após análise de variância seguida do teste de Student-Newman-keuls.

Fonte: O autor (2013).

5.6.2 Efeito do extrato etanólico de *B. pinnatum* sobre o edema de orelha induzido por ácido araquidônico

A aplicação tópica de ácido araquidônico promoveu, após 1h, formação do edema, sendo demonstrado através do aumento da massa da orelha (massa do edema) do grupo controle (acetona) (Tabela 21). Nas concentrações de 0,1, 0,5 e 1,0 mg/orelha, o extrato etanólico, aplicado topicamente na orelha dos camundongos após o agente flogístico, inibiu significativamente ($p < 0,01$ ou $p < 0,001$) a formação do edema em 41,67, 53,82 e 67,01%, respectivamente, quando comparado ao grupo controle ($2,88 \pm 0,50$) (Tabela 21). A indometacina, inibidor não seletivo da COX utilizado como controle positivo, reduziu a massa edematosa para $0,65 \pm 0,08$, inibindo em 77,43% a formação do edema.

Tabela 21. Efeito do extrato etanólico de *B. pinnatum* sobre o edema de orelha induzido por ácido araquidônico.

Grupo	Concentração	Massa do edema (mg)	Inibição do edema (%)
Controle (acetona)	20 μ L/orelha	$2,88 \pm 0,50$	0
	0,1 mg/orelha	$1,68 \pm 0,34^{**}$	41,67
Extrato etanólico	0,5 mg/orelha	$1,33 \pm 0,19^{**}$	53,82
	1,0 mg/orelha	$0,95 \pm 0,09^{***}$	67,01
Indometacina	2 mg/orelha	$0,65 \pm 0,08^{***}$	77,43

Os valores correspondem à média \pm E.P.M. de seis camundongos. $^{**}p < 0,01$, $^{***}p < 0,001$, diferente do grupo controle após análise de variância seguida do teste de Student-Newman-keuls.

Fonte: O autor (2013).

5.6.3 Efeito do extrato etanólico de *B. pinnatum* no edema de orelha induzido por fenol

A aplicação tópica de fenol induziu, após 2h, a formação do edema através do aumento da massa da orelha (massa do edema), sendo tratado com o extrato etanólico (Tabela 22). O extrato etanólico administrado topicamente após o agente flogístico, foi capaz de inibir significativamente em 79,73 ($p < 0,001$), 33,14 ($p < 0,05$) e 33,71% ($p < 0,05$) o edema nas concentrações de 0,1, 0,5 e 1,0 mg/orelha, respectivamente, em relação ao grupo controle. A dexametsona, controle positivo, reduziu o edema de orelha em 82,00%, comprovando sua ação anti-inflamatória.

Tabela 22. Efeito do extrato etanólico de *B. pinnatum* sobre o edema de orelha induzido por fenol.

Grupo	Concentração	Massa do edema (mg)	Inibição do edema (%)
Controle (acetona)	20 µL/orelha	8,78 ± 0,41	0
	0,1 mg/orelha	1,78 ± 0,85 ^{***}	79,73
Extrato etanólico	0,5 mg/orelha	5,87 ± 0,52 [*]	33,14
	1,0 mg/orelha	5,82 ± 0,73 [*]	33,71
Dexametasona	0,1 mg/orelha	1,58 ± 0,26 ^{***}	82,00

Os valores correspondem à média ± E.P.M. de seis camundongos. *p < 0,05, ***p < 0,001, diferente do grupo controle após análise de variância seguida do teste de Student-Newman-keuls.

Fonte: O autor (2013).

5.6.4 Efeito do extrato etanólico de *B. pinnatum* sobre o edema de orelha induzido por capsaicina

Capsaicina aplicada topicamente induziu edema de orelha, após 30 min, que é avaliado através do aumento da massa da orelha (massa do edema) e observado principalmente no grupo controle (não tratado) (Tabela 23). Concentrações de 0,1 (1,55 ± 0,19; p < 0,001), 0,5 (0,75 ± 0,28; p < 0,01) e 1,0 mg/orelha (1,77 ± 0,17; p < 0,01) do extrato etanólico reduziram significativamente o edema de orelha em 43,22, 72,53 e 35,16%, respectivamente, em relação ao grupo controle (2,73 ± 0,06). O grupo tratado com dexametasona também apresentou massa do edema (0,48 ± 0,13; p < 0,001) significativamente menor que o controle.

Tabela 23. Efeito do extrato etanólico de *B. pinnatum* sobre o edema de orelha induzido por capsaicina.

Grupo	Concentração	Massa do edema (mg)	Inibição do edema (%)
Controle (acetona)	20 µL/orelha	2,73 ± 0,06	0
	0,1 mg/orelha	1,55 ± 0,19 ^{**}	43,22
Extrato etanólico	0,5 mg/orelha	0,75 ± 0,28 ^{***}	72,53
	1,0 mg/orelha	1,77 ± 0,17 ^{**}	35,16
Dexametasona	0,1 mg/orelha	0,48 ± 0,13 ^{***}	82,42

Os valores correspondem à média ± E.P.M. de seis camundongos. **p < 0,01, ***p < 0,001, diferente do grupo controle após análise de variância seguida do teste de Student-Newman-keuls.

Fonte: O autor (2013).

5.6.5 Efeito do extrato etanólico de *B. pinnatum* no edema de orelha induzido por etil-fenil-propriolato

O agente flogístico etil-fenil-propriolato (EPP), induziu edema de orelha após 1h da aplicação tópica que é observado através do aumento da massa da orelha (massa do edema) (Tabela 24). O extrato etanólico, nas concentrações de 0,1, 0,5 e 1,0 mg/orelha, inibiu significativamente a formação do edema em 75,00 ($p < 0,001$), 69,77 ($p < 0,001$) e 43,60% ($p < 0,01$) quando comparado ao grupo controle, cuja massa do edema foi $1,72 \pm 0,22$ (Tabela 24). A dexametasona, controle positivo, reduziu a massa do edema em 73,84% ($p < 0,001$), demonstrando seu potencial anti-inflamatório.

Tabela 24. Efeito do extrato etanólico de *B. pinnatum* sobre o edema de orelha induzido por EPP.

Grupo	Concentração	Massa do edema (mg)	Inibição do edema (%)
Controle (acetona)	20 μ L/orelha	$1,72 \pm 0,22$	0
	0,1 mg/orelha	$0,43 \pm 0,08^{***}$	75,00
Extrato etanólico	0,5 mg/orelha	$0,52 \pm 0,09^{***}$	69,77
	1,0 mg/orelha	$0,97 \pm 0,08^{**}$	43,60
Dexametasona	0,1 mg/orelha	$0,45 \pm 0,16^{***}$	73,84

Os valores correspondem à média \pm E.P.M. de seis camundongos. ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$, diferente do grupo controle após análise de variância seguida do teste de Student-Newman-keuls.

Fonte: O autor (2013).

5.6.6 Efeito do extrato etanólico das folhas de *B. pinnatum* sobre o edema de orelha induzido pela aplicação múltipla de óleo de cróton

Após o estabelecimento do processo inflamatório crônico decorrente da aplicação múltipla de óleo de cróton, o tratamento com o extrato etanólico de *B. pinnatum* nas concentrações de 0,1 ($393,2 \pm 12,8$; $p < 0,001$), 0,5 ($505,7 \pm 49,9$; $p < 0,001$) e 1,0 mg/orelha ($422,5 \pm 27,4$; $p < 0,001$) foi capaz de reverter o edema significativamente, apresentando no nono dia de experimento uma inibição do edema de 54,95, 42,05 e 51,58%, respectivamente (Tabela 25). A dexametasona, como esperado, produziu 79,33% de inibição do edema. A Figura 34 mostra o estabelecimento do processo inflamatório ao longo dos nove dias de experimento e o efeito do tratamento crônico sobre o edema de orelha.

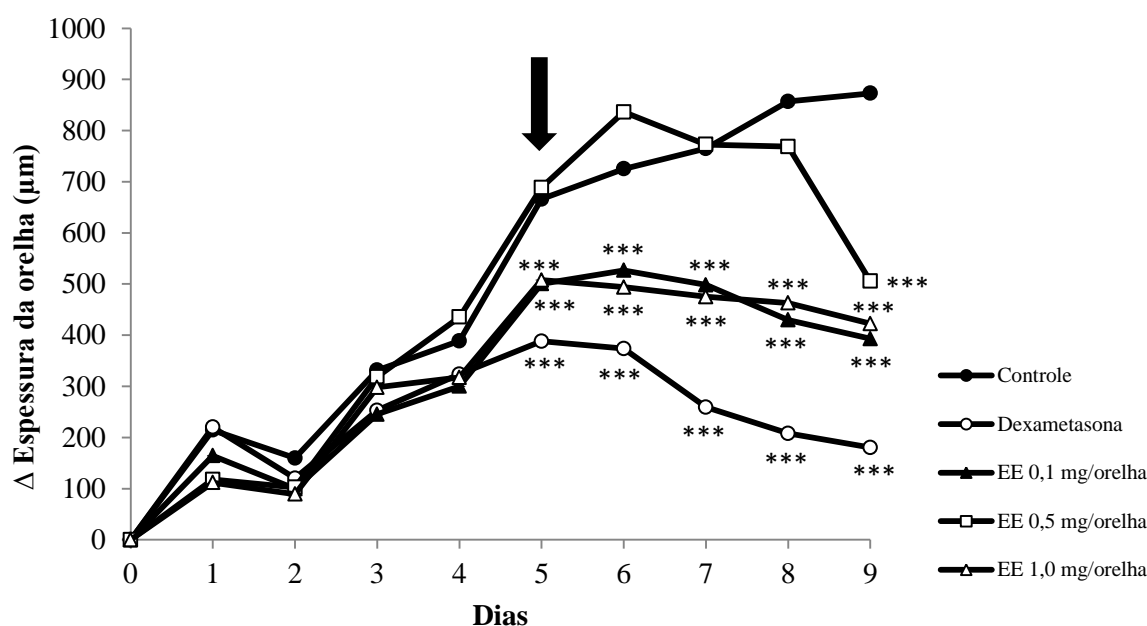
Tabela 25. Efeito do extrato etanólico das folhas de *B. pinnatum* sobre o tamanho do edema de orelha induzido por aplicação múltipla de óleo de cróton no nono dia de experimento.

Grupo	Concentração	Δ espessura da orelha (μm)	Inibição do edema (%)
Controle (acetona)	20 μL /orelha	$872,7 \pm 62,7$	0
	0,1 mg/orelha	$393,2 \pm 12,8^{***}$	54,95
Extrato etanólico	0,5 mg/orelha	$505,7 \pm 49,9^{***}$	42,05
	1,0 mg/orelha	$422,5 \pm 27,4^{***}$	51,58
Dexametasona	0,1 mg/orelha	$180,3 \pm 31,7^{***}$	79,33

Os valores correspondem à média \pm E.P.M. de seis camundongos. *** $p < 0,001$ diferente do grupo controle após análise de variância seguida do teste de Student-Newman-keuls.

Fonte: O autor (2013).

Figura 34. Efeito do extrato etanólico de *B. pinnatum* sobre o tamanho do edema de orelha induzido por aplicação múltipla de óleo de cróton durante os nove dias de experimento.



Os valores correspondem à média \pm E.P.M. de seis camundongos. *** $p < 0,001$ diferente do grupo controle após análise de variância seguida do teste de Student-Newman-keuls.

Fonte: O autor (2013).

Na Tabela 26 são mostrados os dados de massa do edema (mg) no nono dia do experimento, os quais através do aumento da massa das orelhas confirmam o processo inflamatório instalado pela aplicação múltipla de óleo de cróton e que a aplicação do extrato etanólico (0,1, 0,5 e 1,0 mg/orelha) e da dexametasona foram eficazes na reversão do edema em 36,63, 20,33, 22,59 e 75,39%, respectivamente.

Tabela 26. Efeito do extrato etanólico de *B. pinnatum* sobre a massa do edema de orelha induzido por aplicação múltipla de óleo de cróton no nono dia de experimento.

Grupo	Concentração	Δ massa da orelha (mg)	Inibição do edema (%)
Controle (acetona)	20 μ L/orelha	14,02 \pm 0,71	0
	0,1 mg/orelha	8,88 \pm 0,87**	36,63
Extrato etanólico	0,5 mg/orelha	11,17 \pm 1,34*	20,33
	1,0 mg/orelha	10,85 \pm 0,69*	22,59
Dexametasona	0,1 mg/orelha	3,45 \pm 0,38***	75,39

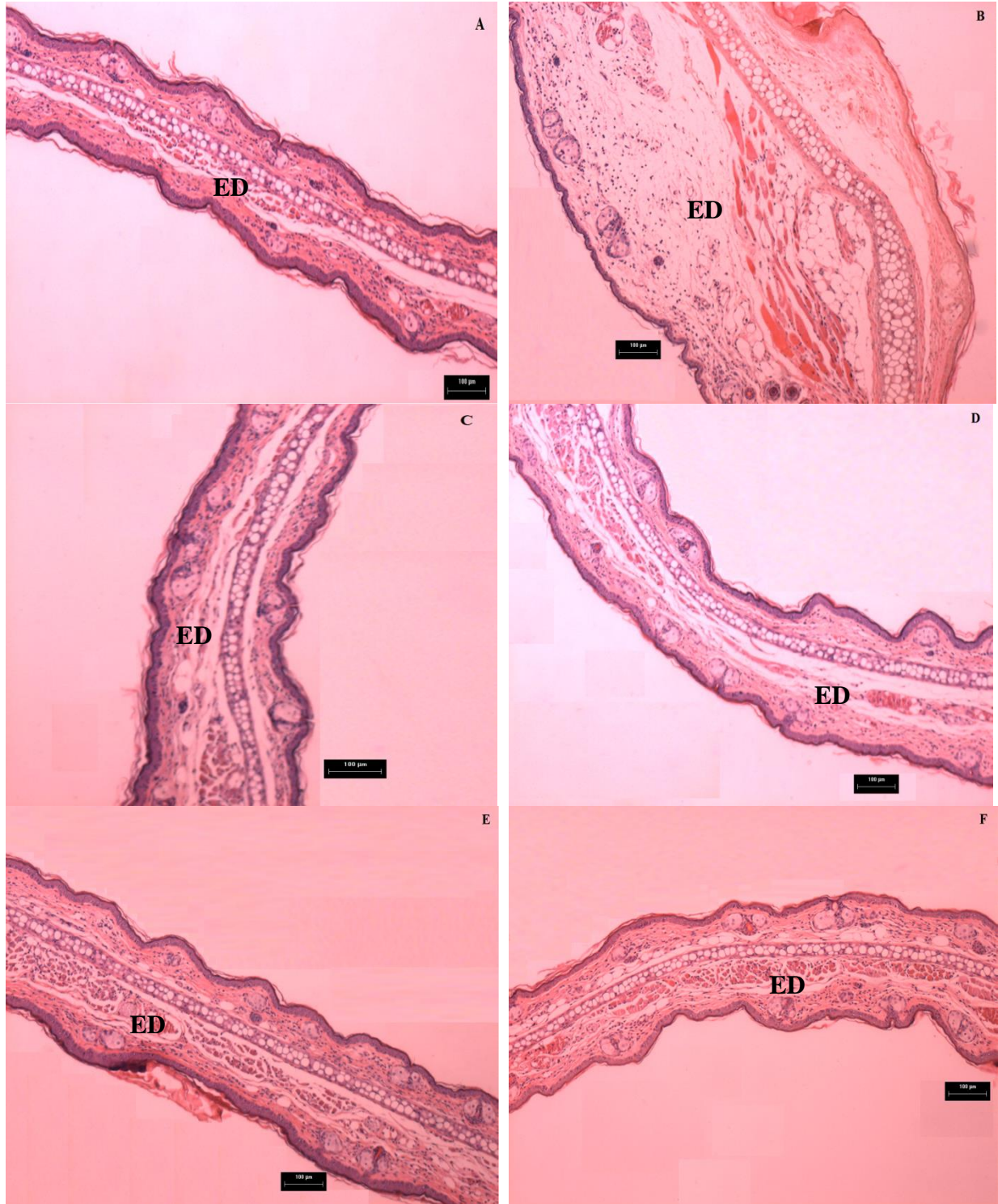
Os valores correspondem à média \pm E.P.M. de seis camundongos. *** p < 0,001, ** p < 0,01, * p < 0,05 diferente do grupo controle após análise de variância seguida do teste de Student-Newman-keuls.

Fonte: O autor (2013).

