



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO OESTE DO PARÁ  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA, PÓS-GRADUAÇÃO E INOVAÇÃO TECNOLÓGICA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM RECURSOS NATURAIS DA AMAZÔNIA**

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE FARMACOLÓGICA DO  
EXTRATO AQUOSO DAS CASCAS DE *Plathymenia reticulata*  
Benth**

**ANA PAULA FERREIRA DE ASSUNÇÃO**

**Santarém, PA  
Março de 2014**

**ANA PAULA FERREIRA DE ASSUNÇÃO**

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE FARMACOLÓGICA DO  
EXTRATO AQUOSO DAS CASCAS DE *Plathymenia reticulata*  
Benth**

**ORIENTADOR: DR. RICARDO BEZERRA DE OLIVEIRA**

**CO-ORIENTADORA: DRA. ROSA HELENA VERAS MOURÃO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal do Oeste do Pará – UFOPA, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Ambientais, junto ao Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Recursos Naturais da Amazônia.

Área de concentração: Estudos e Manejos dos Ecossistemas Amazônicos

Linha de pesquisa: Bioprospecção de Recursos Naturais da Amazônia.

**Santarém, PA  
Março de 2014**

# DEDICATÓRIA

*À minha família pelo amor, dedicação, educação e apoio integral em todos os momentos, e sem os quais os meus passos não seriam os mesmos. Em especial à minha mãe Maria de Fátima, pelo imenso amor, carinho, compreensão e incentivo.*

## AGRADECIMENTOS

Aos meus orientadores **Dr. Ricardo Bezerra de Oliveira** e **Dra. Rosa Helena Veras Mourão**, por me permitirem ser uma livre pensadora e estimularem sempre essa característica em seus alunos. Vocês são exemplos de otimismo e incentivo!

À **Sandra Sarrazin**, em especial a pela confiança, amizade, conhecimento transmitido, estímulo e pela paciência.

À minha família, em especial minha mãe **Maria de Fátima Matias** e meus irmãos **Ana Caroline Assunção** e **Luiz Victor Assunção** por valorizarem as minhas conquistas, respeitarem minhas escolhas e compreenderem a minha ausência. Vocês são parte de tudo que eu alcanço em minha vida!

À **FAPESPA, CAPES, CNPq e PGRNA** pelo apoio financeiro.

À **Wania Cristina**, por ser a minha amiga e parceira fiel durante a pós-graduação. Você é um exemplo de boa vontade e companheirismo!

Aos amigos da **turma PGRNA 2012**, com os quais compartilhei dúvidas, dificuldades, mas também momentos de imensa alegria.

À **Everton Coelho** pelo amor, carinho, companheirismo e paciência quando eu mais precisava!

Aos meus amigos biólogos: **Cárlison Oliveira, Leomara Andrade, Luciana Sousa, Joanderson Martins, Lívia Carla, Maria Gabriela, Raianny Oliveira, Suzane Pinto e Thuanny Castro** pela amizade construída, pelos bons e inesquecíveis momentos de convivência.

À todos os **meus amigos!** Obrigada por acreditarem em mim e por todo o incentivo. Vocês direta e indiretamente são os responsáveis por muitos momentos de alegria e descontração que fazem a vida valer a pena!

À todos os amigos e parceiros do LabBBex: **Juliana Raposo, Celyane Batista, Norah Costa, Antônio Júnior, Fernanda, Diana Santos, Meive Freire, Juliana Almeida, Taiara Picanço, Adrielle Serra, Tamella Portal e Soraia Baia**. Obrigada pelos momentos de trabalho e descontração, e por sempre tornarem tudo mais fácil e divertido!

Ao **Programa de Pós-graduação em Recursos Naturais da Amazônia** pelo acompanhamento ao longo desses 2 anos.

À **Universidade Federal do Oeste do Pará** por estes 7 anos de abrigo e investimento.

À **Deus**, pela força e saúde para enfrentar os grandes desafios.

# EPÍGRAFE

“Enquanto ensino, continuo buscando, reprocurando. Ensino porque busco, porque indaguei, porque indago e me indago. Pesquiso para conhecer o que ainda não conheço e comunicar e anunciar a novidade”.

Paulo Freire

ASSUNÇÃO, Ana Paula Ferreira de. Avaliação da atividade farmacológica do extrato aquoso das cascas de *Plathymania reticulata* Benth, 2014. 86 páginas. Dissertação de Mestrado em Ciências Ambientais. Área de concentração: Estudos e Manejos dos Ecossistemas Amazônicos - Programa de Pós-Graduação em Recursos Naturais da Amazônia. Universidade Federal do Oeste do Pará-UFOPA, Santarém, 2014.

## RESUMO

*Plathymania reticulata* Benth é uma planta medicinal empregada no tratamento de diversas doenças, em especial por comunidades tradicionais das savanas amazônicas no município de Santarém, estado do Pará – Brasil. O objetivo desse estudo foi avaliar as atividades farmacológicas e o efeito do extrato aquoso das cascas de *Plathymania reticulata* (EAPR) sobre o comportamento e aprendizagem em ratos, bem como determinar o seu perfil fitoquímico. Para isso, a atividade antimicrobiana foi verificada pelos métodos de microdiluição em caldo e por meio das concentrações bactericida e fungicida mínimas, a atividade antinociceptiva foi avaliada por meio do teste da formalina, a atividade antiedematogênica por meio do teste de edema de pata induzido por carragenina e o testes do labirinto aquático de Morris, labirinto Y, campo aberto, caixa clara-escuro e barra giratória foram realizados para a avaliação do comportamento e aprendizagem em ratos. A análise fitoquímica foi realizada através de CCD. O EAPR apresentou ação promissora contra bactérias gram-positivas e gram-negativas, com concentração inibitória mínima de 0,0008 mg/mL para *Enterococcus faecalis* e de 0,0004 mg/mL para *Klebsiella pneumoniae*, mas não foi eficiente frente às leveduras do gênero *Candida*. O EAPR na dose de 240 mg/kg inibiu em 100% o tempo de lambidas das patas na fase inflamatória do teste da formalina, mas não apresentou efeito antinociceptivo em nenhuma das doses testadas na fase neurogênica. No teste do edema de pata induzido por carragenina, o EAPR na dose de 240 mg/kg reduziu 82,4%, 80,9%, 81,8% e 86,9% do volume do edema na 1<sup>a</sup>, 2<sup>a</sup>, 3<sup>a</sup> e 4<sup>ah</sup>, respectivamente, após a indução do edema por carragenina. Em relação à avaliação do comportamento e aprendizagem em ratos, o extrato não apresentou atividade depressora sobre o SNC, pois nos testes realizados os animais não apresentaram alterações comportamentais e nem motoras. A CCD indicou a presença de taninos, como metabólitos secundários. No momento, pode-se propor que o EAPR possui propriedades antimicrobiana, antinociceptiva e anti-inflamatória, o que fornece bases científicas para o seu uso etnobotânico. Essas atividades possivelmente podem ser atribuídas à presença de fenóis do grupo dos taninos condensados. No entanto, é importante que mais estudos sejam realizados para a compreensão dos mecanismos de ação envolvidos nessas ações farmacológicas e para a avaliação dos efeitos do extrato na hematopoiese, função hepática e renal para completarmos o perfil de segurança desta espécie.

Palavras-chave: *Plathymania reticulata*, extrato aquoso, atividades farmacológicas, comportamento animal

ASSUNÇÃO, Ana Paula Ferreira de. Avaliação da atividade farmacológica do extrato aquoso das cascas de *Plathymenia reticulata* Benth, 2014. 86 páginas. Dissertação de Mestrado em Recursos Naturais da Amazônia. Área de concentração: Estudos e Manejos dos Ecossistemas Amazônicos - Programa de Pós-Graduação em Recursos Naturais da Amazônia. Universidade Federal do Oeste do Pará- UFOPA, Santarém, 2014.

## ABSTRACT

*Plathymenia reticulata* Benth is a medicinal plant used in the treatment of various diseases, especially by traditional communities of the Amazonian savannas in the municipality of Santarém, state of Pará - Brazil. The aim of this study was to evaluate the pharmacological activity and the effect of the aqueous extract of the bark of *Plathymenia reticulata* (EAPR) on behavior and learning in rats, as well as determine their phytochemistry. For this, the antimicrobial activity was verified by broth microdilution methods and through bactericidal and fungicidal minimum concentrations, the antinociceptive activity was assessed using the formalin test, antiedematogenic activity by the paw edema test induced by carrageenan and the Morris water maze, Y maze, open field, light/dark box and swivel bar tests were performed to evaluate the behavior and learning in rats. The phytochemical analysis was performed by thin layer chromatography. The EAPR showed promising activity against both gram-positive and gram-negative bacteria with minimum inhibitory concentration of 0.0008 mg/mL for *Enterococcus faecalis* and 0.0004 mg/mL of *Klebsiella pneumonia*, but was not efficient against *Candida* spp. The EAPR at a dose of 240 mg/kg inhibited in 100% the time of licking paws in the inflammatory phase of the formalin test. In the paw edema induced by carrageenan test, EAPR at a dose of 240 mg/kg decreased 82.41%, 80.95%, 81.87% and 86.90% of the volume of edema in 1st, 2nd, 3rd and 4th hour after administration of carrageenan. Regarding the assessment of the behavior and learning in mice, the extract showed no depressant activity on the CNS, as in the tests the animals showed no behavioral and no motor changes. The EAPR has tannins such as secondary metabolites. At the moment, it can be proposed that the EAPR has antimicrobial, antinociceptive and anti-inflammatory, which provides scientific basis for their ethnobotanical use properties. These activities can be attributed to the presence of phenols from the group of condensed tannins. However, it is important that further studies be conducted to understand the mechanisms involved in these pharmacological actions plus additional studies evaluating the effects of the extract on hematopoiesis, liver and kidney function for us to complete the safety profile of this species.

Keywords : *Plathymenia reticulata*, aqueous extract, pharmacological activities, animal behavior

# SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE ABREVIACÕES E SIGLAS

LISTA DE FIGURAS .....	10
1 INTRODUÇÃO GERAL .....	12
1.1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	14
1.1.1 Plantas medicinais .....	14
1.1.2 <i>Plathymenia reticulata</i> Benth.....	15
1.1.3 Constituintes químicos de extratos vegetais.....	17
1.1.4 Atividades farmacológicas de plantas medicinais .....	20
1.1.5 Toxicidade de extratos vegetais.....	30
1.1.6 Neurotoxicidade.....	31
1.1.7 Testes de comportamento animal .....	32
1.2 OBJETIVOS .....	37
1.2.1 Objetivo geral .....	37
1.2.2 Objetivos específicos .....	37
2 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	38
CAPÍTULO I.....	50
INTRODUÇÃO.....	52
MATERIAL E MÉTODOS.....	53
Área de estudo e coleta do material vegetal .....	53
Preparação do extrato aquoso .....	54
Análise fitoquímica .....	54
Animais .....	55
Microrganismos e condições de cultivo .....	55
Concentração Inibitória Mínima (CIM) .....	56
Determinação da Concentração Bactericida e Fungicida Mínima .....	56
Teste da formalina .....	57
Edema de pata induzido por carragenina.....	57
Labirinto aquático de Morris .....	58
Labirinto em Y .....	58
Teste do campo aberto.....	59

Caixa clara-escuro.....	59
Barra giratória.....	59
RESULTADOS .....	60
DISCUSSÃO .....	62
CONCLUSÃO.....	67
AGRADECIMENTOS .....	67
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	68
3 SÍNTESE INTEGRADORA.....	80
ANEXOS .....	81

## LISTA DE FIGURAS

### Figuras da Revisão Bibliográfica

<b>Figura 1</b> – <i>Plathymenia reticulata</i> Benth.....	16
<b>Figura 2</b> – Identificação da ocorrência natural de <i>Plathymenia reticulata</i> Benth no Brasil.....	17
<b>Figura 3</b> – Via aferente primária e suas conexões no corno dorsal da medula espinhal.....	21
<b>Figura 4</b> – Resposta Inflamatória.....	23
<b>Figura 5</b> – Labirinto aquático de Morris.....	28
<b>Figura 6</b> – Labirinto em Y.....	29
<b>Figura 7</b> – Campo aberto.....	29
<b>Figura 8</b> – Caixa clara-escura.....	30
<b>Figura 9</b> – Barra giratória.....	30

### Figuras do Capítulo 1

<b>Figura 1</b> – Efeito antiedematogênico do extrato aquoso de <i>Plathymenia reticulata</i> no teste de edema de pata induzido por carragenina em ratos.....	75
<b>Figura 2</b> – Efeito antinociceptivo do extrato aquoso de <i>Plathymenia reticulata</i> sobre à nocicepção induzida por formalina em ratos.....	76
<b>Figura 3</b> – Efeito da administração por via oral do extrato aquoso das cascas de <i>Plathymenia reticulata</i> em ratos no labirinto aquático de Morris.....	76
<b>Figura 4</b> – Efeito da administração por via oral extrato aquoso das cascas de <i>Plathymenia reticulata</i> em ratos no labirinto em Y.....	77
<b>Figura 5</b> – Efeito da administração por via oral do extrato aquoso de <i>Plathymenia reticulata</i> em ratos submetidos ao teste da caixa clara-escura.....	77
<b>Figura 6</b> – Efeito da administração por via oral do extrato aquoso das cascas de <i>Plathymenia reticulata</i> no desempenho de ratos no teste da barra giratória.....	78
<b>Figura 6</b> – Efeito da administração do extrato aquoso de <i>Plathymenia reticulata</i> em ratos no teste do campo aberto.....	79

## LISTA DE ABREVIACÕES E SIGLAS

**AINES** – Anti-inflamatórios não-esteroidais

**ATCC** – American Type Culture Collection

**CCD** – Cromatografia em Camada Delgada

**CBM** – Concentração Bactericida Mínima

**CFM** – Concentração Fungicida Mínima

**CIM** – Concentração Inibitória Mínima

**COX** – Ciclooxigenase

**EAPR** – Extrato aquoso das cascas de *Plathymenia reticulata*

**EMBRAPA** – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

**LOX** – Lipooxigenase

**NCCLS** – National Committee for Clinical Laboratory Standards

**NF- $\kappa$ B** – Fator nuclear kappa B

**NO** – Óxido nítrico

**OMS** – Organização Mundial da Saúde

**RENISUS** – Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse do SUS

**SNC** – Sistema Nervoso Central

**SUS** – Sistema Único de Saúde

## 1 INTRODUÇÃO GERAL

As primeiras manifestações do homem em relação ao uso e compreensão dos recursos naturais estão relacionadas com o uso de plantas como alimento e ainda o seu uso medicinal, pois estas apresentam substâncias bioativas com propriedades terapêuticas, profiláticas ou paliativas (GILBERT, 2005). De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), 88% da população dos países em desenvolvimento faz uso de plantas medicinais, principalmente extratos de plantas, pois a droga vegetal é um produto mais tolerado pelo organismo que as drogas sintéticas, é mais acessível e pode beneficiar um grande número de pacientes (CARVALHO, 2004; OMS, 2002; SARRAZIN, 2012).

Há um crescente interesse mundial por produtos derivados da biodiversidade e, nesse aspecto, o Brasil é privilegiado, pois é detentor de grande diversidade biológica, com inúmeras espécies vegetais com potencial medicinal (ALI-SHTAYEH et al., 1998; ALMEIDA, 2009; AGARWAL et al., 2010). Esse cenário favorece a pesquisa e o desenvolvimento de fitoterápicos no país, sendo um grande avanço nesse sentido a Portaria do Ministério da Saúde de nº 971 de 03 de maio de 2006, que aprova a Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares (PNPIC) no Sistema Único de Saúde (SUS), que traz em suas diretrizes a elaboração da Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS (RENISUS) (BRASIL, 2006a).

Ainda em 2006, o Decreto Federal de nº 5.813 de 22 de junho de 2006 instituiu a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos, que incentiva as pesquisas e dá diretrizes para implantação de serviços em caráter nacional pelas Secretarias de Saúde dos Estados, Distrito Federal e dos Municípios, o que associado a diversidade étnica e cultural brasileira, detentora de um valioso conhecimento tradicional sobre o uso de plantas medicinais, representa um grande potencial para desenvolvimento de pesquisas com resultados em tecnologias e terapêuticas apropriadas (BRASIL, 2006b).

Estudos recentes, que conferem resultados satisfatórios em relação à atividade biológica *in vitro* e *in vivo* de extratos vegetais (ASSOB et al., 2011; KUETE et al., 2011; TOYANG et al., 2012; ARARUNA et al., 2013), também contribuem com o aumento do interesse da pesquisa científica sobre o conhecimento popular e assim, proporcionam o aumento das informações sobre as potencialidades farmacológicas de espécies vegetais e o isolamento de princípios ativos, o que é necessário para validar cientificamente uma espécie como planta medicinal (LORENZI & MATOS, 2008) e colabora ainda para o seu emprego no

Sistema Único de Saúde (SUS) sob a forma de medicamentos de baixo custo (BRASIL, 2009; AGARWAL et al., 2010).

Mesmo que exista preferência pelas indústrias farmacêuticas no desenvolvimento de medicamentos sintéticos, é relevante o interesse no mercado internacional pelo recurso terapêutico que as plantas medicinais representam, sendo que cerca de 30% dos fármacos prescritos são direta ou indiretamente obtidos por meio de plantas (CALIXTO et al., 2000; KOEHN & CARTER, 2005). Observou-se ainda que no período entre 1981 e 2002, aproximadamente 50% dos fármacos foram derivados de produtos naturais ou análogos semissintéticos ou sintéticos baseados em produtos naturais (KOEHN & CARTER, 2005).

Outro aspecto importante na pesquisa com plantas medicinais está relacionado com a avaliação de seus efeitos toxicológicos, pois a crença na “naturalidade inócua” dos recursos vegetais expõe a população a riscos para a saúde, devendo-se dessa maneira existir a uma ampla linha de estudos de base toxicológica sobre uma espécie, antes do desenvolvimento de um novo medicamento (ATSAMOA et al., 2011), uma vez que pesquisas comprovaram que muitas espécies que são comumente utilizadas pela população apresentam efeitos tóxicos (HOSSEINZADEH & YOUNESI, 2002; ADEOYE & OYEDAPA, 2004).

Assim, a avaliação do potencial farmacológico e da toxicidade de extratos vegetais são relevantes, pois estes constituem a principal forma de preparação utilizada pela população em comunidades no município de Santarém-PA e em diversas regiões do Brasil no tratamento de diversas patologias. Dessa forma, constituem um recurso acessível que valoriza os produtos naturais da Floresta Amazônica, promovendo a sua preservação e ainda aumentando a sua importância social e econômica.

A apresentação deste trabalho foi realizada segundo as normas do Programa de Pós-Graduação em Recursos Naturais da Amazônia da Universidade Federal do Oeste do Pará-UFOPA. A dissertação foi dividida em: **REVISÃO DA LITERATURA** sobre os aspectos de plantas medicinais, características de *Plathymenia reticulata*, componentes químicos, atividades farmacológicas e toxicidade de extratos de plantas medicinais, bem como sobre testes de comportamento animal. **OBJETIVOS** geral e específicos. As sessões **MATERIAL E MÉTODOS** e **RESULTADOS** foram apresentados em forma de artigo, organizado em um capítulo. **Capítulo 1** – Avaliação da atividade farmacológica do extrato aquoso das cascas de *Plathymenia reticulata* Benth (Fabaceae) (artigo escrito de acordo com as normas da revista Journal of Medicinal Plants Research).

