

**UNIVERSIDADE DO EXTREMO SUL CATARINENSE - UNESC  
UNIDADE ACADÊMICA HUMANAS CIÊNCIAS EDUCAÇÃO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS  
AMBIENTAIS  
MESTRADO EM CIÊNCIAS AMBIENTAIS**

**VANESSA RODRIGUES NICOLAU TORRES**

**AVALIAÇÃO FITOQUÍMICA, CITOTÓXICA E  
FARMACOLÓGICA DE *Calea uniflora* LESS.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Ambientais da Universidade do Extremo Sul Catarinense - UNESC, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências Ambientais.

Orientador: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Patrícia de Aguiar Amaral.

Co-orientador: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Silvia Dal Bó.

**CRICIÚMA  
2014**

Dedico esta dissertação a todos que me apoiaram, mas principalmente ao meu esposo Luciano, que sempre esteve ao meu lado.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos que de uma forma ou outra contribuíram para a realização deste trabalho, especialmente:

A Deus, por conceder essa dádiva maravilhosa que é viver e por permitir que meus sonhos se tornem realidade.

Aos meus pais Fernando de Oliveira Nicolau e Vera Suzana Rodrigues Nicolau, pelo apoio e compreensão que foi fundamental para eu alcançar mais essa conquista.

Ao meu amor Luciano Medeiros Torres, pela paciência, dedicação, por compartilhar todos os momentos dos mais felizes aos tristes, acreditando sempre no meu potencial, muitas vezes mais do que eu mesmo. Te Amo!

Aos meus irmãos Paulo Roberto e Carlos Alberto, que mesmo estando longe sei que posso contar com eles, afinal “Seja legal com seus irmãos: Eles são a melhor ponte com o seu passado e possivelmente que vai sempre mesmo te apoiar no futuro”.

À minha orientadora Prof<sup>a</sup> Dra Patrícia de Aguiar Amaral por todos os ensinamentos desde a iniciação científica, confiança, amizade e pelas oportunidades dadas ao longo destes 5 anos de LaPlaM, isso foi fundamental para o meu crescimento pessoal e profissional. Muito Obrigada!

A Prof<sup>a</sup>. Dra Silvia Dal Bó, pela co-orientação, amizade, grande contribuição para a realização deste trabalho, por estar ali sempre que precisei e pelas descontração nas conversas. Muito Obrigada!

Aos colegas do Laboratório de Plantas Mediciniais, Jéssica, Luan, Alan, Marília, Paulinha, Cassi, Maiara, Grazi, Michele, Renato. Obrigada por tornar meus experimentos reais, afinal sem a ajuda de vocês tudo seria mais difícil. Com certeza as tardes com vocês foram as melhores, sentirei saudades!!

A amiga do mestrado Patrícia Corrêa, nestes dois anos de convivência sua amizade foi fundamental.

Ao Laboratório PNSCM- Produits Naturels - Synthèse - Chimie Médicinale da Université de Rennes 1 – França, por compartilhar os ensinamentos que foram imprescindíveis para a realização do meu trabalho.

Aos funcionários do Laboratório de Química e Fitoterápicos da Universidade, que sempre me ajudaram desde a secagem da planta até a realização de experimentos.

Ao CNPQ pelo apoio financeiro.

Muito Obrigado!

*“Não existem sonhos impossíveis para aqueles que realmente acreditam que o poder realizador reside no interior de cada ser humano, sempre que alguém descobre esse poder algo antes considerado impossível se torna realidade.”*

*(Albert Einstein)*

## RESUMO

As plantas medicinais sempre foram utilizadas, sendo no passado o principal recurso terapêutico conhecido para o tratamento de enfermidades pela população. Dentre elas encontra-se *Calea uniflora* Less., planta medicinal nativa da região sul do Brasil encontrada também no centro-sul do Brasil, Argentina, Uruguai e Paraguai. Esta planta é utilizada popularmente para processos inflamatórios e hematomas. A partir destas informações e devido aos poucos estudos com a *C. uniflora*, surgiu o interesse em investigar os possíveis constituintes químicos, efeitos citotóxicos, efeitos antinociceptivo e anti-inflamatório desta espécie, para a avaliação fitoquímica foram analisados os extratos brutos da planta, através de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE). Para a atividade citotóxica, foi utilizado o teste de MTT, *in vitro*, a fim de verificar se o extrato e as frações de *C. uniflora* apresentaram efeitos citotóxicos. Para a avaliação das atividades antinociceptiva e anti-inflamatória foram utilizados modelos *in vivo*. Os modelos animais antinociceptivos empregados foram baseados em estímulos químicos (modelo de contorções abdominais induzidas por ácido acético, teste da formalina) e estímulos térmicos (placa quente), enquanto a possível incoordenação motora foi analisada pelo teste rota rod, e para a avaliação anti-inflamatória utilizou-se o modelo de edema de pata induzido por carragenina. Após a realização dos testes, verificamos, na análise fitoquímica, à presença de flavonoides e alcaloides. Na atividade citotóxica *in vitro*, os extratos brutos e as frações de acetato de etila e butanol apresentaram uma IC<sub>50</sub> maior que 58 µg/ml para linhagem HaCaT e 48 µg/ml para a linhagem B-16, sendo assim esses valores não apresentaram um efeito citotóxico. Entretanto a fração do diclorometano apresentou uma IC<sub>50</sub> de 18 µg/ml, mostrando inibição significativa quando comparada aos controles vincristina e doxorrubicina. Em relação à atividade antinociceptiva observou-se resultados significativos nos modelos que correspondem a estímulos químicos e térmicos nas doses de 100 e 300 mg/kg do extrato bruto, quando comparados aos grupos controles. No modelo rota rod os resultados foram satisfatórios, pois o extrato não causou incoordenação motora e sedação nas doses avaliadas. Entretanto, pode-se relacionar com os flavonoides e alcaloides com as atividades farmacológicas relatadas popularmente e com as atividades citotóxicas e antinociceptiva. Entretanto são necessários novos estudos para determinação do mecanismo de ação das atividades descritas bem como relacionar com os compostos químicos presentes na planta.

**Palavras-chave:** Uso popular. Citotoxicidade. Anti-inflamatória. Extrato. *Calea uniflora*.

## ABSTRACT

The medicinal plants always were utilized by population, in the past they were the main therapeutic resource for treatment diseases. Among these therapeutic resources find the medicinal plant *Calea uniflora* Less., native by region south find also south central of Brazil, Argentina, Uruguay and Paraguay. This plant is utilized popularly to process inflammatory and hematomas. From these informations and due the few studies with *C. uniflora*, emerged the interest of investigate possible compounds chemical, cytotoxic effects, antinociceptive effects, and anti-inflammatory. To the phytochemistry evaluation were analyzed the crude extract of plant by HPLC. To the evaluation about activity cytotoxic, were utilized the MTT test, *in vitro*, in order to verify as extract and fractions de *C. uniflora* cause possible effects cytotoxic. To evaluation of antinociceptive activity and anti-inflammatory were utilized models *in vivo*. This animals models were based in chemical stimuli (writhing induced by acetic acid and formalin test) and thermal stimuli (hot plate), while the motor incoordination was analized by rota rod. To evaluate activity anti-inflammatory was used the model paw edema induced by carrageenan. After the performing the tests, verified in the analyses phytochemistry the presence the flavonoid and alkaloid. In the test cytotoxic *in vitro*, the crude extract and fractions of ethyl acetate and butanol produce IC<sub>50</sub> greater that 58 µg/ml to lineage HaCaT and 48 µg/ml to lineage B-16, thus this values not present a cytotoxic effects. However fraction dichloromethane produced IC<sub>50</sub> 18 µg/ml, showed significant inhibition when compared to controls vincristine and doxorubicin. In relation of antinociceptive activity, the models presented results significant that correspond to chemical and thermal stimuli in the doses of 100 and 300 mg/kg of the crude extract, when compared with the control groups. The rota rod model showed satisfactory results, since the extract did not cause motor incoordination and sedation. According this results, can be related the flavonoids and alkaloids with pharmacological activities reported by agents of “pastoral da saúde” with the antinociceptive and cytotoxic activities. However further studies are needed to determine the action of the activities described and relate to the chemical compounds present in the plant.

**Keywords:** Popular use. Cytotoxicity. Antiinflammatory. Extract. *Calea uniflora*.



## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

|   |    |
|---|----|
| Figura 1: Imagem da <i>C. uniflora</i> Less.....  | 22 |
| Figura 2: Principais fatores que podem influenciar o acúmulo de metabólitos.....  | 24 |
| Figura 3: Danos no tecido inflamatórios e células tumorais liberando mediadores químicos, ativando as propriedades dos nociceptores aferentes em resposta ao estímulo. ....   | 29 |
| Figura 4: Fluxograma adaptado do fracionamento líquido-líquido.....   | 36 |
| Figura 5: Cromatografia de camada delgada dos extratos brutos (1 extrato bruto das folhas; 2 extrato bruto das flores) frações de <i>C. uniflora</i> (3 CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> ; 4 AcOEt; 5 BuOH). As amostras foram submetidas a placas cromatográficas de sílica gel 60 F <sub>254</sub> e analisadas em detector UV 365 nm após a migração em fase móvel diclorometano, metanol e ácido fórmico (90:10:0,5).....  | 42 |
| Figura 6: Placa preparativa de sílica gel 60 F <sub>254</sub> da fração de AcOEt, Fase móvel diclorometano, metanol e ácido fórmico (90:10:0,5) mostrou a purificação de três bandas. ....  | 43 |
| Figura 7: Cromatografia de camada delgada de sílica gel 60 F <sub>254</sub> de frações de AcOEt purificadas na placa preparativas, após ser revelada com o revelador específico Neu, que em luz visível apresentando coloração amarela e laranja indicam a presença de flavonoides.....   | 44 |
| Figura 8: Cromatografia de camada delgada de sílica gel 60 F <sub>254</sub> de frações de AcOEt purificadas na placa preparativas, após ser revelada com o revelador específico Dragendorff, que em luz visível apresentando coloração marrom indica a presença de alcaloides.....  | 44 |
| Figura 9: Cromatograma do extrato bruto das flores de <i>C. uniflora</i> . Detectado em CLAE 540 DAD, em 280 nm, com um tempo de corrida de 60 minutos. Fase móvel utilizada para a separação foi acetonitrila (solvente A) e ácido fosfórico (1%), ácido acético (10%), acetonitrila (5%) (v/v/v) e água (84%) (solvente B). O programa de eluição de gradiente linear foi: 0 min, 100% (solvente B), 30 min 70% e 30% do solvente A, 40 min, 100% (solvente A)..... | 45 |

Figura 10: Cromatograma do extrato bruto das folhas de *C. uniflora*. Detectado em CLAE 540 DAD, em 280 nm, com um tempo de corrida de 60 minutos. Fase móvel utilizada para a separação foi acetonitrila (solvente A) e ácido fosfórico (1%), ácido acético (10%), acetonitrila (5%) (v/v/v) e água (84%) (solvente B). O programa de eluição de gradiente linear foi: 0 min, 100% (solvente B), 30 min 70% e 30% do solvente A, 40 min, 100% (solvente A).....46

Figura 11: Cromatograma das frações de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> de *C. uniflora*. Detectado em CLAE 540 DAD, em 280 nm, com um tempo de corrida de 60 minutos. Fase móvel utilizada para a separação foi acetonitrila (solvente A) e ácido fosfórico (1%), ácido acético (10%), acetonitrila (5%) (v/v/v) e água (84%) (solvente B). O programa de eluição de gradiente linear foi: 0 min, 100% (solvente B), 30 min 70% e 30% do solvente A, 40 min, 100% (solvente A). .....47

Figura 12: Cromatograma das frações de AcOEt de *C. uniflora*. Detectado em CLAE 540 DAD, em 280 nm, com um tempo de corrida de 60 minutos. Fase móvel utilizada para a separação foi acetonitrila (solvente A) e ácido fosfórico (1%), ácido acético (10%), acetonitrila (5%) (v/v/v) e água (84%) (solvente B). O programa de eluição de gradiente linear foi: 0 min, 100% (solvente B), 30 min 70% e 30% do solvente A, 40 min, 100% (solvente A). .....48

Figura 13: Cromatograma das frações de BuOH de *C. uniflora*. Detectado em CLAE 540 DAD, em 280 nm, com um tempo de corrida de 60 minutos. Fase móvel utilizada para a separação foi acetonitrila (solvente A) e ácido fosfórico (1%), ácido acético (10%), acetonitrila (5%) (v/v/v) e água (84%) (solvente B). O programa de eluição de gradiente linear foi: 0 min, 100% (solvente B), 30 min 70% e 30% do solvente A, 40 min, 100% (solvente A). .....49

Figura 14: Cromatograma das referências. Detectado em CLAE 540 DAD, em 280 nm, com um tempo de corrida de 60 minutos. Fase móvel utilizada para a separação foi acetonitrila (solvente A) e ácido fosfórico (1%), ácido acético (10%), acetonitrila (5%) (v/v/v) e água (84%) (solvente B). O programa de eluição de gradiente linear foi: 0 min, 100% (solvente B), 30 min 70% e 30% do solvente A, 40 min, 100% (solvente A).....49

Figura 15: Cromatograma da purificação das frações 2 e 3 de AcOEt de *C. uniflora*. Detectado em CLAE 540 DAD, em 280 nm, com um tempo de corrida de 60 minutos. Fase móvel utilizada para a separação foi acetonitrila

(solvente A) e ácido fosfórico (1%), ácido acético (10%), acetonitrila (5%) (v/v/v) e água (84%) (solvente B). O programa de eluição de gradiente linear foi: 0 min, 100% (solvente B), 30 min 70% e 30% do solvente A, 40 min, 100% (solvente A). ..... 51

Figura 16: Cromatograma da purificação das frações 2 e 3 de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> de *C. uniflora*. Detectado em CLAE 540 DAD, em 280 nm, com um tempo de corrida de 60 minutos. Fase móvel utilizada para a separação foi acetonitrila (solvente A) e ácido fosfórico (1%), ácido acético (10%), acetonitrila (5%) (v/v/v) e água (84%) (solvente B). O programa de eluição de gradiente linear foi: 0 min, 100% (solvente B), 30 min 70% e 30% do solvente A, 40 min, 100% (solvente A). ..... 52

Figura 17: Valores das IC<sub>50</sub> do extrato bruto das folhas e flores de *C. uniflora* e das frações de AcOEt, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> e BuOH das flores de *C. uniflora*, estes foram comparados com os padrões vincristina e doxorubicina em duas linhagens celulares (B-16 e HaCaT). ..... 52

Figura 18: Efeito do extrato hidroalcoólico de *Calea uniflora* (30 mg/Kg, 100 mg/Kg e 300 mg/Kg, v.o.) nas contorções abdominais induzidas por ácido acético 0,6% em camundongos. Os dados representam média ± erro padrão da média de oito animais e estão expressos de acordo com o número de contorções realizadas pelos animais durante os 20 minutos subsequentes à injeção do ácido acético. \*p≤0,05, comparado ao controle (ANOVA/Dunnet)..... 54

Figura 19: Efeito do extrato hidroalcoólico de *Calea uniflora* (30mg/Kg, 100mg/Kg e 300mg/Kg, v.o.) em relação à primeira (A) e segunda fase (B) da nocicepção induzida pela injeção intraplantar de formalina 2,5% em camundongos. Os dados representam média ± erro padrão da média de oito animais e estão expressos de acordo com o tempo (s) que os animais permaneceram lambendo as patas. \*p≤0,05; \*\*p≤0,01, comparado ao controle (ANOVA/Dunnet)..... 54

Figura 20: Efeito do extrato hidroalcoólico de *Calea uniflora* (30mg/Kg, 100mg/Kg e 300mg/Kg, v.o.) em relação ao modelo da placa quente (hot plate). Os dados representam média ± erro padrão da média de oito animais e estão expressos de acordo com o tempo (s) que os animais permaneceram sobre a superfície aquecida sem lamber as patas. \*p≤0,05; \*\*\*p≤0,001, comparado ao controle (ANOVA/Dunnet). ..... 56

Figura 21: Efeito do extrato hidroalcoólico de *Calea uniflora* (30mg/Kg, 100mg/Kg e 300mg/Kg, v.o.) em relação à incoordenação motora e relaxamento muscular (rota rod) em camundongos. Os dados representam média  $\pm$  erro padrão da média de oito animais e estão expressos de acordo com o tempo (s) que os animais permaneceram no Rota-rod sem cair. (ANOVA/Dunnet).....57

Figura 22: Efeito do extrato hidroalcoólico de *Calea uniflora* (30mg/Kg, 100mg/Kg e 300mg/Kg, v.o.) no edema de pata induzido por carragenina em camundongos. Os dados representam média  $\pm$  erro padrão da média de oito animais e estão expressos de acordo com o volume das patas dos animais avaliados em diferentes intervalos de tempo (ANOVA de duas vias).....58

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

|                                 |   |
|---------------------------------|---|
| AcOEt                           | Acetato de etila                                |
| AINES                           | Anti-inflamatórios não esteroidal               |
| B16                             | Linhagem celular de melanona de murinho         |
| BuOH                            | Butanol   |
| <i>C. uniflora</i>              | <i>Calea uniflora</i>                           |
| CCD                             | Cromatografia de Camada Delgada                 |
| CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> | Diclorometano                                   |
| CLAE                            | Cromatografia Líquida de Alta Eficiência        |
| DMSO                            | Dimetilsulfóxido                                |
| F1                              | Fração 1  |
| F2                              | Fração 2  |
| HaCaT                           | Linhagem celular humana                         |
| i.p                             | Via intraperitoneal                             |
| IASP                            | International Association for the Study of Pain |
| IL-1                            | Interleucina 1                                  |
| OMS                             | Organização Mundial da Saúde                    |
| PBS                             | Tampão fosfato salino                           |
| UV                              | Ultravioleta                                    |
| v.o                             | Via oral  |

## SUMÁRIO

|  |           |
|--|-----------|
| 1 INTRODUÇÃO .....   | 17        |
| 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....  | 20        |
| 2.1 ETNOFARMACOLOGIA .....   | 20        |
| 2.2 <i>Calea uniflora</i> .....                                      | 20        |
| 2.3 METABÓLITOS SECUNDÁRIOS.....                                     | 22        |
| 2.4 COMPOSTOS FENÓLICOS.....   | 24        |
| <b>2.4.1 Flavonoides .....</b>                                       | <b>25</b> |
| 2.5 ALCALOIDES .....   | 26        |
| 2.6 TOXICOLOGIA DAS PLANTAS .....                                    | 27        |
| 2.7 DOR .....  | 28        |
| 2.8 INFLAMAÇÃO .....   | 31        |
| 3 OBJETIVOS .....  | 34        |
| 3.1 OBJETIVO GERAL .....   | 34        |
| 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....                                       | 34        |
| 4 METODOLOGIA .....  | 35        |
| 4.1 MATERIAL BOTÂNICO .....  | 35        |
| 4.2 EXTRATOS.....  | 35        |
| <b>4.2.1 Preparação da droga vegetal.....</b>                        | <b>35</b> |
| <b>4.2.2 Extrato Hidroalcoólico .....</b>                            | <b>35</b> |
| <b>4.2.3 Fracionamento Líquido- Líquido .....</b>                    | <b>35</b> |
| 4.3 ANÁLISE FITOQUÍMICA .....  | 36        |
| <b>4.3.1 Cromatográfica de Camada Delgada (CCD).....</b>             | <b>36</b> |
| <b>4.3.2 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência.....</b>           | <b>36</b> |
| <b>4.3.3 Placas preparativas.....</b>                                | <b>37</b> |
| 4.4 ATIVIDADE CITOTÓXICA .....                                       | 37        |
| <b>4.4.1 Cultura de células e tratamento.....</b>                    | <b>37</b> |
| <b>4.4.2 Bioensaio MTT (viabilidade celular).....</b>                | <b>38</b> |
| 5. ATIVIDADE FARMACOLOGICA .....                                     | 39        |
| 5.1 ANIMAIS .....  | 39        |
| 5.2 ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA.....                                   | 39        |
| <b>5.2.1 Contorções abdominais induzidas por ácido acético .....</b> | <b>39</b> |
| <b>5.2.2 Teste da Formalina .....</b>                                | <b>39</b> |
| <b>5.2.3 Teste da Placa Quente.....</b>                              | <b>40</b> |
| <b>5.2.4 Rota rod .....</b>  | <b>40</b> |
| 5.3 ATIVIDADE ANTIINFLAMATÓRIA.....                                  | 41        |
| <b>5.3.1 Edema de pata induzido por carragenina.....</b>             | <b>41</b> |
| 5.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA .....  | 41        |
| 6 RESULTADOS.....  | 42        |
| 6.1 AVALIAÇÃO FITOQUÍMICA .....                                      | 42        |

|  |           |
|--|-----------|
| <b>6.1.1 Perfil do Extrato e frações em Cromatografia de Camada Delgada.....</b> | <b>42</b> |
| <b>6.1.2 Placas preparativas .....</b>   | <b>43</b> |
| <b>6.1.3 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) .....</b>               | <b>45</b> |
| 6.2 AVALIAÇÃO CITOTÓXICA.....  | 52        |
| 6.3 AVALIAÇÃO FARMACOLÓGICA .....  | 53        |
| <b>6.3.1 Avaliação da atividade Antinociceptiva .....</b>                        | <b>53</b> |
| 6.3.1.1 Contorções abdominais induzidas por ácido acético .....                  | 53        |
| 6.3.1.2 Teste da Formalina .....   | 54        |
| 6.3.1.3 Teste da Placa Quente .....  | 55        |
| 6.3.1.4 Rota Rod.....  | 56        |
| <b>6.3.2 Avaliação da Atividade Anti-inflamatória .....</b>                      | <b>57</b> |
| 6.3.2.1 Edema de pata induzido por carragenina.....                              | 57        |
| 7 DISCUSSÃO.....   | 59        |
| 8 CONCLUSÃO .....  | 66        |
| REFERÊNCIAS .....  | 67        |





## 1 INTRODUÇÃO

Desde os primórdios da existência humana, os homens buscam na natureza recursos para melhorar suas próprias condições de vida, aumentando suas chances de sobrevivência (GIRALDI; HANAZAKI, 2010). Dentro deste contexto, as plantas medicinais sempre foram utilizadas, sendo no passado o principal meio terapêutico conhecido para o tratamento de enfermidades pela população (ARNOUS; SANTOS; BEINNER, 2005). Apesar do seu emprego, na maioria das vezes empírico, elas continuam sendo utilizadas e não serão totalmente substituídas por fármacos sintéticos pela população (AMARAL et al., 2006). De acordo com a OMS (2000) cerca de 80% da população utiliza ainda algum tipo de erva buscando alívio para sintomas dolorosos ou desagradáveis.