5.6.7 Análise histológica

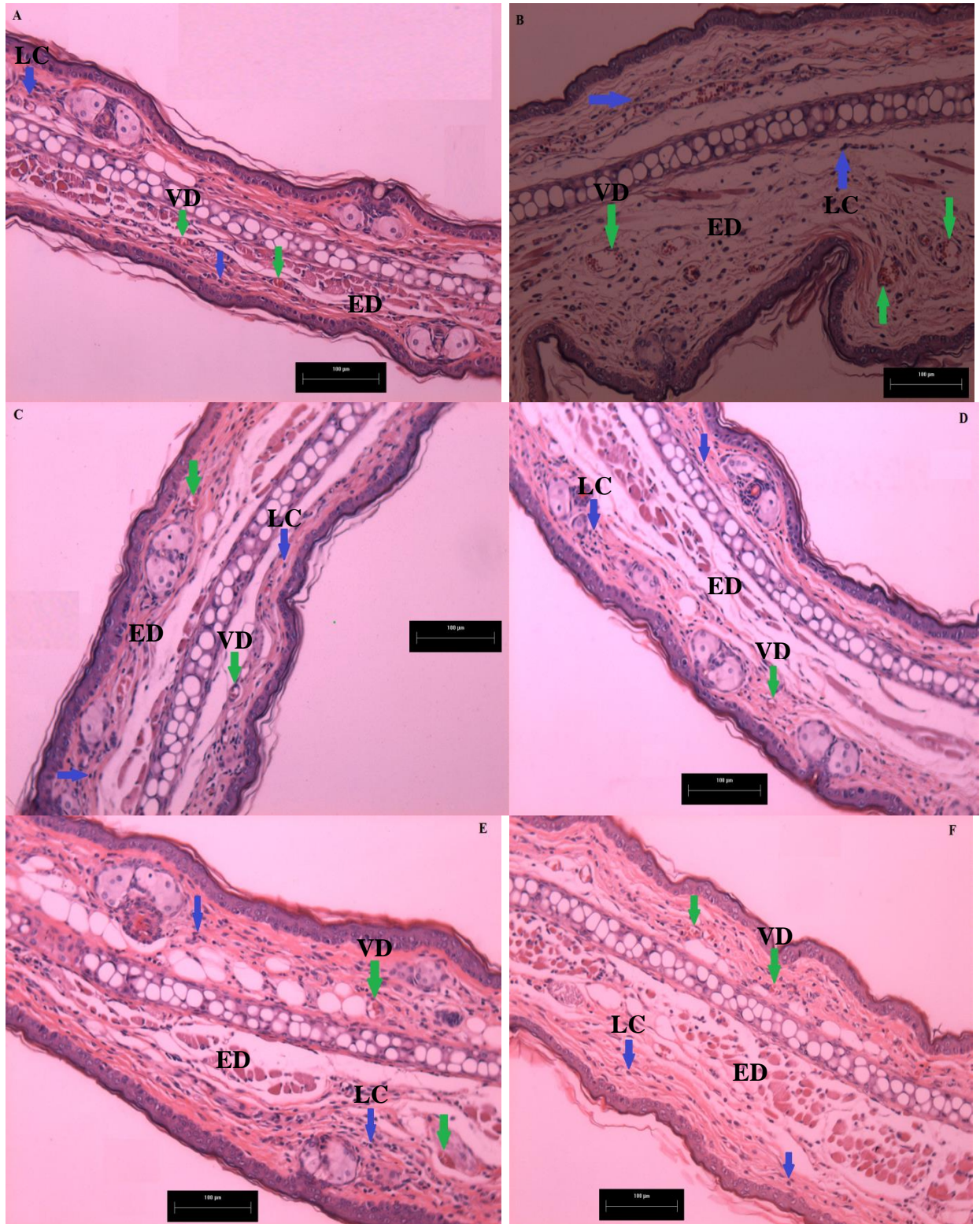
No modelo de edema de orelha induzido pela aplicação única e múltipla de óleo de cróton, para confirmar e compreender melhor o efeito anti-inflamatório do extrato etanólico observado nas Tabelas 20 e 25, respectivamente, foi realizado a análise histológica de parâmetros da inflamação. Para o modelo de inflamação aguda (aplicação única de óleo de cróton), na Figura 35, são apresentadas fotos representativas dos cortes histológicos (100x, escala 100 μ m) de orelhas de camundongos de cada grupo experimental. É verificado que, ao comparar o grupo controle negativo (Figura 35B) com o grupo sem inflamação (Figura 35A), a aplicação tópica única de óleo de cróton produziu um aumento acentuado da espessura da orelha (derme), acompanhado pela ruptura do tecido conjuntivo e desorganização das fibras da matrix extracelular. O tratamento com o extrato etanólico de *B. pinnatum*, nas concentrações de 0,5 e 1,0 mg/orelha, reduziu a formação de edema, ou seja, a espessura da derme, o que pode ser observado nos cortes histológicos das orelhas (Figuras 35E e 35F). Após aplicação da dexametasona (0,1 mg/orelha), controle positivo, a inibição do edema foi também visualizado de forma expressiva (Figura 35C). Analisando ainda parâmetros de inflamação nas amostras das orelhas deste modelo, através da Figura 36 (fotomicrografia dos cortes histológicos em aumento de 200x, escala 100 μ m), observa-se que o óleo de cróton, além dos efeitos citados anteriormente, causou vasodilatação e infiltração de leucócitos polimorfonucleares na derme e que, esses parâmetros inflamatórios foram suprimidos pelo tratamento tópico com o extrato etanólico nas concentrações de 0,5 e 1,0 mg/orelha, assim como pela dexametasona (0,1 mg/orelha).

Figura 35. Fotomicrografia de seções transversais de tecido da orelha de camundongos submetidos à aplicação única de óleo de cróton: efeito do EE de *B. pinnatum* sobre o tamanho do edema (espessamento da derme).



Cortes histológicos de orelhas dos camundongos corados com hematoxilina-eosina (100x, escala de 100 µm). (A) Basal (sem inflamação); (B) Controle (acetona); (C) dexametasona 0,1 mg/orelha; (D) EE 0,1 mg/orelha; (E) EE 0,5 mg/orelha; (F) EE 1,0 mg/orelha; (ED) edema/espessamento da derme.
Fonte: O autor (2013).

Figura 36. Fotomicrografia de seções transversais de tecido da orelha de camundongos submetidos à aplicação única de óleo de cróton: efeito do EE de *B. pinnatum* sobre vasodilatação e infiltração de leucócitos.



Cortes histológicos de orelhas dos camundongos corados com hematoxilina-eosina (200x, escala de 100 µm). (A) Basal (sem inflamação); (B) Controle (acetona); (C) dexametasona 0,1 mg/orelha; (D) EE 0,1 mg/orelha; (E) EE 0,5 mg/orelha; (F) EE 1,0 mg/orelha; (ED) edema/espessamento da derme; (VD) vasodilatação; (LC) leucócitos. Fonte: O autor (2013).

O efeito inibitório do EE sobre a formação de edema pela aplicação única de óleo de cróton a partir da análise histológica foi corroborado pela avaliação da medida da espessura do tecido edematoso (μm) nos cortes teciduais examinados através do programa IMAGE-PRO® PLUS (Tabela 27). Nesta análise, nas concentrações de 0,1, 0,5 e 1,0 mg/orelha, o extrato reduziu a espessura do tecido em 54,27, 47,44 e 56,95%, respectivamente, sendo esses valores estatisticamente iguais ao da dexametasona (57,06%).

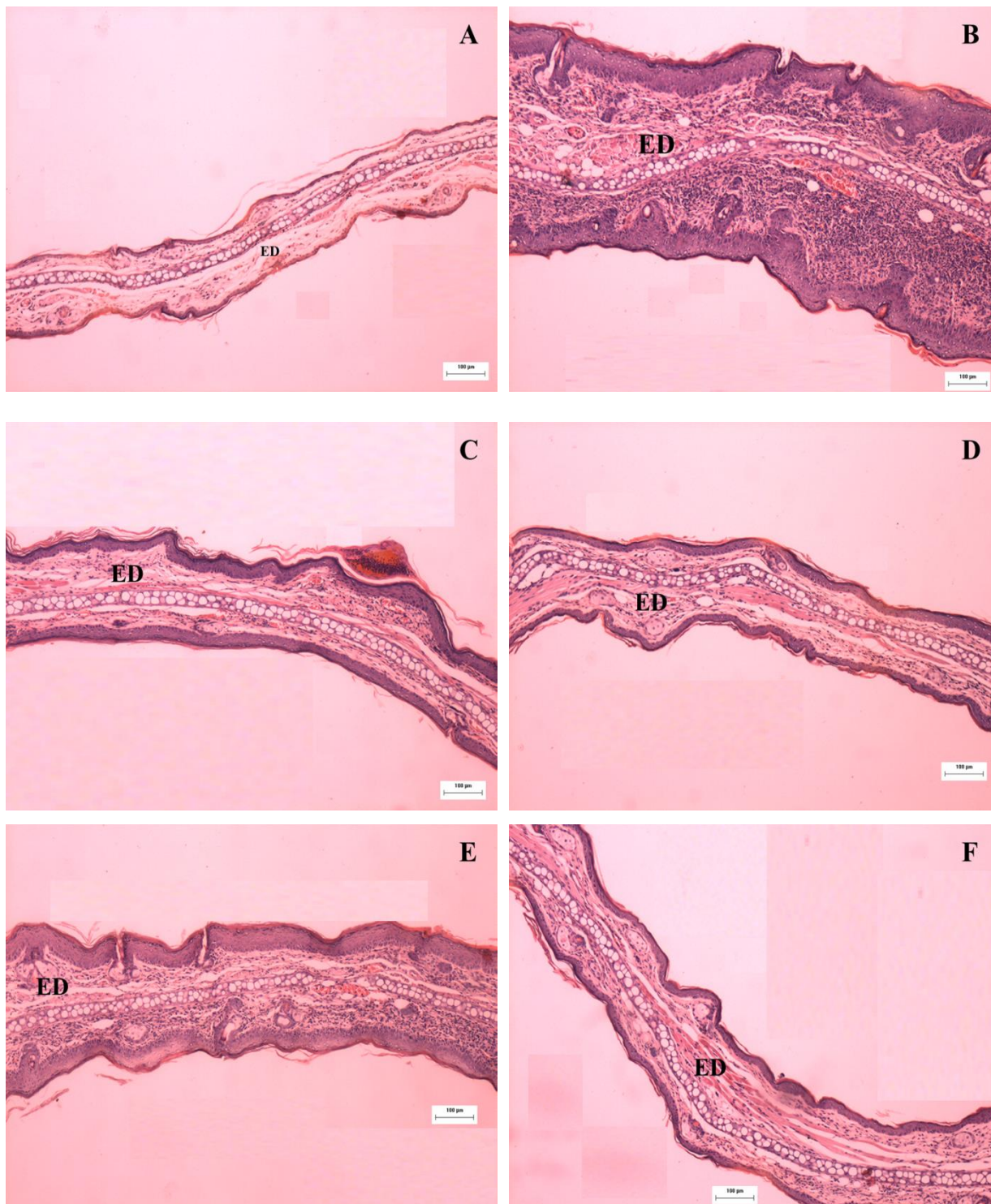
Tabela 27. Efeito do extrato etanólico das folhas de *B. pinnatum* sobre o tamanho do edema de orelha induzido pela aplicação única de óleo de cróton.

Grupo	Concentração	Tamanho do edema (μm)	Inibição do edema (%)
Controle (acetona)	20 μL /orelha	590,90 \pm 33,00	0
Basal (sem óleo de cróton)	-	187,00 \pm 9,00	---
Extrato etanólico	0,1 mg/orelha	270,20 \pm 7,00 ^{***}	54,27
	0,5 mg/orelha	310,60 \pm 41,00 ^{***}	47,44
	1,0 mg/orelha	254,40 \pm 19,00 ^{***}	56,95
Dexametasona	0,1 mg/orelha	253,70 \pm 22,00 ^{***}	57,06

Medidas da espessura do tecido edematoso (μm) em cinco regiões aleatórias de cada corte histológico através de Fotomicrografia utilizando o programa IMAGE-PRO® PLUS. Cada grupo foi representado por quatro cortes histológicos (n = 4). Os valores correspondem à média \pm E.P.M. *** p < 0,001, diferente do grupo controle após análise de variância seguida do teste de Student-Newman-Keuls.

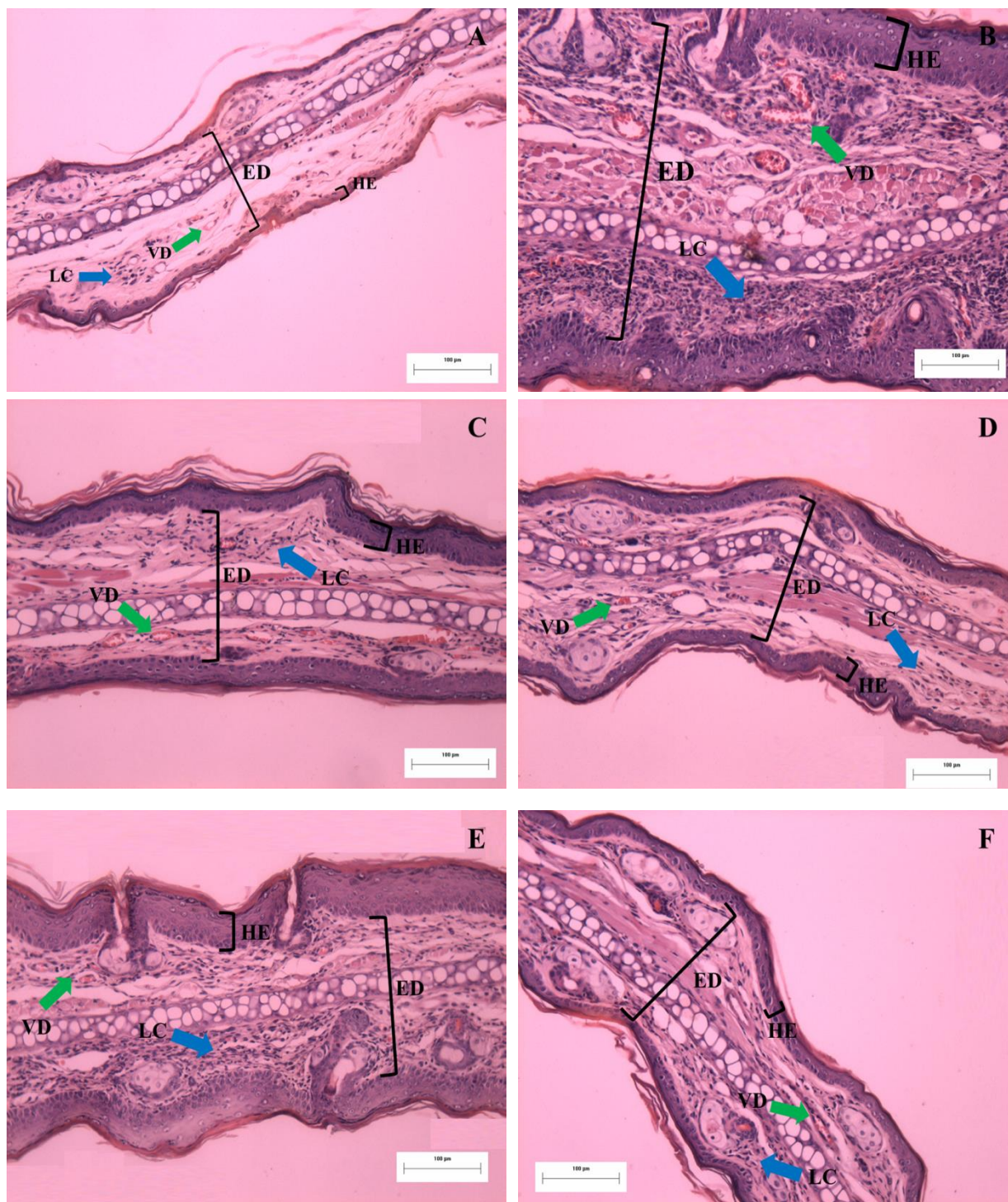
Considerando o modelo de inflamação crônica (aplicação múltipla de óleo de cróton), através da análise comparativa de fotos representativas dos cortes histológicos (100x, escala 100 μm) entre o grupo controle negativo (Figura 37B) e o grupo sem inflamação (Figura 37A), observa-se que a aplicação tópica múltipla de óleo de cróton, assim como a aplicação única, mas em maior extensão, produziu aumento da espessura da orelha (derme), acompanhado pela ruptura do tecido conjuntivo e desorganização das fibras da matrix extracelular. Os tratamentos com o extrato etanólico de *B. pinnatum* (0,1, 0,5 e 1,0 mg/orelha) e a dexametasona inibiram o edema, reduzindo a espessura da derme (Figuras 37C-F). Analisando a Figura 38 (fotomicrografia em 200x, escala 100 μm), observa-se que o óleo de cróton no grupo controle negativo, além dos efeitos citados anteriormente, causou hiperplasia epidérmica, vasodilatação e infiltração de leucócitos (mononucleares) na derme. Novamente, todos esses parâmetros inflamatórios foram suprimidos pelo tratamento tópico com o extrato (0,1, 0,5 e 1,0 mg/orelha), assim como pela dexametasona (0,1 mg/orelha).

Figura 37. Fotomicrografia de seções transversais de tecido da orelha de camundongos submetidos à aplicação múltipla de óleo de cróton: efeito do EE de *B. pinnatum* sobre o tamanho do edema (espessamento da derme).



Cortes histológicos de orelhas dos camundongos corados com hematoxilina-eosina (100x, escala de 100 µm). (A) Basal (sem inflamação); (B) Controle (acetona); (C) dexametasona 0,1 mg/orelha; (D) EE 0,1 mg/orelha; (E) EE 0,5 mg/orelha; (F) EE 1,0 mg/orelha; (ED) edema/espessamento da derme.
Fonte: O autor (2013).

Figura 38. Fotomicrografia de seções transversais de tecido da orelha de camundongos submetidos à aplicação múltipla de óleo de cróton: efeito do EE de *B. pinnatum* sobre tamanho do edema (espessamento da derme e epiderme), vasodilatação e infiltração de leucócitos.



Cortes histológicos de orelhas dos camundongos corados com hematoxilina-eosina (200x, escala de 100 μ m). (A) Basal (sem inflamação); (B) Controle (acetona); (C) dexametasona 0,1 mg/orelha; (D) EE 0,1 mg/orelha; (E) EE 0,5 mg/orelha; (F) EE 1,0 mg/orelha; (ED) edema/espessamento da derme; (HE) hiperplasia epidérmica; (VD) vasodilatação; (LC) leucócitos. Fonte: O autor (2013).

6 DISCUSSÃO

O presente estudo caracterizou quimicamente e avaliou atividades biológicas do extrato etanólico e frações das folhas de *Bryophyllum pinnatum*, uma planta medicinal utilizada popularmente no Brasil e em outros países principalmente na forma de suco, sumo e emplastos de suas folhas (ABRÃO, 2010; GUPTA et al., 2010). Popularmente, a espécie é empregada no tratamento de inflamações, infecções, feridas, contusões, queimaduras, picadas de insetos, furúnculos e ulcerações. Além disso, é útil no tratamento de anexite e gastrite, auxilia na eliminação de cálculos renais, abscessos, alergia, erisipela, frieira, dores de cabeça e nas juntas, reumatismo, hemorroidas, diarreia, disenteria e vômitos (ABRÃO, 2010; LORENZI; MATOS, 2008; NAYAK; MARSHALL; ISITOR, 2010; OJEWOLE, 2005). Baseando-se no uso popular de *B. pinnatum*, estudos têm confirmado diversas atividades farmacológicas, como anti-inflamatória (OJEWOLE, 2005); antioxidante (GUPTA; BANERJEE, 2011); antimicrobiana (AKINPELU et al., 2000); cicatrizante (NAYAK; MARSHALL; ISITOR, 2010); antinociceptiva (IGWE; AKUNYILI, 2005); antidiabética (OJEWOLE, 2005); imunossupressora e antialérgica (CRUZ et al., 2012) e atividade leishmanicida (MUZITANO et al., 2006, 2011).

Com intuito de aprofundar a investigação farmacológica, o presente trabalho avaliou as atividades antioxidante, antibacteriana e anti-inflamatória tópica das folhas de *B. pinnatum* utilizando modelos experimentais específicos que ainda não foram relatados na literatura, além de abordar o extrato e as frações. Essa dissertação tem sua originalidade, viabilidade, importância e atualidade fundamentadas pelo PNPIC e suas diretrizes, pois, envolve a avaliação e confirmação de potenciais de ações farmacológicas de uma espécie medicinal que consta na RENISUS. A mesma está inserida nas diretrizes do PNPIC e assim irá contribuir com a concretização dessa política. Os resultados dessa proposta agregam mais conhecimento acerca da espécie estudada, justificando o seu uso tradicional e evidenciando a espécie como potencial alvo para o desenvolvimento de formulações fitoterápicas, para a obtenção de fitofármacos e/ou semi-síntese de novos fármacos, gerando assim novas possibilidades terapêuticas para a população.