## 1.1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 1.1.1 Plantas medicinais

Ao longo da história de ocupação na terra o homem sempre utilizou os recursos da flora para sua alimentação e ainda explorou as suas propriedades medicinais. Em diversos registros e manuscritos de civilizações da Antiguidade estão descritos o uso de ervas e vegetais com finalidade terapêutica, nos quais diferentes partes (raízes, folhas, flores, frutos e cascas) de plantas eram utilizadas para a fabricação de remédios (CARVALHO, 2004). Percebe-se que desde as sociedades mais antigas até os dias atuais, as mais diversas doenças têm sido tratadas com chás, tinturas, infusões, cataplasmas e unguentos obtidos a partir de plantas medicinais (GILBERT et al., 2005).

A OMS (2002) define plantas medicinais como espécies silvestres ou cultivadas utilizadas como recursos para aliviar, prevenir, curar ou modificar processos fisiológicos que podem ser normais ou patológicos, quando estas são fontes de fármacos ou de seus precursores. O uso de plantas medicinais é empregado tanto por grupos tradicionais como também pelas populações urbanas, sendo este muitas vezes o único recurso terapêutico disponível ou ainda usado de forma complementar a Medicina.

Observa-se assim, que sempre houve a necessidade de pesquisar e conhecer como as diferentes culturas ou grupos humanos fazem o uso de plantas medicinais a fim de resgatar informações valiosas para a descoberta de substâncias biologicamente ativas com potencial para o desenvolvimento de medicamentos (MACIEL et al., 2002). Nesse sentido, a Etnofarmacologia é uma ferramenta que fornece pistas sobre substâncias potencialmente úteis no desenvolvimento de novos fármacos baseada em observações feitas em diversas áreas como Química, Bioquímica, Botânica, Farmacologia e Antropologia (FABRICANT & FARNSWORTH, 2001).

Em 2002, a OMS lançou um plano de estratégias cujas metas principais foram: a criação de políticas públicas para o incentivo a programas de aplicação nos Sistemas Nacionais de Atenção à Saúde; fomento à segurança, eficácia e qualidade da prática da medicina tradicional; aumento do acesso a esta prática terapêutica e promoção do uso racional da medicina tradicional (OMS, 2002). No Brasil, é significativo o número de espécies vegetais utilizadas sob a forma de extratos brutos no tratamento de doenças, por isso os estudos científicos são cada vez mais necessários para a comprovação da eficácia desse tratamento.

Nesse sentido, observa-se que a Fitoterapia está avançando enquanto alternativa de cuidados com a saúde, pois o uso de medicamentos fitoterápicos é uma prática cada vez mais comum (LIMA et al., 2006). Os medicamentos fitoterápicos são aqueles obtidos empregando-se exclusivamente derivados de droga vegetal (extrato, tintura, óleo, cera, exsudato, suco, entre outros). E assim como todos os medicamentos devem oferecer garantia de qualidade, apresentar efeitos terapêuticos comprovados, composição padronizada e segurança para o uso da população. A eficácia e a segurança devem ser validadas por meio de levantamentos etnofarmacológicos, documentos técnico-científicos em bibliografias e/ou publicações indexadas e/ou estudos farmacológicos e toxicológicos clínicos e pré-clínicos (ANVISA, 2004a).

Por meio da Portaria nº. 971 de 03 de maio de 2006 que aprovou, na forma do Anexo, a Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares no SUS (BRASIL, 2006a) foi estabelecida a política de uso de plantas medicinais no serviço público brasileiro, e ainda através do Decreto nº. 5813 de 22 junho de 2006 foi aprovada a Política de Plantas medicinais e Fitoterápicos no país (BRASIL, 2006b).

O Ministério da Saúde, reconhecendo o potencial terapêutico das plantas medicinais e ainda com o objetivo de promover o maior aproveitamento desses recursos pela população brasileira, aprovou a RENISUS, que inclui 71 espécies vegetais selecionadas pelo amplo uso popular. Além disso, a finalidade da relação também é orientar estudos e pesquisas científicas que possam subsidiar a elaboração da lista de plantas medicinais e fitoterápicas a serem disponibilizados para uso da população, com segurança e eficácia para o tratamento de doenças (BRASIL, 2009).

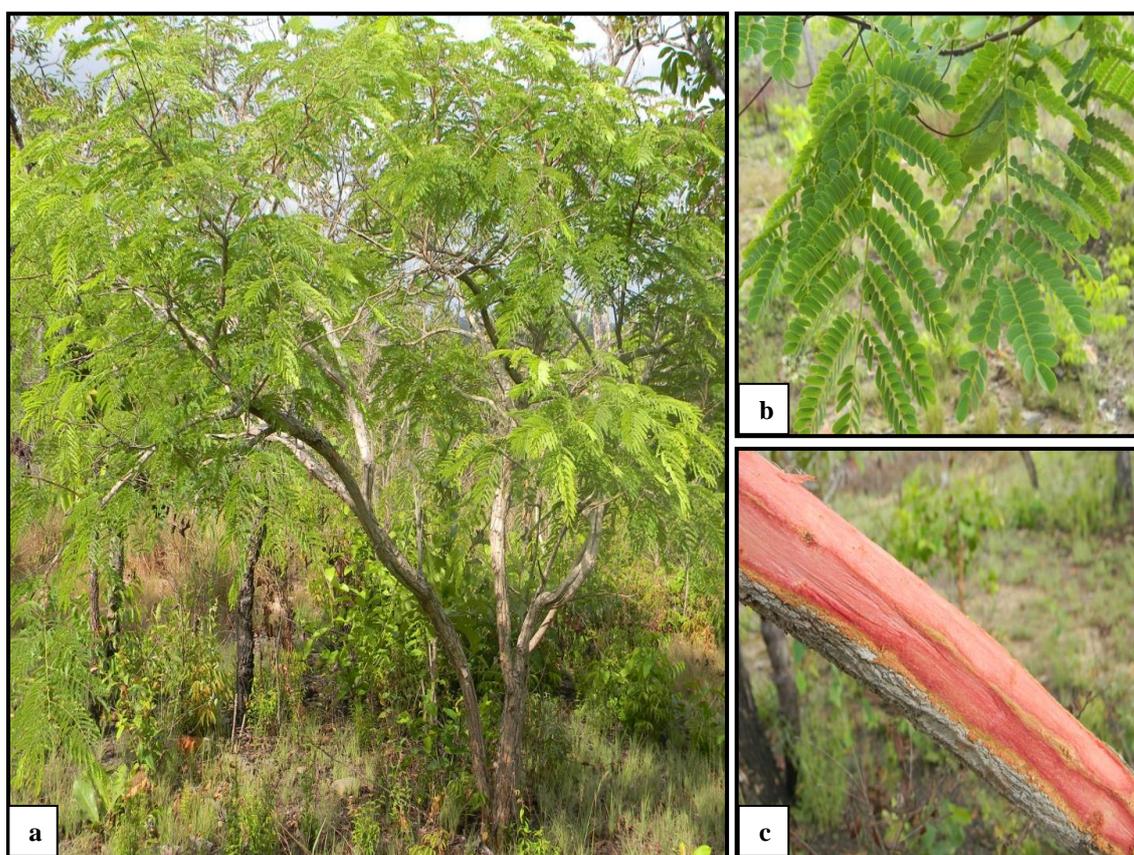
### 1.1.2 *Plathymentia reticulata* Benth

*Plathymentia reticulata* pertence à família Fabaceae, e foi descrita por Bentham em 1842. É conhecida popularmente como barbatimão na região de Santarém e vinhático na região Centro-Oeste, e caracteriza-se por ser uma espécie arbórea, com cerca de 15 metros de altura, decídua, heliófita, folhas bipinadas, flores pequenas dispostas em espigas cilíndricas, frutos em vagem, sementes aladas, xerófita seletiva (LORENZI, 2005 ) (Figura 1).

Ocorre em formações abertas do cerrado Brasileiro, em regiões de transição para florestas, e ainda é característica da região de Alter do Chão, que consiste em uma área de florestas primárias e fragmentos de floresta cercado por vegetação savânica (BERNARD &

FENTON, 2007), sendo sua ocorrência natural já registrada em 13 estados brasileiros e em outros países da América Latina (Figura 2) (LORENZI, 2005; CARVALHO, 2008).

De acordo com Aquino e colaboradores (2007), *P. reticulata* apresenta potencial para sete categorias: medicinal, madeireira, tintorial, ornamental, artesanal, tanífera e apícola. A Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – EMBRAPA considerou em 1994 esta espécie uma das mais importantes do cerrado brasileiro por seu valor comercial, já que possui madeira de qualidade (ALMEIDA et al., 2001 ; HERINGER & FERREIRA, 1972; LORENZI, 2005) e ainda devido às suas propriedades medicinais (SILVA JÚNIOR, 2005).



**Figura 1.** a: *Plathymenia reticulata* Benth. b: folhas c: cascas/caule.

É uma espécie amplamente empregada pela população no tratamento de doenças infecciosas, inflamatórias, hemorragias, picadas de insetos e carrapatos (POTT & POTT, 1994) e a partir de informações obtidas em levantamentos etnobotânicos realizados no ano de 2011, observou-se que *P. reticulata* foi a espécie mais citada por moradores de comunidades do município de Santarém como recurso no tratamento de inflamações, infecções e na preparação de banhos de asseio (ASSUNÇÃO, 2011) e ainda como antiofídica (MOURA,

2012). Por isso, esta espécie foi selecionada para a avaliação das atividades farmacológicas e dos seus efeitos sobre o comportamento e aprendizado animal no presente estudo.



**Figura 2.** Ocorrência natural de *Plathymenia reticulata* Benth no Brasil. Morim, 2014.

### 1.1.3 Constituintes químicos de extratos vegetais

O metabolismo vegetal está relacionado com os processos fotossintéticos realizados pelas plantas e pode ser dividido em primário e secundário. Desses processos, resultam metabólitos primários, como os lipídios, as proteínas, os carboidratos e os ácidos nucleicos, e ainda os metabólitos secundários que são sintetizados a partir do metabolismo da glicose e que possuem função de defesa e comunicação com o ambiente (WINK, 2013).

Quando a glicose é convertida em moléculas de ácido pirúvico pode originar metabólitos secundários por duas vias diferentes. Na primeira, moléculas de piruvato entram na via do ácido chiquímico para formar todos os metabólitos secundários aromáticos

(alcaloides indólicos, quinolínicos, isoquinolínicos; ligninas e lignanas; cumarinas e taninos hidrolisáveis). Na segunda, o purivato continua sendo oxidado até a formação de moléculas de acetil-coenzima A (acetil-coA). Essas podem seguir três vias diferentes: via do ciclo do ácido cítrico, via do mevalonato e via da condensação do acetado, formando os chamados derivados do acetato. Na via do ciclo do ácido cítrico, serão formados os alcaloides pirrolidínicos, tropânicos, pirrolizidínicos, piperidínicos e quinolizidínicos. A via do mevalonato origina terpenóides e os esteróis. A combinação de uma unidade do ácido chiquímico, e uma ou mais unidades de acetato ou derivados desde, poderá resultar na produção de antraquinonas, flavonoides e dos taninos condensados (SANTOS, 2001)

Simões e colaboradores (2007) afirmam que o fracionamento bruto com solventes de polaridade crescente possibilita inferir as possíveis classes de substâncias extraídas nas diferentes frações de acordo com suas polaridades e solubilidades. O fracionamento começa preferencialmente com o hexano onde são extraídos os lipídios, ceras, pigmentos, e furanocumarinas. Com o clorofórmio obtém-se antraquinonas livres, bases livres de alcaloides e glicosídeos cardiotônicos. O acetato de etila e butanol extraem flavonoides, cumarinas simples, triterpenos com polaridade elevada, taninos e diversas classes de heterosídeos.

Os constituintes químicos presentes em *P. reticulata* originam-se do mecanismo geral de todos os metabólitos secundários dos vegetais. Segundo Fernandes (2002), extratos hidroalcoólicos da casca desta espécie são caracterizados pela presença de taninos, antocianinas, saponinas e flavonoides.

Os taninos são considerados uns dos produtos naturais mais importantes das plantas possuem peso molecular entre 500 e 3000 daltons, são solúveis em água e consistem em polifenóis caracterizados pela capacidade de formarem complexos com macromoléculas, como proteínas e alcaloides (HASLAM, 1996; SHAHAT & MARZOUK, 2013). A capacidade de precipitação de proteínas caracteriza o sabor adstringente dos taninos, sendo essa propriedade relevante para a proteção dos vegetais frente aos ataques de patógenos e herbívoros (MADHAN et al., 2005).

Estruturalmente, os taninos apresentam 12-16 grupos fenólicos, 5-7 anéis aromáticos com 1000 unidades relativas e são classificados segundo a sua estrutura química em dois grupos: taninos hidrolisáveis e taninos condensados (BHAT et al., 1998). Os taninos hidrolisáveis consistem em polímeros de ácido gálico ou ésteres elágicos ligados por resíduos de açúcar, geralmente D-glucose, enquanto os taninos condensados são polímeros formados pela condensação de duas ou mais unidades de flavan-3-ol e flavan-3-4-diol, sendo também denominados proantocianidinas ou leucocianidinas (SANTOS & MELLO, 2003).

Dentre as atividades farmacológicas dos taninos já identificadas na literatura destacam-se as atividades antimicrobiana, antivirais, moluscidas, inibidoras de enzimas, antitumoral e sequestradoras de radicais livres, e até de inibição da replicação do vírus HIV (KANBABAEE & REE, 2001). De acordo com Simões e colaboradores (2007), as atividades farmacológicas dos taninos são atribuídas a três ações: complexação com macromoléculas, complexação com íons metálicos e atividade antioxidante.

Os flavonoides são compostos fenólicos, cuja síntese não ocorre na espécie humana. A maioria dos representantes desta classe possui 15 átomos de carbono em seu núcleo fundamental, constituído de duas fenilas ligadas por uma cadeia de três carbonos (SIMÕES et al., 2007). Os flavonoides nas plantas apresentam-se, frequentemente, oxigenados e um grande número ocorre conjugado com açúcares, com ampla variação em sua estrutura. Esses compostos aromáticos, nos vegetais, desempenham o papel de bloqueadores da radiação ultravioleta, além de atuarem na pigmentação das espécies (SIMÕES et al., 2007).

Diversos ensaios biológicos vêm comprovando e determinando a ampla variedade das atividades biológicas dos compostos flavanoídicos. Em seres humanos e animais, os flavonoides apresentam efeitos potenciais como antioxidante, anti-inflamatório, protetor cardíaco, analgésico, antialérgico, antitumoral, antidiabético, cicatrizante, entre outras (SIMÕES et al., 2007).

As saponinas consistem em substâncias derivadas do metabolismo secundário de plantas, que apresentam função relacionada principalmente com o sistema de defesa, sendo por isso denominadas “fitoprotetoras”, e encontradas nos tecidos vegetais mais vulneráveis aos ataques por microrganismos e predação por insetos (PIZARRO, 1999; WINA et al., 2005).

As saponinas consistem em glicosídeos de esteróides ou de terpenos policíclicos que apresentam parte de sua estrutura com caráter lipofílico (triterpeno ou esteroide) e outra hidrofílica (açúcares), sendo essa característica estrutural responsável pela propriedade de redução da tensão superficial da água e suas ações detergentes e emulsificantes (SCHENKEL et al., 2001).

As ações biológicas variadas das saponinas estão relacionadas com o comportamento anfifílico e a capacidade de formar com complexos esteróides, proteínas e fosfolipídeos de membranas que podem levar a mudanças na permeabilidade ou até mesmo levar a destruição celular, sendo as atividades hemolíticas, ictiotóxica e molusquicida estão relacionadas com esta ação sobre as membranas (SCHENKEL et al., 2001). Esses compostos são importantes

para a ação de drogas vegetais, destacando-se o uso tradicional como expectorantes e diuréticas (SIEDENTOPP, 2008).

As antocianinas consistem em pigmentos naturais dos vegetais pertencentes ao grupo dos flavonoides e têm função de atrair polinizadores e dispersores de sementes e proteger os tecidos vegetais (EIBOND et al., 2004). Há um crescente interesse no uso de antocianinas em diversos segmentos, tais como a indústria alimentícia, farmacêutica e cosmética, sendo apresentados muitos benefícios na medicina tradicional em virtude de suas atividades biológicas, que incluem a atividade antioxidante, anti-inflamatória, inibição do LDL, diminuição dos riscos vasculares e câncer (CHANG et al., 2006; CHEN et al., 2006; TOUFEKTSIAN et al., 2008; GARCIA-ALONSO et al., 2009; XIA et al., 2009).

#### 1.1.4 Atividades farmacológicas de plantas medicinais

Durante séculos, preparações contendo extratos vegetais vêm sendo empregadas no tratamento de diversas doenças (VEIGA JÚNIOR & PINTO, 2005). Ao longo das últimas décadas, estudos etnofarmacológicos baseados no uso tradicional e no conhecimento popular têm indicado o potencial farmacológico de certas drogas vegetais, o que associado ao aprimoramento no isolamento, purificação e elucidação estrutural de compostos químicos e à credibilidade na eficácia e segurança clínica, favorecem a expansão mundial do mercado dos fitomedicamentos (CALIXTO, 2005).

Entende-se por atividade biológica a habilidade específica ou a capacidade do produto atingir um efeito biológico definido, o que pode incluir a investigação da atividade farmacológica e toxicológica de substâncias isoladas, frações e extratos totais da droga vegetal (ANVISA, 2011). Segundo Sonaglio e colaboradores (1999) a necessidade de constatar a atividade biológica de uma planta, e de seus produtos derivados, é abordada considerando a necessidade de comprovação de uma determinada atividade farmacológica atribuída pela medicina popular, ou estabelecendo estratégias para o desenvolvimento tecnológico, pois a validação do processo tecnológico exige a conservação da composição química e da atividade farmacológica a ser explorada.

Neste contexto, as plantas são consideradas uma fonte importante de produtos naturais biologicamente ativos que podem ser utilizados na síntese de muitos fármacos (WALL & WANI, 1996). Sendo importante destacar, que a indicação do uso de medicamentos fitoterápicos não tem o objetivo de substituir os medicamentos registrados e comercializados

com eficácia já comprovada, mas sim, aumentar o arsenal terapêutico, ofertando medicamentos equivalentes, registrados e com eficácia comprovada (RATES, 2001).

Por isso, muitos estudos etnobotânicos e farmacológicos têm sido desenvolvidos nos últimos anos com o objetivo de identificar espécies promissoras e ainda explorar esse potencial para as mais diversas atividades farmacológicas, tais como: antitumoral (PARISOTTO et al., 2012; YILDIRIM, 2013), antioxidante (BELLIK, 2014); antiofídica (MOURA et al., 2013), antimicrobiana (ALEKSIC & KNEZEVIC, 2014; SARRAZIN et al., 2012); antinociceptiva (REYNOSO et al., 2013) anti-inflamatória (KUMARI et al., 2014), entre outras.

#### *1.1.4.1 Atividade antinociceptiva*

A dor consiste em um mecanismo de alerta do organismo que indica a presença de um estímulo lesivo e que aciona respostas protetoras apropriadas (WOOLF & SALTER, 2000; JULIUS & BASBAUM, 2001). Dessa maneira, o funcionamento adequado do sistema nociceptivo é essencial para proteger o organismo de danos teciduais. Entretanto, sob condições patológicas, este sistema se torna sensibilizado e a dor transforma-se em uma doença (ZEILHOFER, 2005). De acordo com a Associação Internacional para o Estudo da Dor (IASP do inglês, *International Association for the Study of Pain*), a dor pode ainda ser definida como uma “experiência sensorial e emocional desagradável que está associada com lesões reais ou potenciais ou descrita em termos de tais lesões (LOESER & TREEDE, 2008).