A partir da metade do século XX o uso de medicamentos de origem sintética, tornou-se mais amplo que o uso de plantas medicinais, principalmente na sociedade ocidental, porém países em desenvolvimento continuaram fazendo o uso de propriedades curativas das plantas (SOUZA-MOREIRA; PIETRO; SALGADO, 2010).

Os fármacos sintéticos são a grande maioria no mercado, representando em torno de 51%. Os produtos naturais representam cerca de 6%, os derivados de produtos naturais (semisintéticos) em torno de 27%, e os obtidos por síntese total, onde os produtos naturais podem ser considerados protótipos 16% (CECHINEL-FILHO; YUNES, 2009).

O Brasil pode ser um exemplo de país em desenvolvimento que utiliza plantas medicinais, levando em consideração que possui uma rica biodiversidade vegetal, e que em sua grande parte ainda é desconhecida pela comunidade científica, pois apenas 8% das espécies vegetais foram estudadas, o que estimula grande interesse de pesquisadores a investigar novas plantas, a fim de descobrir novas moléculas bioativas (GUERRA; NODARI, 2003).

A Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos (2006), afirma que “além de uma ampla biodiversidade, o Brasil é detentor de uma rica diversidade cultural e étnica que resultou em um acúmulo considerável de conhecimentos e tecnologias tradicionais, passados de geração a geração, entre os quais se destaca o vasto acervo de conhecimentos sobre manejo e uso de plantas medicinais”.

Dentro deste contexto, chegamos ao termo “Etnobotânica”, que segundo alguns autores “é a área que envolve os estudos sobre a utilização de plantas, inclusive para fins medicinais” (COSTA, MAYWORM, 2011), na qual resgatam e valorizam o conhecimento

tradicional e a diversidade cultural a ser estudada (OLIVEIRA et al., 2010). Através da etnobotânica é possível buscar o conhecimento e o resgate do saber botânico tradicional, particularmente relacionado aos recursos da flora. Essas informações quando comprovadas cientificamente, podem ser utilizadas pela sociedade de forma mais segura (MARTINS et al., 2005; GUARIM NETO; SANTANA; BEZERRA DA SILVA, 2000).

As plantas medicinais só poderão ser consideradas fitoterápicas, quando utilizadas corretamente, numa condição ideal e o princípio ativo identificado. Portanto, são necessários estudos químicos para o isolamento e caracterização de princípio(s) ativo(s) das plantas, farmacológicos, pré-clínicos, clínicos e toxicológicos. Em consequência, a recomendação do seu uso como planta medicinal deve ser validada e incluída em literatura científica pertinente (BRASIL, 2010).

A diversidade química dos vegetais está relacionada ao seu metabolismo secundário, na qual ocorrem inúmeras reações químicas, onde os compostos químicos são formados, degradados ou transformados. Essas reações visam o aproveitamento de nutrientes, para satisfazer as exigências fundamentais das células, bem como defesa da planta contra predadores (VIEGAS JR; BOLZANI; BARREIRO, 2006; SANTOS 2010). O efeito farmacológico das plantas se dá devido aos constituintes químicos presentes, a investigação deverá ser direcionada para o isolamento e posteriormente a elucidação estrutural dos mesmos, pois pode ser uma fonte rica de material de partida para descoberta de moléculas bioativas e desenvolvimento de novos fármacos (FALKENBERG; SANTOS; SIMÕES, 2010).

Informações populares passadas entre gerações podem ser um ponto de partida para a pesquisa de plantas medicinais, uma vez que a população faz empiricamente o uso das plantas e a ciência possui meios científicos que podem comprovar e/ou desmistificar estas informações.

Através de encontros mensais de “Compartilhando Saberes sobre as Plantas Medicinas” com as agentes da Pastoral da Saúde da Diocese de Criciúma (SC) Regional Sul IV juntamente com professores da UNESC, foi estudada a planta medicinal *Calea uniflora* Less., quanto aos aspectos taxonômicos, agroecológicos, etnobotânicos e terapêuticos. Esta planta é conhecida popularmente na região como arnica da praia (ROSSATO; CHAVES, 2012).

Devido a sua grande utilização popular na região sul de Santa Catarina é relevante realizar mais estudos de *Calea uniflora* Less, já que esta possui poucos estudos científicos. Por tanto, o presente trabalho

teve como objetivo traçar o perfil fitoquímico dos extratos brutos das folhas e flores e frações das flores bem como avaliar atividade citotóxica *in vitro* e atividade farmacológica, que poderão auxiliar em pesquisas futuras no desenvolvimento de novas moléculas bioativas.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 ETNOFARMACOLOGIA

Levantamentos etnofarmacológicos de plantas medicinais são úteis para a conservação e descoberta de novos recursos biológicos. Durante as últimas décadas grande quantidade das pesquisas farmacológicas foram realizadas a partir do uso tradicional de plantas e estas foram ganhando progressivamente atenção considerável pelo mundo (KADIR; SAYEED; MIA, 2012).

A etnofarmacologia não se trata de superstições, e sim do conhecimento popular relacionado a sistemas tradicionais de medicina. Para apreciar o conhecimento popular é preciso admiti-lo como um corpo de conhecimento, um produto do intelecto humano e não pode ser preconceituoso (ELIZABETSKY, 2003).

De acordo com Bruhn e Holmsted (1982), define-se a etnofarmacologia como: “exploração científica interdisciplinar dos agentes biologicamente ativos tradicionalmente empregados ou observados pelo homem”.

A seleção etnofarmacológica de plantas para pesquisa e desenvolvimento, baseada na alegação feita por seres humanos de um determinado efeito terapêutico *in vivo*, pode ser um valioso atalho para a descoberta de novos fármacos. Neste contexto, o uso tradicional pode ser encarado como uma pré-triagem quanto à propriedade terapêutica (ELIZABETSKY, 2003).

No entanto, as plantas medicinais e os conhecimentos associados a elas, estão sendo seriamente esgotados devido ao desmatamento ambiental, degradação e migração de curandeiros medicinais para outros trabalhos que vem ocorrendo no país (KADIR; SAYEED; MIA, 2012).

Por isso, os estudos etnofarmacológicos não devem ser esquecidos, sendo importantes e podendo ser um ponto de partida para a descoberta de novas moléculas bioativas. Através das informações populares relatadas pela Pastoral da Saúde-Regional Sul IV, houve interesse em estudar a planta medicinal *C. uniflora*, devido a sua grande utilização popular regional. Frente a essas informações e usos verificou-se a necessidade de estudos fitoquímicos e atividade citotóxica e farmacológica.

### 2.2 *Calea uniflora* Less.

Entre as espécies vegetais, a família Asteraceae se destaca pelos 1.600 gêneros e cerca de 23.000 espécies espalhadas pelo mundo, ocorrendo predominantemente em regiões temperadas, subtropicais e tropicais (FERNANDES; RITTER, 2009). Dentro desta família encontramos 80 espécies do gênero *Calea*, e estas estão distribuídas do norte ao sul do Brasil (MONDIN, BRINGEL, ROQUE, 2013).

As plantas do gênero *Calea*, até o presente momento, foram pouco estudadas. No entanto, estudos já publicados mostram que a planta é rica em constituintes ativos como: lactonas, sesquiterpenos, flavonoides, saponinas e derivados de acetofenona. Além disso, algumas espécies de *Calea* foram estudadas quanto a sua atividade biológica, o que demonstra um grande interesse científico sobre este gênero. Entre as espécies de *Calea* já estudadas, como medicinais podemos citar: *Calea uniflora* (NASCIMENTO; OLIVEIRA, 2004; NASCIMENTO; SILVA; OLIVEIRA, 2002); *Calea clematidea* (FERRAZ et al., 2009); *Calea platylepis* (NASCIMENTO; OLIVEIRA, 2004; NASCIMENTO; SILVA; OLIVEIRA, 2002); *Calea hymenolepis* (BOHLMANN et al., 1982; BOHLMANN et al., 1981); *Calea prunifolia* (CASTRO et al., 1989); *Calea leptcephala* (OBER; URBATSCH; FISCHER, 1986); *Calea megacephala* (OBER; URBATSCH; FISCHER, 1987); *Calea urticifolia*, *Calea zecalechichi* (HERZ; KUMAR, 1980).

Dentro deste gênero, encontramos a planta medicinal *Calea uniflora* Less. (Figura 1). Esta é uma erva perene, ereta ou ascendente, pouco ramificada na base, suas folhas são opostas, lanceoladas ou ovais, com base cuneada, arredondada ou subcordada, de margem serreada, cartáceas, estrigosas em ambas as faces ou moderadamente pilosa. As flores são capítulos solitários no ápice dos ramos longamente pedunculados, com flores marginais de 8-12 por capítulos apresentando coloração amarela; seu fruto cipsela tetrágona, é densamente pubescente a serícea, apresentando coloração castanho escura a preta (MONDIN, 2004).

*Calea uniflora* é nativa da região sul, mas também é encontrada na região sudeste e centro-oeste do Brasil (Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, São Paulo), Argentina, Uruguai e Paraguai (MONDIN, 2004).

Esta planta é conhecida popularmente como arnica-da-praia, e muito utilizada como medicinal na região sul de Santa Catarina.

Nesta região a população relata que a forma farmacêutica mais utilizada é a tintura, preparação alcoólica ou hidroalcoólica resultante da extração de drogas vegetais (BRASIL, 2011). O farmacógeno utilizado são as flores (maioria) e raízes, o solvente utilizado é o álcool e a cachaça (ROSSATO et al., 2011).

Segundo estudos fitoquímicos realizados por Nascimento e Oliveira (2004) *C. uniflora* possui os compostos glicosídeo 5 deoxiflavone, 3',4',7-trihidroxiavona-7-O- $\beta$ -glucopiranosídeo; 2',4-dihidroxi-3-methoxichalcona-4-O- $\beta$ -glucopiranosídeo e quercetina-3-O- $\beta$ -galactopiranosídeo.

Quanto à atividade biológica de *C. uniflora*, já foram estudadas a atividade leishmanicida (NASCIMENTO et al., 2007), atividade antifúngica (NASCIMENTO et al., 2004), ação tripanocida (NASCIMENTO et al., 2002) e ação genotóxica (FERRAZ et al., 2009). No entanto, são necessários outros estudos, uma vez que a planta é utilizada popularmente, sua atividade farmacológica deve ser comprovada, ao mesmo tempo em que se deve verificar os possíveis efeitos tóxicos desta espécie.

De acordo com as informações populares a planta medicinal é utilizada popularmente para atividade anti-inflamatória, dor, hematomas, antisséptico (picada de mosquito), reumatismo, infecções urinárias e gripe (ROSSATO et al., 2011).

Figura 1: Detalhe de *C. uniflora* Less



Fonte: (Autor, 2013).

### 2.3 METABÓLITOS SECUNDÁRIOS

Os compostos químicos formados, degradados ou simplesmente transformados são chamados de metabólitos secundários. Estes

metabólitos são biossintetizados através de reações enzimáticas denominadas anabólicas, catabólicas ou de biotransformação. Essas reações visam primeiramente ao aproveitamento de nutrientes para satisfazer as exigências fundamentais da célula: ATP (energia), NADPH (poder redutor) e biossíntese das substâncias essenciais à sua sobrevivência macromoléculas celulares (SANTOS, 2010).

Os metabólitos primários são considerados imprescindíveis à vida da planta, os aminoácidos, nucleotídeos, açúcares e lipídios presentes nas plantas exercem papéis fundamentais associados à fotossíntese, respiração, crescimento e desenvolvimento. Já os metabólitos secundários são sintetizados para garantir a sobrevivência pelo organismo vegetal e perpetuação da espécie em seu ecossistema. Os metabólitos secundários são divididos em quatro classes principais: os terpenos, glicosídeos, alcaloides e compostos fenólicos (cumarinas, flavonoides, taninos e ligninas), sendo estes compostos os responsáveis pela atividade biológica das plantas (SANTOS, 2010; GARCIA; CARRIL, 2009; FUMAGALI et al., 2008).

A composição química das plantas pode variar de acordo com a temperatura, índice pluviométrico, radiações ultravioletas, nutrientes, composição atmosférica; podendo ser também por modificações resultantes da interação dos processos bioquímicos, fisiológicos, ecológicos e evolutivos (Figura 2). A época e o horário da coleta das plantas são fatores importantes, pois muitas vezes as quantidades destes compostos ativos não são constantes durante o ano e em determinados horários (GOBBO-NETO; LOPES, 2007).

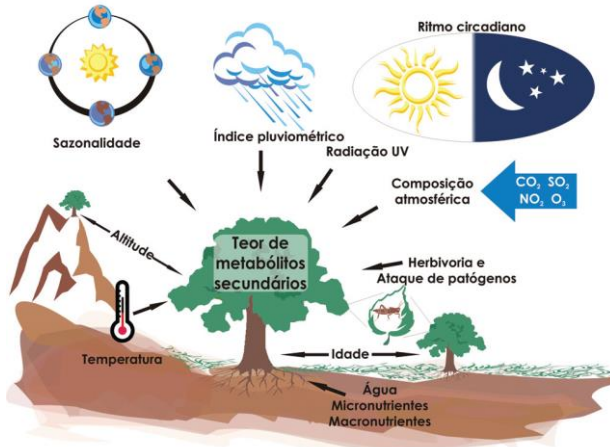
Outros fatores que influenciam na quantidade dos metabólitos secundários são a idade de desenvolvimento da planta e os órgãos vegetais que são responsáveis pelo armazenamento destes compostos. Muitas vezes os metabólitos são produzidos por órgãos que não estão em desenvolvimento dificultando a produção de compostos (GOBBO-NETO; LOPES, 2007).

As plantas medicinais contêm vários constituintes, e alguns deles estão presentes em concentrações muito baixas. Com o auxílio de procedimentos químicos analíticos modernos, os metabólitos secundários presentes nos extratos das plantas podem ser isolados e caracterizados (CALIXTO, 2000).

A análise de substâncias ativas é muito mais complexa e longa. Geralmente os compostos presentes em menor proporção na planta são os que apresentam melhores efeitos biológicos. Por isso, um trabalho em colaboração entre químicos e farmacologistas é necessário para a análise

dos extratos, a fim de verificar as atividades biológicas (CECHINEL-FILHO; YUNES, 1998).

Figura 2: Principais fatores que podem influenciar o acúmulo de metabólitos.



Fonte: (Gobbo-Neto; Lopes, 2007).

Os metabólitos secundários de plantas são usualmente classificados de acordo com a sua rota biosintética. As três principais classes de moléculas são: os compostos fenólicos, terpenóicos e esteróides, e os alcalóides (FUMAGALI et al., 2008). De acordo com os estudos realizados com a planta *C. uniflora*, abordaremos os flavonóides, que pertencem à classe dos compostos fenólicos e os alcalóides.

## 2.4 COMPOSTOS FENÓLICOS

Os compostos fenólicos pertencem a uma classe de compostos que incluem grande diversidade de estruturas, simples e complexas, as quais possuem, no mínimo, um anel aromático, em que pelo menos um hidrogênio é substituído por um grupo hidroxila. Os compostos fenólicos podem ser classificados de acordo com o esqueleto básico como: flavonóides, isoflavonóides, taninos, ácido fenólicos entre outros (CARVALHO; GOSMANN; SCHENKEL, 2010). Esse grande grupo faz parte dos constituintes de uma variedade de vegetais, frutas e



produtos industrializados (BRAND-WILLIAMS; CUVELIER; BERSET, 1995).

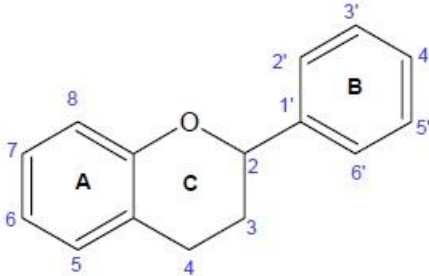
### **2.4.1 Flavonoides**

As substâncias fenólicas possuem um ou mais núcleos aromáticos contendo substituintes hidroxilados ou seus derivados funcionais. Entretanto, a maioria dos representantes dessa classe possui 15 átomos de carbono em seu núcleo funcional, constituído de duas fenilas ligadas por uma cadeia de três carbonos entre elas ( $C_6C_3C_6$ ). Os flavonoides são subdivididos nos seguintes grupos: flavononas, flavonas, isoflavonas, flavonóis e antocianinas (BEECHER, 1999). Além disso, eles possuem várias atividades biológicas, incluindo atividade antimicrobiana, antivirais, anti-inflamatórias, imunomoduladores, atividade antioxidante e atividade antitrombótica (HAVSTEEN, 1983; MIDDLETON; KANDASWAMI, 1992). Dentre estas atividades biológicas, a atividade anti-inflamatória tem sido muito utilizada na medicina chinesa e na indústria de cosméticos através dos extratos vegetais (PARK et al., 2004).