O perfil fitoquímico de *Bryophyllum pinnatum* é extensamente conhecido e diversas substâncias bioativas, desde flavonoides a terpenoides, já foram relatadas na espécie, de modo que todas as atividades biológicas presentes na mesma podem ser explicadas com base em sinergismos (KAMBOJ; SALUJA, 2009; MAJAZ et al., 2011). Os resultados apresentados na caracterização química por CLAE-UV dos derivados das folhas *B. pinnatum* condizem com

dados da literatura relacionados ao perfil fitoquímico da espécie, sendo que foram detectados cinco flavonoides (rutina, quercetina, canferol, luteolina-7-*O*- β -D-glicosídeo e apigenina-7-*O*- β -D-glicosídeo), classe de fitoconstituintes majoritários de *B. pinnatum*, sendo que luteolina-7-*O*- β -D-glicosídeo e apigenina-7-*O*- β -D-glicosídeo ainda não haviam sido detectadas na espécie (PATTEWAR, 2012). Apesar de nenhum dos flavonoides citados terem sido detectados no extrato etanólico, a confirmação da presença dessas substâncias conhecidamente bioativas nas frações (COTTIGLIA et al., 2005; GARCÍA-MEDIAVILLA et al., 2007; GOKBULUT et al., 2013; LEE et al., 2013; LESJAK et al., 2011; MAJAZ et al., 2011; MUZITANO et al., 2006; VITALINI et al., 2011), confirmam a presença delas também no extrato etanólico, uma vez que este deu origem às diferentes frações, e dessa forma evidencia a eficácia das etapas fitoquímicas de obtenção dos derivados vegetais e sustenta os resultados obtidos na avaliação de suas atividades biológicas. Outros derivados flavonoídicos bioativos já foram detectados na espécie, dentre eles luteolina (KAMBOJ; SALUJA, 2009; MAJAZ et al., 2011; GOKBULUT et al., 2013; BALAMURUGAN; KARTHIKEYAN, 2012), α -ramnoisorobina (TATSIMO et al., 2012), 5-metil 4',5,7-trihidroxiflavona e 4',3,5,7-tetrahidroxi 5-metil 5'-propenammina antocianidina (OKWU; NNAMDI, 2011b). Outras classes de metabólitos, também bioativos, tais como alcaloides, saponinas, esteroides, triterpenoides, fenilpropanoides, ácidos fenolcarbônicos, antocianidinas e taninos, têm sido relatadas na espécie (ALMEIDA; MUZITANO; COSTA, 2006; LORENZI; MATOS, 2008; MAJAZ et al., 2011; OKWU; JOSIAH, 2006). Nesse sentido, a análise em CG-EM da fração hexânica confirmou a presença de metabólitos mais apolares, como alguns ésteres graxos; α -tocoferol (vitamina E), substância com elevado potencial antioxidante, estruturalmente relacionada com as quinonas terpênicas do tipo plastoquinonas; e o triterpeno pentacíclico β -amirina, que possui diferentes bioatividades, como potencial antioxidante e anti-inflamatório (DEWICK, 2009; DIAS; HAMERSKI; PINTO, 2011). Os triterpenos pentacíclicos, em sua maioria, pertencem às subclasses ursano, oleano e lupano. A presença de β -amirina (esqueleto olean-12-eno) sugere a presença da α -amirina (esqueleto ursan-12-eno), seu isômero constitucional, cuja presença em *B. pinnatum* já foi relatada (DIAS; HAMERSKI; PINTO, 2011; FERNANDES, 2011; SIDDIQUI et al., 1989; SILVA, 2007). A biossíntese dos triterpenos tem como precursor comum o 2,3-oxidoesqualeno e existem evidências de que as séries de ciclizações e rearranjos de Wagner-Meerwein que convertem o oxidoesqualeno em diferentes triterpenoides (p.ex.: lanosterol, lupeol, α - e β -amirinas), na via do mevalonato (MVA) e metileritritol 4-fosfato (MEP), sejam catalisadas por uma única enzima, a oxidoesqualeno ciclase (OSC) ou triterpeno sintase, que pode gerar um único produto

(monofuncional) ou diferentes produtos (multifuncional) (DEWICK, 2009). Triterpeno sintases multifuncionais têm sido relatadas, como a PSM (*mixed amyrin synthase from P. sativum*) em que os dois produtos majoritários são a α - e β -amirina. OSCs clonadas de *Arabidopsis thaliana* produzem mais de 20 triterpenos, incluindo lupeol e α - e β -amirina (KUSHIRO et al., 2000; SHIBUYA et al., 2009; YU et al., 2013). Além disso, os isômeros constitucionais de posição α - e β -amirina, por diferirem somente na posição de uma metila, que na α -amirina está em C₁₉ e na β -amirina está em C₂₀, saem juntas na CLAE e CG, com diferença de poucos segundos, apresentando sobreposição dos sinais. Portanto, na análise por CG, o sinal identificado como β -amirina (t_r 51,09 min) pode tratar de α -amirina, apesar da comparação dos espectros de massas ter sugerido a estrutura da série oleano. Triterpenos pentacíclicos que possuem ligação π em C₁₂ apresentam padrão de fragmentação característico, via reação Retro-Diels-Alder, sendo assim as amirinas (α - e β -) apresentam o mesmo padrão de fragmentação, sendo m/z 189, m/z 203 e m/z 218 os fragmentos característicos. Existem algumas diferenças nos espectros de massas das duas substâncias: na β -amirina o sinal em m/z 203 apresenta maior intensidade que na α -amirina; e derivados da série oleano (β -amirina) apresentam sinal em m/z 189 mais intenso do que em m/z 203 e na série ursano (α -amirina) essa relação é inversa (FERNANDES, 2011; GIESE, 2005; SILVA, 2007; ZANON et al., 2008).

A quantificação de fenóis totais evidenciou que o extrato etanólico e as frações das folhas de *B. pinnatum* são ricos em substâncias fenólicas, em que os conteúdos variaram de 3,45 a 25,34 g/100 g, sendo que a fração em acetato de etila apresentou maior teor. Os teores de flavonoides totais variaram de 0,66 a 23,31 g/100 g no extrato e nas frações analisadas, destacando novamente a fração em acetato de etila. Devido ao caráter mais polar do acetato de etila já era esperado que apresentasse maiores teores de fenóis totais e flavonoides, substâncias também com maior caráter polar. O teor de flavonoides em extratos de *B. pinnatum* é influenciado pelas condições de cultivo, estação do ano e método de extração, sendo o conteúdo potencializado quando a espécie é exposta à luz solar e coletada nos meses em que há maior incidência de radiação solar, principalmente no verão (MUZITANO et al., 2011). Para a realização deste trabalho, as folhas de *B. pinnatum* foram coletadas no mês de Janeiro (2012), atendendo às condições descritas anteriormente, ao ponto que na fração em acetato de etila o teor flavonoídico correspondeu a 92% do teor total de fenóis. Os dados dessa quantificação, bem como os de caracterização química, demonstram a eficácia das etapas de obtenção dos derivados vegetais de *B. pinnatum* e principalmente corroboram com os resultados apresentados nos ensaios de atividades antioxidante, antimicrobiana e anti-

inflamatória, sugerindo a relação entre constituintes fenólicos e atividades biológicas (COUTINHO; MUZITANO; COSTA, 2009; GUPTA; BANERJEE, 2011; HARLALKA; PATIL; PATIL, 2007; JAIN et al., 2010).

Considerando a atividade antioxidante, o extrato etanólico e as frações das folhas de *B. pinnatum* apresentaram potencial antioxidante, em ensaios que diferem em relação ao mecanismo antioxidante avaliado. Nos ensaios com radical DPPH e de FRAP, a fração em acetato de etila produziu CE_{50} (9,44 e 234,22 $\mu\text{g/mL}$) muito próxima à da rutina (8,66 e 216,81 $\mu\text{g/mL}$), demonstrando sua capacidade de sequestro de radicais livres e de redução de íons Fe^{3+} , respectivamente, ambas envolvendo a doação de elétrons. Os ensaios de avaliação da inibição da peroxidação lipídica ou lipoperoxidação (LPO), como o sistema de cooxidação β -caroteno/ácido linoléico, apesar de também serem testes *in vitro*, reproduzem melhor situações fisiológicas de estresse oxidativo, como a oxidação dos lipídeos insaturados das membranas celulares, que causa a destruição de sua estrutura, alteração de seu funcionamento e em casos extremos, a morte celular (ALVES et al., 2010; LIMA; ABDALLA, 2001). Neste ensaio, analisando o gráfico de decaimento da absorvância da emulsão do sistema β -caroteno/ácido linoléico em função do tempo (Figura 30), ao comparar a curva do controle negativo com as demais curvas, percebe-se que o extrato etanólico e principalmente as frações hexânica e em acetato de etila retardaram e reduziram a LPO e conseqüentemente a oxidação do β -caroteno. A fração em acetato de etila foi a mais promissora com 58% de inibição da peroxidação lipídica, sendo que a rutina, flavonoide com atividade antioxidante utilizado como controle positivo, apresentou 61% de inibição. A LPO é um processo de três etapas: iniciação, propagação e terminação, de modo que os antioxidantes podem agir inibindo a iniciação do processo ao neutralizar ERO do meio e/ou inibir a propagação da LPO, ao neutralizar os radicais peroxila formados pela oxidação dos lipídeos (DUARTE-ALMEIDA et al., 2006; LIMA; ABDALLA, 2001). Ainda com relação a este ensaio, em virtude do meio reacional se tratar de uma emulsão, substâncias lipofílicas encontram maior facilidade de exercer sua ação antioxidante, pois são capazes de permanecer na interface óleo:água da emulsão, onde ocorre a LPO. Enquanto as substâncias mais hidrofílicas solubilizam-se na fase aquosa, o que gera diluição e conseqüente redução de suas atividades (KOLEVA et al., 2002). Isso explica a inibição apresentada pela fração hexânica, além de que nela, através de CG-EM foi detectada a vitamina E (tocoferóis), substância antioxidante que neutraliza radicais peroxila, inibindo a etapa de propagação da LPO (DEWICK, 2009).

Os resultados obtidos através de ensaios de atividade antioxidante *in vitro* não podem ser extrapolados diretamente para situações *in vivo*, uma vez que a ação dos antioxidantes

envolve diferentes mecanismos (MAGALHÃES et al., 2008). Porém, os dados obtidos estão associados aos teores de fenóis e flavonoides totais encontrados especialmente na fração em acetato de etila, que foi a mais ativa em todos os testes de atividade antioxidante realizados, demonstrando uma correlação entre os conteúdos de substâncias fenólicas e atividade antioxidante. Os resultados da bioautografia reafirmam essa correlação uma vez que, de acordo com os valores de Rf apresentados pelo extrato etanólico e pelas frações, relacionou-se a atividade antioxidante (revelação com DPPH) com substâncias fenólicas (revelação com FeCl₃) e flavonoides (revelação com NP/PEG e AlCl₃), além de terpenoides, esteroides e/ou saponinas (revelação com reagente de Liebermann-Burchard). A caracterização química por CLAE-UV detectou a presença de flavonoides antioxidantes (GOKBULUT et al., 2013; VITALINI et al., 2011) e outros derivados flavonoídicos com atividade antioxidante já foram relatados em *B. pinnatum* (GOKBULUT et al., 2013; MAJAZ et al., 2011; MUZITANO et al., 2006; TATSIMO et al., 2012). Cinco fatores determinam a atividade antioxidante das substâncias fenólicas, especialmente os flavonoides: reatividade como doador de H e elétrons (hidroxilas); estabilidade do radical flavonoila formado (ressonância); capacidade de complexar com metais (grupos *orto*-difenólicos); reatividade frente a outros antioxidantes e afinidade com as membranas biológicas (BARREIROS; DAVID; DAVID, 2005). Além disso, os flavonoides exercem inibição sobre enzimas pró-oxidantes como xantina oxidase, mieloperoxidase e lipoxigenase (SADIK; SIES; SCHEWE, 2003).

O teste de difusão em ágar constitui uma abordagem de triagem na avaliação da atividade antibacteriana, e apesar de não ser recomendado pelo CLSI, é um método simples, rápido e que permite analisar diversas amostras, além de que essa técnica consta na rotina clínica do FDA, sendo importante quando o trabalho envolve desenvolvimento e inovação (BURT, 2004). No teste de difusão somente o extrato etanólico e as frações em acetato de etila e butanólica apresentaram halo de inibição do crescimento em *S. aureus*, sendo que frente às demais cepas bacterianas nenhuma amostra foi ativa. A ausência de atividade antimicrobiana das amostras no teste de difusão em ágar não significa que as mesmas sejam inativas, pois este teste é pouco conclusivo devido a limitações técnicas, como difusão da amostra através do meio, tamanho do inóculo bacteriano, agentes solubilizantes no meio e temperatura de incubação das placas de petri. A necessidade de difusão da amostra através do meio (ágar) é o principal fator limitante, especialmente para derivados vegetais (p. ex.: extratos), devido à sua viscosidade elevada e presença de constituintes com diferentes polaridades, o que gera uma difusão diferencial e insuficiente para que as amostras inibam efetivamente o crescimento dos microrganismos (WILKINSON, 2006). As cepas de *S. aureus*

e *P. aeruginosa*, além de avaliar a atividade antibacteriana das amostras testadas, foram utilizadas também para o controle de qualidade dos testes. Quanto à *S. aureus*, de acordo com o documento M100-S22 do CLSI (CLSI, 2012), os valores dos diâmetros dos halos para ampicilina e cloranfenicol estão dentro do previsto (27-35 e 19-26 mm, respectivamente). O mesmo foi observado para *P. aeruginosa*, em que o resultado esperado para ampicilina e cloranfenicol é zero (0), uma vez que estes antimicrobianos não são eficazes contra essa bactéria (CLSI, 2012). A segunda abordagem na avaliação da atividade antibacteriana foi a determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM), procedimento de caráter quantitativo exigido pelo CLSI e FDA, empregando o teste de microdiluição. As CIM mais significativas foram da fração hexânica frente a *S. aureus* e da fração butanólica frente a *P. aeruginosa*, ambas 0,625 mg/mL (bacteriostático). Somente a fração diclometânica não apresentou CIM menor ou igual a 2,5 mg/mL, porém seus valores de CIM (5,0 mg/mL para todas bactérias) foram CBM do tipo bactericida frente à todas as cepas. Os valores de CIM esperados, descritos no CLSI, para o antimicrobiano usado como controle (cloranfenicol) não condizem com os observados (CLSI, 2012). Porém, os valores de CIM encontrados para o cloranfenicol foram reprodutivos e validam o método de microdiluição em placa. Além disso, as concentrações descritas pelo CLSI (2012) foram calculadas por meio do método de diluição e não por microdiluição, o que pode gerar alguma variação. Portanto, observa-se que os procedimentos de difusão e microdiluição estão devidamente validados e que os resultados obtidos são reprodutivos e confiáveis.

Com o crescente aumento de cepas resistentes a antibióticos, como *S. aureus* resistentes à oxacilina e meticilina (SADER et al., 1993), torna-se de extrema importância a busca por novas alternativas terapêuticas e os resultados da avaliação da atividade antibacteriana demonstram *B. pinnatum* como um alvo em potencial. Metabólitos especiais já relatados na espécie possuem atividade antimicrobiana, alguns como os flavonoides quercetina, canferol e rutina foram confirmados por CLAE-UV nas amostras utilizadas (CRUZ et al., 2012; GOKBULUT et al., 2013; OKWU; JOSIAH, 2006; OKWU; NNAMDI, 2011a, 2011b). Os principais mecanismos pelos quais os constituintes antibacterianos agem contra microrganismos são: afetam a síntese dos peptídeoglicanos da parede celular, causando lise e morte; danificam a membrana citoplasmática, afetando o seu funcionamento e causando o extravasamento de conteúdo intracelular; afetam, por diferentes mecanismos, a síntese de ácidos nucleicos e/ou de ácido fólico, impedindo sua replicação; e podem afetar a função ribossomal e assim a síntese proteica (APPELBAUM; JACOBS, 2005; BURT, 2004). *P. aeruginosa* é comumente encontrada em infecções hospitalares e *S. aureus* está relacionada,

por exemplo, a folicolite, endocardite e pneumonia. Ambas as bactérias, juntamente com *Klebsiella pneumonia*, são as mais encontradas em feridas. A significativa atividade antibacteriana (CIM) da fração butanólica frente a *P. aeruginosa* e da fração hexânica frente a *S. aureus* abrem novas perspectivas de estudos relacionados ao tratamento de feridas em pacientes diabéticos e infecções hospitalares (MAHADY et al., 2008; SADER et al., 1993). Além disso, a atividade cicatrizante e antidiabética de *B. pinnatum* já foram relatadas cientificamente (NAYAK; MARSHALL; ISITOR, 2010; OJEWOLE, 2005).

Os modelos de inflamação *in vivo*, como edema de orelha induzido por agentes flogísticos, têm sido utilizados frequentemente nos estudos de atividade anti-inflamatória tópica de produtos naturais e sintéticos (WILLOUGHBY, 2003). Esses modelos são ferramentas de pesquisa bastante simples e rápida, requerem pequena quantidade de amostra, apresentam boa reprodutibilidade, fornecem resultados rápidos e com elevado grau de confiança, além de identificar produtos com capacidade de penetrar na pele e atingir concentrações adequadas para exercer o efeito farmacológico (GÁBOR, 2003). *B. pinnatum* é utilizada popularmente no tratamento tópico de inflamações e feridas (LORENZI; MATOS, 2008), e apesar da atividade anti-inflamatória já ter sido relatada na literatura (OJEWOLE, 2005), ainda não havia sido avaliada sua ação tópica pelo modelo do edema de orelha. Diferentemente das outras avaliações de atividade biológica realizadas (antioxidante e antibacteriana), em que se avaliou o efeito do extrato etanólico e das frações, na avaliação da atividade anti-inflamatória tópica por edema de orelha foi avaliado somente o extrato etanólico, pois houve tempo e animais suficientes para avaliar somente uma amostra. O etanol é um solvente extrator universal, tornando o extrato etanólico uma boa opção para o teste, devido à diversidade de substâncias presentes, especialmente heterosídeos, o que permite sinergismos.