Pode-se ainda classificar a dor levando-se em consideração alguns parâmetros como a duração, origem (fisiológica ou não) e localização, podendo esta ser mediada pelo SNC ou periférico. No que se refere à duração, a dor pode ser classificada como aguda ou crônica. A dor aguda é caracterizada por ser pontual delimitada e desaparecer com a resolução do processo patológico. A dor crônica persiste por um longo período de tempo, sendo associada a processos patológicos crônicos e mudanças no padrão de transmissão neuronal (ALMEIDA et al., 2004).

De maneira precisa, a dor é um resultado subjetivo da nocicepção, que pode ser definida como o processo no qual estímulos térmicos, mecânicos ou químicos nocivos são detectados por fibras nervosas periféricas, denominadas nociceptores (BASBAUM et al., 2009). Assim, enquanto a dor representa uma percepção subjetiva com uma dimensão psicológica, a nocicepção consiste na recepção de estímulos pelos nociceptores que codificam sinais para fornecer informações ao SNC da existência da lesão. Portanto, dor é o termo mais

apropriado para referir-se ao homem e nocicepção o termo indicado para animais experimentais (JULIUS & BASBAUM, 2001).

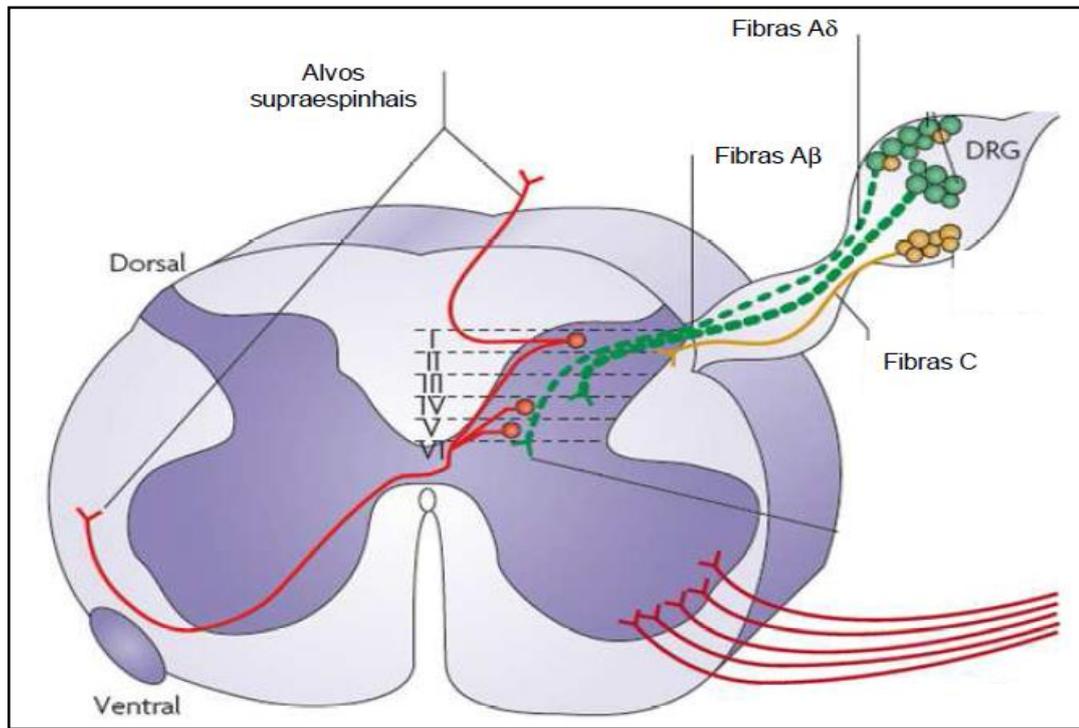
Os nociceptores são terminações nervosas livres na pele que respondem apenas aos estímulos intensos, potencialmente danosos. Extremamente heterogêneos, diferem quanto aos tipos de neurotransmissores que contêm, os receptores e canais iônicos que expressam, na velocidade de condução, nas suas propriedades de resposta ao estímulo nocivo e sua capacidade de serem sensibilizados durante a inflamação, lesão e doença (STUCKY et al., 2001).

Inúmeras substâncias algogênicas (causadoras de dor) que afetam a sensibilidade dos nociceptores são liberadas dentro do tecido extracelular em consequência do dano tecidual. Histamina, bradicinina, acetilcolina, serotonina e substância P são substâncias químicas que aumentam a transmissão da dor, e as prostaglandinas são por sua vez capazes de aumentar a sensibilidade dos receptores dolorosos ao estimularem o efeito de provocação da dor da bradicinina. Esses mediadores químicos também causam vasodilatação e permeabilidade vascular aumentada, resultando em rubor, calor e edema da área lesionada (SMELTZER et al., 2009).

Quando a nocicepção é iniciada, os potenciais de ação nociceptivos são transmitidos pelo sistema nervoso periférico. Os neurônios de primeira ordem viajam da periferia (pele, córnea, órgãos viscerais) até a medula espinhal através do corno dorsal (SMELTZER et al., 2009). Existem dois tipos principais de fibras envolvidas na transmissão da nocicepção. As fibras A $\delta$  (A delta) são mielinizadas e menores, transmitindo rapidamente a nocicepção e as fibras do tipo C que são fibras maiores, não mielinizadas e que transmitem a nocicepção de forma mais lenta (BASBAUM et al., 2009).

A estimulação dos nociceptores gera potenciais de ação que são conduzidos pelas fibras dos neurônios sensoriais primários aos neurônios de segunda ordem no corno dorsal da medula espinhal, ascendendo para o córtex (Figura 3) (CHENG & JI, 2008). Assim como todos os neurônios sensoriais primários do sistema somatosensorial, os nociceptores possuem seus corpos celulares no gânglio da raiz dorsal ou trigeminal e um axônio que se bifurca em um ramo periférico (para inervar o tecido alvo periférico) e um ramo central (o qual entra no SNC para fazer sinapse com neurônios nociceptivos de segunda ordem) (WOOLF & MA, 2007). As fibras nervosas aferentes primárias projetam-se para o corno dorsal da medula espinhal, o qual é organizado em lâminas anatomicamente e eletrofisiologicamente distintas. Por exemplo, nociceptores A $\delta$  projetam-se para as lâminas I e V, enquanto que as fibras C projetam-se para lâminas mais superficiais I e II (BASBAUM et al., 2009).

Os axônios dos neurônios de segunda ordem constituem os feixes aferentes que transmitem os impulsos nociceptivos para as estruturas do tronco cerebral e diencefalo incluindo o tálamo, substância cinzenta periaquedutal, hipotálamo, entre outros (ALMEIDA et al., 2004).



**Figura 3.** Via aferente primária e suas conexões no corno dorsal da medula espinhal. Fibras C não-mielinizadas e fibras A $\delta$  mielinizadas transmitem o impulso nociceptivo até o corno da medula espinhal. Ocorre então sinapse com os neurônios de segunda ordem que ascendem para o córtex. Extraído de Milligan & Watkins (2009).

Os analgésicos correspondem a maior categoria de fármacos no mercado, no entanto nas últimas décadas a procura por novas drogas analgésicas com maior ação e menos efeitos colaterais tem sido contínua (ELIZABETSKY & CASTILHOS, 1990). Esses medicamentos são divididos em dois grupos: os analgésicos opióides e os anti-inflamatórios não-esteroidais (AINES). As drogas opióides incluem a morfina e a codeína e são muito efetivas no tratamento da dor, porém a sua aplicação torna-se limitada por apresentarem muitos efeitos colaterais como hipotensão, bradicardia, náuseas, constipação, depressão respiratória, além da rápida tolerância e dependência física associada ao seu uso (RANG et al., 2012).

Os AINES correspondem a uma grande variedade de drogas de diferentes classes químicas como ácidos salicílicos, ácidos propiônicos, ácidos acéticos, oxicans, fenomatos e pirazolonas e em sua maioria possuem ação analgésica, anti-inflamatória e antipirética.

Apresentam diversos efeitos indesejáveis como hemorragias, úlceras gástricas, reações cutâneas, disfunção renal e hepática, porém não estão relacionadas com tolerância e dependência por uso crônico (RANG et al., 2012).

Nessa perspectiva os produtos naturais são uma importante alternativa como fontes promissoras no desenvolvimento de medicamentos para o tratamento da dor. E para a avaliação desse potencial, diversos modelos experimentais são utilizados para verificar a nocicepção em animais, como o teste da placa quente, o teste de retirada da cauda (tail-flick), além do teste das contorções abdominais induzidas por ácido acético e do teste da formalina, que são os mais aplicados (SANTOS et al., 1998).

O teste da formalina é um método de avaliação comportamental utilizado para medir a efetividade de agentes antinociceptivos, sendo esse modelo associado à dor causada por uma lesão tecidual, no qual a resposta comportamental provocada pela injeção de formalina na pata traseira do animal é quantificada (DUBUISSON & DENNIS, 1977; HUNSKAAR & HOLE, 1987; MARTINS et al., 2006). Esse teste tem a vantagens em relação a outros métodos de nocicepção, pois possibilita a avaliação de dois tipos diferentes de dor por um período prolongado e, assim, permite o teste de analgésicos com diferentes mecanismos de ação (RANDOLPH & PETERS, 1997).

As respostas comportamentais à formalina seguem um padrão bifásico composto de uma fase inicial aguda (primeira fase), imediatamente após a injeção de formalina e se estende pelos primeiros 5min (dor neurogênica ou aguda). Essa fase está relacionada com a estimulação química direta dos nociceptores das fibras aferentes do tipo C e, em parte, das fibras do tipo A $\delta$ , associada ainda à liberação de aminoácidos excitatórios, óxido nítrico (NO) e substância P. O período mais prolongado (segunda fase) ocorre entre 15 e 30 minutos após a injeção de formalina, caracterizado pela liberação de vários mediadores pró-inflamatórios, como bradicinina, prostaglandinas e serotonina, entre outros. O intervalo de quiescência entre a primeira e a segunda fase é resultado de uma inibição da transmissão nociceptiva através de circuitos supra-espinhais e espinhais (HUNSKAAR & HOLE, 1987).

Diversos extratos vegetais utilizados na medicina popular apresentam efeitos frente a modelos experimentais e são recursos promissores para aplicação no tratamento de doenças dolorosas. Em um estudo desenvolvido por Walker e colaboradores (2013), extratos de *Mirabilis jalapa*, uma espécie de uso popular no Brasil, exibiram efeito antinociceptivo em modelos de dor clinicamente relevantes, que pode ser mediado pela ativação do sistema colinérgico através da inibição da acetilcolinesterase. Já Heidari e colaboradores (2006) afirmam que o extrato metanólico das pétalas de *Echium amoenum* induz uma resposta na

segunda fase da formalina em relação ao controle. Este extrato é rico em antocianinas, alcaloides e flavonoides, sendo este último um importante metabólito secundário com atividade analgésica *in vivo*.

Rejón-Orantes e colaboradores (2013) sugerem que a administração de doses baixas do extrato aquoso das raízes de *Mimosa albida* resulta em efeitos antinociceptivos através de mecanismos que não envolvem a ação de opióides, confirmando o uso etnofarmacológico da espécie. De maneira contrária, o mecanismo de analgesia induzido pelo extrato das sementes de *Peganum harmala* nos testes da placa quente e formalina demonstra que esse extrato, rico em alcaloides, apresenta princípios ativos com efeito antinociceptivo de ação central e periférica que podem ser mediados por receptores opióides (FAROUK et al., 2008).

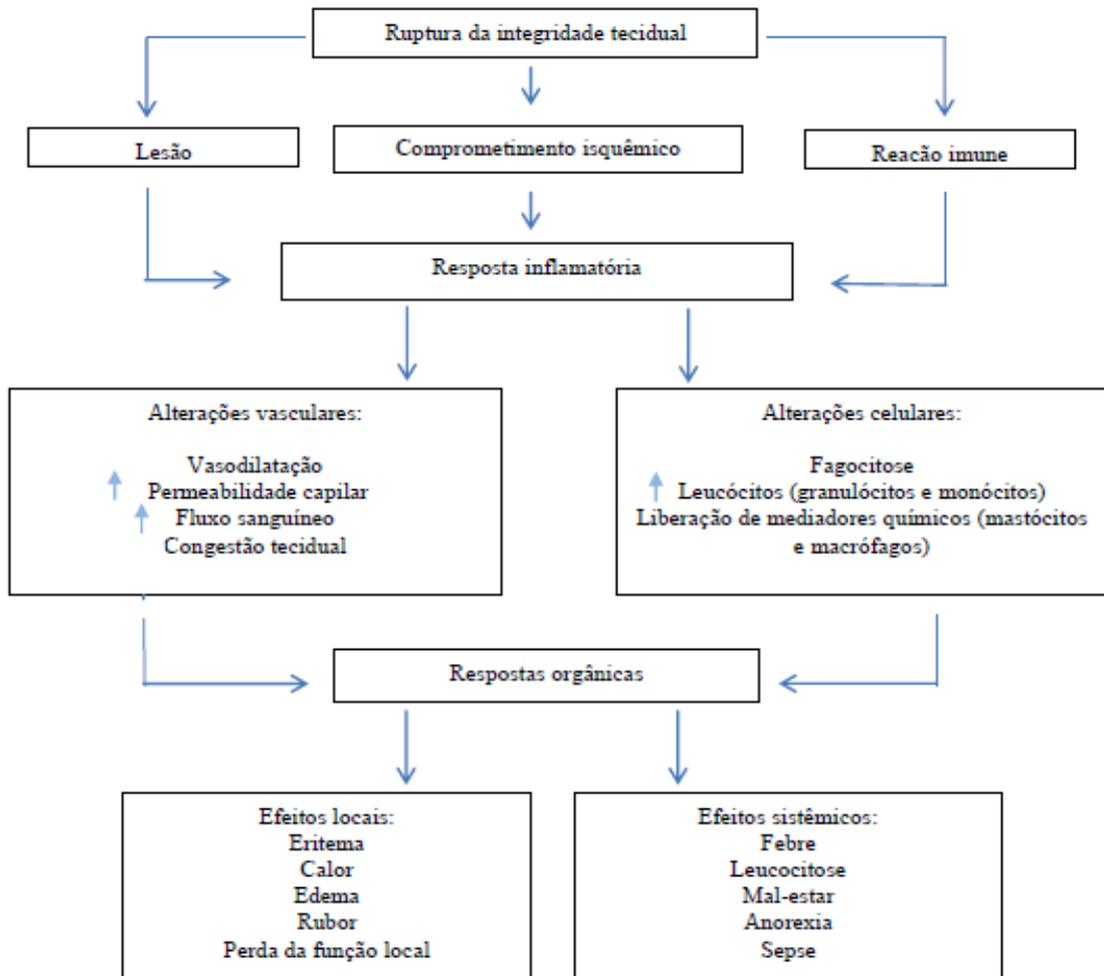
#### 1.1.4.2 Atividade anti-inflamatória

As células e tecidos de um organismo vivo podem ser lesionadas ou mortas por agentes físicos, químicos e infecciosos, levando a uma resposta inflamatória ou inflamação nos tecidos saudáveis adjacentes ao sítio da lesão. A inflamação ou flogose é definida por Brasileiro Filho (2011) como uma reação dos tecidos a um agente agressor caracterizada morfológicamente pela saída de líquidos e de células do sangue (leucócitos) para o interstício, destinada a neutralizar, controlar ou eliminar o agente agressor e preparar o sítio afetado para a reparação.

A reação inflamatória é conhecida desde a antiguidade pela observação de seus sinais clínicos, no entanto só foi observada cientificamente em 1794 por John Hunter. No século XIX, Cohnhein estabeleceu os trabalhos clássicos de experimentação da inflamação utilizando membranas interdigitais de rãs mostrando a exsudação celular e alterações vasculares após a irritação da pele. No século XX, os estudos experimentais progrediram e possibilitaram a descoberta do primeiro mediador químico da inflamação (histamina) e até hoje esses modelos experimentais colaboram para os conhecimentos sobre esse processo fisiológico, entre os quais se destacam a inflamação induzida em patas de ratos por calor ou irritante químico, inflamação induzida por agente inerte, inflamação provocada por lamínulas de vidro, entre outros (BRASILEIRO FILHO, 2011).

A inflamação é uma resposta inespecífica (não depende da etiologia) que visa servir a uma função protetora. No entanto, independente de sua etiologia, uma sequência geral de eventos acontece na resposta inflamatória local, que envolve alterações na microcirculação, incluindo a vasodilatação, permeabilidade vascular aumentada e a infiltração celular

leucocítica. À medida que essas mudanças acontecem, são produzidos cinco sinais cardinais da inflamação: rubor, calor, edema, dor e perda da função local. (SMELTZER et al., 2009) (Figura 4).



**Figura 4.** Resposta Inflamatória. Adaptado de SMELTZER et al., 2009

A vasoconstrição transitória que acontece logo após a lesão, é seguida por vasodilatação aumento do fluxo sanguíneo através da microcirculação até a área de comprometimento tecidual, levando ao surgimento do rubor e calor locais. Em seguida, a estrutura do sistema microvascular se modifica para acomodar o movimento da proteína plasmática do sangue dentro dos tecidos. Após esse aumento na permeabilidade vascular, os líquidos plasmáticos extravasam para dentro dos tecidos inflamados, produzindo o edema. A migração leucocitária ocorre através do endotélio e se acumula no tecido no sítio da lesão. A dor que ocorre é atribuída à pressão dos líquidos ou edema nas terminações nervosas e à

irritação dessas terminações devido a liberação de mediadores químicos, sendo a bradicinina um dos mediadores suspeitos de desencadear esse efeito. A perda da função está mais provavelmente relacionada com a dor e o edema, mas o mecanismo exato, não é totalmente conhecido (SHERWOOD & TOLIVER-KINSKY, 2004).

À medida que o fluxo sanguíneo aumenta e o líquido extravasa para dentro dos tecidos adjacentes, os elementos formadores (eritrócitos, leucócitos e plaquetas) permanecem no sangue, fazendo com que ele se torne viscoso. Os leucócitos presentes nos vasos migram até o sítio da lesão para engolfar os organismos agressores e para remover os resíduos celulares, por meio da fagocitose. O fibrinogênio extravasado coagula, formando a fibrina para a formação do coágulo, que serve para isolar a área lesionada e evitar a disseminação da infecção (SMELTZER et al., 2009).

Todo esse processo é desencadeado em sua maioria pela participação de mediadores químicos, como a histamina e as cininas que induzem alterações vasculares após a lesão tecidual. A histamina está presente em muitos tecidos do organismo, mas sua maior concentração está nos mastócitos. Ela é liberada quando a lesão é iniciada e é responsável pelas alterações iniciais na vasodilatação e a permeabilidade vascular. As cininas aumentam a vasodilatação e a permeabilidade vascular, e também atraem os neutrófilos para o local. Prostaglandinas também são um grupo de substâncias que causam o aumento da permeabilidade vascular (SHERWOOD & TOLIVER-KINSKY, 2004).

É importante destacar que o processo inflamatório é diferente de uma infecção, pois um agente infeccioso é somente um dos fatores que pode deflagrar uma resposta inflamatória. A infecção existe quando o agente infeccioso está vivendo, crescendo e se reproduzindo nos tecidos e ainda é capaz de superar as defesas naturais do organismo. Bactérias e fungos são os principais agentes infecciosos relacionados com esse processo patológico, e desencadeiam desde infecções locais até infecções sistêmicas que afetam a saúde dos seres humanos (SMELTZER et al., 2009).