Os flavonoides são compostos polifenólicos biossintetizados a partir da via dos fenilpropanoides e do acetato, precursores de vários grupos de substâncias como aminoácidos alifáticos, terpenoides, ácidos graxos, entre outros (ZUANAZZI; MONTANHA, 2010). Essa classe de compostos representa um dos grupos fenólicos mais importantes e diversificados entre os produtos de origem vegetal, sendo amplamente distribuídos em frutas, vegetais, sementes, flores e cascas de árvores e vários destes alimentos são parte integrante da dieta humana (COOK; SAMMAN, 1996). Os flavonoides são os responsáveis pelo aspecto colorido das flores e folhas e podem estar presentes em outras partes da planta, participando também de importantes funções no crescimento, desenvolvimento e na defesa dos vegetais contra o ataque de patógenos (NIJVELDT et al., 2001).

Dos 40 fármacos anti-inflamatórios aprovados entre 1983 e 1994, 12 foram derivados ou baseados nos polifenóis de origem natural (YOON & BAEK, 2005).

Figura 3: Estrutura básica de flavonoide.



Fonte: (Beecher, 1999).

## 2.5 ALCALOIDES

Os alcaloides são compostos nitrogenados farmacologicamente ativos, que são encontrados predominantemente nas angiospermas. “Alcaloides são substâncias orgânicas cíclicas que contém um nitrogênio em um estado de oxidação negativo e cuja distribuição é limitada entre os organismos vivos” (BRUNETON, 2003).

Essa definição englobaria todos os compostos que até o momento foram considerados alcaloides, porém os compostos nitrogenados como as aminas simples, aminoácidos, proteínas, ácidos nucleicos, entre outros, seriam excluídos. Com isso os alcaloides que possuem um átomo de nitrogênio em um anel heterocíclico são chamados de alcaloides verdadeiros e são classificados de acordo com o sistema anelar presente na molécula. As substâncias que possuem o átomo de nitrogênio não pertencente a um sistema heterocíclico são os protoalcaloides e os compostos nitrogenados com e sem anéis heterocíclicos que não são derivados de aminoácidos são chamados de pseudoalcaloides (HENRIQUES et al., 2010).

Esses compostos são encontrados e representados em todos os grupos vegetais, sendo que sua maioria pertence às angiospermas. Os compostos estão presentes em todas as partes dos vegetais, podendo apresentar um acúmulo de substâncias em algum ou mais órgãos específicos (HENRIQUES et al., 2010).

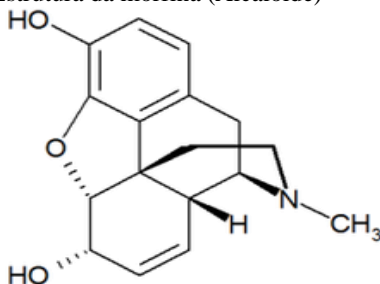
Muitas plantas medicinais apresentam compostos que devido ao seu amargor e a sua toxicidade atuam como repelentes de herbívoros, e com isso ajudam na proteção das espécies (RAMOS et al., 1998).

Quanto a sua atividade biológica, os alcaloides possuem ampla variedade, como: analgésica, antioxidante, antiviral e citotóxica

(NGOUMFO et al., 2010;ALMEIDA et al., 2009; PERES et al., 2003; YAMAMOTO et al., 1989).

Devido a grande utilização das plantas medicinais se faz necessário estudos químicos juntamente com estudos toxicológicos, pois frente aos resultados químicos obtidos, os compostos podem apresentar algum efeito tóxico. Sendo assim, a população poderá fazer o uso das plantas medicinais de forma segura.

Figura 4: Estrutura da morfina (Alcaloide)



Fonte: (Henriques et al., 2010).

## 2.6 TOXICOLOGIA DAS PLANTAS

A toxicidade é a ciência que estuda os efeitos adversos das substâncias químicas na qual interagem com organismos vivos. Existem relatos de milhares de anos que mostram que o homem utilizava venenos de animais ou extraídos de plantas para a caça, a guerra e até mesmo para assassinatos (ANDRADE FILHO, CAMPOLINA, DIAS 2001).

Com o uso milenar de plantas medicinais demonstrou-se, ao longo dos anos, que determinadas plantas apresentam substâncias potencialmente perigosas, e estas devem ser utilizadas com cuidado respeitando os seus riscos toxicológicos (VEIGA-JUNIOR; PINTO; MACIEL, 2005). Com isso o homem teve que aprender a distinguir uma planta venenosa de outra que pudesse servir de alimento (ANDRADE FILHO, CAMPOLINA, DIAS. 2001).

De acordo com os dados da Sinitox (2010), foram registrados 1377 casos de intoxicação com plantas medicinais e, destes, cinco casos foram a óbito.

As substâncias que mais apresentam toxicidade para animais e humanos são classificados segundo sua origem, estrutura química ou os

efeitos que causam. As classes que frequentemente apresentam toxicidade são os alcaloides, glicosídeos cardioativos, compostos calcinogênicos e cianogênicos (ABREU-MATOS et al., 2011).

Dentro da toxicologia encontramos alguns elementos fundamentais, sendo um deles a toxicidade, que representa, por sua vez, a capacidade de uma substância química produzir efeito adverso quando interage com um organismo vivo. A toxicidade de uma substância depende da dose e de outras condições da exposição ao toxicante, assim como o sistema biológico (MOREAU, SIQUEIRA, 2008).

Dentro dos processos da toxicologia existem os estudos citotóxicos. A citotoxicidade é considerada, principalmente, como potencial que um composto tem para induzir a morte celular. Os testes citotóxicos *in vitro* são necessários para investigar a potencialidade de lesão ou morte celular, causada por extratos, frações ou compostos isolados de plantas medicinais (EISENBRAND et al., 2002).

A investigação da atividade citotóxica pode ser atribuída a pontos positivos e negativos. Dentre os pontos positivos podemos citar a importância de compostos tóxicos para as células, frente ao desenvolvimento de fármacos anticancerígenos. Já por outro lado, deve-se ter muito cuidado com a utilização desordenada das plantas medicinais, pois a população faz uso de plantas que não são validadas, desconhecendo os efeitos tóxicos que determinadas substâncias podem produzir à saúde humana (FRESHNEY, 2001).

Antes da aprovação de qualquer composto novo a ser testado em seres humanos, são realizados ensaios *in vitro* e *in vivo*. Após estes testes em animais parte-se para os testes pré-clínicos e clínicos.

De acordo com a classe de metabólitos encontrados em *C. uniflora*, verificou-se a necessidade de estudar a atividade antinociceptiva e anti-inflamatória, pois estes compostos encontrados podem ser os responsáveis pelas atividades farmacológicas relatadas pela Pastoral da Saúde.

## 2.7 DOR

Os sistemas sensoriais do organismo humano têm a função de informar ao cérebro sobre o estado interno e externo do organismo, sempre buscando o controle da homeostase (LE BARS; GOZARIUM; CADDEN, 2001).

Nos últimos anos grandes avanços foram feitos na compreensão dos mecanismos que estão por trás da dor e no tratamento de pessoas que sofrem de dor. Afinal todos nós temos ou tivemos dores de cabeça,

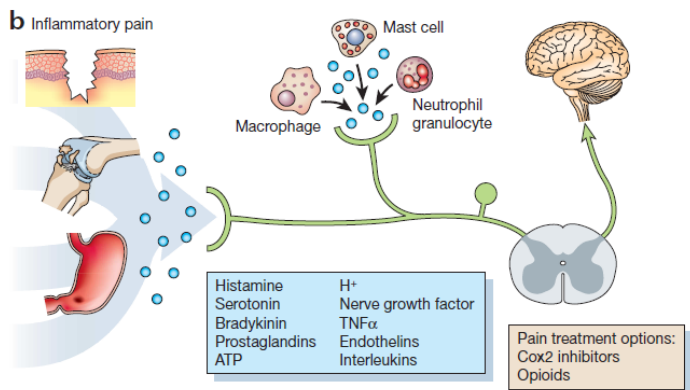
cortes, queimaduras em algum momento de nossas vidas (SHOLZ; WOOLF, 2002).

A percepção da dor é frequentemente provocada por um estímulo nocivo, lesão ou até mesmo por doenças. De acordo com a International Association for the Study of Pain (IASP), a dor pode ser definida como “uma experiência sensorial e emocional desagradável associada com o tecido real ou potencial dano, ou descrito em termos de tal dano” (IASP, 2010).

Com isso a introdução de hipersensibilidade a estímulos normalmente inócuos podem auxiliar na reparação do dano tecidual, pois a dor serve normalmente como um dispositivo de aviso, um sistema de alarme que é ativado em resposta ao dano para o organismo lesado (SHOLZ; WOOLF, 2002).

Uma vez que o tecido foi danificado mecanicamente ou por infecção, isquemia, crescimento de um tumor ou por processos autoimunes, são liberados vários mediadores inflamatórios. Esses mediadores ativam diretamente os nociceptores provocando a dor, ou agem conduzindo uma sensibilização do sistema nervoso somatossensorial. Esse processo é característico de dor inflamatória, facilitando a ativação da via da dor até que o processo de cicatrização finalize (Fig.5) (SHOLZ; WOOLF, 2002).

Figura 5: Danos no tecido inflamatórios e células tumorais liberando mediadores químicos, ativando as propriedades dos nociceptores aferentes em resposta ao estímulo.



Fonte: (Scholz; Woolf, 2002).

A nociceção é um mecanismo pela qual são transmitidos os estímulos nocivos para o sistema nervoso central por transdutores especializados ligados às fibras sensoriais, que podem ser de pequeno, médio e grande calibre (fibras A $\delta$  e C). É ativada quando ocorrem danos nos tecidos, gerando alterações inflamatórias e neurais no local afetado (LOEZER; MELZACK, 1999). Então, o processo de transmissão da dor ocorre após os neurônios de primeira ordem transmitirem os impulsos pelas fibras A $\delta$  e/ou C até o SNC. Estas fibras apresentam características anatômicas e funcionais distintas, porém são componentes importantes para o início da transmissão do impulso nociceptivo (BASBAUM et al., 2009; FURST, 1999).

As fibras A $\delta$  são consideradas de diâmetro intermediário (2-6  $\mu$ m de diâmetro), são mielinizadas e apresentam velocidade de condução de 12-30 m/s. Existem dois tipos de nociceptores A $\delta$ , o tipo I e o tipo II. Ambos respondem ao estímulo mecânico intenso, porém podem apresentar respostas diferentes ao estímulo térmico, de acordo com a maneira como são afetados pela lesão tecidual (JULIS; BASBAM, 2001).

As fibras C são consideradas fibras finas (0,4-1,2  $\mu$ m de diâmetro) são amielinizadas e apresentam baixa velocidade de condução do impulso (0,65-2,0 m/s). Algumas fibras C são chamadas de nociceptores polimodais, ou seja, respondem a estímulos térmicos, químicos e mecânicos (JULIS; BASBAM, 2001).

Além do componente sensorial, a dor também apresenta o componente emocional (afetivo) que é característico do ser humano, e pode ser classificado utilizando diferentes critérios. Sendo assim, a dor pode ser classificada de acordo com o tempo de duração em dor aguda e dor crônica.

A dor aguda é definida como uma “resposta fisiológica adversa a um estímulo químico, térmico ou mecânico, podendo estar associada a cirurgias, traumas ou doenças agudas”. Na presença de uma lesão tecidual, ocorre a liberação de mediadores e posterior ativação dos nociceptores. Também pode ser vista como o início de uma fase extensa, persistindo por dias ou algumas semanas (CARR; GOUDAN, 1999).

A dor crônica ocorre quando a capacidade de recuperação do tecido é excedida, devido à extensão de um trauma e cicatrizes subsequentes. Não é apenas o prolongamento da dor aguda, são estimulações nociceptivas repetidas, que levam a uma variedade de modificações no SNC, produzindo uma adaptação às respostas simpáticas provocadas pela dor aguda (INCA, 2002).

Todos os tipos de dor crônica levam os pacientes a procurarem cuidados de saúde. Diferentemente da dor aguda, as terapias que proporcionam o alívio da dor transitória não resolvem o processo patológico (LOEZER; MELZACK, 1999).

O estímulo doloroso na dor aguda, leva em média 0,1s para chegar até o SNC. Já na dor crônica o tempo necessário é superior a 1s devido à destruição dos tecidos, se tornando uma dor mais intensa com o tempo (GUYTON; HALL, 2006).

## 2.8 INFLAMAÇÃO

A inflamação é uma resposta biológica complexa de tecidos vasculares contra a lesão tecidual causada por trauma físico, por substâncias químicas ou agentes microbiológicos, visando remover substâncias irritantes e a manutenção da homeostase. Pode ser classificada como aguda ou crônica, e envolve uma cascata de eventos bioquímicos que constituem o sistema vascular local e sistema imunológico, e diferentes tipos de células encontradas no tecido lesionado (SÁ; ANDRADE; SOUZA, 2013).

Em função destes eventos, surgem os sinais da inflamação, chamados de sinais cardinais, que compreendem: calor, rubor, dor, edema e perda de função (MEDZHITOV, 2010).

A inflamação aguda é caracterizada por vasodilatação, exudação de fluídos ricos em proteínas e migração de células para o local da lesão. Esse processo normalmente é de curta duração, levando horas ou dias e cessa quando ocorre a eliminação do agente agressor. Na inflamação crônica o processo tem duração mais prolongada (semanas, meses e anos). A inflamação ativa a destruição dos tecidos, enquanto isso ocorre simultaneamente tentativas de reparação (SHERWOOD; TOLIVER-KINSKY, 2004).

Uma resposta inflamatória típica consiste em quatro componentes: indutores inflamatórios; receptores que detectam os indutores; mediadores inflamatórios que são liberados a partir da ativação dos receptores; tecidos alvos afetados pelos mediadores inflamatórios (MEDZHITOV, 2010).

Os indutores inflamatórios podem ser de natureza física, química ou traumática (ROBBINS et al., 2010). Os danos ocasionados pelos agentes agressores são detectados por macrófagos residentes do tecido lesado, que induzem uma resposta inflamatória e ativam os nociceptores, causando sensação de dor na área afetada (MEDZHITOV, 2010). Isso ocorre devido à liberação de mediadores inflamatórios pelas

células danificadas como, histamina, bradicinina, e as prostaglandinas, que, além de provocarem reação inflamatória, levam a marginação e migração dos leucócitos para o tecido afetado, onde realizam fagocitose e outros processos atribuídos à resposta imune, sensibilizando também as terminações nervosas sensoriais, levando a nocicepção e a transmissão da dor (BECKER, 2013).

Concomitantemente, ocorre a produção de citocinas pró-inflamatórias, tais como fator de necrose tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) e interleucina-1 (IL-1), que ativam vias de sinalização em células endoteliais e regulam a expressão de moléculas de adesão para que uma maior quantidade de leucócitos e células fagocitárias possam se infiltrar para o sítio da lesão (FALCÃO et al., 2005; FERRERO-MILIANI et al., 2007). Além disso, aumentam a síntese de prostaglandinas e desencadeiam uma cascata de citocinas secundárias, como as quimiocinas, que atraem e ativam células inflamatórias móveis (LÓPES-POSADAS et al., 2008).

Mesmo sendo considerada uma resposta de defesa do organismo, as reações inflamatórias estão presentes em grande número de doenças encontradas na clínica. Logo, os fármacos anti-inflamatórios são extensamente utilizados em todos os ramos da medicina (RANG e DALE, 2012).

Os anti-inflamatórios não-esteroidal (AINEs) são medicamentos frequentemente utilizados para o tratamento de dor, inflamação e febre. Atuam inibindo COX-1 e COX-2, enzimas que catalisam a conversão do ácido araquidônico em prostaglandina, histamina, um precursor da síntese de prostaglandinas, prostaciclina e tromboxanos (GURPINAR et al., 2013). No trato gastrointestinal, prostaciclina e PGE2 exercem um efeito protetor através da redução da secreção de ácido, vasodilatação dos vasos sanguíneos da mucosa gástrica e estimulação da produção de muco (WHELTON, 1999). Devido à inibição destes agentes, os AINEs podem provocar sintomas gastrointestinais, incluindo lesões de mucosa, sangramento, úlcera péptica, entre outros (HAWKEY, 2000).

O córtex supra-renal é constituído por três zonas celulares, sendo que cada uma delas é responsável por sintetizar uma classe específica de hormônios esteróides (BECKER, 2013). O cortisol é o principal glicocorticosteroide e fornece muitas funções fisiológicas (ROBBINS et al., 2010). Devido à atuação do cortisol endógeno no metabolismo de diferentes moléculas como, proteínas, lipídios, carboidratos e tecido ósseo (SAPOLSKY et al., 2000), a administração dos glicocorticoides leva ao desenvolvimento de uma série de efeitos indesejados, como: ganho de peso e redistribuição de gordura; problemas ósseos como



osteoporose e fraturas; hiperglicemia; imunossupressão e vários outros (GENSLER, 2012).

Outra classe importante de medicamentos são os fitoterápicos. Estes são obtidos com o emprego exclusivo de matérias primas vegetal, cuja eficácia e segurança são validadas por meio de levantamentos etnofarmacológicos, de utilização, documentações tecnocientíficas ou evidências clínicas (BRASIL, 2010).

Apesar da grande gama de medicamentos anti-inflamatórios já presentes no mercado, a busca por novas opções terapêuticas nesta área permanece constante. Um dos principais motivos são os efeitos colaterais apresentados juntamente com a ação farmacológica e o elevado custo de alguns medicamentos (PRESIBELLA, 2003).

Frente a essas informações verifica-se a necessidade de mais estudos com as plantas medicinais, pois estas podem ser o ponto de partida para novos medicamentos.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar os constituintes químicos, atividade citotóxica, antinociceptiva e anti-inflamatória do extrato hidroalcoólico de *Calea uniflora* Less.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Verificar se o uso popular do extrato bruto hidroalcoólico das flores de *C. uniflora*. correspondem a ação dos constituintes químicos frente a atividade antinociceptiva e anti-inflamatória *in vivo*.
- Avaliar os constituintes químicos presentes no extrato bruto hidroalcoólico das flores e folhas de *C. uniflora*.
- Avaliar os constituintes químicos presentes nas frações de acetato de etila, diclorometano e butanol das flores *C. uniflora*.
- Avaliar atividade citotóxica *in vitro* do extrato bruto hidroalcoólico das flores e folhas e das frações das folhas de *C. uniflora*.
- Avaliar a atividade antinociceptiva de diferentes concentrações do extrato bruto hidroalcoólico das flores de *C. uniflora*, frente aos modelos animais: teste da formalina, teste da placa quente e contorções abdominais induzidas por ácido acético.
- Avaliar a atividade locomotora em diferentes concentrações do extrato bruto hidroalcoólico das flores de *C. uniflora*, frente ao modelo animal: rota rod.
- Avaliar a atividade anti-inflamatória em diferentes concentrações do extrato hidroalcoólico das flores de *C. uniflora*, frente ao modelo animal de edema de pata induzido por carragenina.

## **4 METODOLOGIA**

### **4.1 MATERIAL BOTÂNICO**

O material vegetal utilizado para as análises foram às partes aéreas (folhas e inflorescências) de *C. uniflora* Less., coletadas no município de Balneário Rincão. O material foi identificado pela botânica Dra. Vanilde Citadini Zanette, herborizada e exsiccado no Herbário Pe. Dr. Raulino Reitz (CRI) da Universidade do Extremo Sul Catarinense, com o n° de registo CRI 10304.

### **4.2 EXTRATOS**

#### **4.2.1 Preparação da droga vegetal**

As partes aéreas de *C. uniflora* foram secas em estufa entre 50°C a 60°C e posteriormente trituradas com auxílio de um moedor de facas para obtenção de um pó fino.