O óleo de cróton é um agente flogístico constituído por uma mistura de lipídeos, sendo o 13-acetato de 12-*O*-tetradecanoilforbol (TPA) um dos principais componentes. A aplicação tópica desse agente está associada à resposta inflamatória (vasodilatação, infiltração de leucócitos e edema), estresse oxidativo, proliferação e ativação de oncogenes nucleares. Esse modelo é útil na triagem de substâncias que atuam na fase aguda da inflamação e processos inflamatórios hiperproliferativos (GARG et al., 2008; SARAIVA et al., 2011). O mecanismo de sinalização pelo qual o TPA exerce seu efeito é decorrente da ativação da proteína quinase C (PKC), da ativação seqüencial da via das proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAP quinase), fosfolipase A₂ (PLA₂), indução da expressão da ciclooxigenase 2 (COX-2) e translocação/ativação da lipoxigenase (LOX), que por sua vez culminam na síntese e

liberação de diversos mediadores pró-inflamatórios responsáveis pela formação de edema, migração de leucócitos para a derme e hiperproliferação celular, sendo estas as características da resposta inflamatória induzida pela aplicação tópica do TPA (MURAKAWA et al., 2006; DE BERNARDIS et al., 1994). A ativação da via da MAPK pela PKC, promove a estimulação de alguns fatores de transcrição nuclear, como o NF- κ B e a AP-1, os quais têm um papel central na regulação da produção de diversas proteínas pró-inflamatórias, tais como algumas citocinas (IL-1, IL-2, IL-6, IL-8, TNF- α), enzimas pró-inflamatórias (COX-2, iNOS) e moléculas de adesão (PASCUAL; GLASS, 2006; GLASS; OGAWA, 2006; GARCIA-PIÑERES et al., 2001; SANCHEZ; MORENO, 1999). Enquanto a fosforilação da PLA₂ pela PKC resulta na liberação do ácido araquidônico (AA) seguida da produção de prostaglandinas (PG) e leucotrienos (LT) via COX e LOX, respectivamente (YOUNG et al., 1984). Além disso, entre os diversos mediadores que podem induzir a permeabilidade vascular, destacam-se o óxido nítrico (NO) e a PGE₂ que, comumente estão envolvidos na patogênese de várias doenças associadas à inflamação (GUSLANDI, 1998; RITCHLIN et al., 2003). Dessa forma, as vias do TNF- α -NO e COX-2-PGE₂ têm sido consideradas com as principais rotas de processos inflamatórios, as quais são bloqueadas, por exemplo, pelos corticosteroides (ROMANO et al., 1997; WALLACE; CHAPMAN; MCKNIGHT, 1999).

Os resultados no modelo de edema de orelha induzido por óleo de cróton mostraram que, na resposta inflamatória aguda, o extrato etanólico foi capaz de inibir o edema (Tabela 20), promovendo resposta semelhante à da dexametasona (corticosteroide). Provavelmente essa ação antiedematogênica do extrato se deve à redução da permeabilidade vascular, pois através da análise histológica (Figura 35) observou-se que, quando comparado ao controle, o extrato diminuiu a vasodilatação e conseqüentemente a infiltração de leucócitos polimorfonucleares, em sua maioria neutrófilos por se tratar de um processo inflamatório agudo (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2008; CHRISTY et al., 2013; GEERING et al., 2013). Metabólitos especiais com atividade anti-inflamatória já foram isolados e identificados em *B. pinnatum* (AFZAL et al., 2012), dentre eles destaca-se a α -amirina, um triterpeno pentacíclico, cuja aplicação tópica apresentou efeito dose-dependente na redução do edema induzido por TPA em ratos. A α -amirina foi capaz de diminuir a expressão de COX-2, reduzindo os níveis de PGE₂ e diminuiu a atividade de fatores de transcrição nuclear (p.ex.: NF- κ B), diminuindo a síntese de proteínas pró-inflamatórias, como IL-1 β (MEDEIROS et al., 2007; SIDDIQUI et al., 1989). Além disso, considerando o estresse oxidativo induzido pelo óleo de cróton, a presença de flavonoides com atividades antioxidante e anti-inflamatória em *B. pinnatum*, como quercetina, canferol, luteolina e rutina, podem justificar o efeito anti-

inflamatório tópico por inibição das vias do TNF- α -NO e COX-II-PGE2 (GOKBULUT et al., 2013; GARCÍA-MEDIAVILLA et al., 2007; MUZITANO et al., 2006; MAJAZ et al., 2011; BALAMURUGAN; KARTHIKEYAN, 2012; LEE et al., 2013).

O ácido araquidônico (AA), nas células, origina-se dos fosfolipídeos de membrana por ação da PLA₂. Ao ser metabolizado pelas enzimas COX e LOX, o AA origina mediadores da inflamação como PG e LT, respectivamente, promovendo a formação do edema. Este agente flogístico, quando aplicado topicamente, gera uma resposta inflamatória rápida caracterizada por intenso eritema e edema com pequeno acúmulo de neutrófilos (CRUMMEY et al., 1987; HUMES, OPAS, BONNEY, 1986; YOUNG et al., 1984), sendo utilizado para identificar substâncias que interferem no seu metabolismo, principalmente aquelas que inibem a LOX (RECIO et al., 2000; CRUMMEY et al., 1987; YOUNG et al., 1984). Os antiinflamatórios não esteroides (AINE) inibem a via da COX, impedindo, portanto a síntese das prostaglandinas (BROOKS; DAY, 1991). Assim, o fármaco de referência (controle positivo) utilizado neste modelo foi a indometacina, um AINE inibidor não seletivo das isoformas da COX (COX-1 e COX-2) e que reverte efetivamente o edema induzido pela aplicação tópica do AA (GÁBOR, 2000). Da mesma forma que a indometacina, o extrato etanólico das folhas de *B. pinnatum* se mostrou efetivo na inibição da formação do edema neste modelo (Tabela 21). Estudos comprovam que flavonoides identificados no extrato etanólico de *B. pinnatum*, bem como a α -amirina, possam contribuir para a ação anti-inflamatória pela inibição da via do AA (COUTINHO; MUZITANO; COSTA, 2009; GARCÍA-MEDIAVILLA et al., 2007; LEE et al., 2013).

A atividade anti-inflamatória do extrato etanólico de *B. pinnatum* foi também avaliada através do modelo de inflamação cutânea aguda induzida pelo fenol, cuja aplicação produz edema em 2h e mimetiza a dermatite de contato que ocorre em humanos (LIM; PARK; KIM, 2004). Diversos mecanismos estão envolvidos na inflamação causada pelo fenol, sendo decorrentes principalmente da sua ação sobre os queratinócitos, que promove a liberação de mediadores pró-inflamatórios, tais como IL-1 α , TNF- α e IL-8, metabólitos do AA e espécies reativas de oxigênio (ERO) (MURRAY et al., 2007; WILMER et al., 1994). Além disso, o fenol pode ser oxidado por peroxidases e tirosinases, gerando radicais fenoxila que irão aumentar a produção e liberação de mediadores pró-inflamatórios (LIM; PARK; KIM, 2004; MURRAY et al., 2007). Ao inibir o edema, semelhantemente à dexametasona, o extrato etanólico demonstrou uma possível eficácia no tratamento da dermatite de contato e aparentemente, sua ação anti-inflamatória não se restringe a um único mecanismo, pois foi ativo tanto no modelo de edema induzido pelo fenol como por óleo de cróton e AA. Nesses

três modelos a resposta inflamatória está relacionada com metabólitos do AA e ERO, porém os mecanismos pelos quais as citocinas pró-inflamatórias são induzidas são diferentes (WILMER et al., 1994). Em virtude do envolvimento de radicais livres no processo inflamatório induzido pelo fenol, mais uma vez é provável o envolvimento de flavonoides e outros metabólitos com atividade antioxidante e anti-inflamatória já identificados na espécie (GOKBULUT et al., 2013).

A capsaicina (8-metil-N-vanilil-6-nonenemida), um alcaloide encontrado em espécies de pimenta do gênero *Capsicum*, quando aplicada topicamente promove uma resposta inflamatória neurogênica com pico máximo de formação de edema atingido 30 minutos após sua aplicação (GÁBOR, 2000; KWAK et al., 1998). Atua como agonista dos receptores vaniloides de potencial de receptor transitório (TRPV1). A ativação desses receptores ionotrópicos promove a propagação do estímulo nociceptivo através dos neurônios sensoriais de pequeno diâmetro (fibras C), induzindo assim a liberação de neuropeptídeos, como substância P (SP) e peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP), que por sua vez geram a inflamação através da liberação de mediadores neurogênicos como bradicinina, serotonina, histamina e PGs, que promovem vasodilatação arteriolar, aumento do fluxo sanguíneo e eritema como resposta imediata (RANG et al., 2007; SZOLCSÁNYI, 2004; ZEGARSKA et al., 2006). O extrato etanólico de *B. pinnatum* inibiu a formação do edema (Tabela 23), sugerindo que substâncias presentes nesse extrato podem bloquear os receptores TRPV1, o que impediria a propagação de estímulos pelos neurônios sensoriais nociceptivos. Essa hipótese mecanística é corroborada por Oliveira e outros (2005), que descrevem que a mistura de α - e β -amirina possui efeito analgésico em modelo de nocicepção induzida por capsaicina em camundongos, possivelmente envolvendo os receptores TRPV1 e um mecanismo opióide. No entanto, o edema induzido pela capsaicina também pode ser inibido por antagonistas da histamina e serotonina, ampliando as possibilidades de mecanismos de ação nesse modelo. Independente de qual seja o mecanismo envolvido, a ação anti-inflamatória de *B. pinnatum* sobre a resposta inflamatória neurogênica induzida por capsaicina resulta consequentemente em ação antinociceptiva, convergindo com dados da literatura (OJEWOLE, 2005). Os inibidores da COX (p.ex.: indometacina) não são eficazes no processo inflamatório neurogênico, tendo sido utilizado como controle positivo a dexametasona (anti-inflamatório esteroide), que assim como o extrato etanólico promoveu a redução do edema tanto no modelo da capsaicina, quanto no modelo do óleo de cróton e do AA (GÁBOR, 2000).

Etil-fenil-propiolato (EPP) é um éster que promove a liberação de mediadores pró-inflamatórios como citocinas, serotonina e PGs, causando aumento da permeabilidade vascular e do fluxo sanguíneo, e infiltração de leucócitos (KALE et al., 2007). Ao inibir o edema induzido por EPP (Tabela 24), o extrato etanólico de *B. pinnatum* provavelmente inibiu a liberação e/ou a produção de citocinas e mediadores inflamatórios, reduzindo assim a permeabilidade vascular, impedindo a migração leucocitária e a passagem do plasma (OJEWOLE, 2005). Como fármaco anti-inflamatório esteroide, a dexametasona, controle positivo utilizado, age em receptores nucleares, estimula a expressão de proteínas anti-inflamatórias, como a lipocortina que inibe a PLA₂ e, conseqüentemente, a produção de PGs. Além disso, inibe a síntese de COX, potencializando o efeito. Constituintes do extrato etanólico, principalmente os flavonoídicos, exercem mecanismo de ação parecido com a dexametasona (COUTINHO; MUZITANO; COSTA, 2009).

O óleo de cróton, assim como outros agentes flogísticos, promove vasodilatação, induz a expressão da COX-2, IL-1 β , TNF- α e molécula intracelular de adesão (ICAM-1) e aumenta a síntese de metabólitos do ácido araquidônico, como prostaglandinas e leucotrienos (CHI et al, 2003; DE YOUNG et al., 1989). Quando aplicado de forma múltipla, o óleo de cróton produz uma reação inflamatória persistente (crônica) acompanhada do aumento do tamanho e da massa das orelhas (edema), hiperproliferação epidérmica (espessamento da epiderme/acantose) e migração leucocitária (STANLEY et al., 1991). As primeiras células que migram através do endotélio para o local infectado são neutrófilos (entre 4-12 h) e posteriormente monócitos (entre 24-48 h). Os monócitos, ao serem ativados tornam-se macrófagos, que além de exercerem sua ação como células fagocíticas, participam na ativação dos linfonodos e assim, na proliferação de linfócitos T (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2008). Esse modelo de inflamação crônica reproduz bem doenças inflamatórias crônicas da pele e o tratamento utilizado se assemelha aos tratamentos clínicos com produtos anti-inflamatórios, principalmente esteroides (corticoides) ou inibidores da LOX (GREEN; SHUSTER, 1987; STANLEY et al., 1991). Os resultados demonstram que, assim como a dexametasona, o extrato etanólico das folhas de *B. pinnatum* reduziu o edema, sendo eficaz na supressão do processo inflamatório já instalado.

Em virtude dos resultados positivos nos diferentes modelos de edema de orelha e da complexidade química dos derivados vegetais, não se pode afirmar que a ação anti-inflamatória de *B. pinnatum* se dê por um único mecanismo de ação. Entretanto, devido às respostas apresentadas nos modelos de edema induzido por óleo de cróton (agudo e crônico), ácido araquidônico e fenol, modelos que têm em comum a via do AA, pode-se sugerir que um

desses mecanismos esteja relacionado com a inibição dessa via, reduzindo seus metabólitos no local e assim os efeitos mediados por eles, principalmente edema, vasodilatação e infiltração de leucócitos. Além disso, a presença de derivados flavonoídicos, como flavonóis (quercetina e canferol) e flavonas (apigenina, e luteolina), os quais exercem efeito anti-inflamatório por meio de inibição da PLA₂, COX, LOX e iNOS, fortalece essa hipótese mecanística (COUTINHO; MUZITANO; COSTA, 2009). Assim como os flavonoides, vários outros metabólitos com atividade anti-inflamatória já foram detectados em *B. pinnatum*, fundamentando os bons resultados obtidos nos experimentos realizados. Além da α -amirina, citada anteriormente, seu isômero β -amirina e a mistura dos dois triterpenos também possuem ação anti-inflamatória. Simão da Silva e outros (2011) relatam que α - e β -amirina inibiram a produção de citocinas e a expressão de NF- κ B e COX-2. Nos modelos de edema induzido por fenol, capsaicina e EPP, observa-se que o EE de *B. pinnatum* apresentou a menor porcentagem de inibição do edema na maior concentração (1,0 mg/orelha), o que é notável mesmo existindo a hipótese do extrato agir de maneira não dependente da dose (concentração). Isso pode estar acontecendo devido a uma ação citotóxica do extrato. Yamagishi e outros (1988, 1989) relataram a presença em *B. pinnatum* de bufadienólídeos (briofilina A e B), glicosídeos esteroidais (cardiotônicos) com potente atividade citotóxica. Supratman e outros (2000) identificaram outro bufadienólídeo na espécie, a briofilina C, que possui ação inseticida. Mahata e outros (2012) avaliaram e confirmaram a atividade anticancerígena de *B. pinnatum*, porém mais estudos abordando a atividade citotóxica da espécie frente a diferentes linhagens celulares são necessários para confirmar ou não esta hipótese.

A confirmação do potencial antioxidante, antibacteriano e anti-inflamatório tópico em derivados vegetais das folhas de *B. pinnatum*, juntamente com a presença de metabólitos especiais com estas bioatividades, sustentam cientificamente o seu uso popular no tratamento de inflamações e infecções. Complementarmente, sustentam o seu uso como cicatrizante no tratamento de feridas, queimaduras e ulcerações uma vez que, em ferimentos geralmente ocorre processo inflamatório, em menor ou maior escala, o que envolve a formação de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio pela atividade aeróbica das células fagocitárias ou mesmo de células não fagocitárias, pelo mecanismo das oxidases dependentes de NADH/NADPH. A presença desses radicais livres causa estresse oxidativo, com peroxidação de lipídeos, danos ao DNA e inativação de enzimas (KUMAR et al., 2007; NAYAK; MARSHALL; ISITOR, 2010; OKWU; JOSIAH, 2006). Diferentes microrganismos, encontrados em feridas e furúnculos, como *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*

e *Staphylococcus aureus*, podem exacerbar o processo inflamatório e conseqüentemente o dano tecidual. A presença de agentes antimicrobianos em *B. pinnatum* corrobora com a ação cicatrizante, pois ao inibir patógenos de feridas, elimina-se a infecção e permite a proliferação celular (OKWU; NNAMDI, 2011a, 2011b). Além das substâncias antioxidantes, antibacterianas e anti-inflamatórias já identificadas na espécie, outras podem contribuir sinergicamente para a atividade cicatrizante. As saponinas, presentes majoritariamente em *B. pinnatum*, possuem caráter anfifílico e formam complexos com proteínas, conferindo a elas a capacidade de precipitar e coagular as células sanguíneas vermelhas, auxiliando a cessar o sangramento. Taninos condensados e taninos hidrolisáveis também formam complexos com proteínas, potencializam a cura de feridas, queimaduras e mucosas inflamadas, formam uma proteção sobre o local e permitem que o processo de cura proceda naturalmente. O cálcio, macroelemento mais abundante na espécie, é essencial no processo de coagulação, de acordo com sua concentração extracelular (OKWU; JOSIAH, 2006; SANTOS; MELLO, 2003; SCHENKEL et al., 2003; SIMÕES; SPITZER, 2003).

7 CONCLUSÕES

Considerando os resultados apresentados nesta dissertação, foi possível obter as seguintes conclusões:

Os flavonoides bioativos rutina, canferol, quercetina, apigenina 7-*O*- β -D-glicosídeo e luteolina 7-*O*- β -D-glicosídeo foram identificados nas frações de *B. pinnatum* por CLAE-UV.

β -amirina foi o constituinte majoritário da fração hexânica detectado por CG-EM.

O extrato etanólico e frações das folhas de *B. pinnatum* apresentaram teores expressivos de fenóis e flavonoides totais, destacando-se a fração em acetato de etila.

O extrato etanólico e as frações das folhas de *B. pinnatum* apresentaram atividade antioxidante através de sequestro de radicais livres (ensaio com radical DPPH e bioautografia), poder de redução de íons metálicos (ensaio de FRAP) e inibição da peroxidação lipídica (ensaio de cooxidação do β -caroteno/ácido linoléico).

O extrato e as frações das folhas de *B. pinnatum* inibiram o crescimento bacteriano, produzindo atividade bactericida e bacteriostática.

O extrato etanólico das folhas de *B. pinnatum* apresentou atividade anti-inflamatória tópica em modelos agudos e crônico de edema de orelha utilizando diferentes agentes flogísticos.