Apesar do recente progresso no desenvolvimento de novas drogas com fins terapêuticos, ainda existe uma busca exaustiva por anti-inflamatórios potentes e efetivos. Atualmente, os anti-inflamatórios utilizados, como os inibidores de ciclooxigenase e corticoides, possuem inúmeros efeitos colaterais como gastrite, úlcera gástrica, alterações hemostáticas, predisposição a infarto agudo do miocárdio, dentre outros (KONTOGIORGIS et al., 2002).

Moléculas de origem vegetal apresentam importantes atividades anti-inflamatórias e muitas de suas ações são relacionadas à habilidade de inibir a síntese ou ação de citocinas,

quiocininas e moléculas de adesão, vias do ácido araquidônico e NO, além de inibição do NF- $\kappa$ B (CALIXTO et al., 2004).

As preparações de plantas, por sua vez, frequentemente inibem mais de uma via de ação, maximizando os efeitos anti-inflamatórios e minimizando efeitos adversos (SCHMITZ & BACHER, 2005). Isso ocorre em virtude de uma mistura de substâncias que podem agir sinergicamente ou antagonicamente, através de diferentes mecanismos de ação. Além disso, sugere-se que compostos derivados de plantas possam ser utilizados na forma de monopreparados ou em associação aos medicamentos atuais, com o objetivo de diminuir os custos e aumentar a eficácia (CALIXTO et al., 2004).

Muitos extratos e compostos isolados de espécies de plantas com uso popular demonstraram promover a inibição COX e/ou 5-LOX, como a *Achillea illefolium*, *Echinacea angustifolia*, *Echinacea purpurea*, *Hamamelis virginiana*, *Juniperus communis*, *Ledum palustre*, *Polygonum aviculare*, *Sanguinaria canadensis* e *Tanacetum vulgare* (BORCHERS et al., 2000). Outras plantas como a *Glycyrrhiza glabra*, impedem a inflamação atuando na inibição da COX e ainda da enzima fosfolipase A<sub>2</sub>, exibindo uma atividade comparável à hidrocortisona. A *Arnica montana* atua inibindo alvos centrais do processo inflamatório como o fator de transcrição NF- $\kappa$ B, que resulta na supressão da transcrição gênica de alguns mediadores pró-inflamatórios (MERFORT, 2003).

#### 1.1.4.3 Atividade antimicrobiana

Em relação a uma significativa quantidade de bactérias e fungos encontrados no meio ambiente, uma pequena é patogênica e responsável pelo surgimento de infecções de interesse médico. De acordo com a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (2007): *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Enterococcus* spp, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella* spp., *Enterobacter* spp., *Eschericia coli* e a levedura *Candida albicans* são os patógenos infecciosos de maior importância clínica e, por isso, são preconizados para estudos em que se avaliam o potencial antimicrobiano de determinados produtos.

As drogas com potencial anti-infeccioso correspondem a aproximadamente 50% das drogas investigadas e aprovadas, derivadas de produtos naturais no período entre 2000 e 2006. Esse amplo interesse é justificado pela velocidade em que ocorre o processo de resistência dos microrganismos patogênicos aos medicamentos existentes no mercado, superando a capacidade de indústria na produção de novas drogas (NEWMAN & CRAGG, 2007; BUSH, 2004; FERRONATTO et al., 2007).

As propriedades antimicrobianas de plantas estão relacionadas a compostos sintetizados no metabolismo secundário das mesmas, como os compostos fenólicos, que podem ser parte dos óleos essenciais e também dos taninos (SAXENA et al., 1994). Tais produtos podem atuar no metabolismo intermediário ativando enzimas, alterando a ação de inibidores que influenciam os nutrientes do meio, interferindo nos processos enzimáticos em nível nuclear ou ribossomal, provocando alterações nas membranas ou ainda interferindo no metabolismo secundário (COWAN, 1999).

Estudos vêm sendo realizados com o objetivo de comprovar a propriedade antimicrobiana de plantas utilizadas na cultura popular (FABRI et al., 2011; MOUOKEU et al., 2011; HUMEERA et al., 2013). O extrato de planta consiste em uma mistura de compostos bioativos que atuam na permeabilidade da membrana e na respiração celular microbiana, causando a morte (bactericida) ou apenas inibindo o crescimento microbiano (bacteriostático) (SILVEIRA, 1997).

Bussman e colaboradores (2010) avaliaram a atividade antimicrobiana de 141 plantas medicinais utilizadas tradicionalmente para o tratamento de infecções e verificaram que os extratos etanólicos de 51 espécies inibiram *Escherichia coli* e 114 extratos etanólicos inibiram *Staphylococcus aureus*. Em contraste, apenas 30 extratos aquosos mostraram atividade contra *Escherichia coli* e 38 extratos foram ativos contra *Staphylococcus aureus*. Yim e colaboradores (2013) verificaram que os extratos aquosos de 14 espécies de plantas medicinais demonstraram atividade antimicrobiana contra cinco tipos de bactérias orais patogênicas, o que levou esses autores a sugerirem que plantas com potencial antimicrobiano comprovado, podem ser utilizadas no tratamento de doenças.

Diversas metodologias são empregadas para a determinação da atividade antimicrobiana, tais como o método de disco difusão em ágar, microdiluição em caldo, bioautografia, sendo possível a partir dessas técnicas a análise de vários compostos e de diferentes espécies de microrganismos concomitantemente (FARMACOPEIA BRASILEIRA IV, 1988; NCCLS, 2004; SHAHVERDI et al., 2007).

O método de disco difusão em ágar é empregado desde a década de 40, utilizando-se discos de papel filtro como reservatórios que são mantidos em contato com um meio de cultura sólido, inoculado com um determinado microrganismo. Após o tempo adequado de incubação, afere-se o diâmetro do halo de inibição (zona clara onde não houve crescimento microbiano) ao redor da substância avaliada (NCCLS, 2002). Neste método a informação é qualitativa, útil para estabelecer a sensibilidade do microrganismo, mas pode apresentar problemas com as substâncias que não se difundem no meio (ZACCHINO, 2001).

A técnica de microdiluição em caldo emprega a amostra a ser testada dissolvida em um meio sólido ou líquido conveniente e possui a vantagem por ser um método quantitativo. A desvantagem deste método reside no fato do excessivo trabalho envolvido na realização, no consumo considerável de material e de estar sujeito à solubilidade no sistema aquoso (FREIBURGHAUS et al., 1996). Apesar de existirem diferentes métodos para avaliar a atividade antimicrobiana, eles não podem ser comparados, pois algumas metodologias favorecem a interação droga-microrganismo, propiciando melhores resultados (AHMAD & BEG, 2001).

#### 1.1.5 Toxicidade de extratos vegetais

A toxicidade é caracterizada como o potencial de uma substância em causar lesões ao corpo, considerada um evento complexo *in vivo*, pois pode desencadear um dano celular direto, gerando respostas fisiológicas, como efeitos inflamatórios ou sistêmicos (SMELTZER et al., 2009). Qualquer substância pode ser considerada um agente tóxico, de acordo com as condições de exposição como a dose, tempo, frequência de exposição e a via de administração. Por isso é fundamental conhecer as condições seguras de uso das mais variadas substâncias químicas a fim de evitar danos à saúde do homem ou ainda agravos ao meio ambiente e óbitos (ANVISA, 2004b).

O uso de plantas com finalidade terapêutica, bem como de outras substâncias exige a avaliação de parâmetros como a atividade biológica e principalmente a sua toxicidade (CALIXTO, 2005). Existe na população a crença na “naturalidade inócua” desses produtos, baseada na tendência em acreditar que os recursos existentes na natureza foram criados para satisfazer as necessidades humanas, não existindo riscos em seu consumo (CARVALHO, 2001). Além disso, as informações a respeito de intoxicações e efeitos colaterais dificilmente chegam ao alcance da população, principalmente a de baixa renda (SILVA et al., 2006). Dessa forma, os estudos toxicológicos são importantes para avaliar a ideia errônea de que os produtos naturais são isentos de efeitos tóxicos ou adversos, e que somente o uso popular de plantas medicinais é suficiente para a validação da eficácia desses recursos como medicamentos (ATSAMOA et al., 2011).

Estudos que avaliam os efeitos tóxicos de *Plathymenia reticulata* são escassos. Albuquerque (2009) verificou a citotoxicidade de diferentes concentrações do extrato hidroalcoólico desta espécie, que foi avaliada *in vitro* em células ovarianas de hamster chinês, sendo a DL 50 = 1.1379,67 mg/kg e *in vivo* durante a gestação de ratas, no qual foi

demonstrado que não ocorreu má formação congênita. Porém, no decorrer do experimento observou-se reabsorção de fetos dos grupos experimentais com a dose de 1,0 g/Kg, contrastando com o índice de implantação, o que indica uma falha no desenvolvimento embrionário, provavelmente ocasionada pela administração do extrato.

Della Torre et al. (2011), demonstraram que o extrato etanólico de *Plathymenia reticulata* apresentou atividade mutagênica nos ensaios de mutagenicidade de *Salmonella* (teste de Ames) e no teste de micronúcleos. De forma geral, estes resultados demonstram que mais estudos toxicológicos são necessários para a avaliação dos riscos de toxicidade que podem estar associados ao uso desta espécie como recurso terapêutico, principalmente, no que diz respeito aos riscos de neurotoxicidade, que geralmente está associada ao uso a longo prazo de substâncias tóxicas.

#### 1.1.6 Neurotoxicidade

O sistema nervoso consiste em duas divisões: o sistema nervoso central (SNC), incluindo o cérebro e a medula espinhal, e o sistema nervoso periférico, que inclui os nervos cranianos e espinhais. A função do SNC é controlar todas as atividades motoras, sensoriais, autonômicas, cognitivas e comportamentais. O cérebro, propriamente dito, possui mais de 100 bilhões de células que ligam as vias motoras e sensoriais, monitoram os processos corporais, respondem aos ambientes externo e interno, mantém a homeostase e dirigem todas as atividades psicológicas, biológicas e físicas através de mensagens químicas e elétricas (SMELTZER et al., 2009).

A neurotoxicidade constitui os efeitos adversos, tanto estruturais quanto funcionais causados pela ação de agentes biológicos, físicos e químicos no sistema nervoso periférico e central, que podem ser permanentes ou irreversíveis e afetarem a capacidade de adaptação do organismo ao ambiente e promover a diminuição no tempo de sobrevivência e reprodução (SLIKKER & BOWYER et al., 2005). Essas manifestações tóxicas podem consistir em efeitos discretos, como a redução do nível de atenção e dificuldade de concentração, ou até mesmo em um comprometimento mais severo da capacidade psicomotora e cognitiva (BRASILEIRO FILHO, 2011).

Alterações nas vias de sinalização celular, perturbações da estrutura genômica e interrupção do processo de comunicação são algumas das alterações causadas às células nervosas após a exposição a compostos neurotóxicos. Estes compostos podem causar

deficiências funcionais celulares transitórios, ou mesmo permanentes, e ainda danos celulares e/ou morte celular (SONG et al., 2011).

O sistema límbico é uma das principais áreas do SNC afetadas por substâncias tóxicas, sendo nesta região localizado o hipocampo, responsável pelos processos de aprendizagem e memória, além do processamento de informações comportamentais (LIU et al., 2013). A região dorsal do hipocampo está relacionada com os processos de memória espacial e aprendizagem, e a região ventral tem sua função relacionada com a ansiedade (BANNERMAN et al., 2004). O cerebelo é reconhecido também como uma região frequentemente afetada pela ação de substâncias tóxicas, e está relacionado com coordenação motora, equilíbrio, além de funções cognitivas e sensoriais (MURDOCH, 2010).

Estudos científicos sobre o comportamento animal têm demonstrado que os organismos são capazes de adquirir informações sobre muitos aspectos do ambiente e também de seu próprio comportamento, registrar e conservar os eventos relevantes de modo codificado em seu SNC. Desse modo, os estudos experimentais *in vitro* e, principalmente, os modelos *in vivo* considerados cruciais para a elucidação dos mecanismos moleculares e celulares da neurotoxicidade (FARINA et al., 2011).

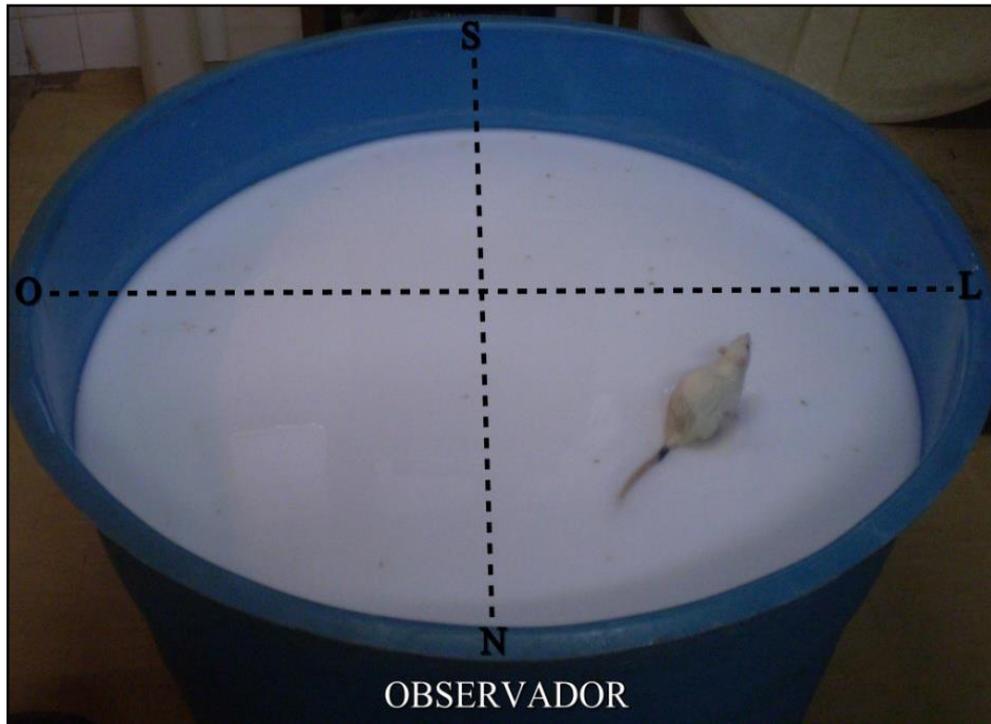
#### 1.1.7 Testes de comportamento animal

Em virtude da complexidade funcional do sistema nervoso, da natureza múltipla dos eventos neurotóxicos, da variabilidade e inacessibilidade dos sítios celulares e ainda dos efeitos tardios das substâncias tóxicas, os recursos para a avaliação de efeitos neurotóxicos são limitados, sendo destaque, nesse sentido, o parâmetro neurocomportamental. Existem diversos modelos comportamentais que podem ser aplicados para avaliação de alterações de funções cognitivas, como, por exemplo, aprendizagem e memória, já que a principal região do sistema nervoso afetada pela ação de substâncias tóxicas é o hipocampo, cuja função está relacionada com a memória e o aprendizado, consideradas funções básicas do SNC (MANZO, 1995; SMELTZER et al., 2009).

Os métodos comportamentais objetivam avaliar respostas de animais quanto à função motora de por meio de metodologias de esforço e resistência muscular, função sensorial e comportamento cognitivo, sendo este avaliado através de parâmetros como o aprendizado e memória espacial (KULLIG et al., 1996).

A memória espacial corresponde à função do cérebro responsável pelo reconhecimento, codificação, armazenamento e recuperação de informações espaciais sobre a

disposição de objetos e rotas específicas (KESSELS et al., 2001). O labirinto aquático de Morris consiste na análise comportamental mais conhecida e aceita para a avaliação deste parâmetro (D'HOOGHE e DE DEYN, 2001).



**Figura 5.** Labirinto Aquático de Morris. Foto: Ellen Aranha

O teste de labirinto aquático de Morris (Figura 5) consiste na verificação da cognição em ratos por meio de uma atividade que avalia a memória espacial dependente do hipocampo (MORRIS, 1984). Estes animais serem nadadores natos e apresentam bom desempenho na localização de uma plataforma de escape submersa em um tanque. Por apresentarem aversão à água, a fuga para a plataforma é a principal motivação deste aprendizado, e após alguns treinos os animais mesmo sem ver, ouvir ou sentir o odor da plataforma aprendem a alcançá-la pelo caminho mais curto (MORRIS, 1984; LUCAS et al., 2005).

Outro teste aplicado para a avaliação da memória em ratos é o do labirinto em Y (Figura 6) foi proposto por Montgomery nos anos 50. O objetivo é avaliar a memória espacial e a ansiedade de animais, submetidos a um ambiente novo, fundamentado na habilidade inata de roedores na exploração de novos ambientes (CHEN et al., 2010).



**Figura 6.** Labirinto em Y

O teste do campo aberto (Figura 7) tem por finalidade a avaliação de uma atividade depressora ou estimulante de um composto químico sobre SNC de animais, por meio do efeito deste na memória espacial. A locomoção e sedação são utilizadas como parâmetros comportamentais que tendem a aumentar ou diminuir de acordo com o efeito da substância química (OLIVEIRA et al., 2008).



**Figura 7.** Campo aberto

O teste da caixa clara-escura foi proposto por Denoble et al. (1986), e consiste em um modelo experimental de esquiva inibitória aplicado para avaliação da memória aversiva, baseado na aversão natural dos roedores a áreas iluminadas e no comportamento exploratório habitual (Figura 8). O comportamento natural do animal é inibido pela aplicação de choques elétricos de baixa amperagem, portanto a aprendizagem é observada pela inibição do comportamento exploratório (MAZZAMBANI et al., 2005).



**Figura 8.** Caixa Clara-escura

Dunham e Miya (1957) propuseram o teste da barra gortória (Rotarod) que é utilizado na avaliação da coordenação motora em ratos. O equipamento utilizado possui uma haste com giro circular que mantém velocidade constante ou crescente (Figura 9) e fornece uma estimativa sobre o nível de coordenação neuromuscular dos animais, uma vez que diversas drogas podem provocar perturbação nesse parâmetro, o que leva a redução do tempo de permanência dos animais sobre a haste (CASTAGNÉ et al, 2013).



**Figura 9.** Barra giratória

Levando-se em consideração os riscos associados ao uso de produtos naturais sem averiguação da eficácia e segurança, os extratos vegetais com fins farmacológicos e terapêuticos devem ser avaliados quanto a sua toxicidade. Uma vez que estudos de bases toxicológicas são fundamentais antes da utilização de espécies vegetais no desenvolvimento de novos medicamentos, pois uma substância altamente tóxica pode provocar efeitos danosos aos organismos vivos ou ao meio ambiente mesmo que seja utilizada em doses baixas, enquanto que as de baixa toxicidade necessitam de altas doses para promover um efeito tóxico (HARIZAL et al., 2010).

## 1.2 OBJETIVOS

### 1.2.1 Objetivo geral

Avaliar as atividades farmacológicas e o efeito do extrato aquoso das cascas de *lathymenia reticulata* sobre o comportamento e aprendizagem em ratos, bem como determinar o seu perfil fitoquímico.