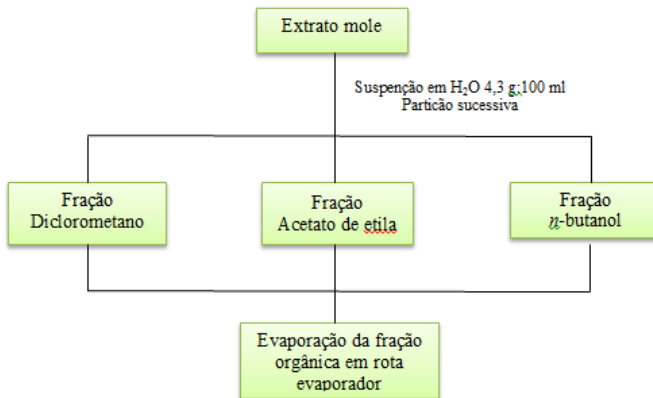
#### **4.2.2 Extrato Hidroalcoólico**

A preparação do extrato foi realizada pela técnica de maceração com álcool 70% na proporção 1:10 (p/v). A planta permaneceu 15 dias em maceração, após filtrada com algodão e, posteriormente, o solvente foi evaporado com auxílio de um rota evaporador, formando um extrato mole (BRASIL, 2011).

#### **4.2.3 Fracionamento Líquido- Líquido**

Em pêra de separação foi adicionado o extrato mole em 100 ml de água destilada. Em seguida o solvente extrator foi adicionado a mistura aquosa e a extração foi particionada em 3 vezes. Os solventes utilizados foram: diclorometano, acetato de etila e *n*- butanol. Após o fracionamento, os solventes foram eliminados com o auxílio de um rota evaporador para obtenção das frações (Figura 4) (CECHINEL-FILHO; YUNES, 1998).

Figura 6: Fluxograma adaptado do fracionamento líquido-líquido.



Fonte: (Cechinel-filho; Yunes, 1998).

## 4.3 ANÁLISE FITOQUÍMICA

### 4.3.1 Cromatografia de Camada Delgada (CCD)

As análises cromatográficas foram realizadas com os extratos brutos das flores e folhas de *C. uniflora* e com as frações obtidas do fracionamento líquido-líquido.

Os cromatogramas foram analisados em lâmpada UV no comprimento de onda de 365 nm e em seguida foram revelados com reveladores específicos, sendo eles: Anisaldeído sulfúrico para detecção de esteroides, saponinas e terpenos; Dragendorff para detecção de alcaloides; Neu para a detecção de flavonoides e Ninidrina para detecção de aminas livres (WAGNER; BLADT, 1996).

### 4.3.2 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

As análises por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) foram realizadas num cromatograma Waters Spherisorb ODS-2, coluna C18 (150x4,6mm. Tamanho de partícula 5 µm). A detecção dos picos foi realizada *on-line* através de um detector de arranjo de diodos (CLAE 540 DAD, Kontron instrumentos, Montigny Le

Bretonneux, França) em 280 a 310 nm, e o espectro de absorção (210-400 nm).

Os solventes utilizados para a separação foram: acetonitrila (solvente A) e ácido fosfórico (1%), ácido acético (10%), acetonitrila (5%) (v/v/v) e água (84%) (solvente B). O programa de eluição de gradiente linear foi: 0 min, 100% (solvente B), 30 min 70% e 30% do solvente A, 40 min, 100% (solvente A) (GIUSTI et al., 1999).

Foi pesado 1 mg do extrato bruto e das frações de *C. uniflora*, e acrescentou-se 1 mL de etanol (grau CLAE). Estas foram homegeinizadas em vórtex, filtradas e posteriormente injetados 20 µl das amostras diretamente no equipamento.

As referências utilizadas foram: ácido gálico, ácido cafeíco, ácido cumárico, ácido ferrúlico, quercetina, quinidina, campferol, ácido cinâmico, ácido protocatecuico.

### **4.3.3 Placas preparativas**

Como tentativa de isolamento dos metabólitos, as amostras foram submetidas à purificação em placas preparativas (sílica gel). Posteriormente estas placas foram submetidas a lâmpada UV onde visualiza-sepercebe-se as diferentes bandas através da fluorescência. Essas bandas foram separadas e purificadas novamente para obter compostos isolados.

## **4.4 ATIVIDADE CITOTÓXICA**

### **4.4.1 Cultura de células e tratamento**

Estudos *in vitro* foram realizados com uma linhagem celular de melanoma de murinho B16 e uma linhagem celular humana sadia HaCaT (queratinócitos humanos). A linhagem celular B16 foi cultivada em frascos estéreis na presença do meio de cultura RPMI 1640 contendo 5% soro bovino fetal, 5 mL de penicilina/estreptomicina. As células HaCaT foram mantidas como descrito anteriormente para B16, exceto a utilização de meio RPMI como meio de cultura (MILLOT et al., 2007).

Por estas células estarem aderidas à parede do recipiente, o meio cultural é descartado e as células são lavadas com uma solução de tampão PBS, pH 7,4. Em seguida as células são removidas com uma solução de tripsina (0,25% + EDTA 1 mM). Após foram transferidas para tubos cônicos contendo meio de cultura completo seguido de

centrifugação a baixa rotação. O meio de cultura e tripsina foram desprezados e as células ressuspensas em pequeno volume de meio completo. Foi feita a contagem com uma alíquota dessas células em uma câmara de Neubauer e coradas com Trypan Blue® para que em cada cavidade da placa de 96 poços fosse depositado um volume de 100 µL de meio contendo 10.000, 12.000 ou 15.000 células (100.000/mL, 120.000/mL ou 15.000/mL conforme a linhagem).

Após 24 horas de incubação o efeito das frações foi analisado. As frações foram previamente dissolvidas em DMSO, de tal forma que a concentração final deste solvente, não excedesse 0,5%. Foram utilizadas concentrações de cada fração-teste (12,5, 25, 50, 100, 200 e 400 µg/mL), e os testes realizados em triplicata (MILLOT et al., 2007).

#### **4.4.2 Bioensaio MTT (viabilidade celular)**

A preparação das células ocorreu conforme descrito no ítem 4.4.1. O ensaio de MTT (brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio) foi realizado como descrito anteriormente por MILLOT e colaboradores (2007). As amostras foram colocadas, em placas de 96 poços, contendo 1700, 1500 células por poço para as linhagens HaCaT e B16, respectivamente. Elas foram incubadas a 37°C em ambiente umidificado, contendo de 5-10% de CO<sub>2</sub>. O controle positivo foi tratado com o quimioterápico padrão doxorrubicina na concentração de 2,60 E<sup>-03</sup> para B-16, e 1,55 E<sup>-03</sup> HaCaT e a vincristina na concentração de 6,00 E<sup>-03</sup> para B-16 e 3,50 E<sup>-03</sup> para HaCaT. Os extratos testados foram: extrato bruto, frações de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, AcOEt e BuOH em diferentes concentrações incubados por 48 horas. Faltando 3 horas para o término do tratamento, 10µL de MTT foram adicionados para cada micro poço e mantidos a 37°C. Após 3 horas, o sobrenadante foi removido e os cristais formados foram dissolvidos em 50 µL de DMSO. A densidade óptica de cada amostra foi mensurada com o auxílio de leitor de microplacas em 540 nm. Cada experimento foi repetido três vezes pelo menos, em três ocasiões diferentes, permitindo com isso, a determinação do IC<sub>50</sub> (MILLOT et al., 2007).

## 5. ATIVIDADE FARMACOLOGICA

### 5.1 ANIMAIS

Foram utilizados camundongos swiss machos pesando aproximadamente 25-30 g, com idade entre 10 a 14 semanas de vida, fornecidos pelo Biotério da Universidade do Extremo Sul Catarinense (UNESC). Os animais foram alojados em caixas plásticas com cama de maravalha e mantidos em ambiente com temperatura ideal de 20°C a 22°C, umidade relativa de 40% a 60%, ciclo-claro escuro de 12 horas cada, controlados automaticamente. Os animais receberam água e ração “*ad libitum*”. Todos os procedimentos foram realizados de acordo com a aprovação do Comitê de Ética para Uso de Animais (CEUA/UNESC), que segue a Lei n° 11.794, de 8 de outubro de 2008, sob o número 019/2013.

### 5.2 ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA

#### 5.2.1 Contorções abdominais induzidas por ácido acético

Os animais foram tratados com o extrato de *C. uniflora* nas concentrações de 30, 100 e 300 mg/kg (v.o), ou veículo, 60 minutos antes da injeção do agente irritante. As contorções abdominais foram induzidas pela injeção intraperitoneal (i.p), de ácido acético (0,6%) diluído em PBS, e foram registradas durante um período de 20 minutos iniciados imediatamente após a aplicação da injeção. Os animais foram colocados individualmente em campanulas de vidro, com espelhos posicionados ao fundo, permitindo uma completa visualização do comportamento do animal (KOSTER et al., 1959; CHOI et al., 2003).

#### 5.2.2 Teste da Formalina

Neste teste os animais receberam 20 µL de formalina 2,5% na superfície plantar da pata posterior direita. Após os animais foram colocados individualmente em campanulas de vidro e observados por 30 minutos após a indução da nocicepção. Neste modelo podemos avaliar dois tipos de nocicepção: a primeira fase é causada pela ativação direta de nociceptores periféricos, compreendendo os 5 minutos após a injeção de formalina e a segunda fase é uma resposta inflamatória que ocorre entre 15 e 30 minutos após a injeção da formalina. O tempo em que os animais permaneceram lambendo ou mordendo a pata injetada foi

registrado com o auxílio de um cronômetro, considerado assim como indicativo de nocicepção.

Os animais receberam diferentes doses 30, 100 e 300 mg/Kg (v.o) do extrato de *C. uniflora*, ou veículo por via i.p 30 min antes da indução de nocicepção (HUNSKAAR; HOLE, 1987).

### 5.2.3 Teste da Placa Quente

Neste ensaio, os animais foram colocados sob uma superfície aquecida a  $52 \pm 1^\circ\text{C}$ . A medida do tempo decorrido entre a aplicação do estímulo e a reação de lambe as patas ou pular, foi registrada fornecendo assim o índice nociceptivo. Os animais foram tratados com o extrato de *C. uniflora*, nas doses de 30, 100 e 300 mg/kg (v.o), ou morfina na dose de 10 mg/kg (i.p.) 60 e 30 minutos antes da exposição do estímulo doloroso, respectivamente. Os animais do grupo controle receberam apenas o veículo. Um tempo máximo de 30 segundos foi adotado para evitar possíveis danos teciduais (LE BARS et al., 2001).

### 5.2.4 Rota Rod

Os animais foram treinados um dia antes da realização dos experimentos. No dia do experimento, os camundongos foram colocados no rota-rod 60 minutos após os tratamentos com o extrato de *C. uniflora*, nas doses de 30, 100 e 300 mg/kg (v.o), e o controle positivo (clonazepam 10mg/kg) e negativo (veículo) foram avaliados o número de quedas e o tempo de permanência na barra giratória. O número máximo de quedas permitidas será de 3, sendo que após a terceira o animal não será conduzido novamente ao equipamento (OLIVEIRA et al., 2008).



## 5.3 ATIVIDADE ANTIINFLAMATÓRIA

### 5.3.1 Edema de pata induzido por carragenina

Os animais foram tratados com as diferentes concentrações do extrato da planta (30, 100 e 300mg/kg v.o). O grupo controle negativo foi tratado com veículo (v.o), e o grupo controle positivo com dexametasona (10mg/kg i.p.). Após 60 minutos para o extrato e controle negativo e 120 min para o controle positivo, após foram submetidos a uma injeção subplantar de carragenina 1,5% (0,1 mL) na pata traseira direita. Na pata contralateral os animais receberam apenas veículo. O volume da pata do camundongo foi medido antes e imediatamente após a injeção do agente edematogênico, em intervalos pré-estabelecidos, utilizando o aparelho hidropletismômetro. A pata direita posterior dos animais foi submergida até o maléolo lateral em recipiente contendo um transdutor de volume ligado a um multímetro digital.

As variações de volumes, mediante a imersão das patas no recipiente, foram registradas pelo multímetro digital nos tempos zero (imediatamente após a injeção de carragenina), 0, 30, 60, 90, 120, 180 e 240 minutos após a injeção do agente flogístico (WINTER; RISLEY; NUSS, 1962).

## 5.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram analisados através da análise de variância (ANOVA) de uma ou duas vias seguida pelo teste de Dunnet ou Student Newman Kews, quando necessário. Os dados estão apresentados como média  $\pm$  o erro padrão da média (E.P.M). O programa utilizado para a análise estatística será o GraphPad Prims 5 e os resultados que apresentaram  $P$  menor que 0,05 ( $P \leq 0,05$ ) foram considerados estatisticamente significativos.

## 6 RESULTADOS

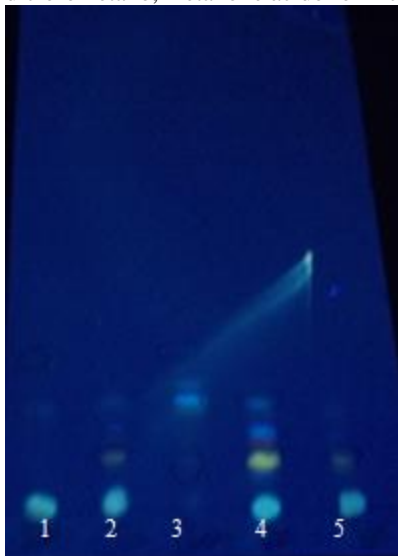
### 6.1 AVALIAÇÃO FITOQUÍMICA

#### 6.1.1 Perfil do Extrato e frações em Cromatografia de Camada Delgada

Foram analisados os extratos brutos e as frações de *Calea uniflora* frente a diferentes sistemas de eluentes. A fase móvel que apresentou uma separação mais eficiente foi a de diclorometano, metanol e ácido fórmico (90:10:0,5).

As frações de acetato de etila e diclorometano mostraram um perfil cromatográfico mais eficiente quando comparados com os extratos brutos e a fração de BuOH, sendo submetidas a placa preparativa, para possível isolamento das bandas apresentadas na figura 5 AcOEt (4) e  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (2).

Figura 7: Cromatografia de camada delgada dos extratos brutos (1 extrato bruto das folhas; 2 extrato bruto das flores) frações de *C. uniflora* (3  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ; 4 AcOEt; 5 BuOH). As amostras foram submetidas a placas cromatográficas de sílica gel 60 F<sub>254</sub> e analisadas em detector UV 365 nm após a migração em fase móvel diclorometano, metanol e ácido fórmico (90:10:0,5).



Fonte: (Autor, 2013).

### 6.1.2 Placas preparativas

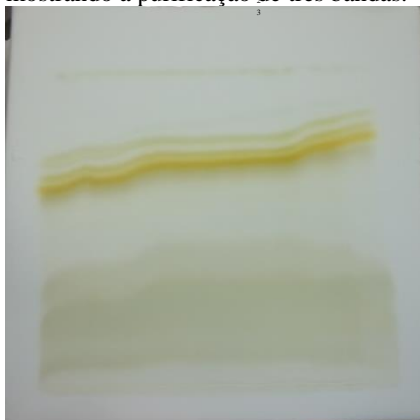
Na placa preparativa da fração de AcOEt, foi possível separar três bandas (figura 6). Já na fração de diclorometano separou-se duas bandas (Fr2 e Fr3). Com a finalidade de isolar possíveis compostos, estas frações foram submetidas novamente a outra placa preparativa e posteriormente foi realizado CCD, a fim de verificar a eficiência da separação.

Na figura 7, a placa das frações de AcOEt, foi revelada com o revelador Neu, que indica a presença de flavonoides para a coloração amarelo e laranja.

Na figura 8 a CCD foi revelada com o revelador Dragendorff, e este indicou a possível presença de alcaloides para a coloração marrom em luz visível.

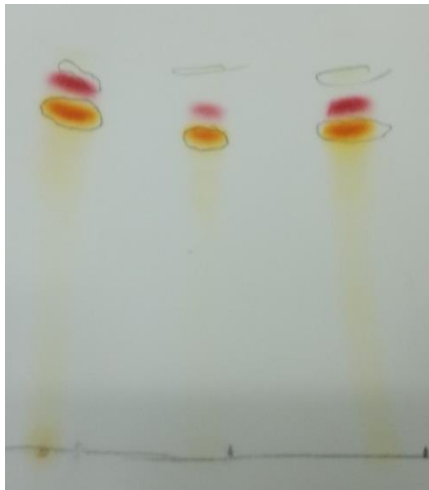
Após esta separação, as frações isoladas foram submetidas a novas CCDs e posteriormente ao CLAE 540 DAD, a fim de identificar os possíveis compostos presentes nas frações.

Figura 8: Placa preparativa de sílica gel 60 F<sub>254</sub> da fração de AcOEt, Fase móvel diclorometano, metanol e ácido fórmico (90:10:0,5) mostrando a purificação de três bandas.



Fonte: (Autor, 2013).

Figura 9: Cromatografia de camada delgada de sílica gel 60 F<sub>254</sub> de frações de AcOEt purificadas na placa preparativas, após ser revelada com o revelador específico Neu, que em luz visível apresentam coloração amarela e laranja indicam a presença de flavonoides.



Fonte: (Autor, 2013).

Figura 10: Cromatografia de camada delgada de sílica gel 60 F<sub>254</sub> de frações de AcOEt purificadas na placa preparativas, após ser revelada com o revelador específico Dragendorff, que em luz visível apresentou coloração marrom indicando a presença de alcaloides.



Fonte: (Autor, 2013).

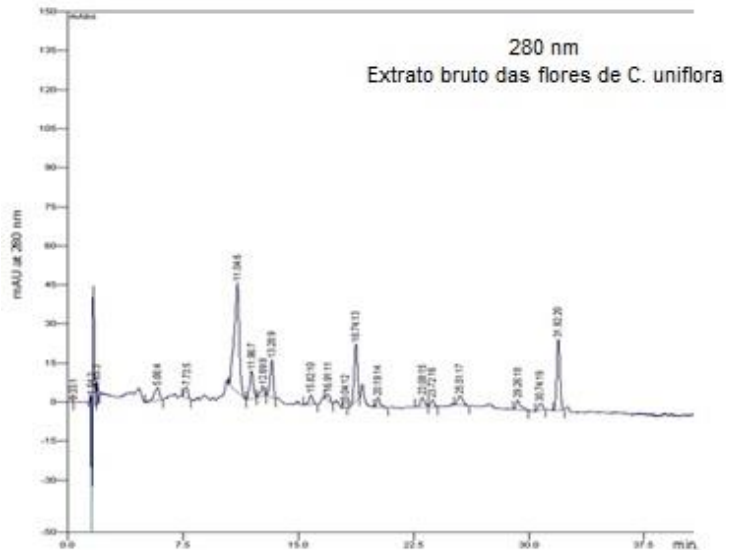
### 6.1.3 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

Os extratos brutos das folhas e flores juntamente com as frações de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , AcOEt e BuOH foram submetidos ao CLAE 540 DAD, em 280 nm, a fim de verificar os possíveis compostos químicos presentes.

As frações foram comparadas com as referências: ácido gálico, ácido cafeíco, ácido cumárico, ácido ferrúlico, quercetina, quinidina, camferol, ácido cinâmico, ácido protocatecuico.