Os resultados do presente estudo indicam que as folhas de *Bryophyllum pinnatum*, espécie integrante da RENISUS, são fontes de substâncias ativas com atividades antioxidante, antibacteriana e anti-inflamatória tópica, justificando o uso tradicional da “folha-da-fortuna” e evidenciando a espécie como potencial alvo para o desenvolvimento de formulações fitoterápicas, para a obtenção de fitofármacos e/ou semi-síntese de novos fármacos, gerando assim novas possibilidades terapêuticas para a população.

REFERÊNCIAS

- ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. **Imunologia celular e molecular**. 6.ed. Elsevier, 2008, 576 p.
- ABRÃO, R. **As ervas e a saúde** – A farmácia no cerrado. Ed. de autor. Campo Grande, MS: Produtora M, 2010, 303 p.
- AFZAL, M.; GUPTA, G.; KAZMI, I.; RAHMAN, M.; AFZAL, O.; ALAM, J.; HAKEEM, K. R.; PRAVEZ, M.; GUPTA, R.; ANWAR, F. Anti-inflammatory and analgesic potential of a novel steroidal derivative from *Bryophyllum pinnatum*. **Fitoterapia**, v. 83, p. 853-858, 2012.
- AKINPELU, D. A. Antimicrobial activity of *Bryophyllum pinnatum* leaves. **Fitoterapia**, v. 71, p. 193-194, 2000.
- AKINSULIRE, O. R.; AIBINU, I. E.; ADENIPEKUN, T.; ADELOWOTAN, T.; ODUGBEMI, T. *In vitro* antimicrobial activity of crude extracts from plants *Bryophyllum pinnatum* and *Kalanchoe crenata*. **African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines**, v. 4, n. 3, p. 338-344, 2007.
- ALBUQUERQUE, U. P.; HANAZAKI, N. As pesquisas etnodirigidas na descoberta de novos fármacos de interesse médico e farmacêutico: fragilidades e perspectivas. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16, p. 678-689, 2006.
- ALI, H.; HARIBABU, B.; RICHARDSON, R. M.; SNYDERMAN, R. Mechanisms of inflammation and leukocyte activation. **Advances in Rheumatology**, v. 81, n.1, p. 1-28, 1997.
- ALIYU, A. B.; MUSA, A. M.; ABDULLAHI, M. S.; IBRAHIM, M. A.; TIJJANI, M. B.; ALIYU, M. S.; OYEWALE, A. O. Activity of saponin fraction of *Anisopus mannii* against some pathogenic microorganisms. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 5, n. 31, p. 6709-6713, 2011.
- ALLEN JR, L. V.; POPOVICH, N. G.; ANSEL, H. C. **Formas farmacêuticas e sistemas de liberação de fármacos**. 8ª ed. Porto Alegre: Artmed, 2007, 776 p.
- ALMEIDA, A. P.; MUZITANO, M. F.; COSTA, S. S.; 1-Octen-3-O- α -L-arabinopyranosyl-(1 \rightarrow 6)- β -glucopyranoside, a minor substance from the leaves of *Kalanchoe pinnata*(Crassulaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16, n. 4, p. 485-489, 2006.
- ALVES, C. Q.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P.; BAHIA, M. V.; AGUIAR, R. M. Métodos para determinação de atividade antioxidante *in vitro* em substratos orgânicos. **Química Nova**, v. 33, n. 10, p. 2202-2210, 2010.
- AMABEOKU, G. J.; GREEN, I.; KABATENDE, J. Anticonvulsivant activity of *Cotyledon orbiculata* L. (Crassulaceae) leaf extract in mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 112, p. 101-107, 2007.

ANISIMOV, M. M.; GERASIMENKO, N. I.; CHAIKINA, E. L.; SEREBRYAKOV, Y. M. Biological Activity of Metabolites of the Herb *Kalanchoe diargremontania* (Hamet de la Bathie) Jacobs et Perr. **Plant Physiology**, v. 36, n. 6, p. 568-574, 2009.

APPELBAUM, P. C.; JACOBS, M. R. Recently approved and investigational antibiotics for treatment of severe infections caused by Gram-positive bacteria. **Current Opinion in Microbiology**, v. 8, p. 510-517, 2005.

ARAÚJO, P. W. B. D.; JÚNIOR, L. J. Q.; VASCONCELOS, H. D. D.; ALMEIDA, J. R. G. D. S. Flavonoides e hipertensão. **Revista Brasileira de Hipertensão**, v. 12, n. 3, p. 188-189, 2005.

ARNAO, M. B. Some methodological problems in the determination of antioxidant activity using chromogen radicals: a practical case. **Trends in Food Science & Technology**, v. 11, p. 419-421, 2000.

ARON, P. M.; KENNEDY, J. A. Flavan-3-ols: Nature, occurrence and biological activity. **Molecular Nutrition & Food Research**, v. 52, p. 79-104, 2008.

AZMIR, J.; ZAIDUL, I. S. M.; RAHMAN, M. M.; SHARIF, K. M.; MOHAMED, A.; SAHENA, F.; JAHURUL, M. H. A.; GHAFOR, K.; NORULAINI, N. A. N.; OMAR, A. K. M. Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review. **Journal of Food Engineering**, v. 117, n. 4, p. 426-436, 2013.

BALAMURUGAN, K.; KARTHIKEYAN, J. Evaluation of the antioxidant and anti-inflammatory nature of luteolin in experimentally induced hepatocellular carcinoma. **Biomedicine & Preventive Nutrition**, v. 2, p. 86-90, 2012.

BANGERT, C.; BRUNNER, P. M.; STINGL, G. Immune functions of the skin. **Clinics in Dermatology**, v. 29, p. 360-376, 2011.

BARREIROS, A. L. B. S.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Química Nova**, v. 29, n. 1, p. 113-123, 2006.

BHATTARAM, V. A.; GRAEFE, U.; KOHLERT, C.; VEIT, M.; DERENDORF, H. Pharmacokinetics and Bioavailability of herbal Medicinal products. **Phytomedicine**, v. 9, p. 1-33, 2002.

BISWAS, S. K.; CHOWDHURY, A.; DAS, J.; HOSEN, S. M. Z.; UDDIN, R.; RAHAMAN, M. S. Literature review on pharmacological potentials of *Kalanchoe pinnata* (Crassulaceae). **African Journal of pharmacy and pharmacology**, v. 5, n. 10, p. 1258-1262, 2011.

BONATI, A. How and why should we standardize phytopharmaceutical drugs for clinical validation?. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 32, p. 195-197, 1991.

BONOLI, M.; VERARDO, V.; MARCONI, E.; CABONI, M. F. Antioxidant phenols in Barley (*Hordeum vulgare* L.) flour: Comparative spectrophotometric study among extraction methods of free and bound phenolic compounds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, p. 5195-5200, 2004.

BRADLEY, P.P.; PRIEBAT, D.A.; CHRISTENSEN, R.D.; ROTHSTEIN, G. Measurement of cutaneous inflammation: estimation of neutrophil content with an enzyme marker. **Journal Investigative of Dermatology**. v. 78, p. 206-209, 1982.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Farmacopéia Brasileira**, 5ª Ed., volume 1 e 2 / Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brasília: Anvisa, 2010.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Formulário de Fitoterápicos da Farmacopéia Brasileira** / Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brasília: Anvisa, 2011.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Políticas de Saúde. **Proposta de política Nacional de Plantas Medicinais e Medicamentos Fitoterápicos** / Ministério da Saúde. 1ª ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2001.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento de Assistência Farmacêutica. **Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos** / Ministério da Saúde, Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos, Departamento de Assistência Farmacêutica. Brasília: Ministério da Saúde, 2006a.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. **Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares no SUS – PNPIC-SUS** / Ministério da Saúde, Secretaria de Atenção à Saúde, Departamento de Atenção Básica. Brasília: Ministério da Saúde, 2006b.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento de Assistência Farmacêutica. **A Fitoterapia no SUS e o Programa de Pesquisas de Plantas Medicinais da Central de Medicamentos**/ Ministério da Saúde, Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos, Departamento de Assistência Farmacêutica. Brasília: Ministério da Saúde, 2006c.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **RDC n.º. 48, de 16 de março de 2004** – dispõe sobre o registro de fitoterápicos / Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brasília: Anvisa, 2004.

BROOKS, P. M.; DAY, R. O. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs-differences and similarities. **New England Journal of Medicine**, v. 324 (24), p. 1716-1725, 1991.

BUER, S. C.; IMIN, N.; DJORDJEVIC, M. A. Flavonoids: new roles for old molecules. **Journal of Integrative Plant Biology**, v. 52, v. 1, p. 98-111, 2010.

BUMANN, D. Pathogen proteomes during infection: A basis for infection research and novel control strategies. **Journal of proteomics**, v. 73, p. 2267-2276, 2010.

BURT, S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods – a review. **International Journal of Food Microbiology**, v. 94, p. 223-253, 2004.

BUTLER, M. S.; BUSS, A. D. Natural products – The future scaffolds for novel antibiotics?. **Biochemical Pharmacology**, v. 71, p. 919-929, 2006.

BYEON, S. E.; CHUNG, J. Y.; LEE, Y. G.; KIM, B. H.; KIM, K. H.; CHO, J. Y. *In vitro* and *in vivo* anti-inflammatory effects of taheebo, a water extract from inner bark of *Tabebuia avellanedae*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 119, p. 145-152, 2008.

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

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

CAO, G. A.; SOFIC, E.; PRIOR, R. L. Antioxidant and prooxidant behavior of flavonoids: structure-activity relationships. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 22, n. 5, p. 749-760, 1997.

CAPELARI-OLIVEIRA, P.; PAULA, C. A.; REZENDE, S. A.; CAMPOS, F. T.; GRABE-GUIMARÃES, A.; LOMBARDI, J. A.; SAÚDE-GUIMARÃES, D. A. Anti-inflammatory activity of *Lychnophora passerina*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 135, p. 393-398, 2011.

CAROCHO, M.; FERREIRA, I. C. F. R. A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: Natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. **Food and Chemical Toxicology**, v. 51, p. 15-25, 2013.

CESCA, T. G.; FAQUETI, L. G.; ROCHA, L. W.; MEIRA, N. A.; MEYRE-SILVA, C.; de SOUZA, M. M.; QUINTÃO, N. L. M.; SILVA, R. M. L.; CHECHINEL FILHO, V.; BRESOLIN, T. M. B. Antinociceptive, anti-inflammatory and wound healing features in animal models treated with a semisolid herbal medicine based on *Aleurites moluccana* L. Willd. Euforbiaceae standardized leaf extract semisolid herbal. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 143, p. 355-362, 2012.

CHI, Y. S.; LIM, H.; PARK, H.; KIM, H. P. Effects of wogonin, plant flavone from *Scutellaria radix*, on skin inflammation: *in vivo* regulation of inflammation-associated gene expression. **Biochemical Pharmacology**, v. 66, p. 1271-1278, 2003.

CHRISTY, A. L.; WALKER, M. E.; HESSNER, M. J.; BROWN, M. A. Mast cell activation and neutrophil recruitment promotes early and robust inflammation in the meninges in EAE. **Journal of Autoimmunity**, v. 42, p. 50-61, 2013.

CHOI, E. M. Protective effect of quercitrin against hydrogen peroxide-induced dysfunction in osteoblastic MC3T3-E1 cells. **Experimental and Toxicologic Pathology**, v. 64, p. 211-216, 2012.

CHOUHAN, H. S.; SINGH, S. K. Phytochemical analysis, antioxidant and anti-inflammatory activities of *Phyllanthus simplex*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 137, p. 1337-1344, 2011.

CHUNG, Y. C.; CHANG, C. T.; CHAO, W. W.; LIN, C. F.; CHOU, S. T. Antioxidative activity and safety of the 50% ethanolic extract from red bean fermented by *Bacillus subtilis* IMR-NK1. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, n. 50, p. 2454-2458, 2002.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). **Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests**. Approved Standard-10th ed. M02-A10. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA. 2009a.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). **Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacterial that grow aerobically**. Approved standard-8th ed., M07-A8. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA. 2009b.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). **Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing**. Twenty-Second Information Supplement. M100-S22. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA. 2012.

COLEGATE, S. M.; MOLYNEUX, R. J. **Bioactive natural products: detection, isolation, and structural determination**. 2nd ed. CRC Press. Boca Raton, USA. 2007. 622p.

COELHO DE SOUZA, G. C.; HAAS, A. P. S.; VON POSER, G. L.; SCHAPOVAL, E. E. S.; ELISABETSKY, E. Ethnopharmacological studies of antimicrobial remedies in the South of Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 90, p. 135-143, 2004.

CORREIA, R. T. P.; BORGES, K. C.; MEDEIROS, M. F.; GENOVESE, M. I. Bioactive compounds and phenolic-linked functionality of powdered tropical fruit residues. **Food Science and Technology International**, v. 18, n. 6, p. 538-574, 2013.

COTTIGLIA, F.; LOY, G.; GARAU, D.; FLORIS, C.; CASU, M.; POMPEI, R.; BONSIGNORE, L. Antimicrobial evaluation of coumarins and flavonoids from stems of *Daphne gnidium* L. **Phytomedicine**, v. 4, n. 4, p. 302-305, 2001.

COUTINHO, M. A. S.; MUZITANO, M. F.; COSTA, S. S. Flavonoides: potenciais agentes terapêuticos para o processo inflamatório. **Revista Virtual de Química**, v. 1, n. 3, p. 241-256, 2009.

COWAN, M. M. Plant Products as antimicrobial agents. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 12, n. 4, p. 564-582, 1999.

CROTEAU, R.; KUTCHAN, T. M.; LEWIS, N. G. Natural Products (Secondary Metabolites). In: BUCHANAN, B.; GRUISSEM, W.; JONES, R. **Biochemistry & Molecular Biology of Plantas**. American Society of Plant Physiologists, 2000.

CRUMMEY, A.; HARPER, G.P.; BOYLE, E.A.; MANGAN, F.R. Inhibition of arachidonic acid-induced ear oedema as a model for assessing topical anti-inflammatory compounds. **Agents and Actions**, v. 20, p. 69-76, 1987.

CRUZ, B. P.; CHEDIER, L. M.; FABRI, R. L.; PIMENTA, D. S. Chemical and agronomic development of *Kalanchoe brasiliensis* Camb. and *Kalanchoe pinnata* (Lamk.) Pers under light and temperature levels. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 83, n. 4, p. 1434-1441, 2011.

CRUZ, E. A.; DA-SILVA, S. A. G.; MUZITANO, M. F.; SILVA, P. M. R.; COSTA, S.S.; ROSSI-BERGMANN, B. Immunomodulatory pretreatment with *Kalanchoe pinnata* extract

and its quercitrin flavonoid effectively protects mice against fatal anaphylactic shock. **International Immunopharmacology**, v. 8, p. 1616-1621, 2008.

CRUZ, E. A.; REUTER, S.; MARTIN, H.; DEHZAD, N.; MUZITANO, M. F.; COSTA, S. S.; ROSSI-BERGMANN, B.; BUHL, R.; STASSEN, M.; TAUBE, C. *Kalanchoe pinnata* inhibits mast cell activation and prevents allergic airway disease. **Phytomedicine**, v. 19, p. 115-121, 2012.

CUSHMAN, J. H.; BOHNERT, H. J. Molecular genetics of crassulacean acid metabolism. **Plant Physiology**, v. 113, p. 667-676, 1997.

DA CRUZ, G. M. P.; FELIPE, C. F. B.; SCORZA, F. A.; DA COSTA, M. A. C.; TAVARES, A. A.; MENEZES, M. L. F.; DE ANDRADE, G. M.; LEAL, L. K. A. M.; BRITO, G. A. C.; NAFFAH-MAZZACORATTI, M. D. G.; CAVALHEIRO, E. A.; VIANA, G. S. D. B. Piperine decreases pilocarpine-induced convulsions by GABAergic mechanisms. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v. 104, p. 144-153, 2013.

DAI, J.; MUMPER, R. J. Plant phenolics: extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. **Molecules**, v. 15, p. 7313-7352, 2010.

DATTNER, A. M. Herbal and complementary medicine in dermatology. **Dermatologic Clinics**, v. 22, p. 325-332, 2004.

DEBENEDICTIS, C.; JOUBEH, S.; ZHANG, G.; BARRIA, M.; GHOHESTANI, R. F. Immune functions of the skin. **Clinics in Dermatology**, v. 19, p. 573-585, 2001.

DE BERNARDIS, L.; LEONARDI, G.; CARUSO, A.; CUTULI, V.M; ARNICO-ROXAS, M. Protective effects of papavarine salicylate in mouse ear dermatitis and PAF-induced rat paw oedema. **Agents and Actions**, v. 42, p.29-33, 1994.

DEWICK, P. M. **Medicinal natural products** – A biosynthetic approach. 3^a ed. University of Nottingham, UK: Wiley, 2009, 539p.

DE YOUNG, L.M.; KHEIFETS, J.B.; BALLARON, S.J.; YOUNG, J.M. Edema and cell infiltration in the phorbol ester-treated mouse ear are temporally separate and can be differentially modulated by pharmacologic agents. **Agents & Actions**, v. 26, p. 335-341, 1989.

DIAS, M. O.; HAMERSKI, L.; PINTO, A. C. Separação semipreparativa de α e β -amirina por cromatografia líquida de alta eficiência. **Química Nova**, v. 34, n. 4, p. 704-706, 2011.

DRÖGE, W. Free radicals in the physiological control of cell function. **Physiological Reviews**, v. 82, p. 47-95, 2002.

DUARTE, M. C. T.; FIGUEIRA, G. M.; SARTORATTO, A.; REHDER, V. L. G.; DELARMELINA, C. Anti-*Candida* activity of Brazilian medicinal plants. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 97, p. 305-311, 2005.

DUARTE-ALMEIDA, J. M.; SANTOS, R. J.; GENOVESE, M. I; LAJOLO, F. M. Avaliação da atividade antioxidante utilizando o sistema β -caroteno/ácido linoleico e método de

sequestro de radicais DPPH. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 26, n. 2, p. 446-452, 2006.

EL ABDELLAOUI, S.; DESTANDAU, E.; TORIBIO, A.; ELFAKIR, C.; LAFOSSE, M.; RENIMEL, I.; ANDRÉ, P.; CANCELLIERI, P.; LANDEMARRE, L. Bioactive molecules in *Kalanchoe pinnata* leaves: extraction, purification, and identification. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 398, p. 1329-1338, 2010.

EL-SEEDI, H. R.; OHARA, T.; SATA, N.; NISHIYAMA, S. Antimicrobial diterpenoids from *Eupatorium glutinosum* (Asteraceae). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 81, p. 293-296, 2002.

ERDEMOGLU, N.; TURAN, N. N.; AKKOL, E. K.; SENER, B.; ABACIOGLU, N. Estimation of anti-inflammatory, antinociceptive and antioxidante activities on *Arctium minus* (Hill) Bernh. Ssp. *Minus*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 121, p. 318-323, 2009.