### 1.2.2 Objetivos específicos

- ✓ Determinar a concentração inibitória mínima do extrato aquoso de *P. reticulata*;
- ✓ Determinar as concentrações bactericida e fungicida mínimas do extrato aquoso de *P. reticulata*;
- ✓ Investigar o efeito antinociceptivo do extrato aquoso de *P. reticulata*
- ✓ Investigar o efeito antiedematogênico do extrato aquoso da entrecasca de *P. reticulata*;
- ✓ Avaliar o efeito do extrato aquoso de *P. reticulata* sobre o comportamento e aprendizagem em ratos

## 2 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADEOYE, B.A.; OYEDAPA, O.O. Toxicity of *Erythrophleum guineense* stem-bark: role of alkaloidal fraction. **African Journal of Traditional Complementary and Alternative Medicine**, v. 1, p. 45–54, 2004.
- AGARWAL, V.; LAL, P.; PRUTHI, V. Effect of Plant Oils on *Candida albicans*. **Journal of Microbiology, Immunology and Infection**, v. 43, n. 5, p. 447– 451, 2010.
- AHMAD, I.; BEG, A.Z. Antimicrobial and phytochemical studies on 45 Indian medicinal plants against multi-drug resistant human pathogens. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 74, n. 2, p. 113-123, 2001.
- ALBUQUERQUE, L.B.L **Estudos *in vitro* e *in vivo* da *Plathymenia reticulata* Benth.** Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas). Universidade de Sorocaba. São Paulo, 2009.
- ALEKSIC, V.; KNEZEVIC, P. Antimicrobial and antioxidative activity of extracts and essential oils of *Myrtus communis* L., **Microbiological Research**, v. 169, n. 4, p. 250-254, 2014.
- ALMEIDA SP, PROENÇA CEB, SANO SM. Cerrado: Espécies Vegetais Úteis. EMBRAPA–CPAC, Planaltina, 1998 apud LACERDA, D.R.; LEMOS-FILHO, J.P.; ACEDO, M.D.P.; LOVATO, M.B. Genetic diversity and structure of natural populations of *Plathymenia reticulata* (Mimosoideae), a tropical tree from the Brazilian Cerrado. **Molecular Ecology**, v. 10, p. 1142 – 1152, 2001.
- ALMEIDA, T. F.; ROIZENBLATT, S.; TUFIK, S. Afferent pain pathways: a neuroanatomical review. **Brain Res**, v. 1000, n. 1-2, p. 40-56, 2004.
- ALMEIDA, A.C.; SOBRINHO, E.M.; PINHO, L.; SOUZA, P.N.S.; MARTINS, E.R.; DUARTE, E.R.; SANTOS, H.O.; BRANDI, I.V.; CANGUSSU, A.S.; COSTA, J.P.R. Toxicidade aguda dos extratos hidroalcoólicos das folhas de alecrim-pimenta, aroeira e barbatimão e do farelo da casca de pequi administrados por via intraperitoneal. **Ciência Rural**, v. 40, p. 200–203, 2009.
- ALI-SHTAYEH, M.S.; YAGHMOUR, R. M. R.; FAIDI, Y. R.; SALEM, K.; AL-NURI, M. A. Antimicrobial activity of 20 plants used in folkloric medicine in the Palestinian area. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 60, p. 265–271, 1998.
- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA – ANVISA. **Resolução RDC nº 48, 16 de março de 2004 - Registro de Medicamentos Fitoterápicos**. Brasília: ANVISA/Ministério da Saúde, 2004a.
- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA – ANVISA. **Guia para a Realização de Estudos de Toxicidade Pré-Clínica de Fitoterápicos**. Brasília: ANVISA/Ministério da Saúde, 2004b.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA - ANVISA. **Investigação e controle de bactérias multirresistentes**. Brasília: ANVISA/Ministério da Saúde, 2007.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA - ANVISA. **Registro de Produtos Biológicos/Bases Legais e Guias – Coletânea**. Brasília: ANVISA/Ministério da Saúde, 2011.

AQUINO, F.G.; WALTER, B.M.T.; RIBEIRO, J.F. Espécies vegetais de uso múltiplo em reservas legais de cerrado - Balsas, MA. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 5, p. 147-149, 2007.

ARARUNA, M.K.A; SANTOS, K.K.A; COSTA, J.G.M; COUTINHO, H.D.M; BOLIGON. A.A.; STEFANELLO, S.T.; ATHAYDE, M.L; SARAIVA, R.A.; ROCHA, J.B.T; KERNTOPF, M,R; MENEZES, I.R.A. Phenolic composition and in vitro activity of the Brazilian fruit tree *Caryocar coriaceum* Wittm.European. **Journal of Integrative Medicine**, v. 5, p.178-183, 2013.

ASSOB, J.C.N.; KAMGA, H.L.F.; NSAGHA, D.S.; NJUNDA, A.L.; NDE, P.F.; ASONLAGEM, E.A.; NJOUENDO, A.J.; SANDJON, B.; PENLAP, V.B. Antimicrobial and toxicological activities of five medicinal plant species from Cameroon Traditional Medicine. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v.11, p.70, 2011.

ASSUNÇÃO, A.P.F. **Abordagem etnobotânica, potencial anti-Candida e toxicidade de plantas medicinais da comunidade do Cucurunã - Santarém, Pará**. Trabalho de conclusão de curso (graduação em ciências biológicas). Universidade Federal do Oeste do Pará, 2011.

ATSAMOA, A.D.; NGUELEFACKA, T.B.; DATTÉB, J.Y.; KAMANYIA, A. Acute and subchronic oral toxicity assessment of the aqueous extract from the stem bark of *Erythrina senegalensis* DC (Fabaceae) in rodents. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 134, p. 697–702, 2011.

BANNERMAN, D.M.; RAWLINS, J.N.P.; MCHUGH, S.B.; DEACON, R.M.J.; YEE, B.K.; BAST, T. ; ZHANG, W.N.; H.H.J. POTHUIZEN, H.H.J.; FELDON, J. Regional dissociations within the hippocampus memory and anxiety. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 28, p. 273–283, 2004.

BASBAUM, A. I.; BAUTISTA, D. M.; SCHERRER, G.; JULIUS, D. Cellular and molecular mechanisms of pain. **Cell**, v. 139, n. 2, p. 267-84, 2009.

BELLIK, Y. Total antioxidant activity and antimicrobial potency of the essential oil and oleoresin of *Zingiber officinale* Roscoe. **Asian Pacific Journal of Tropical Disease**, v. 4, n. 1, p. 40-44, 2014.

BERNARD, E; FENTON, M.B. Bats in a fragmented landscape: Species composition, diversity and habitat interactions in savannas of Santarém, Central Amazonia, Brazil. **Biological conservation**, v. 134, p. 332-343, 2007.

BHAT, T.K.; SINGH, B.; SHARMA, O.P.; Microbial degradation of tannins – A current perspective. **Biodegradation**, v. 9, p. 343-357, 1998.

BORCHERS, A.T.; KEEN, C.L.; STERN, J.D.; GERSHWIN, E. Inflammation and native American medicine: the role of botanicals. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 72, p. 339-347, 2000.

BRASIL, **Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares no Sistema Único de Saúde**. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 03 de maio de 2006a.

BRASIL. **Política Nacional de Plantas Mediciniais e Fitoterápicos**. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 23 de junho de 2006b.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento de Assistência Farmacêutica e Insumos Estratégicos-Formulário Terapêutico Nacional: Relação Nacional de Plantas Mediciniais de Interesse do SUS RENISUS Fev 2009. Disponível em: < <http://www.saude.gov.br/bvs> >. Acessado em junho de 2013.

BRASILEIRO FILHO, G. **Bogliolo Patologia Geral**. 8. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2011.

BUSH, K. Why it is important to continue antibacterial drug discovery. **ASM News**, v. 70, n. 6, p. 282–287, 2004.

BUSSMANN, R.W.; MALCA-GARCÍAB, G.; GLENNA, A.; SHARONA, D.; CHAITC, G.; DÍAZB, D.; POURMANDD, K.; JONATD, B.; SOMOGYE, S.; GUARDADOF, G.; AGUIRREF, C.; CHANF, R.; MEYERA, K.; KUHLMANA, A.; TOWNESMITHA, A.; EFFIO-CARBAJALB, J.; FRÍAS-FERNANDEZB, F.; BENITO, M. Minimum inhibitory concentrations of medicinal plants used in Northern Peru as antibacterial remedies. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 132, p. 101–108, 2010.

CALIXTO, J.B.; BEIRITH, A.; FERREIRA, J.; SANTOS, A.R.; FILHO, V.C.; YUNES, R.A. Naturally occurring antinociceptive substances from plants. **Phytotherapy Research**, v.14, n.6, p.401-418, 2000.

CALIXTO, J.B.; CAMPOS, M.M.; OTUKI, M.F.; SANTOS, A.R.S. Anti-inflammatory compounds of plant origin. Part II. Modulation of pro-inflammatory cytokines, chemokines and adhesion molecules. **Plant Med**, v. 70, p. 93-103, 2004.

CALIXTO, J. B. Twenty-five years of research on medicinal plants in Latin America. A personal view. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 100, n. 2, p. 131-134, 2005.

CARVALHO, J. E. Fitoterápicos: alimento ou medicamento? In: MERCADANTE, A. Z. et al. Ciência de Alimentos: avanços e perspectivas. Campinas: Faculdade de Engenharia de Alimentos da Unicamp, v. 3, p. 196-202, 2001.

CARVALHO, J.C.T. **Fitoterápicos anti-inflamatórios: aspectos clínicos, farmacológicos e aplicações terapêuticas**. Ribeirão Preto: Tecmedd, 2004.

CARVALHO, P. E. R. **Espécies arbóreas brasileiras**. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica; Colombo: Embrapa Florestas, v. 3, 2008.

CASTAGNÉ, V.; FROGER-COLLÉAUX, C.; ESNEAULT, E.; HERNIER, A.; LEMAIRE, M.; PORSOLT, R. Central Nervous System (CNS) Safety Pharmacology Studies. In: **Drug Discovery and Evaluation: Safety and Pharmacokinetic Assays**, p 17-72, 2013.

CHANG, Y.C.; HUANG, K.X.; HUANG, A.C.; HO, Y.C.; WANG, C.J. Hibiscus anthocyanins-rich extract inhibited LDL oxidation and oxLDL-mediated macrophages Apoptosis. **Food and Chemical Toxicology**, v. 44, n. 7, p. 1015, 2006.

CHEN, P.N.; KUO, W.H.; CHIANG, C.L.; CHIOU, H.L.; SHOU, Y.S.; CHUC, S.C. Black rice anthocyanins inhibit cancer cells invasion via repressions of MMPs and u-PA Expression. **Chemico-Biological Interactions**, v. 163, n. 3, p. 218, 2006.

CHEN, Y.; MAO, Y.; ZHOU, D.; HU, X.; WANG, J.; MA, Y. Environmental enrichment and chronic restraint stress in ICR mice: Effects on prepulse inhibition of startle and Y-maze spatial recognition memory. **Behavioural Brain Research**, v. 212, p. 49–55, 2010.

CHENG, J. K.; JI, R. R. Intracellular signaling in primary sensory neurons and persistent pain. **Neurochem Res**, v. 33, n. 10, p. 1970-8, 2008.

COWAN, M. M. Plants products as antimicrobial agents. **Clin. Microbiol. Rev**, v. 12, p. 564-582, 1999.

D'HOOGE, R.; DE DEYN, P. Applications of the Morris water maze in the study of learning and Memory. **Brain Research Reviews**, v. 36, p. 60-90, 2001.

DELLA TORRE, A.; ALBUQUERQUE, L.B.L.; FARRAPO, N.M.; OSHIMA-FRANCO, Y.; SANTOS, M.G.; TAVARES, R.V.S.; RODAS, A.C.D.; DAL BELO, C.A.; CARDOSO, C.R.P.; VARANDA, E.A.; GROppo, F.C.; LOPES, P.S. Mutagenicity induced by the hydroalcoholic extract of the medicinal plant *Plathymenia reticulata* Benth. **The Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, v. 17 n.2. p. 190-198, 2011.

DENOBLE, V.J.; REPETTI, S.J.; GELPKE, L.W.; WOOD, L.M.; KEIM, K.L. Vinpocetine: nootropic effects on scopolamine-induced and hypoxia-induced retrieval deficits of a step-through passive avoidance response in rats. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 24, n. 4, p. 1123-1128, 1986.

DUBUISSON, D.; DENNIS, S.G. The formalin test: a quantitative study of the analgesic effects of morphine, meperidine and brain stem stimulation in rats and cats. **Pain**, v. 4, n. 2, p. 161 – 174, 1977.

DUNHAM, N.W.; MIYA, T.S. A note on a simple apparatus for detection neurological deficit in rats a mice. **Journal of the American Pharmaceutical Association**, v. 46, p. 208-209, 1957.

EIBOND, L.S.; REYNERTSON, K.A.; LUO, X.D.; BASILE, M.J.; KENNELLY, E.J. Anthocyanin antioxidants from edible fruits. **Food Chemistry**, v. 84, n. 1, p. 23, 2004.

ELIZABETSKY, E & CASTILHOS, Z. Plants used as analgesic by Amazonian caboclos as a basic for selecting plants for investigation. **International Journal of Crude Drug Research**, v. 28, p. 309-320, 1990.

EMBRAPA. **Atlas do meio ambiente do Brasil**. Brasília. Ed. Terra Viva, 1994.

FABRI, R.L.; NOGUEIRA, M.S.; DUTRA, L.B.; BOUZADA, M.L.M.; SCIO, E. Potencial antioxidante e antimicrobiano de espécies da família Asteraceae. **Rev. Bras. Pl. Med**, v.13, n.2, p.183-189, 2011.

FABRICANT, D.S.; FARNSWORTH, N.R. The value of plants used in traditional medicine for drug discovery. **Environmental Health Perspectives**, v. 109, n. 1, p. 69-75, 2001.

FARINA, M.; ROCHA, J.B.T.; ASCHNER, M. Mechanisms of methylmercury-induced neurotoxicity: Evidence from experimental studies. **Life Sciences**, v. 89, p. 555–563, 2011.

FARMACOPEIA BRASILEIRA. 4 ed. Parte I. São Paulo: Atheneu, 1988.

FAROUK, L.; LAROUBI, A.; ABOUFATIMA, R.; BENHARREF, A.; CHAIT, A. Evaluation of the analgesic effect of alkaloid extract of *Peganum harmala* L.: Possible mechanisms involved. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 115, n. 3, p. 449-454, 2008.

FERNANDES, A.T. **Atividade farmacológica dos extratos obtidos de *Plathymenia reticulata* Benth (Leguminosae)**. Dissertação (Mestrado em Clínica Médica). Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2002.

FERRONATTO, R.; MARCHESAN, E.D.; PEZENTI, E.; BEDNARSKI, F.; ONOFRE, S.B. Atividade antimicrobiana de óleos essenciais produzidos por *Baccharis dracunculifolia* D.C. e *Baccharis uncinella* D.C. (Asteraceae). **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 17, n. 2, p. 224–230, 2007.

FREIBURGHAUS, F.; KAMINSKY, R.; NKUNYA, M. H. H.; BRUN, R. Evaluation of African medicinal plants for their in vitro trypanocidal activity. **J. Ethnopharmacol.**, v. 55, p. 1-11, 1996.

GARCIA-ALONSO, M.; MINIHANE, A.M.; RIMBACH, G.; RIVAS-GONZALO, J.C.; TEREZA, S.P. Red wine anthocyanins are rapidly absorbed in humans and affect monocyte chemoattractant protein 1 levels and antioxidant capacity of plasma. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 20, n. 7, p.521, 2009.

GILBERT, B.; J.L.P, FERREIRA; ALVES, L.F. **Monografias de plantas medicinais brasileiras e aclimatadas**. Curitiba: Abifito, 2005.

HARIZAL, S.N.; MANSON, S.M.; HASNAN, J.; THARAKAN, J.K.J.; ABDULLHAH, J. Acute toxicity study of the standardized methanolic extract of *Mitragyna speciosa* Korth in Rodent. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 131, p. 404–409, 2010.

HASLAM, E. Natural polyphenols (vegetable tannins) as drugs: possible modes of action. **Journal of Natural Products**, v. 59, p. 205-215, 1996.

HERINGER, E.P.; FERREIRA, M.B. Árvores úteis no cerrado (I): Vinhático – o gênero *Plathymenia* Benth. *P. foliosa* Benth e *P. reticulata* Benth., vinhático da mata e vinhático do campo. **Cerrado**, v. 5, p.28-34, 1972.

HOSSEINZADEH, H.; YOUNESI, H.M.. Antinociceptive and anti-inflammatory effects of *Crocus sativus* L. stigma and petal extracts in mice. **BMC Pharmacology**, v. 2, n. 7, 2002.

HEIDARI, M.R.; AZAD, E.M.; MEHRABANI, M. Evaluation of the analgesic effect of *Echium amoenum* Fisch & C.A. Mey. extract in mice: Possible mechanism involved, **Journal of Ethnopharmacology**, v. 103, n. 3, p. 345-349, 2006.

HUMEERA, N.; AZRA, K.N.; BANDH, S.A.; AMIN, S.; LONE, B.A.; GOUSIA, N. Antimicrobial and antioxidant activities of alcoholic extracts of *Rumex dentatus* L. **Microbial Pathogenesis**, v. 57, p. 17-20, 2013.

HUNSKAAR, S.; HOLE, K. The formalin test in mice: dissociation between inflammatory and non-inflammatory pain. **Pain**, v. 30, n. 1, p. 103-114, 1987.

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

KANBABAEI, K.; van REE, T. **Tannins: Classification and Definition**. **Natural Product Reports**, Londres, v.18, n.6, p. 641-649, 2001. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1039/B101061L>. Acesso em: 16 ago. 2013.

KESSELS, R. P. C.; HAAN, E. H. F.; KAPPELLE, L. J.; POSTMA, A. Varieties of human spatial memory: a meta-analysis on the effects of hippocampal lesions. **Brain Research Reviews**, v. 35, p. 295-303, 2001.

KOEHN, F.E.; CARTER, G.T. The evolving role of natural products in drug discovery. **Nat. Rev. Drug Discov**, v.4, n.3, p. 206-20, 2005.

KONTOGIORGIS, C. A.; HADJIPAVLOU-LITINA, D. J. Non-steroidal anti-inflammatory and anti-allergy agents. **Current Medicinal Chemistry**, v. 9, p. 89-98, 2002.

KUETE, V.; ANGO, P.Y.; FOTSO, G.W.; KAPCHE, G.D.W.F.; WOUKING, A.G. Antimicrobial activities of the methanol extract and compounds from *Artocarpus communis* (Moraceae). **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 11, p. 42, 2011.

KULLIG, B.; ALLEVA, E.; BIGNAMI, G.; COHN, J.; CORY-SLECHTA, D.; LANDA, V.; O'DONOGHUE, J.; PEAKALL, D. Animal behavioral methods in neurotoxicity assessment: SGOMSEC joint report. *Environmental health perspectives*, v. 104, n. 2, p. 193-204, 1996.

KUMARI, K. D. K. P.; WEERAKOON, T. C. S.; HANDUNNETTI, S. M.; SAMARASINGHE, K.; SURESH, T. S. Anti-inflammatory activity of dried flower extracts of *Aegle marmelos* in Wistar rats, **Journal of Ethnopharmacology**, v. 151, n. 3, p. 1202-1208, 2014.

LIMA, M.R.F.; LUNA, J.S.; SANTOS, A.F.; ANDRADE, M.C.C.; SANT'ANA, A.E.G.; GENET, J.; MARQUEZ, B.; NEUVILLE, L.; MOREAU, N. Antibacterial activity of some Brazilian medicinal plants. **Journal of Ethnopharmacology**, v.105, p. 137-147, 2006.

LIU, K.; HAO, J.; ZENG, Y.; DAI, F.; GU, P. Neurotoxicity and Biomarkers of Lead Exposure: a Review. **Chinese Medical Sciences Journal**, v. 28, n. 3, 2013.

LOESER, J. D.; TREEDE, R. D. The Kyoto protocol of IASP Basic Pain Terminology. **Pain**, v. 137, n. 3, p. 473-7, 2008.