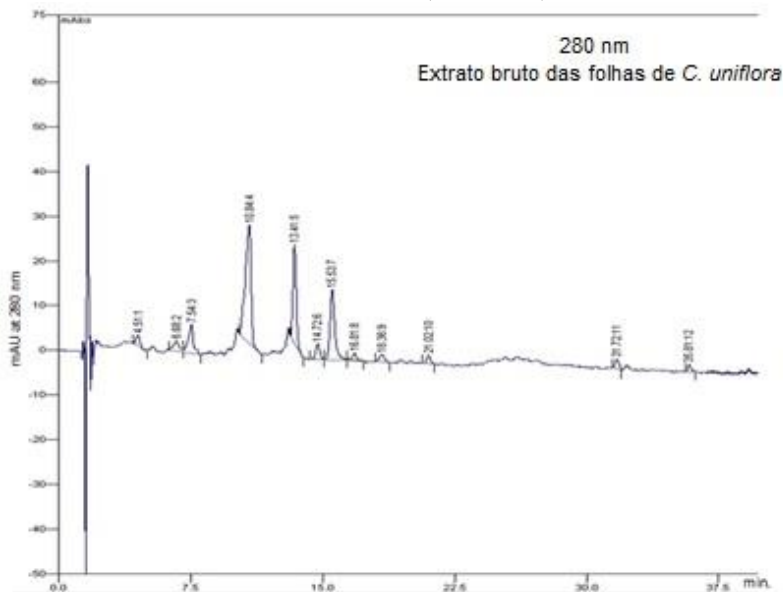
As figuras 9 e 10 mostram o cromatograma do extrato bruto das folhas e flores, na qual se verificou a presença de diferentes picos no extrato bruto das flores comparado com o extrato bruto das folhas, observa-se que o extrato bruto das flores apresentou mais picos, o que indica a presença de mais compostos químicos neste extrato.

Figura 11: Cromatograma do extrato bruto das flores de *C. uniflora*. Detectado em CLAE 540 DAD, em 280 nm, com um tempo de corrida de 60 minutos. Fase móvel utilizada para a separação foi acetonitrila (solvente A) e ácido fosfórico (1%), ácido acético (10%), acetonitrila (5%) (v/v/v) e água (84%) (solvente B). O programa de eluição de gradiente linear foi: 0 min, 100% (solvente B), 30 min 70% e 30% do solvente A, 40 min, 100% (solvente A).



Fonte: (Autor, 2013).

Figura 12: Cromatograma do extrato bruto das folhas de *C. uniflora*. Detectado em CLAE 540 DAD, em 280 nm, com um tempo de corrida de 60 minutos. Fase móvel utilizada para a separação foi acetonitrila (solvente A) e ácido fosfórico (1%), ácido acético (10%), acetonitrila (5%) (v/v/v) e água (84%) (solvente B). O programa de eluição de gradiente linear foi: 0 min, 100% (solvente B), 30 min 70% e 30% do solvente A, 40 min, 100% (solvente A).

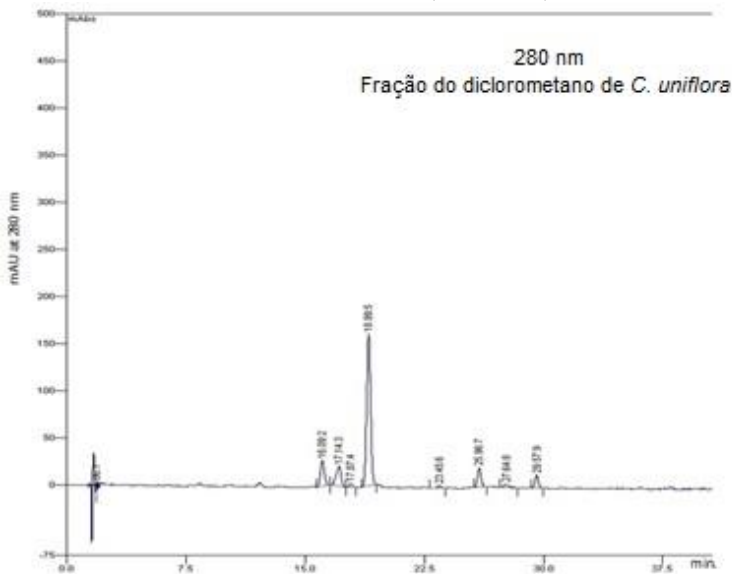


Fonte: (Autor, 2013).

As figuras 11, 12 e 13 mostram o cromatograma das frações obtidas no fracionamento líquido-líquido.

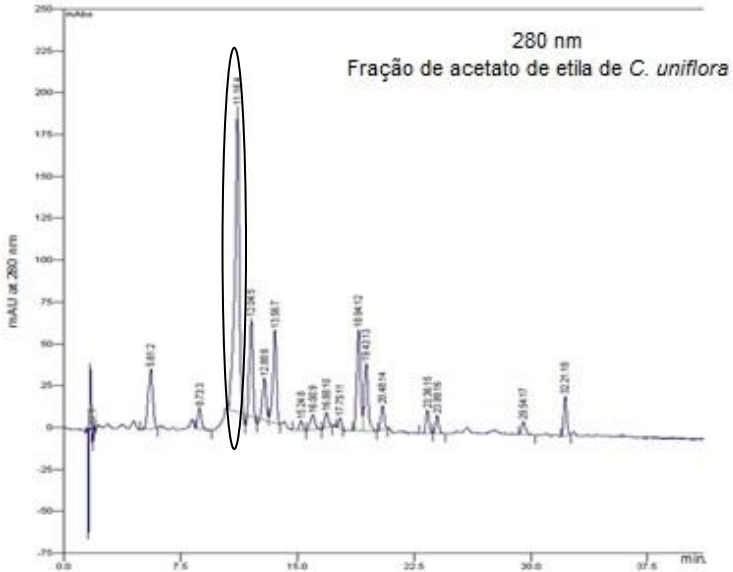
Os cromatogramas das frações de AcOEt e BuOH apresentaram mais picos sendo que um dos picos presentes nas frações são semelhantes, pois apresentaram o mesmo perfil cromatográfico e o mesmo tempo de retenção (10 a 15 min). Já a fração de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  apresentou menor número de picos, porém a fração do BuOH não apresentou uma separação eficiente nas CCDs e na placa preparativa, com os eluentes testados ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  / MeOH / Ac. Fór) em diferentes proporções como (9:1:0,5/ 5:5:0,5/ 6:4:0,5/ 4: 6:0,5)

Figura 13: Cromatograma das frações de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  de *C. uniflora*. Detectado em CLAE 540 DAD, em 280 nm, com um tempo de corrida de 60 minutos. Fase móvel utilizada para a separação foi acetonitrila (solvente A) e ácido fosfórico (1%), ácido acético (10%), acetonitrila (5%) (v/v/v) e água (84%) (solvente B). O programa de eluição de gradiente linear foi: 0 min, 100% (solvente B), 30 min 70% e 30% do solvente A, 40 min, 100% (solvente A).



Fonte: (Autor, 2013).

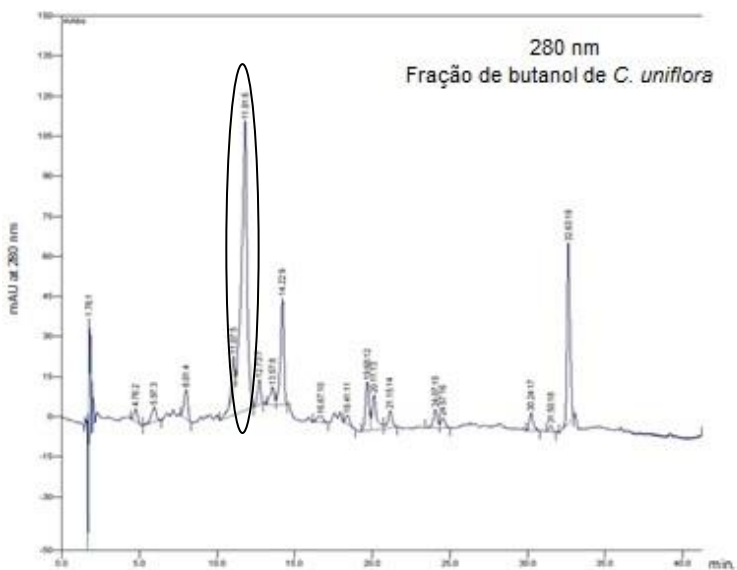
Figura 14: Cromatograma das frações de AcOEt de *C. uniflora*. Detectado em CLAE 540 DAD, em 280 nm, com um tempo de corrida de 60 minutos. Fase móvel utilizada para a separação foi acetonitrila (solvente A) e ácido fosfórico (1%), ácido acético (10%), acetonitrila (5%) (v/v/v) e água (84%) (solvente B). O programa de eluição de gradiente linear foi: 0 min, 100% (solvente B), 30 min 70% e 30% do solvente A, 40 min, 100% (solvente A).



Fonte: (Autor, 2013).



Figura 15: Cromatograma das frações de BuOH de *C. uniflora*. Detectado em CLAE 540 DAD, em 280 nm, com um tempo de corrida de 60 minutos. Fase móvel utilizada para a separação foi acetonitrila (solvente A) e ácido fosfórico (1%), ácido acético (10%), acetonitrila (5%) (v/v/v) e água (84%) (solvente B). O programa de eluição de gradiente linear foi: 0 min, 100% (solvente B), 30 min 70% e 30% do solvente A, 40 min, 100% (solvente A).

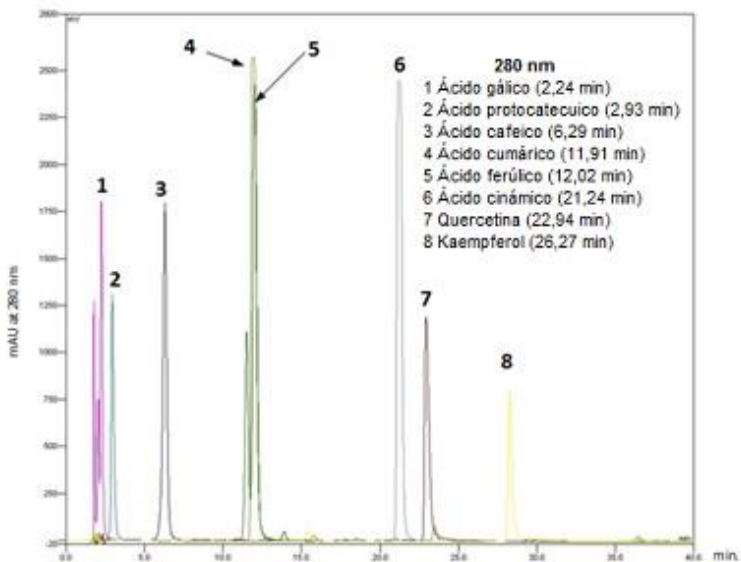


Fonte: (Autor, 2013).

Observamos os cromatogramas das figuras 11, 12 e 13 comparados com a figura 14, os picos encontrados não correspondem a nenhum dos compostos referência, por isso a necessidade de mais estudos para possível isolamento e caracterização, com o auxílio de outras técnicas como a ressonância magnética nuclear (RMN), para poder identificar os possíveis compostos presentes nos extratos e frações de *C. uniflora*.

Figura 16: Cromatograma das referências. Detectado em CLAE 540 DAD, em 280 nm, com um tempo de corrida de 60 minutos. Fase móvel utilizada para a separação foi acetonitrila (solvente A) e ácido fosfórico (1%), ácido acético (10%), acetonitrila (5%) (v/v/v) e água (84%) (solvente B). O programa de eluição de gradiente linear foi: 0

min, 100% (solvente B), 30 min 70% e 30% do solvente A, 40 min, 100% (solvente A).



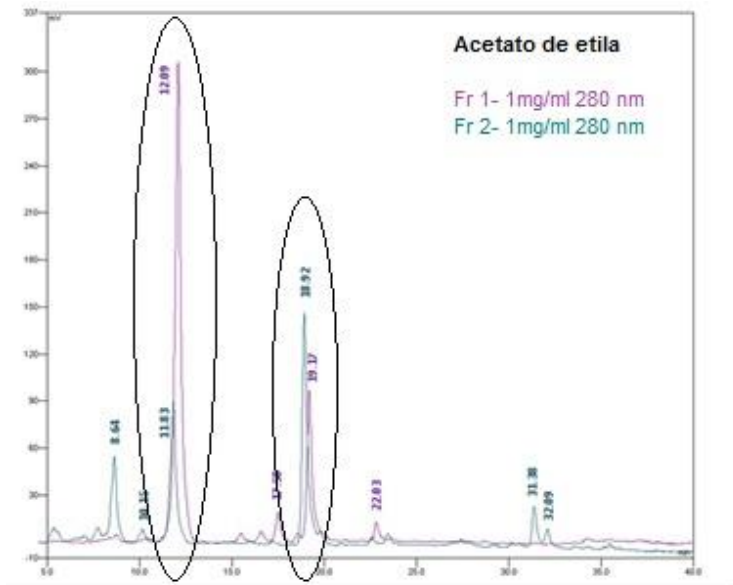
Fonte: (Autor, 2013).

As frações de AcOEt e  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  foram submetidas a placas preparativas para obter uma separação mais eficiente, pois nas CCDs estas frações apresentaram bandas separadas que instigou a investigação dos possíveis compostos.

A fração de AcOEt tanto quanto a fração de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  foram purificadas em F1 e F2, porém a F3 do AcOEt não apresentou nenhum pico, sendo descartada.

Na figura 15, podem ser observados alguns picos, sendo que dois destes saem praticamente no mesmo tempo de retenção e se sobrepõem, possuindo um perfil cromatográfico semelhante na Fração 1(F1) e Fração 2 (F2) do AcOEt. No entanto, os picos presentes neste cromatograma não correspondem as referências utilizadas, podendo ser outras classes de compostos que não correspondem as referências utilizadas.

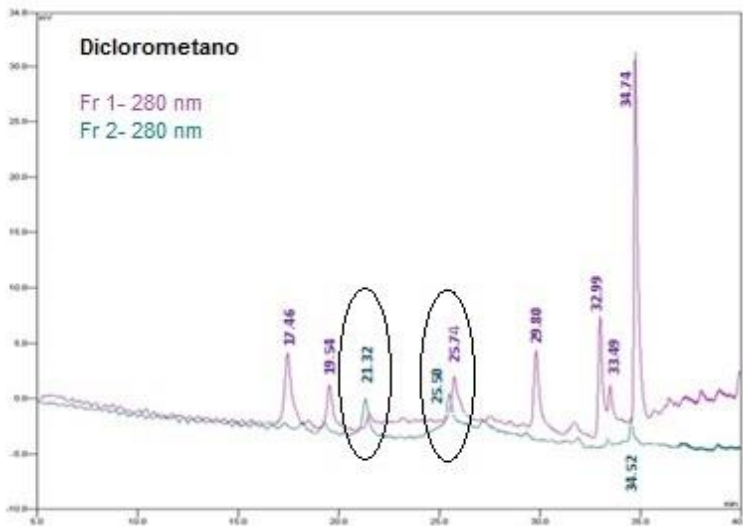
Figura 17: Cromatograma da purificação das frações 2 e 3 de AcOEt de *C. uniflora*. Detectado em CLAE 540 DAD, em 280 nm, com um tempo de corrida de 60 minutos. Fase móvel utilizada para a separação foi acetonitrila (solvente A) e ácido fosfórico (1%), ácido acético (10%), acetonitrila (5%) (v/v/v) e água (84%) (solvente B). O programa de eluição de gradiente linear foi: 0 min, 100% (solvente B), 30 min 70% e 30% do solvente A, 40 min, 100% (solvente A).



Fonte: (Autor, 2013).

O cromatograma da fração de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , figura 16 a F1 (violeta) apresentou maior quantidade de picos, sendo que a F2 (azul) apresentou apenas dois picos que se sobressaem praticamente no mesmo tempo de retenção do F1, indicando um perfil cromatográfico semelhante. Os picos presentes neste cromatograma não correspondem às referências utilizadas.

Figura 18: Cromatograma da purificação das frações 2 e 3 de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  de *C. uniflora*. Detectado em CLAE 540 DAD, em 280 nm, com um tempo de corrida de 60 minutos. Fase móvel utilizada para a separação foi acetonitrila (solvente A) e ácido fosfórico (1%), ácido acético (10%), acetonitrila (5%) (v/v/v) e água (84%) (solvente B). O programa de eluição de gradiente linear foi: 0 min, 100% (solvente B), 30 min 70% e 30% do solvente A, 40 min, 100% (solvente A).



Fonte: (Autor, 2013).

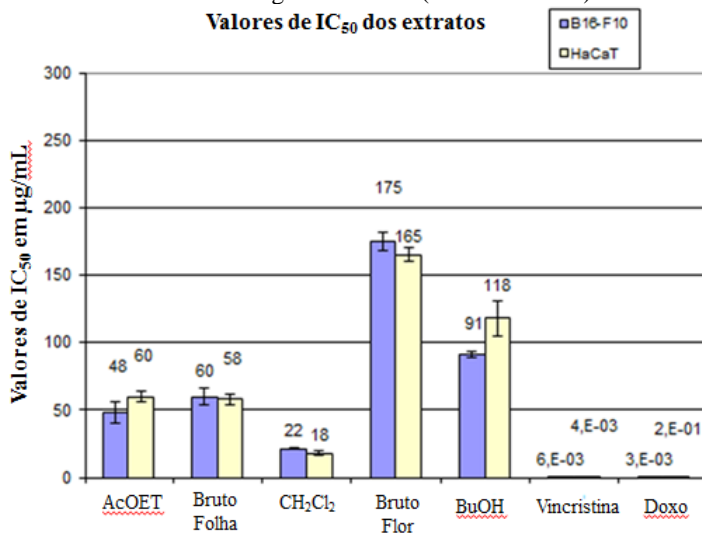
## 6.2 AVALIAÇÃO CITOTÓXICA

Os valores de  $\text{IC}_{50}$  dos extratos brutos das folhas e flores e das frações do extrato das flores de *C. uniflora* encontram-se na figura 17.

Os extratos brutos das folhas e flores não apresentaram alto grau de citotoxicidade, quando comparados com os controles. As frações de AcOEt e BuOH do extrato das flores também não apresentaram alto grau de citotoxicidade, porém a fração de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  apresentou uma inibição significativa tanto nas linhagens de células B-16 F-10 quanto nas HaCaT, quando comparadas com os controles vincristina e doxorubicina.

Figura 19: Valores das  $\text{IC}_{50}$  do extrato bruto das folhas e flores de *C. uniflora* e das frações de AcOEt,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  e BuOH das flores de *C.*

*uniflora*, estes foram comparados com os padrões vincristina e doxorubicina em duas linhagens celulares (B-16 e HaCaT).



Fonte: (Autor, 2013).

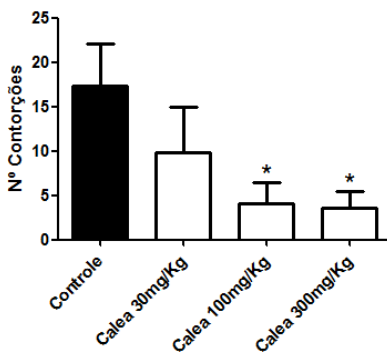
## 6.3 AVALIAÇÃO FARMACOLÓGICA

### 6.3.1 Avaliação da atividade Antinociceptiva

#### 6.3.1.1 Contorções abdominais induzidas por ácido acético

Os resultados apresentados na figura 18 demonstram que os extratos de *C. uniflora*, administrados 60 minutos antes da injeção do ácido acético, produziu uma inibição significativa das contorções abdominais nas doses de 100 mg/kg e 300 mg/kg.

Figura 20: Efeito do extrato hidroalcoólico de *Calea uniflora* (30 mg/Kg, 100 mg/Kg e 300 mg/Kg, v.o.) nas contorções abdominais induzidas por ácido acético 0,6% em camundongos. Os dados representam média  $\pm$  erro padrão da média de oito animais e estão expressos de acordo com o número de contorções realizadas pelos animais durante os 20 minutos subsequentes à injeção do ácido acético. \* $p \leq 0,05$ , comparado ao controle (ANOVA/Dunnet).