FALKENBERG, M. B.; SANTOS, R. I.; SIMÕES, C. M. O. Introdução à análise fitoquímica. In: SIMÕES, C.M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMAN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5ªed. rev. ampl. Porto Alegre / Florianópolis: Editora da UFRGS / Editora da UFSC, 2003, p. 466-496.

FELTROW, C. W.; AVILA, J. R. **Manual de Medicina Alternativa para o profissional**. Rio de Janeiro, RJ: Guanabara Koogan S. A., 2000, 743p.

FERNANDES, C. P. **Estudo fitoquímico e biológico da espécie vegetal *Manilkara subsericea* (Mart.) Dubard**. 2011. Dissertação de Mestrado – Universidade Federal Fluminense, Niterói, RJ, 2011.

FERNANDES, A. J. D., FERREIRA, M. R. A., RANDAU, K. P., SOUZA, T. P., SOARES, L. A. L. Total Flavonoids Content in the Raw Material and Aqueous Extractives from *Bauhinia monandra* Kurz (Caesalpiniaceae). **The Scientific World Journal**, p. 1-7, 2012.

FERREIRA, O.; PINHO, S. P. Solubility of flavonoids in pure solvents. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v. 51, p. 6586-6590, 2012.

FERREIRA, S. H.; BARATA, L. E. S.; SALLES Fº, S. L. M.; DE QUEIROZ, S. R. R. **Medicamentos a partir de plantas medicinais no Brasil**. Academia Brasileira de Ciências, 1998.

FILHO, V. C.; YUNES, R. A. Estratégias para a obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais. Conceitos sobre modificação estrutural para otimização da atividade. **Química Nova**, v. 21, n. 1, p. 99-105, 1997.

FOLDVARI, M. Non-invasive administration of drugs through the skin: challenges in delivery system design. **Pharmaceutical Science Technology Today**, v. 3, n.20, p. 417-425, 2000.

FUCHS-TARLOVSKY, V. Role of antioxidants in cancer therapy. **Nutrition**, v. 29, p. 15-21, 2013.

GÁBOR, M. **Mouse Ear Inflammation Models and their Pharmacological Applications**. Budapest: Akadémiai Kiadó, 2000.

GÁBOR, M. Models of acute inflammation in the ear. In: WINYARD, P. G.; WILLOUGHBY, D. A. **Inflammation protocols**, New Jersey: Humana Press, p. 129-131, 2003.

GÁBOR, M.; RÁZGA, Z. Development and inhibition of mouse ear oedema induced with capsaicin. **Agents Actions**, v. 36, 1992, p. 83-86.

GARCÍA-MEDIAVILLA, V.; CRESPO, I.; COLLADO, P. S.; ESTELLER, A.; SÁNCHEZ-CAMPOS, S.; TUÑÓN, M. J.; GONZÁLEZ-GALLEGO, J. The anti-inflammatory flavones quercetin and kaempferol cause inhibition of inducible nitric oxide synthase, cyclooxygenase-2 and reactive C-protein, and down-regulation of the nuclear factor kappaB pathway in Chang Liver cells. **European Journal of Pharmacology**, v. 557, p. 221-229, 2007.

GARCIA-PIÑERES, A. J.; CASTRO, V.; MORAES, G.; SCHMIDT, T. J.; STRUNCK, E.; PAHL, H. L.; MERFORT, I. Cysteine 38 in p65/NF-KB plays a crucial role in DNA binding inhibition by sesquiterpene lactones. **Journal of Biological Chemistry**. v. 276, p. 39713-39720, 2001.

GARG, R.; RAMCHANDANI, A. G.; MARU, G. B. Curcumin decreases 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate induced protein kinase C translocation to modulate downstream targets in mouse skin. **Carcinogenesis**, v. 29, n. 6, p. 1249-1257, 2008.

GEERING, B.; STOECKLE, C.; CONUS, S.; SIMON, H. Living and dying for inflammation: neutrophils, eosinophils, basophils. **Cell Press**, p. 1-12, 2013.

GIESE, S. O. K. **Estudo da composição química dos óleos florais de *Byrsonima brachybotrya* (Malpighiaceae)**. 2005. Dissertação de Mestrado – Universidade Federal do Paraná, Paraná, PR, 2005.

GLASS, C. K.; OGAWA, S. Combinatorial roles of nuclear receptors in inflammation and immunity. **Nature Reviews in Immunology**, v. 6, p. 44-55, 2006.

GOBBO-NETO, L.; LOPES, N. P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 374-381, 2007.

GOKBULUT, A.; OZHAN, O.; SATILMIS, B.; BATCIOGLU, K.; GUNAL, S.; SARER, E. Antioxidant and antimicrobial activities and phenolic compounds of selected *Inula* species from Turkey. **Natural Product Communications**, v. 8, n. 4, p. 475-478, 2013.

GONTIJO, V. S.; JUDICE, W. A. S.; CODONHO, B.; PEREIRA, I. V.; ASSIS, D. M.; JANUÁRIO, J. P.; CAROSELLI, E. E.; JULIANO, M. A.; DOSATTI, A. C.; MARQUES, M. J.; JUNIOR, C. V.; SANTOS, M. H. Leishmanicidal, antiproteolytic and antioxidant evaluation of natural biflavonoids isolated from *Garcinia brasiliensis* and their semisynthetic derivatives. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 58, p. 613-623, 2012.

GOTTLIEB, O. R. Phytochemicals: differentiation and function. **Phytochemistry**, v. 29, n. 6, p. 1715-1724, 1990.

GOTTLIEB, O. R.; BORIN, M. R. M. B.; PAGOTTO, C. L. A. C.; ZOCHER, D. H. T. Biodiversidade: o enfoque interdisciplinar brasileiro. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 3, n. 2, p. 97-102, 1998.

GREEN, C. A.; SHUSTER, S. Lack of effect of topical indomethacin on psoriasis. **British Journal of Clinical Pharmacology**, v. 24, p. 381-384, 1987.

GUERRA, P. M.; NODARI, R. O. Biodiversidade: aspectos biológicos, geográficos, legais e éticos. In: SIMÕES, C.M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMAN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5ªed. rev. ampl. Porto Alegre / Florianópolis: Editora da UFRGS / Editora da UFSC, 2003, p.13-28.

GUO, D.; XU, L.; CAO, X.; GUO, Y.; YE, Y.; CHAN, C. O.; MOK, D. K. W.; YU, Z.; CHEN, S. Anti-inflammatory activities and mechanisms of action of the petroleum ether fraction of *Rosa multiflora* Thunb. Hips. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 138, p. 717-722, 2011.

GUPTA, R.; LOHANI, M.; ARORA, S. Anti-inflammatory activity of the leaf extracts/fractions of *Bryophyllum pinnatum* Saliv.Syn. **International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research**, v. 3, n.1, p. 16-18, 2010.

GÜLÇİN, I.; ELMASTAS, M.; ABOUL-ENEIN, Y. Determination of antioxidant and radical scavenging activity of Basil (*Ocimum basilicum* L. Family Lamiaceae) assayed by different methodologies. **Phytotherapeutic Research**, v. 21, p. 354-361, 2007.

GUSLANDI, M. Nitric oxide and inflammatory bowel diseases. **European Journal of Clinical Investigation**, v. 28, p. 904-907, 1998.

HAIDER, S.; NAZREEN, S.; ALAM, M. M.; GUPTA, A.; HAMID, H.; ALAM, M. S. Anti-inflammatory and anti-nociceptive activities of ethanolic extract and its various fractions from *Adiantum capillus veneris* Linn. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 138, p. 741-747, 2011.

HAM, Y. M.; YOON, W. J.; PARK, S. Y.; SONG, G. P.; JUNG, Y. H.; JEON, Y. J.; KANG, S. M.; KIM, K. N. Quercitrin protects against oxidative stress-induced injury in lung fibroblast cells via up-regulation of Bcl-xL. **Journal of Functional Foods**, v. 4, p. 253-262, 2012.

HALLIWELL, B. Free radicals and other reactive species in disease. **Encyclopedia of Life Sciences**, p. 1-7, 2001.

HAM, Y. M.; YOON, W. J.; PARK, S. Y.; SONG, G. P.; JUNG, Y. H.; JEON, Y. J.; KANG, S. M.; KIM, K. N. Quercetin protects against oxidative stress-induced injury in lung fibroblast cells via up-regulation of Bcl-xL. **Journal of Functional Foods**, v. 4, p. 253-262, 2012.

HARRIS, D. C. **Análise Química Quantitativa**. 7ed. Rio de Janeiro: LTC, 2008. 886p.

HARRIS, E. S. J.; ERICKSON, S. D.; TOLOPKO, A. N.; CAO, S.; CRAYCROFT, J. A.; SCHOLTEN, R.; FU, Y.; WANG, W.; LIU, Y.; ZHAO, Z.; CLARDY, J.; SHAMU, C. E.; EISENBERG, D. M. Traditional Medicine Collection Tracking System (TM-CTS); a database for ethnobotanically driven drug-discovery programs. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 135, p. 590-593, 2011.

HE, J.; HUANG, B.; BAN, X.; TIAN, J.; ZHU, L.; WANG, Y. *In vitro* and *in vivo* antioxidant activity of the ethanolic extract from *Meconopsis quintuplinervia*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 141, p. 104-110, 2012.

HEMAISWARYA, S.; KRUTHIVENTI, A. K.; DOBLE, M. Synergism between natural products and antibiotics against infectious diseases. **Phytomedicine**, v. 15, p. 639-652, 2008.

HERRERA, A. Crassulacean acid metabolism and fitness under water deficit stress: if not for carbon gain, what is facultative CAM good for?. **Annals of Botany**, v. 103, p. 645-653, 2009.

HERRMANN, K.; ENTUS, R. Shikimate pathway: aromatic amino acids and beyond. **Encyclopedia of Life Sciences**, 2001.

HOLLER, F. J.; SKOOG, D. A.; CROUCH, S. R. **Princípios de Análise Instrumental**, 6ª ed. Porto Alegre, RS: Artmed-Bookman, 2009, 836p.

HOSSAIN, M. A.; SHAH, M. D.; GNANARAJ, C.; IQBAL, M. *In vitro* total phenolics, flavonoids contents and antioxidant activity of essential oil, various organic extracts from the leaves of tropical medicinal plant *Tetrastigma* from Sabah. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, p. 717-721, 2011.

HUANG, D.; OU, B.; PRIOR, R. L. The chemistry behind antioxidant capacity assays. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, p. 1841-1856, 2005.

HUANG, M.; LU, J. J.; HUANG, M. Q.; BAO, J. L.; CHAN, X. P.; WANG, Y. T. Terpenoids: natural products for cancer therapy. **Expert Opinion on Investigational Drugs**, v. 21, n. 12, p. 1801-1818, 2012.

HUIE, C. W. A review of modern sample-preparation techniques for the extraction and analysis of medicinal plants. **Analital and Bioanalital Chemistry**, v. 373, p. 23-30, 2002.

HUMES, J. L.; OPAS, E. E.; BONNEY, R.J. Arachidonic acid metabolites in mouse ear oedema. In: LEWIS, A.; CAPETOLA, R. **Advances in Inflammations Research I**. New York: Raven Press, p. 57-65, 1986.

IBRAHIM, R. K. Phenylpropanoid Metabolism. **Encyclopedia of Life Sciences**, 2001a.

IBRAHIM, R. K. Flavonoids. **Encyclopedia of Life Sciences**, 2001b.

IGWE, S. A.; AKUNYILI, D. N. Analgesic effects of aqueous extracts of the leaves of *Bryophyllum pinnatum*. **Pharmaceutical Biology**, v. 43, n.8, p. 658-661, 2005.

JAIN, V. C.; PATEL, N. M.; SHAH, D. P.; PATEL, P. K.; JOSHI, B. H. Antioxidant and antimicrobial activities of *Bryophyllum calycinum* Salisb leaf. **Pharmacologyonline**, v. 1, p. 393-405, 2010.

JARDIM; I. C. S. F.; COLLINS, C. H.; GUIMARÃES, L. F. L. Cromatografia líquida de alta eficiência. In: COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. **Fundamentos de cromatografia**. Campinas: Editora da Unicamp, 2006. Capítulo IX, p. 273-398.

JIRCHITZKA, J.; MATTERN, D. J.; GERSHENZON, J.; D`AURIA, J. C. Learnig from nature: new approaches to the metabolic engineering of plant defense pathways. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 24, p. 320-328, 2013.

JONES, D. P. Redefining oxidative stress. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 8, n. 9-10, p. 1865-1879, 2006

KALE, M.; MISAR, A. V.; DAVE, V.; JOSHI, M.; MUJUMDAR, A. M. Anti-inflammatory activity of *Dalbergia lanceolaria* bark ethanol extract in mice and rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 112, p. 330-304, 2007.

KAMBOJ, A.; SALUJA, A. K. *Bryophyllum pinnatum* (Lam.) Kurz.: Phytochemical and pharmacological profile : A review. **Pharmacognosy Review**, v.3, n. 6, p. 364-374, 2009.

KATERERE, D. R.; GRAY, A. I.; NASH, R. J.; WAIGH, R. D. Antimicrobial activity of pentacyclic triterpenes isolated from African Combretaceae. **Phytochemistry**, v. 63, p. 81-88, 2003.

KATERERE, D. R.; GRAY, A. I.; NASH, R. J.; WAIGH, R. D. Phytochemical and antimicrobial investigations of stilbenoids and flavonoids isolated from three species of Combretaceae. **Fitoterapia**, v. 83, p. 932-940, 2012.

KENNEDY, D. O.; WIGHTMAN, E. L. Herbal Extracts and Phytochemicals: Secondary Metabolites and the Enhancement of Human Brain Function. **Advances in Nutrition**, v. 2, p. 32-50, 2011.

KHODDAMI, A.; WILKES, M. A.; ROBERTS, T. H. Techniques for Analysis of Plant Phenolics Compouds. **Molecules**, v. 18, p. 2328-2375, 2013.

KOMAROVA, N. I.; ROGACHEV, A. D.; CHERNYAK, E. I.; MOROZOV, S. V.; FOMENKO, V. V.; SALAKHUTDINOV, N. F. Quantitative HPLC determination of main flavonoid content of *Rhododendron adamsii* leaves and stems. **Chemistry of Natural Compounds**, v. 45, n. 1, p. 27-31, 2009.

KOLEVA, I. I.; VAN BEEK, T. A.; LINSSEN, J. P. H.; DE GROOT, A.; EVSTATIEVA, L. N. Screening of plant extracts for antioxidant activity: a comparative study on three testing methods. **Phytochemical analysis**, v. 13, p. 8-17, 2002.

KUETE, V.; NGAMENI, B.; SIMO, C. C. F.; TANKEU, R. K.; NGADJUI, B. T.; MEYER, J. J. M.; LALL, N.; KUIATE, J. R. Antimicrobial activity of the crude extracts and compounds from *Ficus chlamydocarpa* and *Ficus cordata* (Moraceae). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 120, p. 17-24, 2008.

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 ovate* (Moraceae). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 124, p. 556-561, 2009.

KULKA, R. G. Cytokinins inhibit epiphyllous plantlet development on leaves of *Bryophyllum (Kalanchoë) marnierianum*. **Journal of Experimental Botany**, v. 57, n.15, p. 4089-4098, 2006.

KUMAR, B.; VIJAYAKUMAR, M.; GOVINDARAJAN, R.; PUSHPANGADAN, P. Ethnopharmacological approaches to wound healing – Exploring medicinal plants of India. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 114, p. 103-113, 2007.

KUPPER, T. S. Immune and inflammatory processes in cutaneous tissues – mechanisms and speculations. **Journal of Clinical Investigation**, v. 86, p. 1783-1789, 1990.

KUSHIRO, T.; SHIBUYA, M.; MASUDA, K.; EBIZUKA, Y. A novel multifunctional triterpene synthase from *Arabidopsis thaliana*. **Tetrahedron Letters**, v. 41, p. 7705-7710, 2000.

KWAK, J. Y.; JUNG, J. Y.; HWANG, S. W.; LEE, W. T. OH, U. A capsaicin-receptor antagonist, capsazepine reduces inflammatory-induced hyperalgesic responses in the rat: evidence for an endogenous capsaicin-like substance. **Neuroscience**, v. 86, n. 2, p. 619-626, 1998.

LANÇAS, F. M. **Cromatografia líquida moderna: HPLC/CLAE**. Campinas: Editora Átomo, 2009. 382p.

LAPA, A. J.; SOUCCAR, C.; LIMA-LANDMAN, M. T. R.; GODINHO, R. O.; NOGUEIRA, T. C. M. L. Farmacologia e toxicologia de produtos naturais. In: SIMÕES, C.M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMAN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5ªed. rev. ampl. Porto Alegre / Florianópolis: Editora da UFRGS / Editora da UFSC, 2003. p.247-288.

LARSEN, G. L.; HENSON, P. M. Mediators of inflammation. **Annual Review of Immunology**, v. 1, p. 335-359, 1983.

LARSSON, S. The “new” chemosystematics: Phylogeny and phytochemistry. **Phytochemistry**, v. 68, p. 2903-2907, 2007.

LASISI, A. A.; AYINDE, B. W.; ADELEYE, A. O.; ONOCHA, P. A.; OLADOSU, I. A.; IDOWU, P. A. New triterpene isovanniloyl and antibacterial activity of constituents from the roots of *Paullinia pinnata* Linn (Sapindaceae). **Journal of Saudi Chemical Society**, v. X, p. X-Y, 2012.

LEE, C. C.; SHEN, A. R.; LAJ, Y. J.; WU, S. C. Rutin and quercetin, bioactive compounds from tartary buckwheat, prevent liver inflammation injury. **Food & Function**, v. 4, p. 794-802, 2013.

LEITE, J. P. V. **Estudo fitoquímico de folhas de *Maytenus illicifolia* Mart. Ex Reis. E variação sazonal e intra-específica de polifenóis em populações nativas**. Tese de Doutorado. Departamento de Química/UFMG, 299p. 2002

LEONTI, M.; CABRAS, S.; WECKERLE, C. S.; SOLINAS, M. N.; CASU, L. The casual dependence of present plant knowledge on herbals – Contemporary medicinal plant use in Campania (Italy) compared to Matthioli (1568). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 130, p. 379-391, 2010.

LESJAK, M. M.; BEARA, I. N.; ORCIC, D. Z.; ANACKOV, G. T.; BALOG, K. J.; FRANCISKOVIC, M. M.; MIMICA-DUKIC, N. M. *Juniperus sibirica* Burgsdorf. As a novel source of antioxidant and anti-inflammatory agents. **Food Chemistry**, v. 124, p. 850-856, 2011.