LORENZI, H. Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. Nova Odessa: Plantarum, 1992. In: BRAGA, L.L.; G.S. TOLENTINO; M.R. SANTOS; M.D.M. VELOSO; Y.R.F. NUNES. Germinação de Sementes de *Plathymenia reticulata* Benth. (Fabaceae-Mimosoideae) sob Influência do Tempo de Armazenamento. **Revista Brasileira de Biociências** 5(2): 258–260, 2005.

LORENZI, H. & ABREU MATOS, F.J. **Plantas Medicinais do Brasil: nativas e exóticas**. 2.ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2008.

LUCAS, L.A; GAMBA H. R; ANDREATINI, R; C. CUNHA, T. M. CENTENO, J. M. MAIA, P. M. GEWEHR, A. L. STELLE. Sistema de imagem para análise de experimentos realizados com o labirinto aquático: WAP – Watermaze Analysis Programme. **Revista Brasileira de Engenharia Biomédica**, v. 21, n. 2-3, p. 115-129, 2005.

MACIEL, M.A.M.; PINTO, A.C.; VEIGA JÚNIOR, V.F. Plantas Medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. **Química Nova**, v. 25, n. 3, p. 429–438, 2002.

MADHAN, B.; SUBRAMANIAN, V.; RAGHAVA RAO, J.; BALACHANDRAN, U. N.; RAMASAMI, T. Stabilization of collagen using plant polyphenol: Role of catechin. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 37, p. 47-53, 2005.

MANZO, L.; CASTOLDI, A.F.; COCCINIA, T.; ROSSI, A.D.; NICOTERA, P.; COSTA, L.G. Mechanisms of neurotoxicity: applications to human biomonitoring. **Toxicology Letters**, v. 77, p. 63-72, 1995.

MARTINS, M.A.; DE CASTRO BASTOS, L.; TONUSSI, C.R. Formalin injection into knee joints of rats: pharmacologic characterization of a deep somatic nociceptive model. **J Pain**, v. 7, n. 2, p. 100 –107, 2006.

MAZZAMBANI, L. **Avaliação das propriedades farmacológicas de compostos imídicos cíclicos selecionados e da agmatina no Sistema Nervoso Central**. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas). Universidade do Vale do Itajaí, Itajaí, 2005.

MERFORT, I. *Arnica*: new insights on the molecular mode of action of a traditional medicinal plant. **Forsch Komplementarmed Klass Naturheilkd**. v. 10 (suppl. 1), p. 45-48, 2003.

MILLIGAN, E. D.; WATKINS, L. R. Pathological and protective roles of glia in chronic pain. **Nat Rev Neurosci**, v. 10, n. 1, p. 23-36, 2009.

MONTGOMERY, K. C. The elevated plus-maze. **Pharmac.Methodol. Ethology Psychopharmacol.**, v. 53, n.1, p. 334–342, 1958.

MOURA, V.M. **Efeitos de extratos vegetais sobre atividades biológicas induzidas por peçonhas botrópicas**. Dissertação (Mestrado em Recursos Naturais da Amazônia) – Universidade Federal do Oeste do Pará. Santarém, 2012.

MOURA, V. M.; SOUSA, L.A.F.; OLIVEIRA, R. B.; SILVA, A. M. M.; CHALKIDIS, H. M.; SILVA, M. N.; PACHECO, S.; MOURÃO, R. H. V. Inhibition of the principal enzymatic and biological effects of the crude venom of *Bothrops atrox* by plant extracts. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 7, n. 31, p. 2330-2337, 2013.

MOUOKEU, R.S.; NGONO, R.A.; LUNGA, P.K.; KOANGA, M.M.; TIABOU, A.T.; NJATENG, G.S.; TAMOKOU, J.D.; KUIATE, J.R. Antibacterial and dermal toxicological profiles of ethyl acetate extract from *Crassocephalum bauchiense* (Hutch.) Milne-Redh (Asteraceae). **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 11, p. 43, 2011.

MORIM, M.P. *Plathymentia* in **Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://reflora.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB83636>>. Acesso em: 01 Mar. 2014.

MORRIS, M. Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat. **Journal Neuroscience Methods**, v. 11, p. 47–60, 1984.

MURDOCH, B.E. The cerebellum and language: Historical perspective and review. **Cortex**, v. 46, p. 858-868, 2010.

NCCLS/CLSI. National Committee for Clinical Laboratory Standards. **Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts**. Approved Standard, M27-A2, 2002.

NCCLS/CLSI - National Committee for Clinical Laboratory Standards. **Metodologia dos testes de sensibilidade a agentes antimicrobianos por diluição para bactéria de crescimento aeróbico**: Norma Aprovada – 6ª Edição. Documento M7-A7, Vol. 26 Nº 2, 2004.

NEWMAN, D.J.; G.M. CRAGG. Natural Products as Sources of New Drugs over the Last 25 Years. **Journal of Natural Products**, v.70, p. 461–477, 2007.

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

OMS. 2002. Estratégia de la OMS sobre medicina tradicional 2002 – 2005, Genebra, 2002. <Disponível em: [http://www.opas.org.br/medicamentos/site/uploadarq/trm\\_srat\\_spam.pdf](http://www.opas.org.br/medicamentos/site/uploadarq/trm_srat_spam.pdf)> acessado em 06 de junho de 2013.

PARISOTTO, E. B.; MICHELIN, E. M. Z.; BISCARO, F.; FERREIRA, S. R. S.; WILHELM FILHO, D.; PEDROSA, R. C. The antitumor activity of extracts from *Cordia verbenacea* D.C. obtained by supercritical fluid extraction. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 61, p. 101-107, 2012.

PIZARRO, A. P. B.; FILHO, A. M. O.; PARENTE, J. P.; MELO, M. T. V.; SANTOS, C. E. ; LIMA, P. R. O aproveitamento do resíduo da indústria do sisal no controle de larvas de mosquitos. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.32, n.1, p. 23-29, 1999.

POTT, A.; POTT, V. J. *Plathymentia reticulata* (Leguminosae) Mimosoideae. In: **Brazilian Agricultural Research Corporation Plants of Pantanal**. EMBRAPA-CPAP-SPI, Brasília, DF, Brazil, 1994.

RANDOLPH, B.C.; PETERS, M.A. Analgesic effectiveness of ketorolac compared to meperidine in the rat formalin test. **Anesth Prog**, v. 44, n.1, p. 11–16, 1997.

RANG, H.P.; DALE, M.M.; RITTER, J.M.; FLOWER, R.J.; HENDERSON, G. **Farmacologia**. 7ªed. Rio de Janeiro: Elsevier, p. 808, 2012.

RATES S. M. K. Promoção do uso racional de fitoterápicos: uma abordagem no ensino de Farmacognosia. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 11, n. 2, p. 57-69, 2001.

REJÓN-ORANTES, J.C.; PERDOMO SUARÉZ, D.P.; REJÓN-RODRÍGUEZ, A.; HERNÁNDEZ, S. H.; GARCÍA LIÉVANO, O.E.; LÓPEZ RODRÍGUEZ, D.; PÉREZ DE LA MORA, M. Aqueous root extracts from *Mimosa albida* Humb. & Bonpl. ex Willd display antinociceptive activity in mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 149, n. 2, p. 522-526, 2013.

REYNOSO, M.A. ; VERA, N.; ARISTIMUÑO, M.E.; DAUD, A.; SÁNCHEZ, A.; RIERA, A. Antinociceptive activity of fruits extracts and “arope” of *Geoffroea decorticans* (chañar). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 145, n. 1, p. 355-362, 2013.

SANTOS, A.R.S.; CAMPOS, R.O.P.; MIGUEL, O.G.; CECHINEL FILHO, V.; SIANI, A.C.; YUNES, R.A.; CALIXTO, J.B. Antinociceptive properties of extracts of new species of plants of the genus *Phyllanthus* (Euphorbiaceae). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 72, p. 229-238, 1998.

SANTOS, R.I. 2001. Metabolismo básico e origem dos metabólitos secundários. In: SIMÕES, C.M.O et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**, 2007.

SANTOS, S. C., MELLO, J. C. P. Taninos, p. 615-655, 2003. In: SIMÕES, C.M.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 3ed. Porto Alegre: Ed. UFRGS/Ed. UFSC, p. 1102, 2007.

SARRAZIN, S.L.F.; OLIVEIRA, R.B.; BARATA, L.E.S.; MOURÃO, R.H.V. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Lippia grandis* Schauer (Verbenaceae) from the western Amazon. **Food Chemistry**, v.134, p. 1474–1478, 2012.

SAXENA, G.; MCCUTCHEON, A. R.; FARMER, S.; TOWERS, G.H.N.; HANCOCK, R.E.W. Antimicrobial constituents of *Rhus glabra*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 42, n. 2, p. 95-99, 1994.

SHAHVERDI, A.R.; ABDOLPOUR, F.; MONSEF-ESFANANI, H.R.; FARSAM, H. A TCL bioautographic assay the detection of nitrofurantoin resistance reversal compound. **Journal of Chromatography B**, v.850,n. 2, p. 528-530, 2007.

SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; ATHAYDE, M. L. Saponinas. 2001. In: SIMÕES, C.M.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK,

P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 3ed. Porto Alegre: Ed. UFRGS/Ed. UFSC, p. 597-619, 2001.

SCHMITZ, M.; BACHER, S. Novel Molecular Targets in the Search for Anti-Inflammatory Agents. **Phytochemistry**, v. 4, n. 1, p. 19-25, 2005.

SHERWOOD, E. R.; TOLIVER-KINSKY, T. Mechanisms of the inflammatory response. **Best Pract Res Clin Anaesthesiol**, v. 18, n. 3, p. 385-405, 2004.

SHAHAT, A.; MARZOUK, M.S. Tannins and Related Compounds from Medicinal Plants of Africa. **Medicinal Plant Research in Africa - Pharmacology and Chemistry**, p. 470-555, 2013.

SIEDENTOPP, U. El regaliz, una planta medicinal eficaz para la tos y las efecciones de estómago. **Revista Internacional de Acupuntura** [online], v.2, n.2, 2008. Disponível em: [http://www.dr-siedentopp.de/\\_zeitschrift/Dietetica\\_elregaliz.pdf](http://www.dr-siedentopp.de/_zeitschrift/Dietetica_elregaliz.pdf). Acesso em: 02 set.2013.

SILVA, A. B. L.; DIAS, K. S.; MARQUES, M. S.; MENEZES, I. A.; SANTOS, T. C.; MELLO, I. C. M.; LISBOA, A. C. C. D.; CAVALCANTI, S. C. H.; MARÇAL, R. M.; ANTONIOLLI, A. R. Avaliação do efeito antinociceptivo e da toxicidade aguda do extrato aquoso da *Hyptis fruticosa* Salmz, ex Benth. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16, n. 4, p. 475-479, 2006.

SILVA JÚNIOR, M. C. **Cem árvores do Cerrado: guia de campo**. Rede de sementes do Cerrado. Brasília, 2005.

SILVEIRA, C.F.S. ***Zanthoxylum rhoifolium* Lamarck (Rutaceae): Determinação da atividade antimicrobiana e caracterização físico-química e biológica**. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas). Universidade Federal de Santa Maria, 1997.

SIMÕES, C.M.O.; E.P. SCHENKEL; G. GOSMANN; J.C.P. MELLO; L.A. MENTZ; P.R. PETROVICK. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Porto Alegre/Florianópolis, Ed da UFRGS/ED. da UFSC, 2007.

SLIKKER JR, W.; BOWYER, J .F. Biomarkers of adult and developmental neurotoxicity. **Toxicology and Applied Pharmacology**, New York, v. 206, n. 2, p.255-260, 2005.

SMELTZER, S. C. et al. BRUNNER & SUDDARTH: **Tratado de Enfermagem médico-cirúrgica**. Revisão técnica Isabel Fonseca da Cruz, Ivone Evangelista Cabral; tradução Fernando Diniz Mundim, José Eduardo Ferreira de Figueiredo]. 11. ed. Rio de Janeiro: Guanarara Koogan, 2009.

SONAGLIO, D.; ORTEGA, G.G.; PETROVICK, P.R. *et al.* 1999. Desenvolvimento tecnológico e produção de fitoterápicos. In: SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G. *et al.* (Ed.). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Porto Alegre: UFRGS, p. 251-258, 2009

SONG, C.; KANTHASAMY, A.; KANTHASAMY, A. Cell signaling mechanisms in developmental neurotoxicity. *Reproductive and Developmental Toxicology*. R. C. Gupta. San Diego: Academic Press, p. 835-845, 2011.

STUCKY, C. L.; GOLD, M. S.; ZHANG, X. Mechanisms of pain. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 98, n. 21, p. 11845-6, 2001.

TOYANG, N.J.; EUGENEN, N.A.; KEISER, J.; VARGAS, M.; BACH, H.; TANE, P.; SONDEGAM, L.B.; DAVIS, H.; BRYANT, J.; VERPOORTE, R. Toxicity, antimicrobial and anthelmintic activities of *Vernonia guineensis* Benth. (Asteraceae) crude extracts. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 144, p. 700–704, 2012.

TOUFEKTSIAN, M.C.; LOGERRIL, M.; NAGY, N.; SALEN, P.; DONATI, M.B.; GIORDANO, L.; MOCK, H.P.; PETEREK, S.; MATROS, A.; PETRONI, K.; PILU, R.; ROTILLO, D.; TONELLI, C.; DE LEIRIS, J.; BOUCHER, F.; MARTIN, C. Chronic dietary intake of plant-derived anthocyanins protects the rat heart against ischemia reperfusion injury. **Journal of Nutrition**, v. 138, n. 4, p. 747, 2008.

VEIGA JUNIOR, V. F.; PINTO, A. C. Plantas medicinais: cura segura? **Quim. Nova**, v. 28, n. 3, p. 519-528, 2005.

WALL, M. E, WANI, M. C. Camptothecin and taxol. From discovery to clinic. **Journal for Ethnopharmacology**, v. 51, p. 239-254, 1996.

WALKER, C. I. B.; TREVISAN, G.; ROSSATO, M.F.; SILVA, C.R.; PINHEIRO, F.V.; FRANCISCATO, C.; TATSCH, E.; MORETTO, M.B.; SILVA, M.D.; MANFRON, M.P.; MORESCO, R.N.; SANTOS, A.R.S.; PEREIRA, M.E.; FERREIRA, J. Antinociceptive effect of *Mirabilis jalapa* on acute and chronic pain models in mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 149, n. 3, p. 685-693, 2013.

WINK, M. Evolution of secondary metabolites in legumes (Fabaceae). **South African Journal of Botany**, v. 89, p. 164–175, 2013.

WOOLF, C. J.; SALTER, M. W. Neuronal plasticity: increasing the gain in pain. **Science**, v. 288, p. 1765-9, 2000.

WOOLF, C. J.; MA, Q. Nociceptors--noxious stimulus detectors. **Neuron**, v. 55, n. 3, p. 353-64, 2007.

XIA, M.; LING, W.; ZHU, H.; MA, J.; WANG, Q.; HOU, M.; TANG, Z.; GUO, H.; LIU, C.; YE, Q. Anthocyanin attenuates CD40-mediated endothelial cell activation and apoptosis by inhibiting CD40-induced MAPK activation. **Atherosclerosis**, v. 202, n. 1, p. 41, 2009.

YILDIRIM, A. B.; KARAKAS, F. P.; TURKER, A. U. In vitro antibacterial and antitumor activities of some medicinal plant extracts, growing in Turkey. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, v. 6, n. 8, p. 616-624, 2013.

YIM, N.; JUNG, Y.P.; CHO, W.; KIM, TAESOO, K.; KIM, A.; IM, M.; MA, J.Y. Screening of aqueous extracts of medicinal herbs for antimicrobial activity against oral bacteria. **Integr med res**, v. 2, p. 18-24, 2013.

ZACCHINO, S. Estratégias para a descoberta de novos agentes antifúngicos, 2001. In: Yunes, R.A.; Calixto, J.B. **Plantas medicinais sob a ótica da química medicinal moderna**. Chapecó: Argos, p. 435-479, 2001.

ZEILHOFER, H. U. Synaptic modulation in pain pathways. **Rev Physiol Biochem Pharmacol**, v. 154, p. 73-100, 2005.

## CAPÍTULO I

Avaliação da atividade farmacológica do extrato aquoso das cascas de  
*Plathymenia reticulata* Benth (Fabaceae)\*

\*Capítulo escrito de acordo com as normas da revista Journal of Medicinal Plants Research, o qual deverá ser submetido após a tradução para a língua inglesa.

## Avaliação da atividade farmacológica do extrato aquoso das cascas de *Plathymenia reticulata* Benth (Fabaceae)

**Ana Paula Ferreira de ASSUNÇÃO** - [ap\\_assuncao@hotmail.com](mailto:ap_assuncao@hotmail.com)

**Sandra Layse Ferreira SARRAZIN** - [sarrazin@ufpa.br](mailto:sarrazin@ufpa.br)

**Rosa Helena Veras MOURÃO** - [mouraorhv@yahoo.com.br](mailto:mouraorhv@yahoo.com.br)

**Ricardo Bezerra de OLIVEIRA** - [rbo@ufpa.br](mailto:rbo@ufpa.br)

Programa de Pós-Graduação em Recursos Naturais da Amazônia, Universidade Federal do Oeste do Pará-UFOPA, Campus Tapajós, Av. Vera Paz, s/n, Salé, 68040-000, Santarém - PA, Brasil, Tel.: +55 93 21014954 - Fax: + 55 93 30649052.

Resumo:

*Plathymenia reticulata* Benth é uma planta medicinal empregada no tratamento de diversas doenças, em especial por comunidades tradicionais das savanas amazônicas no município de Santarém, estado do Pará – Brasil. O objetivo desse estudo foi avaliar as atividades farmacológicas e o efeito do extrato aquoso das cascas de *Plathymenia reticulata* (EAPR) sobre o comportamento e aprendizagem em ratos, bem como determinar o seu perfil fitoquímico. Para isso, a atividade antimicrobiana foi verificada pelos métodos de microdiluição em caldo e por meio das concentrações bactericida e fungicida mínimas, a atividade antinociceptiva foi avaliada por meio do teste da formalina, a atividade antiedematogênica por meio do teste de edema de pata induzido por carragenina e o testes do labirinto aquático de Morris, labirinto Y, campo aberto, caixa clara-escuro e barra giratória foram realizados para a avaliação do comportamento e aprendizagem em ratos. A análise fitoquímica foi realizada através de cromatografia em camada delgada. O EAPR apresentou ação promissora contra bactérias gram-positivas e gram-negativas, com concentração inibitória mínima de 0,0008 mg/mL para *Enterococcus faecalis* e de 0,0004 mg/mL para *Klebsiella pneumoniae*, mas não foi eficiente frente às leveduras do gênero *Candida*. O EAPR na dose de 240 mg/kg inibiu em 100% o tempo de lambidas das patas na fase inflamatória do teste da formalina, mas não apresentou efeito antinociceptivo em nenhuma das doses testadas na fase neurogênica. No teste do edema de pata induzido por carragenina, o EAPR na dose de 240 mg/kg reduziu 82,41%, 80,95%, 81,87% e 86,90% do volume do edema na 1<sup>a</sup>, 2<sup>a</sup>, 3<sup>a</sup> e 4<sup>a</sup>h, respectivamente, após administração da carragenina. Em relação à avaliação do comportamento e aprendizagem em ratos, o extrato não apresentou atividade depressora sobre o SNC, pois nos testes realizados os animais não apresentaram alterações comportamentais e nem motoras. O EAPR possui taninos, como metabólitos secundários. No momento, pode-se propor que o EAPR possui propriedades antimicrobiana, antinociceptiva e anti-inflamatória, o que fornece bases científicas para o seu uso etnobotânico. Essas atividades possivelmente podem ser atribuídas à presença de fenóis do grupo dos taninos condensados. No entanto, é importante que mais estudos sejam realizados para a compreensão dos mecanismos de ação envolvidos nessas ações farmacológicas e para a avaliação dos efeitos do extrato na hematopoiese, função hepática e renal para completarmos o perfil de segurança desta espécie.