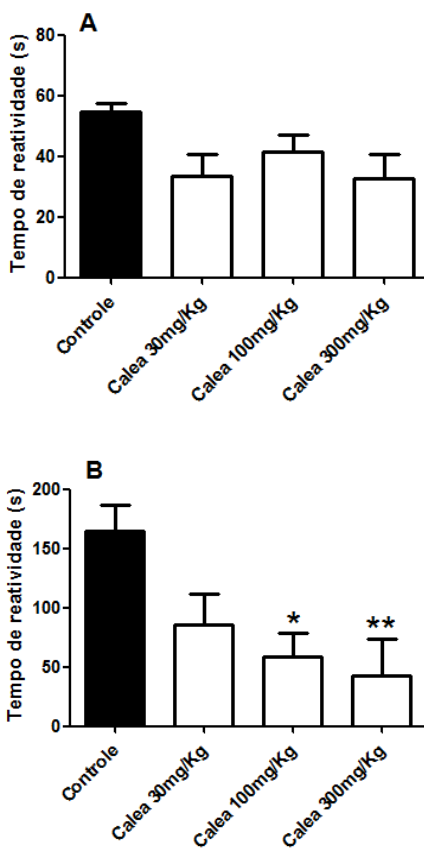
Fonte: (Autor, 2013).

### 6.3.1.2 Teste da Formalina

A injeção intraplantar de 20  $\mu$ L de formalina a 2,5% (formaldeído 0,92%) na pata posterior direita dos camundongos induziu um quadro nociceptivo. A figura 19 demonstra o efeito do extrato de *C. uniflora*, na nocicepção induzida pela formalina, onde podemos observar que nas doses de 100 mg/kg e 300 mg/kg, 60 minutos antes da injeção de formalina causou um efeito antinociceptivo apenas na segunda fase (15 à 30 minutos).

Figura 21: Efeito do extrato hidroalcoólico de *Calea uniflora* (30mg/Kg, 100mg/Kg e 300mg/Kg, v.o.) em relação à primeira (A) e segunda fase (B) da nocicepção induzida pela injeção intraplantar de formalina 2,5% em camundongos. Os dados representam média  $\pm$

erro padrão da média de oito animais e estão expressos de acordo com o tempo (s) que os animais permaneceram lambendo as patas. \* $p \leq 0,05$ ; \*\* $p \leq 0,01$ , comparado ao controle (ANOVA/Dunnett).

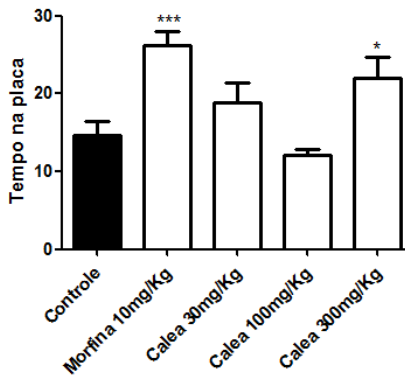


Fonte: (Autor, 2013).

### 6.3.1.3 Teste da Placa Quente

Os resultados apresentados na figura 20 demonstram que o tratamento com o extrato de *C. uniflora* na dose de 300mg/kg administrados 60 minutos antes de submeter os camundongos a placa quente, aumentou o tempo de permanência dos animais sobre a placa aquecida de maneira significativa quando comparado ao grupo controle.

Figura 22: Efeito do extrato hidroalcoólico de *Calea uniflora* (30mg/Kg, 100mg/Kg e 300mg/Kg, v.o.) em relação ao modelo da placa quente (hot plate). Os dados representam média  $\pm$  erro padrão da média de oito animais e estão expressos de acordo com o tempo (s) que os animais permaneceram sobre a superfície aquecida sem lamber as patas. \* $p \leq 0,05$ ; \*\*\* $p \leq 0,001$ , comparado ao controle (ANOVA/Dunnet).



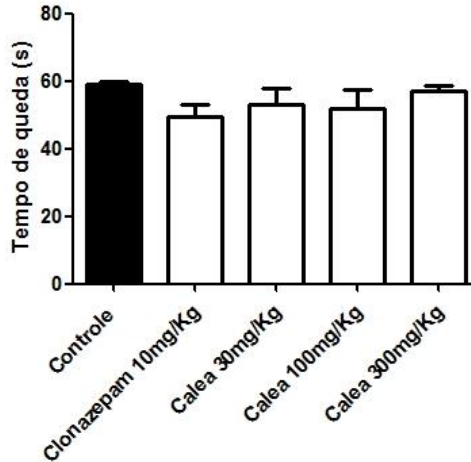
Fonte: (Autor, 2013).

#### 6.3.1.4 Rota Rod

Os resultados apresentados na figura 21 mostram que, os extratos de *C. uniflora* não foram significativos, em relação à incoordenação motora e relaxamento muscular (Rota Rod) em camundongos quando comparados ao grupo controle.



Figura 23: Efeito do extrato hidroalcoólico de *Calea uniflora* (30mg/Kg, 100mg/Kg e 300mg/Kg, v.o.) em relação à incoordenação motora e relaxamento muscular (rota rod) em camundongos. Os dados representam media  $\pm$  erro padrão da média de oito animais e estão expressos de acordo com o tempo (s) que os animais permaneceram no Rota-rod sem cair. (ANOVA/Dunnet).



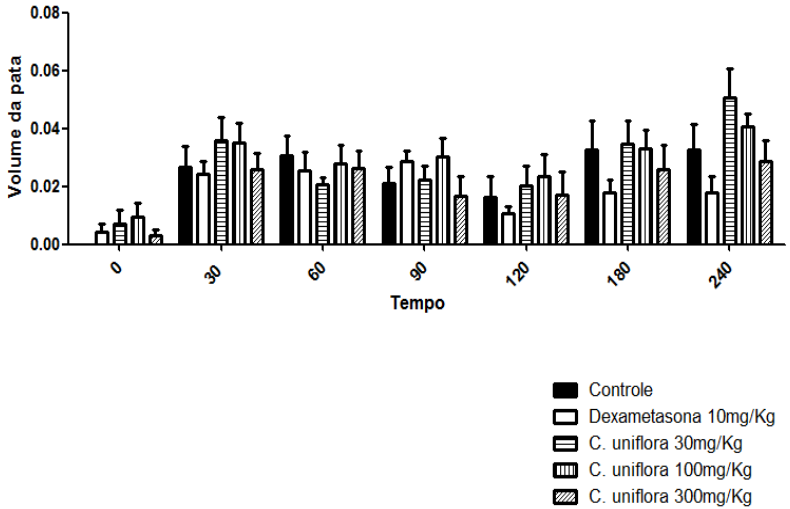
Fonte: (Autor, 2013).

## 6.3.2 Avaliação da Atividade Anti-inflamatória

### 6.3.2.1 Edema de pata induzido por carragenina

Os resultados apresentados na figura 22 mostram que, os extratos brutos de *C. uniflora* nas concentrações de 30 mg/kg 100 mg/kg e 300 mg/kg não apresentaram efeito anti-inflamatório no modelo de edema de pata induzido por carragenina quando comparados com o grupo controle.

Figura 24: Efeito do extrato hidroalcoólico de *Calea uniflora* (30mg/Kg, 100mg/Kg e 300mg/Kg, v.o.) no edema de pata induzido por carragenina em camundongos. Os dados representam média  $\pm$  erro padrão da média de oito animais e estão expressos de acordo com o volume das patas dos animais avaliados em diferentes intervalos de tempo (ANOVA de duas vias).



Fonte: (Autor, 2013).

## 7 DISCUSSÃO

De acordo com as informações populares relatadas nos encontros mensais na Universidade do Extremo Sul Catarinense, pelas agentes da Pastoral da Saúde Regional Sul IV, a planta medicinal *Calea uniflora* é muito utilizada pela população local para atividade anti-inflamatória, dor, hematomas, antisséptico (picada de mosquito), reumatismo, infecções urinárias e gripe (ROSSATO et al., 2011). Frente a essas informações e devido a poucos estudos sobre a planta medicinal, verificamos a necessidade de estudá-la.

Segundo os relatos das agentes, três formas farmacêuticas são utilizadas para *C. uniflora*: tintura da planta inteira, tintura das inflorescências, infusão e cremes com tinturas das inflorescências. A tintura é uma preparação alcoólica ou hidroalcoólica resultante da extração de drogas vegetais, animais ou diluição dos respectivos extratos. Infusão é uma preparação que consiste em verter água fervente sobre a droga vegetal, em seguida tampar ou abafar o recipiente por tempo determinado. Esse método é indicado para partes de drogas vegetais de consistência menos rígida, como as folhas, flores e frutos ou substâncias ativas voláteis. Creme é uma forma farmacêutica semi-sólida que consiste de uma emulsão, formada por uma fase lipofílica e outra hidrofílica, que contém um ou mais princípios ativos dissolvidos dispersos em uma base apropriada, sendo utilizado em aplicações externas na pele (BRASIL, 2011).

As investigações preliminares dos constituintes químicos representa muitas vezes um estímulo motivador de curiosidade, já que possibilita o conhecimento prévio dos extratos e indica as substâncias presentes (MACIEL et al., 2002). Os efeitos biológicos observados em uma planta medicinal são consequência da interação de uma certa concentração dos constituintes biologicamente ativos produzidos pela planta em um determinado tempo (CORDELL, 2011).

Em estudos realizados com plantas do gênero *Calea* foram detectados compostos químicos como as lactonas, saponinas e os flavonoides, que são amplamente descritos na literatura como detentores de uma variedade de efeitos sobre o sistema biológico como: atividade antimicrobiana (CHAKRABORTY et al., 2012), antiviral (HAYASHI et al., 1997), antiulcerogênica (PELZER et al., 1998), citotóxica (TRIANAA et al., 2011), antineoplásica (THOMAS et al., 2012), antioxidante (MARTINO et al., 2012), antihepatotóxica (KIM et al., 2004) e anti-inflamatória (MINÕ et al., 2004).

*Calea uniflora* possui poucos estudos sobre suas atividades biológicas, tornando importante alvo para pesquisas. Estudos sobre os constituintes químicos também são restritos, mas já foi demonstrada a presença do glicosídeo 5-deoxyflavona, compostos que sugerem propriedades antioxidantes e anticancerígenas (ZHANG et al., 2008; ZHANG et al., 2005; NASCIMENTO; OLIVEIRA, 2004).

Nascimento et al (2004) identificou a presença de quatro derivados de *p*-hidroxiacetofenona do extrato bruto de diclorometano de *C. uniflora*. Estes compostos apresentaram atividade tripanocida em testes realizados *in vitro* com o sangue de camundongos infectados e ação antifúngica contra *Candida albicans*, *Candida krusei*, *Candida parapsilosis*, *Candida glabrata*, *Trichophyton rubrum* e *Trichophyton mentagrophyte*.

As acetofenonas pertencem ao grupo dos compostos fenólicos, e são responsáveis por várias atividades biológicas como: anti-inflamatória (FAVIER et al., 1998), antiespasmódica (SANTOS; KUHNEN; YUNES, 2006), antibacteriana (NIERO, et al. 1996), antifúngica (NASCIMENTO; OLIVEIRA, 2004).

Através das informações científicas coletadas e juntamente com as informações populares levantadas, decidiu-se analisar os extratos brutos das flores e folhas e as frações de AcOEt, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> e BuOH de *Calea uniflora*.

Conforme os cromatogramas obtidos pelo CLAE, dos extratos brutos das flores comparados com o extrato bruto das folhas, foi constatado diferença na quantidade de compostos, pois o extrato das flores apresentou mais picos que o extrato bruto das folhas. Essa diferença pode estar relacionada com o órgão vegetal onde os compostos são armazenados, no qual concentra uma quantidade maior de compostos nas flores do que nas folhas (GOBBO-NETTO; LOPES, 2007).

As frações do extrato bruto de *C. uniflora* que foram submetidas ao CLAE mostraram a presença de diferentes picos nas frações AcOEt, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> e BuOH, porém estes picos não corresponderam a nenhum dos compostos referência utilizados. Sendo assim, mais estudos devem ser realizados para possível isolamento e identificação destes compostos que podem ser os responsáveis pela atividade farmacológica da planta.

Os cromatogramas das frações de AcOEt e CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> apresentaram alguns picos que não correspondem aos compostos referência utilizados. Nas análises cromatográficas realizadas por CCDs da fração AcOEt após a purificação de 3 placas preparativas para a fração de *C. uniflora*, indicaram a presença de alguns constituintes químicos, na qual

predominou os flavonoides e possivelmente a classe dos alcaloides na fração de AcOEt.

Os flavonoides tem demonstrado grande gama de propriedades terapêuticas como: antioxidante, anti-inflamatória, antifúngica, antimicrobiana e anticancerígena (FAVARIN et al., 2013; NYJVELDT et al., 2001; LOPES-POSADA et al., 2008; KIM et al., 2004). Segundo os relatos da Pastoral da Saúde, a *C. uniflora* é popularmente utilizada para processos inflamatórios e apresenta ação cicatrizante. Essa atividade pode estar relacionada à presença de flavonoides.

No processo anti-inflamatório estes compostos atuam sobre as células envolvidas na inflamação, inibindo a produção de citocinas pró-inflamatórias, modulando a atividade das enzimas da via do ácido araquidônico, como a ciclo-oxigenase, fosfolipase A<sub>2</sub> e lipo-oxigenase, além de agirem sobre a enzima formadora de óxido nítrico e óxido nítrico sintase (MIDDLETON; KANDAWASWAMI; THEOHARIDES, 2000).

Já na cicatrização, os flavonoides evitam a liberação das prostaglandinas e histamina, evitando a migração celular. Estes processos estão ligados à cascata da inflamação, pois, estabilizam a membrana celular por meio da captura de radicais livres presentes, evitando dano celular e ativando o sistema bioquímico para a regeneração do tecido (SORIANO et al., 2004).

Os alcaloides estão presentes em algumas espécies da família Asteraceae, porém apenas um estudo até o momento com o gênero *Calea* indicou a presença desta classe. Entretanto a fração de AcOEt em CCD de *C. uniflora* detectou a presença desta classe de composto. Na literatura há relatos que a planta medicinal *Arnica montana*, pertencente a mesma família de *C. uniflora*, apresenta em suas flores diversos compostos, sendo um deles a arnicaína (alcaloide) (YUI, LINARELLI, ZELANTE, 1998).

Os alcaloides possuem uma gama de atividade biológica. Entre elas, podemos citar atividade antimicrobiana, citotóxica e analgésicas, sendo assim pode relacionar a presença destes compostos com o uso popular regional (ALMEIDA et al., 2009; SILVA et al., 2007; CASTILHOS et al., 2007). Em 1804 o farmacêutico alemão Friedrich Wilhelm Adam, isolou a morfina da planta *Papaver somniferum*, descrita como o principal alcaloide do ópio, sabe-se que um quarto do peso do pó de ópio é constituído por pelo menos 25 alcaloides. Atualmente a morfina ainda encontra uma importante aplicação terapêutica. Segundo a OMS ela é indicada para o tratamento da dor intensa, especialmente

em pacientes terminais com câncer (DUARTE, 2005; BARREIRO; BOLZANI, 2009).

Além destas análises fitoquímicas, também foi avaliado o potencial citotóxico dos extratos brutos das folhas e flores e as frações de AcOEt, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> e BuOH, utilizando o ensaio de MTT, com células HaCaT (queratinócitos humanos) e B-16 (melanoma de murino).

A cultura das células *in vitro* é uma importante ferramenta para estudar a atividade citotóxica de substâncias com possíveis atividades terapêuticas (FRESHNEY, 2001).

O ensaio de MTT consiste em uma análise colorimétrica de viabilidade celular. Esse ensaio se baseia na conversão do MTT (amarelo) para formazam (púrpura), avaliando a função celular mitocondrial de acordo a redução enzimática do sal de tetrazólio pelas desidrogenases mitocondriais nas células viáveis, permitindo dessa maneira quantificar a porcentagem de células vivas (MOSMMAN, 1983).

A avaliação da citotoxicidade da *C. uniflora* demonstrou que os extratos brutos e as frações de AcOEt e BuOH não apresentaram grau de citotoxicidade relevante de acordo com o Instituto Nacional do Câncer dos Estados Unidos, o que torna mais seguro o uso popular, já que esta é muito utilizada na região (GERAN et al., 1972).

O programa de triagem de plantas estabelece que os extratos vegetais com IC<sub>50</sub> menor que 20 µg/ml para extratos brutos e 4 µg/ml para compostos puros, apresentam potencial citotóxico. No entanto a fração de diclorometano tem mais afinidade com estes tipos de compostos, extraindo mais substâncias lipofílicas, estas podem ser os responsáveis por apresentar um potencial citotóxico maior, comparado com os extratos brutos e as demais frações (GERAN et al., 1972).

A morte celular causada pela fração de diclorometano pode estar relacionada com a possível presença dos alcaloides, que foram encontrados nos testes preliminares em *C. uniflora*. Segundo estudos realizados por Fahy e colaboradores (1997) os alcaloides da vinca têm sido largamente utilizados na quimioterapia, sendo que, alguns medicamentos já estão disponíveis, como é o caso da vimblastina, vincristina, vinorelbina, derivados da epipodofilotoxina e paclitaxel, sendo assim a fração do diclorometano torna-se mais interessante, pois pode apresentar um efeito promissor.

De acordo com Jains e Jain (2011) há relatos de que várias espécies de plantas ricas em flavonoides apresentam propriedades preventivas e terapêuticas contra a citotoxicidade, os flavonoides são constituintes de muitos vegetais e frutas, que consumidos reduzem os

riscos de câncer.

Estudos farmacológicos foram realizados com o extrato bruto das flores de *C. uniflora*, a fim de verificar a atividade antinociceptiva e anti-inflamatória.

A atividade antinociceptiva pode ser detectada por meio de alguns modelos experimentais baseados em estímulos químicos (contorções abdominais e formalina) e estímulos térmicos (placa quente).

O teste de contorções abdominais é baseado na contagem das contorções que ocorrem como resposta a uma irritação peritoneal produzida pelo ácido acético, sendo semelhante a dor inflamatória da peritonite (LE BARS; GOZARIUM; CADDEN, 2001). Os dados obtidos neste modelo foram satisfatórios para potencial antinociceptivo, pois os extratos brutos de *C. uniflora*, administrados por via oral, nas doses de 100 e 300 mg/kg, reduziram o número de contorções abdominais quando comparadas ao controle.

Segundo Rodrigues e colaboradores (2010) plantas indicadas por 26 etnias indígenas do Brasil com ação analgésica, possuem em sua composição química o predomínio de alcaloides, triterpenoides, compostos fenólicos e cumarinas. Alvarenga et al., (2013) relata que metabólitos como saponinas e flavonoides, podem estar diretamente relacionado a analgesia periférica.

De acordo com os experimentos fitoquímicos realizados neste trabalho, *C. uniflora* possui em sua composição química alcaloides e flavonoides e estes compostos podem estar relacionados com a ação antinociceptiva observada no modelo de contorções abdominais.

O modelo da formalina permite avaliar duas fases distintas da dor. Na primeira fase ocorre à ativação das fibras C e A $\delta$ , sendo denominada fase neurogênica (até 5 minutos após a injeção). Após a primeira fase se inicia uma fase silente (5-15 minutos após a injeção) onde o animal não apresenta comportamento nociceptivo. Na segunda fase ocorre uma reação inflamatória no tecido periférico, sendo denominada como fase neuropática (15-30 minutos após a injeção) (HUNSKAR; HOLE 1987). Neste experimento o extrato da planta apresentou resultado significativo apenas na fase neuropática, nas doses de 100 e 300 mg /kg.

A segunda fase é caracterizada pelo processo inflamatório, na qual é causado pela inflamação local e pela liberação de mediadores hiperalgésicos e inflamatórios, que podem gerar respostas inflamatórias. Sendo assim, podemos dizer que *C. uniflora* pode apresentar atividade anti-inflamatória e está relacionada com a presença de metabólitos

secundários como os flavonoides.

Conforme Mutoh e colaboradores (2000), flavonoides como quercetina e apigenina demonstram ação anti-inflamatória, pois estes compostos causam a inibição de COX-2 e de óxido nítrico síntese.