LI, L.; SUN, B.; ZHANG, Q.; FANG, J.; MA, K.; LI, Y.; CHEN, H.; DONG, F.; GAO, Y.; LI, F.; YAN, X. Metabolomic study on the toxicity of Hei-Shun-Pian, the processed lateral root of *Aconitum carmichaelii* Debx. (Ranunculaceae). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 116, p. 561-568, 2008.

LI, L.; ISHDORJ, G.; GIBSON, S. B. Reactive oxygen species regulation of autophagy in cancer: Implications for cancer treatment. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 53, p. 1399-1410, 2012.

LIM, H.; PARK, H.; KIM, H.P. Inhibition of contact dermatitis in animal models and suppression of proinflammatory gene expression by topically applied flavonoid, wogonin. **Archives of Pharmacal Research**, v. 27, p. 442-448, 2004.

LIM, Y. Y.; LIM, T. T.; TEE, J. J. Antioxidant properties of several tropical fruits: A comparative study. **Food Chemistry**, v. 103, p. 1003-1008, 2007.

LIMA, E. S.; ABDALLA, D. S. P. Peroxidação lipídica: mecanismos e avaliação em amostras biológicas. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 37, n. 3, p. 293-303, 2001.

LIN, F.; HASEGAWA, M.; KODAMA, O. Purification and identification of antimicrobial sesquiterpene lactones from Yacon (*Smallanthus sonchifolius*) leaves. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 67, n.10, p. 2154-2159, 2003.

LIU, J.; SUN, G. The synthesis of novel cationic anthraquinone dyes with high potent antimicrobial activity. **Dyes and Pigments**, v. 77, p. 380-386, 2008.

LIU, YANG.; WHELAN, R. J.; PATTNAIK, B. R.; LUDWIG, K.; SUBUDHI, E.; ROWLAND, H.; CLAUSSEN, N.; ZUCKER, N.; UPPAL, S.; KUSHNER, D. M.; FELDER, M.; PATANKAR, M. S.; KAPUR, A. Terpenoids from *Zingiber officinale* (Ginger) Induce Apoptosis in Endometrial Cancer Cells through the Activation of p53. **Plos one**, v. 7, n. 12, p. 1-10, 2012.

LÓPEZ-ALARCÓN, C.; DENICOLA, A. Evaluating the antioxidante capacity of natural products: A review on the chemical and cellular-based assays. **Analytica Chimica Acta**, v. 763, p. 1-10, 2013.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. **Plantas medicinais no Brasil – Nativas e Exóticas**. 2ª ed. Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum, 2008. 544p.

MACHADO, T. B.; PINTO, A. V.; PINTO, M. C. F. R.; LEAL, I. C. R.; SILVA, M. G.; AMARAL, A. C. F.; KUSTER, R. M.; NETTO-DOS-SANTOS, K. R. *In vitro* activity of Brazilian medicinal plants, naturally occurring naphthoquinones and their analogues, against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 21, p. 279-284, 2003.

MAGALHÃES, L. M.; SEGUNDO, M. A.; REIS, S.; LIMA, J. F. L. C. Methodological aspects about *in vitro* evaluation of antioxidant properties. **Analytica Chimica Acta**, v. 613, p. 1-19, 2008.

MAHADY, G. B.; HUANG, Y.; DOYLE, B. J.; LOCKLEAR, T. Natural products as antibacterial agents. **Studies in Natural Products Chemistry**, v. 35, p. 423-444, 2008.

MAHATA, S.; MARU, S.; SHUKLA, S.; PANDEY, A.; MUGESH, G.; DAS, B. C.; BHARTI, A. C. Anticancer property of *Bryophyllum pinnatum* (Lam.) Oken. Leaf on human cervical cancer cells. **Complementary & Alternative Medicine**, v. 12, n. 15, p. 1-11, 2012.

MAJAZ, A. Q.; TATIYA, A. U.; KHURSHID, M.; NAZIM, S.; SIRAJ, S. The miracle plant (*Kalanchoe pinnata*): a phytochemical and pharmacological review. **International Journal of Research in Ayurveda & Pharmacy**, v. 2, n.5, p. 1478-1482, 2011.

MARCO; G. J. A rapid method for evaluation of antioxidants. **The journal of the American oil chemists' society**, v. 45, p. 594-598, 1968.

MARKHAM, K. R. **Techniques of flavonoid identification**. London: Academic Press. 1982. 113 pp.

MARQUES, G. S.; MONTEIRO, R. P. M.; LEÃO, W. F.; LYRA, M. A. M.; PEIXOTO, M. S.; ROLIM-NETO, P. J.; XAVIER, H. S.; SOARES, L. A. L. Avaliação de procedimentos para quantificação espectrofotométrica de flavonoides totais em folhas de *Bauhinia forficata* Link. **Química Nova**, v. 35, n. 3, p. 517-522, 2012.

MARQUES, G. S.; LEÃO, W. F.; LYRA, M. A. M.; PEIXOTO, M. S.; MONTEIRO, R. P. M.; ROLIM, L. A.; XAVIER, H. S.; NETO, P. J. R.; SOARES, L. A. L. Comparative evaluation of UV/VIS and HPLC analytical methodologies applied for quantification of flavonoids from leaves of *Bauhinia forficata*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v. 23, n. 1, p. 51-87, 2013

MARTINS, M. R. F. M.; V, F. Promotores de permeação para a liberação transdérmica de fármacos: uma nova aplicação para as ciclodextrinas. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 38, n. 1, p. 33-54, 2002.

MEDEIROS, R.; OTUKI, M. F.; AVELLAR, M. C. W.; CALIXTO, J. B. Mechanisms underlying the inhibitory actions of the pentacyclic triterpene α -amyrin in the mouse skin inflammation induced by phorbol ester 12-*O*-tetradecanoylphorbol-13-acetate. **European Journal of Pharmacology**, v. 559, p. 227-235, 2007.

MENON, G. K. New insights into skin structure: scratching the surface. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 54, n. 1, p. 3-17, 2002.

MENSOR, L.L.; MENEZES, F.S.; LEITÃO, G.G.; REIS, A.S.; SANTOS, T.C.; COUBE, C.S.; LEITÃO, S.G. Screening of brazilian plant extracts for antioxidant activity by the use of DPPH free radical method. **Phytother Research**, n.2, v.15, p.127-130, 2001.

MEYER, S.; VOGT, T.; LANDTHALER, M.; KARRER, S. Use of phytopharmaceutical agents in dermatology. Indications, therapeutic approaches and side effects. **Hautarzt**, v. 56, p. 483-502, 2005.

MILLER, H. E. A simplified method for the evaluation of antioxidants. **Journal of the Journal Series of the Pennsylvania Agricultural Experiment Station**, n. 3881, 1970.

MOON, J. K.; SHIBAMOTO, T. Antioxidant assays for plant and food components. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, p. 1655-1666, 2009.

MOON, P. D.; CHOI, I. H.; KIM, H. M. Naringenin suppresses the production of thymic stromal lymphopoietin through the blockade of RIP2 and caspase-1 signal cascade in mast cells. **European Journal of Pharmacology**, v. 671, p. 128-132, 2011.

MOREIRA, N. S.; NASCIMENTO, L. B. S.; LEAL-COSTA, M. V.; TAVARES, E. S. Comparative anatomy of leaves of *Kalanchoe pinnata* and *K. crenata* in sun and shade conditions, as a support for their identification. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, Aop04512, 2012.

MORT, M. E.; SOLTIS, D. E.; SOLTIS, P. S.; FRANCISCO-ORTEGA, J.; SANTOS-GUERRA, A. Phylogenetic relationship and evolution of Crassulaceae inferred from matK sequence data. **American Journal of Botany**, v. 88, n. 1, p. 76-91, 2001.

MOSER, K.; KRIWET, K.; NAIK, A.; KALIA, Y. N.; GUY, R. H.; Passive skin penetration enhancement and its quantification *in vitro*. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 52, p. 103-112, 2001.

MUELLER, M. M. Inflammation in epithelial skin tumours: old stories and new ideas. **European Journal of Cancer**, v. 42, p. 735-744, 2006.

MURAKAWA, M.; YAMAOKA, K.; TANAKA, Y.; FUKUDA, Y. Involvement of tumor necrosis factor (TNF)- α in phorbol ester 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA)-induced skin edema in mice. **Biochemical Pharmacology**, v. 71, p. 1331-1336, 2006.

MURRAY, A. R.; KISIN, E.; CASTRANOVA, V.; KOMMINEMI, C.; GUNTHER, M. R.; SHVEDOVA, A. A. Phenol-induced *in vivo* oxidative stress in Skin: Evidence for enhanced free radical generation, thiol oxidation, and antioxidant depletion. **Chemistry Research in Toxicology**, v. 20, p. 1769-1777, 2007.

MUTHURULAPPAN, S.; RAJENDREN, S. Trend on traditional system of medicine and modern Ethnopharmacology – Perspective view. **International Journal of Research in Pharmaceutical Sciences**, v. 4, n. 1, p. 7-11, 2013.

MUZITANO, M. F.; TINOCO, L. W.; GUETTE, C.; KAISER, C. R.; ROSSI-BERGMANN, B.; COSTA, S. S. The antileishmanial activity assessment of unusual flavonoids from *Kalanchoe pinnata*. **Phytochemistry**, v. 67, p. 2071-2077, 2006.

MUZITANO, M. F.; BERGONZI, M. C.; MELO, G. O. D.; LAGE, C. L. S.; BILIA, A. R.; VINCIERI, F. F.; ROSSI-BERGMANN, B.; COSTA, S. S. Influence of cultivation conditions, season of collection and extraction method on the content of antileishmanial

flavonoids from *Kalanchoe pinnata*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 133, p. 132-137, 2011.

NAYAK, B. S.; MARSHALL, J. R.; ISITOR, G. Wound healing potential of ethanolic extract of *Kalanchoe pinnata* Lam. Leaf – a preliminary study. **Indian Journal of Experimental Biology**, v. 48, p. 572-576, 2010.

NAZ, S.; JAVAD, S.; ILYAS, S.; ALI, A. Na eficiente protocol for rapid multiplication of *Bryophyllum pinnatum* and *Bryophyllum daigremontianum*. **Pakistan Journal of Botany**, v. 41, n. 5, p. 2347-2355, 2009.

NEILSON, E. H.; GOODGER, J. Q. D.; WOODROW, I. E.; MOLLER, B. L. Plant chemical defense: at what cost?. **Trends in Plant Science**, p. 1-9, 2013.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G.M.; SNADER, K. M. Natural products as sources of new drugs over the period 1981–2002. **Journal of Natural Products**, v. 66, p. 1022–1037, 2003.

NGUELEFACK, T. B.; NANA, P.; ATSAMO, A. D.; DIMO, T.; WATCHO, P.; DONGMO, A. B.; TAPONDJOU, L. A.; NJAMAN, D.; WANSI, S. L.; KAMANYI, A. Analgesic and anticonvulsant effects of extracts from the leaves of *Kalanchoe crenata* (Andrews) Haworth (Crassulaceae). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 106, p. 70-75, 2006.

NIRMALA, P.; RAMANATHAN, M. Effect of kaempferol on lipid peroxidation and antioxidant status in 1,2-dimethyl hydrazine induced colorectal carcinoma in rats. **European Journal of Pharmacology**, v. 654, p. 75-79, 2011.

NWADINIGWE, A. O. Antimicrobial activities of methanol and aqueous extracts of the stem of *Bryophyllum pinnatum* Kurz (Crassulaceae). **African Journal of Biotechnology**, v. 10, n. 72, p. 16342-16346, 2011.

OGBONNIA, S. O.; ADIMEGWU, J. I.; ENWURU, V. N. Evaluation of hypoglycaemic and hypolipidaemic effects of aqueous ethanolic extracts of *Treulia Africana* Decne and *Bryophyllum pinnatum* Lam. And their mixture on streptozotocin (STZ)-induced diabetic rats. **African Journal of Biotechnology**, v. 7, n. 15, p. 2535-2539, 2008.

OJEWOLE, J. A. O. Antinociceptive, anti-inflammatory and antidiabetic effects of *Bryophyllum pinnatum* (Crassulaceae) leaf aqueous extract. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 99, p. 13-19, 2005.

OKWU, D. E.; JOSIAH, C. Evaluation of the chemical composition of two Nigerian medicinal plants. **African Journal of Biotechnology**, v. 5, n. 4, p. 357-361, 2006.

OKWU, D. E.; NNAMDI, F. U. A novel antimicrobial phenanthrene alkaloid from *Bryophyllum pinnatum*. **E-Journal of Chemistry**, v. 8, n. 3, p. 1456-1461, 2011a.

OKWU, D. E.; NNAMDI, F. U. Two novel flavonoids from *Bryophyllum pinnatum* and their antimicrobial activity. **Journal of Chemical and Pharmaceutical Research**, v. 3, n. 2, p. 1-10, 2011b.

OLIVEIRA, F. A.; COSTA, C. L. S.; CHAVES, M. H.; ALMEIDA, F. R. C.; CAVALCANTE, I. J. M.; LIMA, A. F.; LIMA Jr, R. C. P.; SILVA, R. M.; CAMPOS, A. R.; SANTOS, F. A.; RAO, V. S. N. Attenuation of capsaicin-induced acute and visceral nociceptive pain by α - and β -amyrin, a triterpene mixture isolated from *Protium heptaphyllum* resin in mice. **Life Sciences**, v. 77, p. 2942-2952, 2005.

OLIVEIRA, A. C.; VALENTIM, I. B.; GOULART, M. O. F.; SILVA, C. A.; BECHARA, E. J. H.; TREVISAN, M. T. S. Fontes vegetais naturais antioxidantes. **Química Nova**, v. 32, n. 3, p. 689-702, 2009.

ONG, E. S. Extraction methods and chemical standardization of botanicals and herbal preparations. **Journal of Chromatography B**, v. 812, p. 23-33, 2004.

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

OTUKI, M. F.; VIEIRA-LIMA, F.; MALHEIROS, A.; YUNES, R. A.; CALIXTO, J. B. Topical antiinflammatory effects of the ether extract from *Protium kleinii* and α -amyrin pentacyclic triterpene. **European Journal of Pharmacology**, v. 507, p. 253-259, 2005.

OYAIZU, M. Studies on product of browning reaction – Antioxidative activities of products of browning reaction prepared from glucosamine. **Japanese Journal of Nutrition**, v. 44, n. 6, p. 307-315, 1986.

PANWAR, A. S.; UPADHYAY, N.; BAIRAGI, M.; GUJAR, S.; DARWHEKAR, G. N.; JAIN, D. K. Emulgel: a review. **Asian Journal of Pharmacy and Life Science**, v. 1, n. 3, p. 33-343, 2011.

PAVIA, D. L.; LAMPMAN, G. M.; KRIZ, G. S.; VYVYAN, J. R. **Introdução à espectroscopia**. 4ª e.d. São Paulo: Cengage Learning, 2010. 700p.

PASCUAL, G.; GLASS, C. K. Nuclear receptor versus inflammation: mechanisms of transrepression. **Trends in Endocrinology and Metabolism**, v. 17, p. 321-328, 2006.

PATTEWAR, S. V. *Kalanchoe pinnata*: phytochemical and pharmacological profile. **International Journal of Phytopharmacy**, v. 2, n. 1, p. 1-8, 2012.

PEDRESCHI, R.; CISNEROS-ZEVALLOS, L. Antimutagenic and antioxidante properties of phenolic fractions from Andean Purple Corn (*Zea mays* L.). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, p. 4557-467, 2006.

PEREIRA, D. M.; VALENTÃO, P.; PEREIRA, J. A.; ANDRADE, P. B. Phenolics: from Chemistry to Biology. **Molecules**, v. 14, p. 2202-2211, 2009.

PINCHUK, I.; SHOVAL, H.; LICHTENBERG, D. D. Evaluation of antioxidants: Scope, limitations and relevance of assays. **Chemistry and Physics of Lipids**, v. 165, p. 638-647, 2012.

PRONIN, S. V.; SHENVI, R. A. Synthesis of a Potent Antimalarial Amphilectene. **Journal of the American Chemical Society**, v. 134, p. 19604-19606, 2012.

PHOSRITHONG, N.; SAMEE, W.; NUNTHANAVANIT, P.; UNGWITAYATORN, J. *In vitro* antioxidant activity study of novel chromone derivatives. **Chemical Biology and Drug Design**, v. 79, p. 981-989, 2012.

PRIETO, M. A.; RODRÍGUEZ-AMADO, I.; VÁZQUEZ, J. A.; MURADO, M. A. β -Carotene assay revisited. Application to characterize and quantify antioxidant and prooxidant activities in a microplate. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, p. 8983-8993, 2012.

RANG, H. P.; DALE, M. M.; RITTER, J. M.; FLOWER, R. J. **Farmacologia**. 6^a ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2007. 829p.

RATES, S. M. K.; BRIDI, R. Heterosídeos cardiativos. In: SIMÕES, C.M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMAN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5^a ed. rev. ampl. Porto Alegre / Florianópolis: Editora da UFRGS / Editora da UFSC, 2003, p.685-710.

RECIO, M. C., GINER, R. M., URIBURU, L., MÁÑEZ, S., CERDÁ, M., De LA FUENTE, J. R., RÍOS, J. L. In vivo activity of pseudoguaianolide sesquiterpene lactones in acute and chronic inflammation. **Life Science**, v. 66, p. 2509-2518, 2000.

RÍOS, J. L.; RECIO, M. C. Medicinal plants and antimicrobial activity. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 100, p. 80-84, 2005.

RITCHLIN, C. T.; HAAS-SMITH, S. A.; LI, P.; HICKS, D. G.; SCHWARZ, E. M. Mechanisms of TNF- α - and RANKL-mediated osteoclastogenesis and bone resorption in psoriatic arthritis. **Journal of Clinical Investigation**, v. 111, n. 6, p. 821-831, 2003.

ROMANO, M.; FAGGIONI, R.; SIRONI, M.; SACCO, S.; ECHTENACHER, B.; DI SANTO, E.; SALMONA, M.; GHEZZI, P. Carrageenan induced acute inflammation in the mouse air pouch synovial model. Role of tumour necrosis factor. **Mediators Inflammation**, v. 6, p. 32-38, 1997.

SADER, H. S.; PIGNATARI, A. C.; HOLLIS, R. J.; LEME, I.; JONES, R. N. Oxacillin- and quinolone-resistant *Staphylococcus aureus* in São Paulo, Brazil: A multicenter molecular epidemiology study. **Infection Control and Hospital Epidemiology**, v. 14, n. 5, p. 260-264, 1993.