Palavras-chave: *Plathymenia reticulata*, extrato aquoso, atividades farmacológicas, comportamento animal

## INTRODUÇÃO

Doenças inflamatórias e infecciosas têm aumentado em todo o mundo, tornando-se uma importante causa de morbidade e mortalidade, principalmente, em pacientes imunocomprometidos (Ara et al., 2009). Grande parte dos medicamentos disponíveis no mercado apresentam alto custo, efeitos secundários, hepatotoxicidade bem como estão associados a mecanismos de resistência, no caso de antibióticos e ainda com a tendência de produzir dependência e tolerância, no caso de analgésicos opióides (Al-Bari et al., 2006; Falkenberg, 2007; Humeera, 2013). Os analgésicos correspondem a maior categoria de fármacos no mercado, no entanto nas últimas décadas a procura por novas drogas analgésicas com maior ação e menos efeitos colaterais tem sido contínua (Elizabetsky e Castilhos, 1990).

As drogas com potencial anti-infeccioso correspondem a aproximadamente 50% das drogas investigadas e aprovadas, derivadas de produtos naturais no período entre 2000 e 2006, isso ocorre devido à velocidade em que ocorre o processo de resistência de microrganismos patogênicos às drogas existentes no mercado, superando a capacidade de indústria na produção de novas drogas (Newman e Cragg, 2007; Bush, 2004; Ferronato *et al.*, 2007; Assob *et al.*, 2011).

O estudo de plantas medicinais, a partir de seu emprego pelas comunidades que fazem o uso contínuo desse recurso, fornece informações úteis para a elaboração de estudos farmacológicos e fitoquímicos. O uso de compostos obtidos a partir de plantas medicinais como recurso terapêutico é promissor, pois estes apresentam menos efeitos colaterais, tem menor custo, fácil aceitação pelo uso popular, maior tolerância por pacientes e ainda consistem em um recurso renovável no ambiente (Reddy et al., 2010; Sarrazin et al., 2012). Dessa forma, percebe-se a importância de pesquisas realizadas com produtos naturais, tornando o mercado de fitoterápicos com comprovação científica de eficácia clínica, segurança e qualidade, promissor em todo mundo, com destaque para o uso de extratos de plantas medicinais como fonte de novas drogas (Assob et al., 2011; Calixto, 2005; Chehregani et al., 2007).

*Plathymania reticulata* Benth.(Fabaceae), conhecida popularmente como vinhático e barbatimão, é uma espécie arbórea típica das regiões de savanas amazônicas e do cerrado brasileiro. As cascas são utilizadas no tratamento de doenças infecciosas, inflamatórias (Pott e Pott, 1994), e ainda no tratamento de picadas de cobras e hemorragias, sob a forma de pomadas e chás (Moura et al., 2013). Os principais grupos detectados na caracterização

fitoquímica de extratos hidroalcoólicos de *P. reticulata* foram taninos, flavonoides, antocianinas, saponinas (Fernandes, 2002), além de polifenóis (Farrapo et al., 2011), muitos dos quais estão relacionados com as propriedades biológicas e farmacológicas atribuídas a esta espécie (Fernandes, 2002; Fernandes et al., 2005, Toledo et al., 2011)

O potencial antiofídico foi indicado por Melo et al. (2009), que verificaram o efeito contra a peçonha de *Crotalus durissus terrificus* e *Bothrops jararacussu* devido a presença dos taninos na planta. Extratos de diferentes polaridades foram capazes de impedir o bloqueio neuromuscular e os efeitos miotóxicos *in vitro* do veneno de *Bothrops jararacussu*, sendo o extrato de diclorometano o mais eficiente, provavelmente devido à precipitação de proteínas em função da presença dos taninos (Farrapo et al., 2011).

Estudos que avaliam os efeitos tóxicos de *Plathymenia reticulata* são escassos. Albuquerque (2009) avaliou a citotoxicidade de diferentes concentrações do extrato hidroalcoólico desta espécie, que foi avaliada *in vitro* em células ovarianas de hamster chinês, sendo a DL 50 = 1.1379,67 mg/kg e *in vivo* durante a gestação de ratas, no qual foi demonstrado que não ocorreu má formação congênita, no entanto no decorrer do experimento observou-se reabsorção de fetos dos grupos experimentais com a dose de 1,0 g/Kg, contrastando com o índice de implantação, o que indica uma falha no desenvolvimento embrionário, provavelmente ocasionada pela administração do extrato.

Della Torre et al. (2011), demonstraram que o extrato etanólico de *Plathymenia reticulata* apresentou atividade mutagênica nos ensaios de mutagenicidade de *Salmonella* (teste de Ames) e no teste de micronúcleos. Apesar dos estudos realizados com a espécie, pouco se enfatiza sobre os seus efeitos toxicológicos, o que é indispensável antes de explorarmos seu potencial como um novo medicamento.

Diante desse contexto, e levando em consideração o uso frequente dessa espécie como recurso terapêutico por populações tradicionais, este estudo teve o objetivo de avaliar as atividades farmacológicas e o efeito do extrato aquoso das cascas de *Plathymenia reticulata* (EAPR) sobre o comportamento e aprendizagem em ratos, bem como determinar o seu perfil fitoquímico.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

### **Área de estudo e coleta do material vegetal**

As cascas de *Plathymenia reticulata* Benth foram coletadas em março de 2012, na savana de Alter do Chão, em uma área próxima a comunidade do Cucurunã (S 02°27'21.0"; W 54°47'45,7"), a leste do município de Santarém-PA. Exsiccatas da espécie foram depositadas no herbário da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária/Amazônia Oriental (Belém – PA, Brasil), sob o código (IAN): 185215.

### **Preparação do extrato aquoso**

Após a coleta o material vegetal fresco foi imerso em água destilada na proporção 1:10 (peso/volume). A mistura permaneceu em placa aquecedora sob agitação constante e temperatura de 70 °C durante 90min. Em seguida, o extrato aquoso foi filtrado em filtro de papel (14µm) (Vetec), liofilizado (Liotop L101 – Liobras) e armazenado em frascos hermeticamente fechados.

### **Análise fitoquímica**

O perfil cromatográfico preliminar do extrato aquoso das cascas de *P. reticulata*, foi determinado por Cromatografia em Camada Delgada (CCD). Para a realização das análises, 10 mg do EAPR foi solubilizado em 1 mL de metanol. Para avaliar a possível presença de cumarinas, flavonoides, taninos, terpenoides e ácidos graxos no extrato foram empregados soluções padrões de 1,2-benzopirona, rutina, timol, esculina, catequina e ácido tânico. O sistema cromatográfico teve como fase estacionária sílica gel 60 F<sub>254</sub> e fase móvel com misturas de eluentes de diferentes polaridades, com variação nas concentrações dos solventes que foram: acetato de etila, ácido fórmico, ácido acético glacial e água- 6,75:0,75:0,75:1,75 (v:v:v:v); butanol, ácido acético e água - 4:1:5 (v:v:v:); hexano, acetato de etila e ácido fórmico- 8,5:1:0,5 (v:v:v:); tolueno: éter etílico 5:5 (v:v) saturada com 10% de ácido acético (Wagner e Blatt, 1996).

Após a eluição, as cromatoplasmas foram derivatizadas com reagentes específicos visando evidenciar as principais classes de substâncias químicas presentes no EAPR: solução NP PEG (difetilboriloxietilamina/ polietilenoglicol), submetidas a luz UV<sub>365nm</sub> para a detecção de flavonoides (coloração laranja) e cumarinas glicosídicas (coloração azul fluorescente); solução alcoólica de cloreto férrico 1% (m/v), para detecção de taninos hidrolisáveis (coloração cor azul escuro); solução metanólica de vanilina clorídrica 1% (m/v) para detecção de taninos condensados (coloração vermelha); vanilina sulfúrica 1% (m/v) para

a detecção de terpenóides (coloração amarelo-marrom); solução etanólica de KOH 5%, submetidas à luz UV<sub>365nm</sub> para detecção de cumarinas agliconas (coloração verde fluorescente) (Wagner e Bladt, 1996).

## **Animais**

Foram utilizados ratos machos adultos da linhagem Wistar (*Rattus norvegicus*) pesando entre 200–250 g, mantidos a temperatura de 21 °C, com ciclo claro/escuro de 12/12h, com livre acesso à água e ração, mantidos em gaiolas de polipropileno. Para a avaliação da atividade antinociceptiva e anti-inflamatória foram realizados os testes da formalina (Hunskar e Hole, 1987) e o edema de pata induzido por carragenina (Winter et al., 1962). Na avaliação do efeito EAPR sobre comportamento e aprendizado, os animais foram divididos em quatro grupos (n=8) e receberam por via oral o extrato aquoso nas doses de 60, 120 e 240 mg/kg durante 21 dias. O grupo controle recebeu água destilada. Em seguida foram realizados os testes comportamentais: labirinto aquático (Morris, 1984), labirinto em Y (Montgomery, 1958), Campo aberto (Broadhurst, 1960), caixa clara-escuro (Denoble et al., 1986) e barra giratória (Dunham e Miya, 1957). Os experimentos foram realizados em acordo com as diretrizes para os procedimentos de uso científicos de animais estabelecidas pelas Lei Federal 11.794 de 08/10/2008 e com aprovação do Comitê de Ética no uso de Animais sob o da Universidade Federal do Oeste do Pará, protocolado sob o número N° 02003/14.

## **Atividades farmacológicas**

### **Microrganismos e condições de cultivo**

A atividade antimicrobiana do EAPR foi realizada utilizando cepas padrão de microrganismos *American Type Culture Collection* (ATCC). Os microrganismos selecionados para a avaliação da atividade antimicrobiana foram: *Escherichia coli* (ATCC: 35218); *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923); *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 12228); *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212); *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 13883), e as leveduras *Candida albicans* (ATCC 10231), *Candida parapsilosis* (ATCC 22019), *Candida tropicalis* (ATCC 13803).

Para a realização dos ensaios, as cepas bacterianas liofilizadas (Cefar) foram inicialmente reidratadas em 1 mL de Caldo Mueller Hinton e incubadas por 24h a 36 °C para reativação, e em seguida foram semeadas em agar Mueller Hinton (Himedia) e reincubadas a 36 °C por 24h. As cepas fúngicas (Cefar) foram reidratadas em 1 mL de caldo Sabouraud dextrose (Himedia) e incubadas a 30 °C por 48h, e após a reativação, culturas foram subcultivadas em agar Sabouraud dextrose a 2% (Himedia) e reincubadas por 48h a 30 °C. Uma amostra de colônias em crescimento foi retirada e apropriadamente diluída em 1mL de solução salina estéril (NaCl 0,9%), para obtenção do inóculo no padrão de turbidez 0,5 na escala de Mac Farland que equivale à concentração final de  $1,5 \times 10^8$  UFC/mL para bactérias (NCCLS, 2002) e à concentração final de  $2$  a  $5 \times 10^6$  UFC/mL (NCCLS, 2006) para fungos.

### **Concentração Inibitória Mínima (CIM)**

Para determinação da CIM, as análises foram realizadas em triplicata utilizando o método de microdiluição em placa (96 poços) (NCCLS, 2004). Para isso, inicialmente o inóculo do organismo teste foi padronizado frente à escala 0,5 de McFarland e submetido a diluições em série (solução salina estéril) até atingir a concentração final de  $1,5 \times 10^4$  UFC/mL, sendo a última diluição realizada em caldo Muller Hinton para bactérias e em caldo Sabouraud dextrose 2% para os fungos. Em seguida, meios de cultivo foram adicionados nos inóculos obtidos. O EAPR, diluído em água destilada estéril, foi adicionado em concentrações que variaram de 15 a 0,0004 mg/mL . As placas foram incubadas a 36°C por 24h para bactérias e a 30 °C por 48h para fungos. Após o período de incubação foram adicionados 20 µL de solução aquosa de resazurina a 0,02% à microplaca com reincubação durante 3h para posterior observação da inibição do crescimento microbiano, evidenciada pela permanência da coloração azul do corante revelador.

### **Determinação da Concentração Bactericida e Fungicida Mínima**

De cada poço utilizado para determinação da CIM, onde não foi evidenciado crescimento microbiano, foram retirados 50 µL da cultura e realizado o semeio em placas de Petri contendo agar Mueller Hinton para o crescimento de bactérias ou agar Sabouraud dextrose para o crescimento de fungos. As placas foram incubadas a 36 °C por 24h para

bactérias e a 30 °C por 48h para fungos. Após a incubação, as placas foram observadas a olho nu para a verificação do crescimento microbiano.

### **Teste da formalina**

No teste da formalina, grupos de ratos machos (n=8) foram tratados com o EAPR nas doses de 60, 120 e 240 mg/kg (v.o.); morfina 2.5 mg/kg (i.p.) (Dimorf® LC Cristália) e água destilada (v.o.). Sessenta minutos após a administração por via oral ou 30min após a administração intraperitoneal foram injetados 20 uL de formalina (solução formol/água 2,5%) (Quimex) por via subcutânea na pata traseira direita de cada animal. O tempo gasto pelos animais lambendo a pata injetada, considerado uma resposta indicativa de dor, foi registrado nos primeiros 5min (primeira fase) e novamente entre 25-30min (segunda fase). Estas fases representam as respostas neurogênica e inflamatórias da dor, respectivamente (Hunskaar e Hole, 1987). O percentual de atividade antinociceptiva foi obtido segundo a fórmula descrita por Xu et al. 2014:

$$\% \text{ inibição} = \frac{\text{tempo de reação (controle)} - \text{tempo de reação (tratamento)}}{\text{tempo de reação (controle)}} \times 100$$

### **Edema de pata induzido por carragenina**

Foram utilizados cinco grupos de ratos machos (n=8). O edema de pata foi induzido pela injeção de 0,1 mL de carragenina (1% em solução salina) (Sigma Aldrich. Company) no tecido subplantar da pata posterior direita (Winter et al., 1962). O EAPR nas doses de 60, 120 e 400 mg/kg, indometacina (Indocin SR) (10 mg/kg) e água destilada (1mL/kg) foram administrados por via oral 1h antes da injeção da carragenina. O volume da pata foi medido nos tempos 0 (imediatamente após a carragenina) e 1<sup>a</sup>, 2<sup>a</sup>, 3<sup>a</sup>, 4<sup>a</sup> e 5<sup>a</sup> h após a injeção da carragenina utilizando-se um pletismômetro digital (modelo EFF 304, Insight). O percentual de inibição do edema foi obtido segundo a fórmula descrita por Xu et al. 2014:

$$\% \text{ inibição} = \frac{\text{aumento no edema (controle)} - \text{aumento no edema (tratamento)}}{\text{aumento no edema (controle)}} \times 100$$

## **Comportamento e aprendizagem animal**

### **Labirinto aquático de Morris**

O efeito do EAPR sobre a memória espacial e aprendizagem de ratos foi avaliado por meio do labirinto aquático de Morris (Morris, 1984). Para isso, utilizou-se uma caixa d'água de 500 L, preenchida com água a uma altura de 40 cm, onde foi adicionada tinta não tóxica para torná-la opaca. A caixa d'água foi dividida em quatro quadrantes imaginários (norte, sul, leste e oeste), sendo que em um dos quadrantes foi colocada uma plataforma submersa a 2 cm abaixo do nível da água. O observador e os demais elementos no laboratório serviram como as pistas para o animal na localização da plataforma. O teste foi realizado em duas fases, sendo a primeira um treino para que os animais aprendessem a localização da plataforma. Cada animal foi colocado quatro vezes no labirinto, adotando-se como ponto de partida cada um dos quadrantes. Após ser colocado na água, o animal nadou livremente, a procura da plataforma, durante 120s ou até em encontrá-la, e quando não a encontrava era colocado manualmente sobre esta durante 10s para a observação do ambiente. No dia seguinte (24h após o treino) os animais foram testados no mesmo procedimento para a retenção da resposta, sendo verificado o tempo, em segundos, que cada animal levou para encontrar a plataforma a partir dos quatro pontos de partida.

### **Labirinto em Y**

Para a avaliação da memória de curta duração em ratos, utilizou-se o teste do labirinto Y, proposto por (Montgomery, 1958). O labirinto consiste em uma estrutura de madeira, em formato de Y, com um braço com 34 cm de comprimento (A) e os outros dois braços iguais medindo 43 cm de comprimento (B e C), tendo todos os três braços 10 cm de largura e paredes com 34 cm de altura. Para realização do teste, tomou-se o braço mais longo como ponto de partida dos animais, que foram deixados livres para caminhar pelo labirinto durante 8min. A sequência e o número de entrada em cada braço foram registrados. Para a avaliação dos resultados foram consideradas apenas as tríades que representavam os três braços (ABC, ACB, BAC, BCA, CAB e CBA). O percentual de alternância entre os braços foi obtido segundo a fórmula :

$$\% \text{ alternância} = \frac{\text{N}^\circ \text{ acertos}}{\text{N}^\circ \text{ entradas} - 2} \times 100$$

### **Teste do campo aberto**

O teste do campo aberto foi aplicado a fim de avaliar a locomoção e comportamento exploratório dos animais (Broadhurst, 1957). O campo aberto consiste em um equipamento de madeira, circular, com 40 cm de diâmetro e 28 cm de altura. O fundo do equipamento é dividido em 12 quadrantes, sendo 4 centrais e 8 periféricos. Os animais foram colocados individualmente no centro da arena, e foram observados durante 5min, sendo utilizada ainda uma câmera filmadora para registrar todos os movimentos dos animais. Alguns parâmetros foram avaliados na visualização dos vídeos: número de transições entre os quadrantes, número de levantamento sobre as patas traseiras, tempo de imobilidade, número de autolimpezas e número de bolos fecais.

### **Caixa clara-escura**

A realização deste teste tem o objetivo de avaliar a memória aversiva dos animais, levando em consideração sua preferência por ambientes escuros (Denoble et al. 1986). O equipamento utilizado consiste em uma caixa com tampa em acrílico e com fundo eletrificado, composta por um compartimento claro e um escuro, e apenas uma pequena abertura entre os dois ambientes. Inicialmente foi realizado o treino, no qual os animais são colocados no compartimento claro, sendo registrado o tempo, em segundos, que eles levam para se deslocarem para o compartimento escuro, onde será acionado um choque de 1 mA por 2s. Após 24h, a retenção da aprendizagem foi avaliada, sendo os animais colocados no compartimento claro e o tempo de latência para entrada no compartimento escuro registrado.

### **Barra giratória**

Nesse teste utilizou-se o equipamento Rota Rod (EFF 411 Insight ®) para avaliar o efeito do extrato aquoso sobre a coordenação motora dos animais. Para isso, inicialmente foi realizado um treino com os animais, que permaneceram durante 2 minutos sobre a barra giratória com velocidade de 7 rotações por minuto. No dia seguinte, mantendo-se a mesma

velocidade, o teste foi realizado registrando-se o tempo de permanência do animal sobre o aparelho por no máximo 2 minutos.

## **RESULTADOS**

### **Perfil fitoquímico**

A Tabela 1 apresenta o perfil fitoquímico por CCD do extrato aquoso das cascas de *P. reticulata*. A CCD identificou a presença de fenóis do grupo dos taninos condensados, no entanto não foi identificada a presença dos outros metabólitos investigados, como terpenos, taninos hidrolisáveis, flavonoides, cumarinas simples e glicosídeos.