A fim de verificar a ação analgésica a nível central, foi realizado o teste da placa quente. Este modelo caracteriza-se por produzir resposta rápida ao estímulo nocivo. O calor estimula termorreceptores e estes ativam uma sequência inalterável de ativação. Na prática, o animal retira rapidamente a pata a partir do estímulo recebido que é decorrente da ação à nível central. Este modelo avalia a atividade antinociceptiva de fármacos opióides (LE BARS, 2001; HIRUMA-LIMA et al., 2000; ANKIER, 1974). Os resultados obtidos neste teste, indicaram que *C. uniflora* apresenta efeito analgésico central nas doses de 300 mg/kg, quando comparado com a morfina. Segundo Almeida e colaboradores (2001) a analgesia central promovida por muitos extratos de plantas é geralmente atribuído à presença dos alcaloides.

Os opióides continuam sendo os analgésicos mais potentes para controlar a dor intensa. Essa qualidade dos opióides já era conhecida na antiguidade, com o uso do suco leitoso seco da papoula, denominado de ópio. Neste suco havia pelo menos 20 tipos de alcaloides, que mais tarde foram isolados, sendo que um desses alcaloides foi a morfina (IASP, 2010).

Nos estudos de substâncias analgésicas devem ser descartadas as possíveis alterações do desempenho motor, que podem ser produzidas por alguns fármacos potencialmente analgésicas. A maior fonte de erros em estudos sobre fármacos que interferem na transmissão da resposta nociceptiva é a modificação no desempenho motor do animal (MILLAN, 2002).

Por esse motivo avaliamos a incoordenação motora por meio do teste rota-rod. Os resultados demonstraram que o extrato bruto de *C. uniflora* não altera o desempenho motor dos animais nas doses (100 e 300 mg/kg). Desta forma, comprovou-se que a redução do comportamento nociceptivo dos animais são devido ao efeito analgésico e não a alteração do desempenho motor.

Para confirmar a atividade anti-inflamatória obtida no teste da formalina, o extrato de *C. uniflora* foi avaliado no modelo de edema de pata induzida por carragenina. A carragenina é um agente flogístico que produz inflamação, promovendo uma intensa vasodilatação e extravasamento plasmático. O edema provocado pela carragenina ocorre em três fases. Segundo Di Rosa e Willowghthby (1971), na 1ª hora após a injeção da carragenina o aumento da permeabilidade



vascular é mediado por histamina e serotonina. Na 2<sup>a</sup> hora aumento da permeabilidade vascular é mediado pelas cininas. A fase de maior intensidade do edema ocorre 3 horas após a injeção da carragenina e é caracterizada pela ação de prostaglandinas sobre a permeabilidade capilar, contribuindo para uma intensa migração celular até o sítio inflamatório (ZHU et al., 2010; FARSAM et al., 2000).

Embora com relevância pelos dados obtidos, os resultados demonstraram que o extrato bruto de *C. uniflora*, não foi capaz de reduzir o edema provocado pela injeção intraplantar de carragenina 1%, o que pode ser devido ao tempo em que os animais foram avaliados, pois com 240 minutos o grupo controle começou a demonstrar um resultado interessante, porém não suficiente para apresentar atividade anti-inflamatória eficiente. Sendo assim devemos rever o tempo e o modelo experimental, já que no modelo de edema de pata induzido por carragenina o controle começou a apresentar uma redução no volume da pata após 4 horas. Frente a isso, é necessário um período maior de análise, compreendendo o tempo das duas fases que ocorre neste modelo experimental.

Segundo os relatos das agentes da Pastoral da Saúde, a planta é utilizada para processos inflamatórios por via tópica o que instiga a realização de testes futuros com outros modelos experimentais, já que o processo inflamatório se diferencia pelo tipo de tecido envolvido, agente flogístico e mediador inflamatório liberado. O mecanismo da carragenina envolve a liberação de prostanóides via ciclooxigenase, já o mecanismo do óleo de cróton na qual é utilizado para via tópica para induzir inflamação, envolve a ativação da fosfolipase A<sub>2</sub> que em diferentes tecidos promove a liberação dos mediadores envolvidos na formação do edema e no processo da quimiotaxia (ZANUSSO JUNIOR et al., 2011; KONDOH; SATO; KANO, 1995).

## 8 CONCLUSÃO

Os resultados do presente trabalho indicam que:

Os extratos brutos das flores possuem mais compostos químicos que os do extrato bruto das folhas de *Calea uniflora*.

Na fração de acetato de etila foram identificados flavonoides e a possível presença dos alcaloides e estes compostos podem ser responsáveis pela ação farmacológica da planta.

Os resultados encontrados demonstraram que os extratos brutos e as frações de AcOEt e BuOH de *C. uniflora* apresentaram uma IC<sub>50</sub> maior que 58 µg/ml para linhagem HaCaT e 48 µg/ml para a linhagem B-16, sendo assim esses valores não apresentaram citotoxicidade, sendo assim a população pode utilizar a planta de forma segura. Já a fração de diclorometano apresentou IC<sub>50</sub> de 18 µg/ml, mostrando inibição significativa quando comparada aos controles vincristina e doxorrubicina, necessitando de mais estudos, pois apresentou um potencial citotóxico maior comparado com as demais frações.

A atividade antinociceptiva, tanto para estímulos químicos como térmicos, apresentaram um efeito significativo para o extrato bruto das flores de *C. uniflora*, nas doses de 100 e 300 mg/kg. Esse efeito pode estar relacionado com a presença dos compostos químicos como alcaloides à nível central e flavonoides à nível periférico.

O extrato de *C. uniflora* não induz a incoordenação motora e atividade relaxante muscular em camundongos.

Em relação à atividade anti-inflamatória, mais estudos são necessários. A forma de administração também pode ser revista, sendo alterada para uso tópico, já que a população utiliza a planta desta forma.

## REFERÊNCIAS

ABREU MATOS, F.J.; LORENZI, H.; SANTOS, L.F.L.; MATOS, M.E.O; SILVA, M.G.V.; SOUZA, M.P. **Plantas Tóxicas**. Estudo de fitotoxicologia química de plantas brasileiras. Instituto plantarum. 2011.

ALMEIDA, R.N.; NAVARRO,D.S.; BARBOSA-FILHO, J.M. Plants with central analgesic activity. **Phytomedicine**. v.8, p. 310–322, 2001.

ALMEIDA,M.R.; LIMA, J.A.; SANTOS,N.P.; PINTO,A.C. Pereirina: o primeiro alcaloide isolado do Brasil?. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v.19, n. 4, p.942-952, Out/ Dez, 2009.

ALVARENGA, F.Q.; MOTA, B.C.F.; LEITE, M, N.; FONSECA, J.M.S.; OLIVEIRA, D.A.; ROYO, V.A.; SILVA, M.L.A.; ESPERNADIM, V.; BORGES, A.; LAURENTIZ, R.S. *in vivo* analgesic activity, toxicity and phytochemical screening of the hydroalcoholic extract from the leaves of *Psidium cattleianum* Sabine. **Journal of Ethnopharmacology**. v, 150,n. 28, P. 280-284, OCT 2013.

AMARAL, A. C. F.; RODRIGUES, A. G.; RIBEIRO, J. E. G.; SANTOS, M. G.; NETTO JR. N. L. Políticas públicas em plantas medicinais e fitoterápicos. In: CORRÊA, A.P.R. (Org). **A Fitoterapia no SUS e o Programa de Pesquisas de Plantas Mediciniais da Central de Medicamento**. ed. 1. Brasilia: Editora MS, 2006. p. 149.

ANDRADE FILHO, A.; CAMPOLINA, D.; CARDOSO, M.F.E.C. Histórico, Conceitos e Epidemiologia. In: ANDRADE FILHO, Adebald. CAMPOLINA, Délio; DIAS, Mariana Borges (Org.), **Toxicologia na pratica clinica**. Belo Horizonte: Folium 2001. p. 23-32.

ANKIER, S, I. New hot plate test to quantify antinociceptive and narcotic-antagonist activities. **European Journal of Pharmacology**. v. 27,p. 1-4, 1974.

ARNOUS, A. H.; SANTOS, A. S.; BEINNER, R. P. C. Plantas medicinais de uso caseiro conhecimento popular e interesse por cultivo comunitário. **Revista Espaço para a Saúde**. v.6, p.1-6, 2005.

BARREIRO, E.J.; BOLZANI, V.S. Biodiversidade: Fontes de Potencial para descoberta de fármacos. **Química nova**. v. 32. n. 3, p. 679-688, 2009.

BASBAUM, A.I.; BAUTISTA, D.M.; SCHERRER, G.; JULLUS, D. Cellular and Molecular Mechanisms of Pain. **Cell**. v.139, Oct 2009.

BECKER, D. E. Basic and Clinical Pharmacology of Glucocorticosteroids. **Anesthesia Progress**. v. 60, p. 25-32, 2013.

BEECHER, G.R. Overview of dietary flavonoids: nomenclature, occurrence and intake. **The Journal of Nutrition**. ??

BOHLMANN, F.; ZDEROT, C.; KINGS, R. M.; ROBINSONI, H. Heliangolides, and nerolidol and p-hydroxyacetophenone derivatives from *Calea* species. **Phytochemistry**. v.20, n. 7, p.1643-1647, 1981.

BOHLMANN, F; MATHUR, R; JAKUPOVIC, J; GUPTA, R. K.; KING, R. M; ROBINSON, H. Furanoheliangolides and other compounds from *Calea Hymenolepis*. **Phytochemistry**. v. 21, n. 8, p. 2045-2048, 1982.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **Lebensmittel-Wissenschaft Technologie**. v. 28, p. 25-30, London, 1995.

BRASIL, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Formulário de Fitoterápicos. Farmacopeia Brasileira. 1º ed. 2011. Disponível em: <[http://www.anvisa.gov.br/hotsite/farmacopeiabrasileira/conteudo/Formulario\\_de\\_Fitoterapicos\\_da\\_Farmacopeia\\_Brasileira.pdf](http://www.anvisa.gov.br/hotsite/farmacopeiabrasileira/conteudo/Formulario_de_Fitoterapicos_da_Farmacopeia_Brasileira.pdf)>  
Acesso em: 14 de set. 2013

BRASIL. Conselho Nacional de Saúde. **Resolução nº 14, de 31 de Março de 2010**. Brasília, 2010. Disponível em: <[http://www.desenvolvimento.gov.br/arquivos/dwnl\\_1268055864.pdf](http://www.desenvolvimento.gov.br/arquivos/dwnl_1268055864.pdf)>. Acesso em: 18 dez. 2013.

BRASIL. Ministério da Saúde. **A Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos**. Brasília 2006. Disponível em:

[http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/politica\\_nacional\\_fitoterapi cos.pdf](http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/politica_nacional_fitoterapi cos.pdf)>.

Acesso em: 05 jan de 2014.

BRUHN, J. G. e HOLMSTEDT, B. Ethnopharmacology, objectives, principles and perspectives". *In: Natural products as medicinal agents*. Stuttgart: Hippokrates, 1982.

BRUNETON, J. **Farmacognosia. Fitoquímica. Plantas Medicinales**. 3.ed. Edicions tec &doc. 2003. p.783-794.

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

CARR, D.B.; GOUDAS, L.C. Acute pain. **Lancet**. V.353, p. 2051-58, 1999.

CARVALHO, J.C.T.; GOSMANN, G.; SCHENKEL, E.P. Compostos fenólicos simples e heterisídicos. In:SIMÕES, C.M.O. (Org) **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6. ed. Porto Alegre: UFRGS, 2010. p. 519-536.

CASTILHOS, T.S.; GIODANI, R.B.; HENRIQUES, A.T.; MENEZES,F.S.; ZUANAZZI,J.A.S. Avaliação in vitro das atividades antiinflamatória, antioxidante e antimicrobiana do alcalóide montanina. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v.17, n. 2, p.209-214, Abr./Jun. 2007.

CASTRO, V; TAMAYO-CASTILLO, G; JAKUPOVIC, J. Sesquiterpene lactones and other constituents from *Calea pruvifolia* and *c. peckii*. **Phytochemistry**. v.28, n. 9, p. 2415-2418, 1989.

CECHINEL-FILHO, V.; 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, 1998.

CECHINEL-FILHO, V; YUNES, R.A. **Química de produtos naturais, novos fármacos e a moderna farmacognosia**. 2.ed. Itajaí: Univali, 2009.

CHAKRABORTY, R.; DE, B.; DE VANNA, N.; SEM, S. Antiinflammatory, antinociceptive and antioxidant activities of *Phyllanthus acious* L. extracts. **Assian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**. p. 953-961, 2012.

CHOI, S.S.; HAN, K.J.; LEE, J.K.; LEE, H.K.; HAN, E.J.; KIM, D.H.; SUH, H.W. Antinociceptive mechanisms of orally administered decursinol in the mouse. **Life Sciences**. v.13, n. 73, p.471-85,2003.

COOK, N.C.; SAMMAN, S. Flavonoids. Chemistry, metabolism, cardioprotective effects, and dietary sources. **Nutritional Biochemistry**. v.7, p. 66-76, 1996.

CORDELL, G.A. Phytochemistry and traditional medicine – A revolution in process. **Phytochemistry Letters**. V, 4, p. 391-398. 2011.

COSTA, V. P.; MAYWORM, M. A. S. Plantas medicinais utilizadas pela comunidade do bairro dos Tenentes - município de Extrema, MG, **Brasil. Revista Brasileira de Plantas Medicinai**s. v. 13, n. 3, p. 282-292. 2011.

DI ROSA, M.; MILLOWGHBY, D.A. Screens of antiinflammatory drugs. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**. v.23, n. 4, p. 297-8, 1971.

DUARTE, D.F. Uma breve história do ópio e dos opióides. **Revista Brasileira de Anestesiologia**. v.55, n. 1, Jan/Feb 2005.

EISENBRAND, G.; POLL-ZOBEL, B.; BAKER, V.; BALLS, M.; BLAAUBOER, B.J.; BOOBIS, A.; CARERE, A.; KEVEKORDES, S.; LHUFUENOT, J.C.; PIETERS, R.; KLEINNER, J. Methods of in vitro toxicology. **Food and Chemical Toxicology**. V.40, p. 193-236, 2002.

ELISABETSKY, E. Etnofarmacologia. **Ciência e Cultura**. v.55, n. 3, São Paulo. July/Sept. 2003

FAHY, J.; DUFLOS, A.; JACQUESY, J. C.; BERRIER, C.; JOUANETAUD, M. P.; ZUNINO, F. Vinca, Alkaloids in Superacidic Media: A Method for Creating a New Family of Antitumor Derivatives. **Journal of the American Chemical Society**. v. 119, p. 8576-8677, 1997.

FALCÃO, H.; LIMA, I. O.; SANTOS, V. L.; DANTAS, H. F.; DINIZ, M. F. F. M.; BARBOSA-FILHO, J. M.; BATISTA, L. M. Review of the plants with anti-inflammatory activity studied in Brazil. **Braz. J. Pharmacogn.** v. 15, p. 381-391, 2005.

FALKENBERG, M. B.; SANTOS, R. I.; SIMÕES, C. M. O. Introdução à análise fitoquímica. In: SIMÕES, C. M. O. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5.ed. Porto Alegre: UFRGS, 2010.

FARSAM, H.; AMANLOU, M.; DEHPUR, A. R.; JAHANIANI, F. Anti-inflammatory and analgesic activity of Biebersteinia multifida DC. root extract. **Journal of Ethnopharmacology**. v 71, p. 443-447, 2000.

FAVARIN, D. C.; OLIVEIRA, J. R.; FREIRE, C. J.; ROGERIO, A. P. Potential Effects of Medicinal Plants and Secondary Metabolites on Acute Lung Injury. **Bio Med Research International**. 2013.

FAVIER, L. et al. Anti-inflammatory activity of acetophenones from Ophryosporus axilliflorus. **Planta Med.** v. 64, p. 657-659, 1998.

FERNANDES, A. C.; RITTER, M. R. A família Astereaceae no Morro Santana, Porto Alegre. Rio Grande do Sul, Brasil. **Brazilian Journal of Biosciences**. v. 7, n. 4, p. 395-439, 2009.

FERRAZ, A. B. F.; PINHEIRO, S. P.; OLIVEIRA, P. A.; LINO, F. L.; PICADA, J. N.; PEREIRA, P. Pharmacological and Genotoxic Evaluation of *Calea clematidea* and *Calea uniflora*. **Latin American Journal of Pharmacy**. v. 28, n. 6. p. 858-62, 2009.

FERRERO-MILIANI, L.; NIELSEN, O. H.; ANDERSEN, P. S.; GIRARDIN, S. E. Chronic inflammation: Importance of NOD2 and NALP3 in interleukin-1beta generation. **Clin. Exp. Immunol.** v. 147, p. 227-235, 2007.

FRESHNEY, I. Application of Cell Cultures to Toxicology. **Cell Biology and Toxicology**. V.17, p. 213-230, 2001.

FUMAGALI, E.; GONÇALVES, R.A.C.; SILVA, M.F.P.; MACHADO, G.J.V.; OLIVEIRA, A.J.B. Produção de metabólitos secundários em cultura de células e tecidos de plantas: O exemplo dos gêneros *Tabernaemontana* e *Aspidosperma*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v.18, n. 4. p. 627-641, Out./Dez. 2008.

FURST, S. Transmitters involved in antinociception in the spinal cord. **Brain Research Bulletin**. v.48, n. 2, p. 129-141- 1999.

GARCIA, A.A.; CARRIL, E.P.U. Metabolismo secundário de plantas. **Reduca** (biologia). v.2, n. 3, p. 119-145, 2009.

GENSLER, L. S. Glucocorticoids: Complicationsto Anticipate and Prevent. **Neurohospitalist**, v. 3, n. 2, p. 92-97, 2012.

GERAN, R. I.; GREENBERG, N. H.; MCDONALD, M. M.; SCHUMACHER, A. M.; ABBOTT B. J. Protocols for screening chemical agents and natural productsagainst animal tumour and other biological systems. **Cancer Chemotherapy and pharmacology**. v. 3, p.17-19, 1972.

GIRALDI, M; HANAZAKI,N. Uso e conhecimento tradicional de plantas medicinais no Sertão do Ribeirão, Florianópolis, SC, Brasil. **Acta botanica. brasílica**. v.24, ed.2, p. 395-406, 2010.

GIUSTI, M, M.; RODRIGUEZ-SAONA, L.E.; GRIFFIN, D.; WROLSTAD, R. E. Electropray and Tandem Mass Spectroscopy As Tools for Anthocyanin Characterization. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 47, p. 4657-4664, 1999.

GOBBO-NETO, L.; LOPES, N.. Plantas Medicinais: Fatores de Influência no Conteúdo de Metabólitos Secundários. **Química Nova**. v. 30, n. 2, p. 374-381, 2007.

GUARIN NETO, G.; SANTANA, S.R.; BEZERRA DA SILVA, J.V. Notas etnobotânicas de espécies de Sapindaceae Jussieu. **Acta botânica brasílica**, v. 14, n.3, p. 327-334, 2000.



GUERRA, M. P.; NODARI, R. O. Biodiversidade: aspectos biológicos, geográficos, legais e éticos. In: SIMÕES, C.M.O. (Org.) **Farmacognosia da Planta ao medicamento**. 5. ed. Porto Alegre/Florianópolis, 2003.

GURPINAR, E.; GRIZZLE, W. E.; PIAZZA, G. A. COX-independent mechanisms of câncer chemoprevention by anti-inflammatory drugs. **Frontiers in Oncology**. v. 3, jul. 2013.

GUYTON, Arthur.C.; HALL, Jonh, E. **Tratado de Fisiologia médica**. 11. Ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2006. 973 p.

HAVSTEEN, B. Flavonoids, a class of natural products of high pharmacological potency. **Biochemical Pharmacology**. v.32, n. 7, p. 1141-1148, 1983.

HAWKEY, C. J. Nonsteroidal anti-inflammatory drug gastropathy. **Gastroenterology**, v. 119, n. 2, p. 521-535, 2000.

HAYASHI, K.; HAYASHI, T, OTSUKA, H.; TAKEDA, Y. Antiviral activity of 5,6,7-trimethoxyflavone and its potentiation of the antiherpes activity of acyclovir. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**. v.39, p. 821-824, 1997.