SADIK, C. D.; SIES, H.; SCHEWE, T. Inhibition of 15-lipoxygenases by flavonoids: structure-activity relations and mode of action. **Biochemical Pharmacology**, v. 65, p. 773-781, 2003.

SALAHDEEN, H. M.; YEMITAN, O. K.; Neuropharmacological effects of aqueous leaf extract of *Bryophyllum pinnatum* in mice. **African Journal of Biomedical Research**, v. 9, p. 101-107, 2006.

SAMPAIO, J. **História da Medicina Tradicional Chinesa**. Lisboa: ciclostilado, 2002.

SANCHEZ, T.; MORENO, J.J. Role of leukocyte influx in tissue prostaglandin H synthase-2 overexpression induced by phorbol ester and arachidonic acid in skin. **Biochemical Pharmacology**, v. 58, p. 877-879, 1999.

SANTOS, R. I. D. Metabolismo básico e origem dos metabólitos secundários. In: SIMÕES, C.M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMAN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5ªed. rev. ampl. Porto Alegre / Florianópolis: Editora da UFRGS / Editora da UFSC, 2003, p.403-434.

SANTOS, S. D. A.; MELLO, J. C. P. D. Taninos. In: SIMÕES, C.M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMAN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5ªed. rev. ampl. Porto Alegre / Florianópolis: Editora da UFRGS / Editora da UFSC, 2003, p. 615-656.

SARAIVA, R. A.; ARARUNA, M. K. A.; OLIVEIRA, R. C.; MENEZES, K. D. P.; LEITE, G. O.; KERNTOPF, M. R.; COSTA, J. G. M.; ROCHA, J. B. T.; TOMÉ, A. R.; CAMPOS, A. R.; MENEZES, I. R. A. Topical anti-inflammatory effects of *Caryocar cariaceum* Wittm. (Caryocaraceae fruit fixed oil on mice ear edema induced by diferente irritant agentes. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 136, p. 504-510, 2011.

SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; PETROVICK, P. R. Produtos de origem vegetal e o desenvolvimento de medicamentos. In: SIMÕES, C.M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMAN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5ªed. rev. ampl. Porto Alegre / Florianópolis: Editora da UFRGS / Editora da UFSC, 2003, p. 371-402.

SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; ATHAYDE, M. L. Saponinas. In: SIMÕES, C.M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMAN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5ªed. rev. ampl. Porto Alegre / Florianópolis: Editora da UFRGS / Editora da UFSC, 2003, p. 711-740.

SCHIANTARELLI, P.; CADEL, S.; ACERBI, D.; PAVESI, L. Antiinflammatory activity and bioavailability of percutaneous piroxicam. **Drug Research**, v. 32, n. 3, 1982, p. 230-235.

SHIBUYA, M.; KATSUBE, Y.; OTSUKA, M.; ZHANG, H.; TANSAKUL, P.; XIANG, T.; EBIZUKA, Y. Identification of a product specif β -amyrin synthase from *Arabidopsis thaliana*. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 47, p. 26-30, 2009.

SHOKEEN, P.; RAY, K.; BALA, M.; TANDON, V. Preliminary studies on activity of *Ocimum sanctum*, *Drynaria quercifolia*, and *Annona squamosa* against *Neisseria gonorrhoeae*. **Sexually transmitted Diseases**, v. 32, n. 2, p. 106-111, 2005.

SIDDIQUI, S.; FAIZI, S.; SIDDIQUI, B. S.; SULTANA, N. Triterpenoids and phenanthrenes from leaves of *Bryophyllum pinnatum*. **Phytochemistry**, v. 28, n. 9, p. 2433-2438, 1989.

SILVA, C. A. M. **Contribuição ao estudo químico e biológico de *Pouteria gardnerii* (Mart. & Miq.) Baehni (Sapotaceae)**. 2007. Dissertação de Mestrado – Universidade de Brasília, Brasília, DF, 2007.

SILVA, J. G.D.; PEREIRA, M. D. S. V.; GURGEL, A. P. D.; SIQUEIRA-JÚNIOR, J. P.; SOUZA, I. A. Atividade inibitória das folhas e caule de *Kalanchoe brasiliensis* Cambess frente a microrganismos com diferentes perfis de resistência a antibióticos. **Revista Brasileira de farmacognosia**, v. 19, n. 3, p. 790-794, 2009.

SILVA, M. C.; CARVALHO, J. C. T. Inflamação. In: CARVALHO, J. C. T. **Fitoterápicos anti-inflamatórios** – Aspectos químicos, farmacológicos e aplicações terapêuticas. Ribeirão preto, SP: Tecmedd, 2004, 480p.

SILVA, M. T. N.; USHIMARU, P. I.; BARBOSA, L. N.; CUNHA, M. L. R. S.; FERNANDES JUNIOR, A. Atividade antibacteriana de óleos essenciais de plantas frente a linhagens de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* isoladas de casos clínicos humanos. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 11, n. 3, p. 257-262, 2009.

SIMÃO DA SILVA, K. A. B.; PASZCUK, A. F.; PASSOS, G. F.; SILVA, E. S.; BENTO, A. F.; MEOTTI, F. C.; CALIXTO, F. B. Activation of cannabinoid receptors by the pentacyclic triterpene α,β -amyrin inhibits inflammatory and neuropathic persistente pain in mice. **Pain**, v. 152, p. 1872-1887, 2011.

SIMÕES, C. M. O.; SPITZER, V. Óleos Voláteis. In: SIMÕES, C.M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMAN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5ªed. rev. ampl. Porto Alegre / Florianópolis: Editora da UFRGS / Editora da UFSC, 2003, p. 466-496.

SINGAB, A. N. B.; EL-AHMADY, S. H.; LABIB, R. M.; FEKRY, S. S. Phenolics from *Kalanchoe marmorata* Baker, Family Crassulaceae. **Bulletin of Faculty of Pharmacy, Cairo University**, v. 49, p. 1-5, 2011.

SINGH, B.; SHARMA, R. A.; Anti-inflammatory and antimicrobial properties of pyrroloquinazoline alkaloids from *Adhatoda vasica* Nees. **Phytomedicine**, v. 20, p. 441-445, 2013.

SINGH, M.; GOVINDARAJAN, R.; NATH, V.; RAWAT, A. K. S.; MEHROTRA, S. Antimicrobial, wound healing and antioxidant activity of *Plagiochasma appendiculatum* Lehm. Et Lind. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 107, p. 67-72, 2006.

SKINNER, R. Role of topical therapies in the management of cutaneous disease. **Journal of Cutaneous Medicine and Surgery**, p.22-31, 2005.

SOBRINHO, T. J. S. P.; SILVA, C. H. T. P.; NASCIMENTO, J. E.; MONTEIRO, J. M.; ALBUQUERQUE, U. P.; AMORIM, E. L. C. Validação de metodologia espectrofotométrica para quantificação dos flavonoides de *Bauhinia cheilantha* (Bongard) Steudel. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 44, n. 4, p. 683-689, 2008.

SOHN, H. Y.; SON, K. H.; KWON, C. S.; KWON, G. S.; KANG, S. S. Antimicrobial and cytotoxic activity of 18 prenylated flavonoids isolated from medicinal plants: *Morus alba* L., *Morus Mongolia* Schneider, *Broussnetia papyrifera* (L.) Vent, *Sophora flavescens* Ait and *Echinosophora koreensis* Nakai. **Phytomedicine**, v. 11, p. 666-672, 2004.

SONAGLIO, D.; ORTEGA, G. G.; PETROVICK, P. R.; BASSANI, V. L. Desenvolvimento tecnológico e produção de fitoterápicos. In: In: SIMÕES, C.M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMAN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5ªed. rev. ampl. Porto Alegre / Florianópolis: Editora da UFRGS / Editora da UFSC, 2003, p.289-326.

SOSA, V.; MOLINÉ, T.; SOMOZA, R.; PACIUCCI, R.; HIROSHI, K.; LLEONART, M. E. Oxidative stress and câncer: An overview. **Ageing Research Reviews**, v. 12, p. 376-390, 2013.

SOTO-VACA, A.; GUTIERREZ, A.; LOSSO, J. N.; XU, Z.; FINLEY, J. W. Evolution of phenolic compounds from color and flavor problems to health benefits. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, p. 6658-6677, 2012.

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

SOUSA, F. C. F.; MELO, C. T. V.; CITÓ, M. C. O.; FÉLIX, 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 visão da bioatividade e potenciais benéficos nos distúrbios da ansiedade em modelos animais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n. 4, p. 642-654, 2008.

SOUZA, V. C.; LORENZI, H. **Botânica Sistemática**: guia ilustrado para identificação das famílias de Angiospermas da flora brasileira, baseado em APG II. Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum, 2005, 606p.

STALIKAS, C. D. Extraction, separation, and detection methods for phenolic acids and flavonoids. **Journal of Separation Science**, v. 30, p. 3268-3295, 2007.

STANLEY, P.L.; STEINER, S.; HAVENS, M.; TRAMPOSH, K.M. Mouse skin inflammation induced by multiple topical applications of 12-Otetradecanoylphorbol-13-acetate. **Skin Pharmacology**, v. 4, p. 262-271, 1991.

STEVENS, J. F.; HART, H.; VAN HAM, R. C. H. J.; ELEMA, E. T.; VAN DEN ENT, M. M. V. X.; WILDEBOER, M.; ZWANVING, J. H. Distribution of Alkaloids and Tannins in the Crassulaceae. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 23, n. 2, p. 157-165, 1995.

SUN, L.; ZHANG, J.; LU, X.; ZHANG, L.; ZHANG, Y. Evaluation to the antioxidant activity of total flavonoids extracts from persimmon (*Diospyros kaki* L.) leaves. **Food and Chemical Toxicology**, v. 49, p. 2689-2696, 2011.

SÜNTAR, I.; AKKOL, E. K.; SENOL, F. S.; KELES, H.; ORHAN, I. E. Investigating wound healing, tyrosinase inhibitory and antioxidant activities of the ethanol extracts of *Salvia cryptantha* and *Salvia cyanescens* using *in vivo* and *in vitro* experimental models. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 135, p. 71-77, 2011.

SUPRATMAN, U.; FUJITA, T.; AKIYAMA, K.; HAYASHI, H. New insecticidal bufadienolide, Bryophyllin C, from *Kalanchoe pinnata*. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 64, n. 6, p. 1310-1312, 2000.

SZOLCSÁNYI, J. Forty years in capsaicin research for sensory pharmacology and physiology. **Neuropeptides**, v. 38, p. 377-384, 2004.

TSAO, R. Chemistry and biochemistry of dietary polyphenols. **Nutrients**, v. 2, p. 1231-1246, 2010.

TATSIMO, S. J. N.; TAMOKOU, J. D. D.; HAVYARIMANA, L.; CSUPOR, D.; FORGO, P.; JUDIT, H.; KUIATE, J. R.; PIERRE, T. Antimicrobial and antioxidant activity of kaempferol rhamnoside derivatives from *Bryophyllum pinnatum*. **BioMed Central Research Notes**, v. 5, n. 158, p.1-13, 2012.

UDAYAKUMAR, M.; CHANDAR, D. P.; ARUN, N.; MATHANGI, J.; HEMAVATHI, K.; SEENIVASAGAM, R. PMDB: Plant Metabolome Database – A Metabolomic Approach. **Medicinal Chemistry Research**, v. 21, p. 47-52, 2012.

ULRICH-MERZENICH, G.; ZEITLER, H.; JOBST, D.; PANEK, D.; VETTER, H.; WAGNER, H. Application of the “-Omic-“ technologies in phytomedicine. **Phytomedicine**, v. 14, p. 70-82, 2007.

UNITED STATES. Department of Health and Human Services. Food and Drug Administration. Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation. May 2001.

VALKO, M.; LEIBFRITZ, D.; MONCOL, J.; CRONIN, M. T. D.; MAZUR, M.; TELSER, J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 39, p. 44-84, 2007.

VERPOORTE, R. Exploration of nature's chemodiversity: the role of secondary metabolites as leads in drug development. **DDT**, v. 3, n. 5, p. 232-238, 1998.

VERPOORTE, R.; CHOI, Y. H.; KIM, H. K. Ethnopharmacology and systems biology: a perfect holistic match. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 100, p. 53-56, 2005.

VERPOORTE, R.; CHOI, Y. H.; KIM, H. K. NMR-based metabolomics at work in phytochemistry. **Phytochemistry Reviews**, v. 6, p. 3-14, 2007.

VIERLING, W.; BRAND, N.; GAEDCKE, F.; SENSCH, K. H.; SCHNEIDER, E.; SCHOLZ, M. Investigation of the pharmaceutical and pharmacological equivalence of different Hawthorn extracts. **Phytomedicine**, v. 10, p. 8-16, 2003.

VITALINI, S.; BERETTA, G.; IRITI, M.; ORSENIGO, S.; BASILICO, N.; DALL'ACQUA, S.; LORIZZI, M.; FICO, G. Phenolic compounds from *Achillea millefolium* L. and their bioactivity. **Acta Biochimica Polonica**, v. 58, n. 2, p. 203-209, 2011.

WAGNER, H.; BLADT, S. **Plant drug analysis: a thin layer chromatography atlas**. 2 e.d. Berlin: Springer, 1995. 384 p.

WALLACE, J.L.; CHAPMAN, K.; MCKNIGHT, W. Limited antiinflammatory efficacy of cyclo-oxygenase-2 inhibition in carrageenan-airpouch inflammation. **British Journal of Pharmacology**, v. 126, p. 1200-1204, 1999.

WHO.WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Quality control methods for medicinal plant materials**. England: WHO, 1998.

WILKINSON, J. M. Methods for testing the antimicrobial activity of extracts. In: AHMAD, I.; AQIL, F.; OWAIS, M. **Modern Phytomedicine: turning medicinal plants into drugs**. Germany: Wiley-VCH, 2006. p. 157-198.

WILLIAMS, I. R.; KUPPER, T. S. Immunity at the surface: homeostatic mechanisms of the skin immune system. **Life Sciences**, v. 58, n. 18, p. 1485-1507, 1996.

WILLOUGHBY, D. A. *In vivo* models of Inflammation. In: WINYARD, P. G.; WILLOUGHBY, D. A. **Inflammation protocols**, New Jersey: Humana Press, p. 129-131, 2003.

WILMER, J. L.; BURLESON, F. G.; KAYAMA, F.; KANNO, J.; LUSTER, M. I. Cytokine induction in human epidermal keratinocytes exposed to contact irritants and its relation to chemical-induced inflammation in mouse skin. **The Journal of Investigative Dermatology**, v. 102, n. 6, 1994.

WINKEL-SHIRLEY, B. Flavonoid biosynthesis. A colorful model for genetics, biochemistry, cell biology, and biotechnology. **Plant Physiology**, v. 126, p. 485-493, 2001.

YAMAGISHI, T.; YAN, X. Z.; WU, R. Y.; MCPHAIL, D. R.; MCPHAIL, A. T.; LEE, K. H. Structure and stereochemistry of Bryophyllin-A, a novel potent cytotoxic bufadienolide orthoacetate from *Bryophyllum pinnatum*. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, v. 36, n. 4, p. 1615-1617, 1988.

YAMAGISHI, T.; HARUNA, M.; YAN, X. Z.; CHANG, J. J.; LEE, K. H. Antitumor agents, 110. ^{1,2}Bryophyllin B, a novel potent cytotoxic bufadienolide from *Bryophyllum pinnatum*. **Journal of natural products**, v. 52, n. 5, p. 1071-1079, 1989.

YANG, M. L.; KUO, P. C.; HWANG, T. L.; WU, T. S. Anti-inflammatory principles from *Cordyceps sinensis*. **Journal of Natural Products**, v. 74, p. 1996-2000, 2011.

YEMITAN, O. K.; SALAHDEEN, H. M. Neurosedative and muscle relaxant activities of aqueous extract of *Bryophyllum pinnatum*. **Fitoterapia**, v. 76, p. 187-193, 2005.

YEN, G. C.; DUH, P. D.; CHUANG, D. Y. Antioxidant activity of anthraquinones and anthrone. **Food Chemistry**, v. 70, p. 437-441, 2000.

YOUNG, J.M.; SPIRES, D.A.; BEDORD, C.J.; WAGNER, B.; BALLRON, S.J.; DE YOUNG, L.M. The mouse ear inflammatory response to topical arachidonic acid. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 82, p. 367-371, 1984.

YU, F.; THAMM, A. M. K.; REED, D.; VILLA-RUANO, N.; QUESADA, A. L.; GLORIA, E. L.; COVELLO, P.; DE LUCA, V. Functional characterization of amyriin synthase involved

in ursolic acid biosynthesis in *Catharanthus roseus* leaf epidermis. **Phytochemistry**, v. 91, p. 122-127, 2013.

YULIANA, N. D.; KHATIB, A.; CHOI, Y, H. VERPOORTE, R. Metabolomics for bioactivity assessment of natural products. **Phytotherapy Research**, v. 25, p. 157-169, 2011.

ZANON, R. B.; PEREIRA, D. F.; BOSCHETTI, T. K.; DOS SANTOS, M.; ATHAYDE, M. L. Fitoconstituintes isolados da fração em diclorometano das folhas de *Vernonia tweediana* Baker. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n. 2, p. 226-229, 2008.

ZEGARSKA, B.; LELINSKA, A.; TYRAKOWSKI, T. Clinical and experimental aspects of cutaneous neurogenic inflammation. **Pharmacological Reports**, v. 58, p. 13-21, 2006.

ZHANG, L.; RAVIPATI, A. S.; KOYYALAMUDI, S. R.; JEONG, S. C.; REDDY, N.; SMITH, P. T.; BARLETT, J.; SHANMUGAM, K.; MÜNCH, G.; WU, M. J. Antioxidant and anti-inflammatory activities of selected medicinal plants containing phenolic and flavonoid compounds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, p. 12361-12367, 2011.

ZHOU, D.; RUAN, J.; CAI, Y.; XIONG, Z.; FU, W.; WEI, A. Antioxidant and hepatoprotective activity of ethanol extract of *Arachniodes exilis* (Hance) Ching. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 129, p. 232-237, 2010.

ZUANAZZI, J. A. S.; MONTANHA, J. A. Flavonoides. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMAN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5ªed. rev. ampl. Porto Alegre / Florianópolis: Editora da UFRGS / Editora da UFSC, 2003, p.577-614.

ZYGMUNT, B.; NAMIESNIK, J. Preparation of samples of plant material for chromatographic analysis. **Journal of Chromatographic Science**, v. 41, p. 109-116, 2003.