HENRIQUES, A.T.; LIMBERGER,R.P.; KERBER, V.A.; MORENO, P.R.H. Alcaloides: Generalidades e Aspectos Básicos. In: SIMÕES, C.M.O. (Org) **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6. ed. Porto Alegre: UFRGS, 2010. p. 765-792.

HERTZ, W; KUMAR, N. Sesquiterpene lactones of *C. zacatechichi* and *C. urticifolia*. **Phytochemistry**. v.19, p. 593-597, 1980.

HIRUMA-LIMA, C.A.; GRACIOSO, J.S.; BIGHETTI, E.J.B.; ROBINEOU, L.G.; BRITO, A.R.M.S. The juice of fresh leaves of *Boerhaavia diffusa* L. (nyctaginaceae) markedly reduces pain in mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 71, p. 267-274, July 2000.

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

IASP. Associação Internacional para Estudos da Dor. **Guia para o Tratamento da Dor em Contextos de Poucos Recursos**. 2010.

INCA. Instituto Nacional do Câncer. **Cuidados paliativos, Oncológicos, Controle da Dor**. 2002. Disponível em: [http://www1.inca.gov.br/publicacoes/manual\\_dor.pdf](http://www1.inca.gov.br/publicacoes/manual_dor.pdf) >  
Acesso em: Acesso em: 10 nov. 2013.

JAIN, R.; JAIN, S. K.; Screening of in vitro cytotoxic activity of some medicinal plants used traditionally to treat cancer in Chhattisgarh state, India. Asian Pacific. **Journal of Tropical Biomedicine**. p.S147-S150, 2011.

JULIS, D.; BASBAUM, A.L. Molecular mechanisms of nociception. **Nature**. v.413. Sep. 2001.

KADIR, M.F.; SAYEED, M.S.B.; MIA, M.M.K. Ethnopharmacological survey of medicinal plants used by indigenous and tribal people in Rangamati, Bangladesh. **Journal of Ethnopharmacology**. v.144, p.627-637, 2012.

KIM, H.P.; SON, K.H.; CHANG, H.W.; KANG, S.S. Anti-inflammatory plant flavonoids and cellular action mechanisms. **Journal Pharmacological Science**. v.96, p. 229-245, 2004.

KONDOH, H.; SATO, Y.; KANO, H. Arachidonic acid metabolism in cultured mouse keratinocytes. **The Journal of Investigative Dermatology**, v.85, p.64-9, 1995.

KOSTER, R.; ANDERSON, M.; BEER, E.J. Acetic Acid for analgesic screening. **Fed. Proceeding**. v.18, p.412-416, 1959.

LE BARS, D.; GOZARIUM, M.; CADDEN, S. W. Animal Models of Nociception. **Pharmacological reviews**. v. 53. n. 4, p. 597-652, 2001.

LOESER, J.D.; MELZACK, R. Pain: an overview. **The Lancet**. v.353. May/ 1999.

LÓPEZ-POSADAS, R.; BALLESTER, I.; ABADÍA-MOLINA, A. C.; SUÁREZ, M. D.; ZARZUELO, A.; MARTÍNEZ-AUGUSTIN, O.; DE MEDINA, F. S. Effect of flavonoids on rat splenocytes, a structure-

activity relationship study. **Reviews of Physiology Biochemistry and Pharmacology**. v.76, p. 495, 2008.

MACIEL, M.A.M.; PINTO, A.C.; VEIGA-JR, V.F.; GRUNBERG, N.F.; ECHEVARRIA, A. Plantas Medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. **Química Nova**, vol. 25, n. 3, p. 429-438, 2002.

MARTINO,L.D.; MENCHERINI,T.; MANCINI, E.; AQUINO, R.P.; ALMEIDA, L.F.R.; DE FEO V. *In vitro* Phytotoxicity and Antioxidant Activit of Selected Flavonoides. **Interbational Journal of Molecular Sciences**. v. 13, p. 5406-5419, 2012.

MARTINS A, ROSÁRIO DL, BARROS MN, JARDIM MAG. Levantamento etnobotânico de plantas medicinais, alimentares e tóxicas da Ilha do Combu, Município de Belém, Estado do Pará, Brasil. **Revista Brasileira de Farmácia** v.86, p.21-30, 2005.

MEDZHITOV, R. Inflammation 2010: New Adventures of an Old Flame. **Cell**, v. 140, n. 6, p. 771-776, mar. 2010.

MIDDLETON, E, JR.; KANDASWAMI, C. Effects of flavonoids on immune and inflammatory cell functions. **Biochemical Pharmacology**. V. 43, n.6, p. 1167-1179. 1992.

MIDDLETON, E.JR.; KANDAWASWAMI, C.; THEOHARIDES,C. The Effects of Plant Flavonoids on Mammalian Cells:Implications for Inflammation, Heart Disease,and Cancer. **Pharmacol Rev**. v. 52, p.673–751, 2000.

MILLAN, M. J. Descending control of pain. **Progress in Neurobioly**,v. 66,p. 355-474,2002.

MILLOT, M.; TOMASI, S.; ARTICUS, K.; ROUAUD, I.; BERNARD, A.; BOUSTIE,J. Metabolites from the Lichen *Ochrolechia* parella Growinon. Different Heliotropic Conditions. **Jounal of Natural Products** v.70, n. 2, p. 316-318, 2007.

MIÑO, J.; MOSCATELLI, V.; HNATYSZYN, O.; GORZALCZANY, S.; ACEVEDO,C.; FERRARO,G. Antinoceptive and anti-inflammatory activities of *Artemisia copa* extracts. **Pharmacological Research**. v. 5, p. 59-63, 2004.

MONDIN, C.A. **Levantamento da Tribo Heliantheae Cass.** (Asteraceae), sensu stricto, no Rio Grande do Sul, Brasil. Tese, UFRGS, 2004.

MONDIN, C.A.; BRINGEL JR., J.B. A.; ROQUE, N. **Calea in Lista de Espécies da Flora do Brasil.** Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB103751>>. Acesso em: 19 dez. 2013.

MOREAU, R.L.M. Características das análises Toxicológicas. In: MOREAU, R.L.M. SIQUEIRA, M.E.P.B (Org). **Toxicologia analítica.** Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008, p.3-9.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival application to proloferation and cytotoxicity assay. **Journal of Immunological Methods.** v.65, p. 55-63, 1983.

MUTOH, M.; TAKAHASHI, M.; FUKUDA, K.; MATSUSHIMA-HIBIYA, Y.; MUTOH, H., SUGIMURA, T., WAKABAYASHI, K. Suppression by flavonoids of cyclooxygenase-2 promoter-dependent transcriptional activity in colon cancer cells: structure-activity relationship. **Japanese Journal of Cancer Research.** v. 91, p. 686-91, 2000.

NASCIMENTO, A, M.; OLIVEIRA D. C. R. A 5-deoxyflavone glycoside from *Calea uniflora* L. (Asteraceae). **Biochemical Systematics and Ecology.** v.32, p.1079–1081, 2004.

NASCIMENTO, A. M.; SILVA F. S.; OLIVEIRA D. C. R. Constituents of *Calea platylepis* Sch. Bip. Ex Baker. **Biochemical Systematics and Ecology.** v. 30, p. 993-996, 2002.

NASCIMENTO, A.M., F.C. COSTA, O.H. THIEMANN & D.C. DE OLIVEIRA. Chromanones with leishmanicidal activity from *Calea uniflora*. **Z. Naturforsch.** v. 62, p. 353-356, 2007.

NGOUMFO, R.M.; JOUDA, J.B.; MOUAFO, F.T.; KOMGUEM, J. MBAZOA, C.D.; SHIAO, T.C.; CHOUDHARY, M.I.; LAATSCH, H.; LEGAULT, J.; PICHETTE, A.; ROY, R. In vitro cytotoxic activity of

isolated acridones alkaloids from *Zanthoxylum leprieurii* Guill. et Perr. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**. v.18, n.10, p.3601-3605.may 2010.

NIERO, R. et al. Isolation of triterpenes and an acetophenone derivative with antispasmodic activity from *Euphorbia milli* Desmoul. Ex Boiss (Euphorbiaceae). **Acta Farmacéutica Boanaerense**, v. 15, p. 239-242. 1996.

NIJVELDT, R.J.; NOOD, E.V.; HOORN, D.E.C.; BOELEN, P.G.; NORREN, K.V.; LEEUWEN, P.A.M. Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. **The American Journal of Clinical Nutrition**. v.74, p. 418-25. 2001.

OBER, A.G, URBATSCH, L.E; FRISCHER, N.H. Sesquiterpene lactones from *Calea megacephala*. **Phytochemistry**. v. 26, n.4, p. 1204-1206, 1987.

OBER, A.G; URBATSCH, L.E; FISCHER, N.H. Sesquiterpene Lactones from *Calea leptcephala*. **Phytochemistry**. v. 23, n. 2, p. 467-4m, 1986.

OLIVEIRA, G. L.; OLIVEIRA, A. F. M.; CAVALCANTI, L. H.; ANDRADE, L. H. C. Plantas medicinais utilizadas na comunidade urbana de Muribeca, Nordeste do Brasil. **Acta Botanica. Brasilica**. v. 24, ed.(2), p. 571 - 577, 2010.

OLIVEIRA, R.B.; NASCIMENTO, M.V.M.; VALADARES, M.C.; PAUL A, J.R.; COSTA, E.A.; CUNHA, L.C. Avaliação dos efeitos depressores centrais do extrato etanólico das folhas de *Synadenium um bellatum* Pax. e de suas frações em camundongos albinos. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**. v. 44, n. 3, 2008.

ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUDE. **Situación regulamentaria de los medicamentos herbáricos-Uma resenã mundial**. Genebra, 2000. Disponível em:

<[http://www.sld.cu/galerias/pdf/sitios/mcdnat/situacion\\_reglamentaria\\_de\\_los\\_medicamentos\\_herbarios.pdf](http://www.sld.cu/galerias/pdf/sitios/mcdnat/situacion_reglamentaria_de_los_medicamentos_herbarios.pdf)>.

Acesso em: 1 out. 2013.

PARK, J. C.; KIM, S. C.; HUR, J. M.; CHOI, S. H.; LEE, K. Y.; CHOI, J. C. Anti-Hepatotoxic Effects of *Rosa rugosa* Root and Its Compound,

Rosamultin, in Rats Intoxicated with Bromobenzene. **Journal of Medicinal Food**. v.7. n. 4, p. 436-441, 2004.

PELZER, L.E.; AMÉRICO, T.G.; JUAREZ, A.O.; GUERREIRO, E. Acute and chronic antiinflammatory effects of plant flavonoids. **IL Farmaco**. v. 53, p. 421-424, 1998.

PÉREZ, R.M.; VARGAS, R.; MARTINEZ, F.J.; GARCIA, E.V.; HERNANDEZ, B. Actividad antioxidante de los alcaloides de *Bacconia arborea*. Estudio sobre seis métodos de analisis. **Ars Pharmaceutica**. v. 44, n. 1, p.5-21, 2003.

PRESIBELLA, M. M. **O efeito de extratos de plantas medicinais naquimiotoxicidade leucocitária *in vitro***. Dissertação de mestrado. Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba. 2003.

RAMOS, G.; FRUTOS, F.; GIRALDEZ, F.J.; MANTECÓN, A.R. Los compuestos secundários de las plantas em la nutrición los herbívoros. **Revista Archivos Zootecnia**. v. 47, p. 597-620. 1998.

RANG, H. P.; DALE, M. M. **Rang & Dale farmacologia**. 7. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2012. 778p.

ROBBINS, S.; COTRAN, R. S.; KUMAR, V.; ABBAS, A.K.; FAUSTO, N. **Robbins e Cotran Patologia: bases patológicas das doenças**. 8. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2010. 1592 p.

RODRIGUES, E.; DUARTE-ALMEIDA, J.M.; PIRES, J.M. Perfil farmacológico e fitoquímico de plantas indicadas pelos cablocos do Parque Nacional do Jaú (AM) como potenciais analgésicos. Parte I. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v.20, n.6, p. 981-991, dez 2010.

ROSSATO, A.E.; CHAVES, T.R.C. Dinâmica utilizada no levantamento das informações que constam neste livro. In: ROSSATO, A.E. et al (Org.) **Fitoterapia Racional: aspectos taxonômicos, agroecológicos, etnobotânicos e terapêuticos**. Florianópolis: DIOESC, 2012. p. 16-39.

ROSSATO, A.E.; CITADINE-ZANETTE, V.; SANTOS, R.R.; AMARAL, P.A.; DAS BÓ, S.; MACHADO, M.; BRISTOT, S.F.; BORGES, M. S.; CARDOSO, P.S.; KUHNEN, B. *Calea uniflora* Less.

In: Fitoterapia Racional: Aspectos Etnobotânicos, Taxonômicos, Agroecológicos e Terapêuticos. **Material Didático**. Universidade do Extremo Sul Catarinense. 2011.

SÁ, R. C.S.; ANDRADE, L.N.; SOUSA, D.P. A Review on Anti-Inflammatory Activity of Monoterpenes. **Molecules**. v.18, p. 1227-1254, 2013.

SANTOS, R.; KUHNNEN, C.A.; YUNES, R.A. Molecular structure and QSAR study on antispasmodic activity of some xanthoxylone derivatives. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**. v.339, n. 5, p.227-37, May.2006.

SANTOS, R.I. Metabolismo básico e origem dos metabólitos secundários. In: SIMÕES, C.M.O. (Org) **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6. ed. Porto Alegre: UFRGS, 2010. p.403-434.

SAPOLSKY, R. M.; ROMERO, L. M.; MUNK, A.U. How do glucocorticoids influence stress responses? Integrating permissive, suppressive, stimulatory and preparative actions. **Endocrinological Review**, v. 21, n. 1, p. 55, 2000.

SCHOLZ, J.; WOOLF, C.J. Can we conquer pain? **Nature Neuroscience**. v.5, p.1062-7, 2002.

SHERWOOD, E. R.; TOLIVER-KINSKY, T. Mechanisms of the inflammatory response. **Best Pract Research Clinical Anaesthesiology**, v. 18, p. 385-405, 2004.

SILVA, D.B.; MATOS, M.F.C.; NAKASHITA, S.T.; MISU, C.K.; YOSHIDA, N.C.; CAROLLO, C.A.; FABRI, J.R.; MIGLIO, H.S.; SIQUEIRA, J.M. Isolamento e avaliação da atividade citotóxica de alguns alcalóides oxaporfínicos obtidos de annonaceae. **Química Nova**, v.30, n. 8, p. 1809-1812, 2007.

SINOTOX. SISTEMA NACIONAL DE INFORMAÇÕES TOXICOLÓGICAS. **Evolução dos Casos Registrados de Intoxicação Humana por Agente Tóxico**. Brasil, 2010.

Disponível em: < [http://www.fiocruz.br/sinotox\\_novo/media/b10.pdf](http://www.fiocruz.br/sinotox_novo/media/b10.pdf)>

Acessado em 05 jan de 2014.

SORIANO, M.Y.S.; BONELLA, P.E.; ARROYO, J.L.A.; PEREYRA, A.S. Aspectos fitoquímicos t actividad cicatrizante de senecio culcíticos Weed. **Ciência e Investigação**. v. 7, n. 2, 2004.

SOUZA-MOREIRA, T.M.; PIETRO, H.R.N.; SALGADO, R.C.L.R. O Brasil no contexto de controle de qualidade de plantas medicinais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v. 20, n. 3, p.435-440, Jun./Jul. 2010.

THOMAS, C. M.; WOOD, R. C.; WYATT, J. E.; PENDLETON, M. H.; TORRENEGRA, R. D.; RODRIGUEZ, O. E.; HARIRFOROOSH, S.; BELLESTER, M.; LIGHTNER, J.; KRISHNAN, K.; RAMSAUER, V. P. Anti-Neoplastic Activity of Two Flavone Isomers Derived from *Gnaphalium elegans* and *Achyrocline bogotensis*. **Plos One**. v. 7, 2012.

TRIANAA, J.; LÓPEZ, M.; PÉREZ, F. J.; LEÓN, F.; QUINTANA, J.; EZTÉVEZ, F.; HERNÁNDEZ, J. H.; GONZÁLEZ-PLATAS, J.; BROUARD, I.; BERMEJO, J.. Secondary Metabolites from Two Species of *Pulicaria* and Their Cytotoxic Activity. **Chemistry & Biodiversity**. v. 8, 2011.

VEIGA JUNIOR, V.F.; PINTO, A.C.; MACIEL, M.A.M. Plantas Medicinais: Cura Segura?. **Química Nova**, v. 28, n. 3, p. 519-528, 2005.

VIEGAS, C. Jr.; BOLZANI, V. S.; BARREIRO, E. J.; Os produtos naturais e a química medicinal moderna. **Química Nova**; v. 29, n. 2, p. 45-61, São Paulo Mar./ Apr. 2006.

WAGNER, H.; BLADT, S. **Plant drug analysis**: a thin layer chromatography atlas. 2 ed Berlin: Springer, 1996.

WHELTON, A. Nephrotoxicity of nonsteroidal antiinflammatory drugs: physiologic foundations and clinical implications. **American Journal of Medicine**, v. 106, n. 5, p. 13-24, 1999.

WINTER, C. A.; RISLEY, E. A.; NUSS, G. W. Carragenin induced edema in hind paw of the rat as an assay for anti-inflammatory drugs. **Proc.Soc.Exp. Biol. Med.** v. 111, p. 544, 1962.



YAMAMOTO,N.; FURUKAWA,H.; ITO,Y.; YOSHIDA, S.; MAENO,K.; NISHIYAMA,Y. Anti-herpesvirus activity of citrusine-I, a new acridone alkaloid, and related compounds. **Antiviral Research**. V.12, p. 21-36. 1989.

YOON, J.H.; BAEK, S.J. Molecular Targets of Dietary Polyphenols with Anti-inflammatory Properties. **Yonsei Medical Journal**. v.46, n.5, p. 585-596, 2005.

YUI, F.; LINARELLI, M.C.B.; ZELANTE, P.M. Atividade anti-inflamatória da *Arnica montana*. **Revista Ciências Médicas** v.7, n, 1, p.21-26, jan/abr 1998.

ZANUSSO-JUNIOR, G; MELO, J.O; ROMERO, A.L; DANTAS, J.A; CAPARROZ-ASSEF, S.M; BERSANI-AMADO, C.A; Cuman, R.K.N. Avaliação da atividade antiinflamatória do coentro (*Coriandrum sativum* L.) em roedores. **Revista Brasileira de plantas medicinais**. v.13, n. 1 Boutucatu, 2011.

ZHANG, Y.; JIAO, J.; LIU,C.; WU,X.; ZHANG,Y. Isolation and purification of four flavone C-glycosides from antioxidant of bamboo leaves by macroporous resin column chromatography and preparative high-performance liquid chromatography. **Food Chemistry**. v. 107, p. 1326–1336, 2008.

ZHANG, Y.; BAO, B.; LU, Y.; REN, X.TIE, Y.; ZHANG, Y. Determination of flavone C-glucosides in antioxidant of bamboo leaves (AOB) fortified foods by reversed-phase high-performance liquid chromatography with ultraviolet diode array detection. **Journal of Chromatography**. v.1065, p. 177–185, 2005.

ZHU, Z.Z., MA, K.J., RAN, X., ZHANG, H., ZHENG, C.J., HAN, T., ZHANG, Q.Y.; QIN, L.P. Analgesic, Anti-inflammatory and antipyretic activities of the petroleum ether fraction from the ethanol extract of *Desmodium podocarpum*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 133, p.1126–1131, 2010.

ZUANAZZI, J.A.S.; MONTANHA, J.A. Flavonoides. In. SIMÔES, C.M.O. (Org). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6. ed. Porto alegre: UFRGS, 2010. p.577-614.