### **Concentração Inibitória Mínima**

As concentrações inibitórias mínimas (CIM) do EAPR estão descritas na Tabela 2. O extrato apresentou atividade contra todas as bactérias avaliadas, no entanto foi inativo contra leveduras do gênero *Candida*.

### **Teste da formalina**

A injeção intraplantar de formalina promoveu uma resposta característica bifásica (Figura 1). A duração média do tempo de lambida na primeira fase (0-5min) foi de  $155,6s \pm 8,56$  e na segunda fase (15-30 min) foi de  $154,2s \pm 11,1$  para o grupo controle. Após 60 min de tratamento o EAPR nas doses de 60 mg/kg, 120 mg/kg e 240 mg/kg não inibiu a atividade nociceptiva na fase neurogênica. Na segunda fase o EAPR nas doses de 120 e 240 mg/kg inibiu 98 e 100% , respectivamente, o efeito nociceptivo causado pela formalina, apresentado diferença significativamente estatística em relação a morfina, que exibiu um percentual de inibição de 60%.

### **Edema de pata induzido por carregenina**

Na avaliação do efeito antiedematogênico do extrato aquoso das cascas de *Plathymenia reticulata* (Figura 02), observou-se que os grupos dos tratamentos EAPR 60, 120

e 240 mg/kg apresentaram variação do volume de pata significativamente menor que o grupo controle, mas essa diferença não foi significativamente estatística ( $p \leq 0,005$ ).

O EAPR 60mg/kg reduziu o edema em 23%, 24% e 28% na 2<sup>a</sup>, 3<sup>a</sup> e 4<sup>a</sup> h respectivamente em relação ao grupo controle. A dose de 120 mg/Kg reduziu o edema em 33, 39 e 37% na 2<sup>a</sup>, 3<sup>a</sup> e 4<sup>a</sup> h respectivamente em relação ao grupo controle. Somente o efeito antiedematogênico do EAPR 240 mg/kg foi semelhante àquele obtido no grupo tratado com indometacina. Na 1<sup>a</sup>, 2<sup>a</sup>, 3<sup>a</sup>, 4<sup>a</sup> e 5<sup>a</sup>h após a indução do edema com percentual de inibição do edema do extrato foi de 82,4%, 80,9%, 81,8%, 86,9% e 89,2% respectivamente, enquanto que o percentual de inibição da indometacina variou entre 65-79% até a 5<sup>a</sup>h.

### **Avaliação da aprendizagem e comportamento animal**

Os resultados sugerem que de forma geral o extrato foi tolerado pelos animais em todas as doses avaliadas, pois não foi observada mortalidade, nem outros sintomas associados à administração oral durante 21 dias. Sob nossas condições experimentais não foram observadas diferenças significativamente estatística entre os grupos tratados com o EAPR e os grupos controle.

No labirinto aquático de Morris, observou-se que todos os animais apresentaram desempenho similar, pois o encontro da plataforma ocorreu cada vez mais rápido à medida que cada quadrante foi utilizado como ponto de partida (Figura 3).

No labirinto Y não foi verificada diferença estatística no % de alternância, que apresentou médias de 63,37%, 66,2% e 59,6% para o EAPR nas doses de 60, 120 e 240 mg/kg, respectivamente, e 68% para o grupo controle (Figura 4).

Em relação ao teste da caixa clara-escuro todos os animais condicionados ao treino foram capazes de reter a informação de memória aversiva ao ambiente escuro (Figura 5)

O EAPR não promoveu alteração na atividade motora dos ratos em relação ao grupo controle, pois não houve diferença estatística entre o número de quedas e nem no tempo de permanência dos animais na barra giratória (Figura 6).

Em nossas condições experimentais a resposta condicionada foi adquirida e mantida em todos os parâmetro no teste do campo aberto pelos animais submetidos aos tratamentos e no grupo que recebeu apenas água destilada (Figura 7).

## DISCUSSÃO

Plantas com potencial medicinal têm suas atividades biológicas avaliadas, confirmando que os compostos de plantas são úteis como terapia alternativa, e podem ser precursores de novas drogas sintéticas (Chehregani, 2007). Têm-se evidenciado ainda a importância do conhecimento popular para a triagem de espécies com potencial farmacológico, demonstrando as práticas de utilização e cura por meio de plantas testadas ao longo do tempo (Brasileiro et al., 2008; Moura et al., 2013). É importante ressaltar que em nosso estudo foi utilizado o extrato aquoso das cascas de *Plathymenia reticulata* Benth e a via de administração oral, com o objetivo de manterem-se os parâmetros do estudo científico os mais próximos da indicação etnomedicinal da planta.

Os resultados do perfil fitoquímico, caracterizado pela presença somente de taninos, foram diferentes do descrito por Fernandes (2002), que verificou a presença de outros grupos em extratos hidroalcoólicos de *P. reticulata* avaliados em espécimes coletadas no cerrado brasileiro, estado do Goiás, tais como flavonoides, antocianinas e saponinas avaliados em modelos experimentais de inflamação, câncer e algesia, que demonstraram uma correlação entre a atividade antiproliferativa e anti-inflamatória provavelmente relacionada com a inibição da enzima COX2. A ausência desses compostos no extrato avaliado neste estudo pode estar relacionada com a diferença no método de extração, pois este processo interfere diretamente na obtenção das frações ativas e ainda nas atividades biológicas de extratos de plantas (Berlin e Berlin, 2005; Albuquerque e Hanazaki, 2006). Além disso, a composição química pode ser influenciada pelas condições climáticas em que a planta cresce, bem como pela parte da planta utilizada para a preparação dos extratos vegetais (Tekwu et al., 2012).

Os taninos consistem em substâncias fenólicas e hidrossolúveis, responsáveis pela adstringência de frutos e outras partes vegetais, pois formam complexos insolúveis com alcaloides, gelatinas e outras proteínas (Shahat et al., 2013). As propriedades farmacológicas dos taninos estão relacionadas com a sua capacidade em complexar-se com proteínas, polissacarídeos e íons metálicos. A ligação entre taninos e proteínas ocorre, provavelmente, através de interações não específicas, como pontes de hidrogênio e efeitos hidrofóbicos, ou mesmo por ligações covalentes. Dessa forma, a capacidade de inibir o crescimento de microrganismos pode estar relacionada com a inativação de adesinas, enzimas e proteínas transportadoras do envelope celular (De Mello e Santos, 2004; Simões et al., 2007).

Extratos vegetais que apresentam CIM inferiores a 0,1 mg/mL são promissores como agentes antimicrobianos (Rios e Recio, 2005). Dessa forma o extrato apresentou atividade promissora para *E. faecalis* com CIM de 0,0008 mg/mL e *K. pneumoniae* com CIM de 0,0004 mg/mL (respectivamente), evidenciando que o extrato foi ativo tanto contra bactérias Gram-positivas, quanto bactérias gram-negativas.

O mecanismo de ação das drogas padrão adotadas na avaliação da atividade antimicrobiana no presente estudo são caracterizados pela inibição da atividade da DNA girase ou topoisomerase II, no caso da norfloxacin, e ainda pela inibição da síntese da parede celular pela ampicilina (Lodise e Drusano, 2011). Assim, mesmo que a CIM tenha sido inferior a apresentada pelas drogas mais investigações são necessárias para a elucidação do mecanismo de ação relacionado com o potencial antimicrobiano do EAPR, uma vez que as drogas utilizadas como controle em testes farmacológicos são puras e os extratos correspondem a uma mistura de compostos ativos (Xu et al., 2014).

Os resultados apresentados nesse estudo confirmaram a atividade antimicrobiana do extrato aquoso de *P. reticulata* já relatada por Fernandes et al. (2005), que avaliaram o extrato hidroalcolico das cascas dessa espécie, demonstrando atividade somente para os microrganismos Gram-positivos, como *Bacillus stearothermophilus*, *Micrococcus luteus*, *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus aureus*. Toledo et al. (2011) obtiveram o extrato de *P. reticulata* utilizando a cachaça como líquido extrator e demonstraram que este apresentou atividade antimicrobiana contra bactérias, no entanto foi eficaz frente a *C. albicans* e *C. parapsilosis*, o que evidencia que o potencial antimicrobiano depende não apenas dos componentes químicos presentes na parte da planta utilizada, mas também do solvente utilizado para extração.

Ferreira et al. (2011) descrevem ainda que extratos de *Rhizophoramangle*L., ricos em taninos, também apresentaram atividade contra bactérias gram-positivas e gram-negativas, com destaque para a atividade frente a *K. pneumoniae*, assim como em nosso estudo. Scalbert (1991) listou 33 estudos que avaliaram atividades inibitórias de taninos, evidenciando que estes são tóxicos para fungos filamentosos, leveduras e bactérias. Nelson et al. (1997) estudaram as interações entre taninos purificados de três espécies vegetais diferentes com cinco cepas de bactérias presentes no rúmen e concluíram que a ligação de bactérias aos taninos são indicativo da ação antimicrobiana desses compostos, com os taninos condensados os que obtiveram maior capacidade de ligação com os microrganismos, sendo os mais inibitórios.

Com relação a atividade antinociceptivo, observou-se que somente na fase inflamatória o extrato aquoso apresentou efeitos inibitórios significativos em um modelo dose-dependente, sugerindo que o efeito antinociceptivo do extrato é mediado por vias periféricas e que possivelmente essa atividade esteja associada à inibição da produção ou ação de mediadores inflamatórios.

O teste da formalina é um dos modelos mais utilizados para explicar os mecanismos de dor e analgesia, com melhores resultados do que os testes que utilizam estímulos mecânicos ou térmicos (Husnkaar e Hole, 1987). O modelo é constituído por duas fases distintas. A primeira fase representa o efeito irritante da formalina nas fibras-C sensoriais. A segunda é uma resposta de dor inflamatória na qual estão associados vários mediadores inflamatórios como a histamina, serotonina, prostaglandinas e bradicinina. Analgésicos de ação central, como a morfina, inibem as duas fases do teste; drogas de ação periférica, como os anti-inflamatórios não-esteroidais e corticosteróides, somente a segunda fase (Tjolsen et al., 1992).

Resultados semelhantes foram descritos por Oliveira et al., (2009), Souza et al., (2009) e Wang et al. (2014) nos quais extratos obtidos a partir de *Amburana cearenses* A.C. Sm., *Caulerpa racemosa* e *Carthamus tinctorius* L, respectivamente, foram eficazes na inibição da fase inflamatória do ação nociceptiva causada pela administração da formalina, caracterizada pela ação de serotonina, histamina e cininas, bem como por interação na via da ciclooxigenase (COX) e biossíntese de prostaglandinas.

O desenvolvimento de edema induzida por carragenina é um evento de três fases. A fase precoce (90min) envolve a liberação de histamina e serotonina, a segunda fase (90-150min) que é mediada por quininas e a terceira fase (180min) mediada por prostaglandinas (Di Rosa et al. 1971; Okpo et al., 2001). Anti-inflamatórios não-esteróides, como a indometacina, inibem a ciclooxigenase, reduzindo a biossíntese de prostaglandinas (Farsam et al., 2000).

Destaca-se que na inflamação aguda duas fases são identificadas: a primeira, detectada em torno de uma hora, chamada de fase rápida, marcada pela liberação de histamina, serotonina e bradicinina; e a segunda, chamada de tardia (1-6 h), em que mediadores como as cininas e prostaglandinas são liberados após duas e três horas, respectivamente, as últimas resultando da ativação da ciclooxigenase 2 (COX-2) (Silva et al., 2005).

Considerando que qualquer substância que cause inibição ou redução da ação da carragenina é considerada como tendo ação anti-inflamatória (Kummer e Coelho, 2002), os resultados aqui encontrados demonstram que o extrato aquoso de *Plathymenia reticulata*,

promoveu a redução do edema induzido pelo flogógeno a partir da segunda hora de administração, evidenciando que os taninos apresentam propriedades anti-inflamatórias importantes. Mota et al. (1985) avaliaram a atividade anti-inflamatória de taninos presentes nas cascas de *Anacardium occidentale* L. e verificaram que provavelmente a ação desses compostos ocorre devido o efeito sobre a migração de leucócitos e antagonismo dos mediadores da inflamação. Outros autores também descrevem a ação anti-inflamatória de compostos ativos presentes em extratos aquosos, o que corrobora com os achados no presente estudo (Huang et al., 2013; Kumari et al., 2014; Sanchez et al., 2013).

Os resultados obtidos a partir do teste de edema de pata induzido por carragenina estão em concordância com os obtidos no teste da formalina, no qual foi verificada atividade periférica, sugerindo que o EAPR possivelmente age inibindo a produção ou ação de mediadores inflamatórios. O extrato aquoso de *Flos Populi* (inflorescência masculina de *Populus tomentosa* Carr.) foi avaliado por Xu et al. 2014, e apresentou atividade semelhante à observada no presente estudo, e possivelmente age inibindo a liberação e/ou ação de cininas e prostaglandinas, uma vez que o extrato apresentou uma significativa atividade inibitória na fase intermediária (150min) e mais pronunciada na fase posterior do desenvolvimento do edema e no teste da formalina o efeito de inibição na resposta nociceptiva foi dose-dependente e significativo ( $P < 0,05$ ).

A avaliação da ação tóxica de extratos vegetais é considerada indispensável para a definição da toxicidade intrínseca e verificação dos efeitos de superdosagem aguda, uma vez que há o uso generalizado de plantas medicinais baseado na acessibilidade, conhecimento tradicional e ainda na crença de que estas são inofensivas (Parra, 2001; Springfield et al., 2005). *Plathymenia reticulata* contém metabólitos secundários com potencial para causar efeitos terapêuticos, no entanto para garantirmos seu uso seguro enquanto planta medicinal, é necessário, além da documentação de suas atividades farmacológicas (Farrapo et al., 2011; Fernandes, 2002; Moura et al., 2013; Toledo et al., 2011,) obter-se uma avaliação da toxicidade desta espécie.

Nesse estudo, o uso do extrato aquoso foi motivado pelo fato de esse tipo de preparação ser a mais utilizada pela população, proporcionando uma forma de uso conveniente que pode ser padronizado em termos de constituintes químicos ou físicos, sendo a toxicidade avaliada por meio de testes de comportamentais, que objetivam avaliar respostas de animais quanto à função motora de por meio de metodologias de esforço e resistência muscular e ainda a função sensorial e o comportamento cognitivo, sendo este avaliado através de parâmetros como o aprendizado e memória espacial (Kullig et al., 1996).

O labirinto de Morris é um modelo experimental utilizado na investigação da memória espacial em roedores (Morris, 1984). Segundo Whishaw e Mittleman (1986) ratos normais são capazes de utilizar estratégias de lugar, orientação e de guiamento simultaneamente para solucionar a tarefa de navegação espacial no labirinto aquático, sendo que os ratos treinados a buscar a plataforma partindo de diferentes pontos da borda do labirinto, como em nosso estudo, devem aprender sobre as posições relativas a esses estímulos de modo a desempenhar a tarefa, o que demanda uma estratégia de lugar (que envolve orientação aloccêntrica), enquanto que ratos treinados partindo de um único ponto da borda do labirinto podem utilizar estratégias de guiamento e/ou orientação.

O labirinto em Y consiste em um teste onde é analisada a memória de reconhecimento espacial, mas que não exige uma regra de aprendizagem dos animais submetidos ao tratamento (Conrad 1997; Martin, 2003). A caixa clara-escura é empregada com a finalidade de avaliar o comportamento de esquiva passiva e ativa (Lorenzini et al., 1984). Os resultados desses testes sugerem que não ocorreram lesões e/ou efeitos tóxicos a nível de hipocampo dos animais em função da administração oral do extrato.

O hipocampo é uma das regiões do cérebro mais sensíveis a estímulos ambientais e ações terapêuticas (Bannerman et al., 2004), está relacionada com processos cognitivos (Barha e Galea, 2010), por isso têm papel fundamental nos processos de síntese, integração, aprendizagem e avaliação de experiências (Prediger et al., 2008). Por meio do sistema dopaminérgico hipocampal participa na consolidação de memórias espaciais, bem como da modulação positiva na persistência do traço mnemônico armazenado (D'Hooge e De Deyn, 2001).

O teste do campo aberto é um dos instrumentos mais empregados na avaliação comportamental e na função motora de animais (Montgomery et al., 1958). O desempenho dos animais indica a ausência de alterações psicomotora e músculo-esqueléticas (Walesiuk et al., 2010).

O teste da barra giratória tem a finalidade de verificar a especificidade da ação nociceptiva de fármacos através da avaliação a coordenação motora, que pode ser alterada por sedação e/ou por relaxamento muscular (Rosland et al., 1990). No entanto, Oliveira et al., (2008) avaliaram frações etanólicas de *Synadenium umbellatum* Pax, verificando que estas não apresentaram influências motoras nas doses de 25, 50 e 100 mg/kg, mas foram capazes de promover ação depressora central, sugestiva de efeito ansiolítico.

Resultado semelhante descrito por Vieira et al. (2013), no qual o extrato aquoso de *Bowdichia virgilioides* Kunth, diferentemente do diazepam, não apresentou efeito sobre a

coordenação motora dos animais no teste de rotação, sugerindo que o efeito ansiolítico pode ser provocado por ação central, e não exercido através do bloqueio muscular periférico e por isso não afeta a atividade motora. No caso de *Plathymenia reticulata*, podemos sugerir que nas doses avaliadas, o extrato não apresentou atividade depressora sobre o SNC, pois nos testes realizados, os animais não apresentaram alterações comportamentais e nem motoras.

## CONCLUSÃO

Em conclusão, EAPR possui propriedades antimicrobiana, analgésica e anti-inflamatória, o que fornece base científica para o seu uso etnobotânico no tratamento de doenças infecciosas e inflamatórias. Baseado nos resultados do presente estudo, essas atividades podem ser atribuídas à presença de fenóis do grupo dos taninos condensados. No entanto, mais investigações são necessárias para exploração dos mecanismos envolvidos nessas ações farmacológicas.

Os resultados dos testes comportamentais demonstraram que a administração via oral do extrato aquoso das cascas de *Plathymenia reticulata* Benth. não causou efeitos neurotóxicos nas doses testadas, avaliados pela atividade comportamental e motora. Desta forma, tendo em vista as potencialidades farmacológicas dessa espécie, esta apresenta um importante potencial para utilização como recurso terapêutico, sendo necessária a realização de estudos adicionais que avaliem os efeitos do extrato na hematopoiese, função hepática e renal para completarmos o seu perfil de segurança.

## AGRADECIMENTOS

Estendemos nossos agradecimentos ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico (CNPq) e Tecnológico, a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), a Universidade Federal do Oeste do Pará e a todos os colaboradores do Laboratório de Bioprospecção de Biologia Experimental.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ara N, Nur MH, Amran MS, Wahid MII, Ahmed M (2009). In vitro antimicrobial and cytotoxic activities of leaves and flower extracts from *Lippia alba*. Pakistan Journal of Biological Sciences 12(1):87-90.
- Al-Bari MA, Sayeed MA, Rahman MS, Mossadik MA (2006). Characterization and antimicrobial activities of a phenolic acid derivative produced by *Streptomyces bangladesiensis* novel species collected in Bangladesh. Res J MedSci. 1:77-81.
- Albuquerque UP, Hanazaki N (2006). As pesquisas etnorientadas na descoberta de novos fármacos de interesse médico e farmacêutico: fragilidades e perspectivas. Brazilian Journal of Pharmacognos 16:678–689.
- Albuquerque LBL (2009). Estudos *in vitro* e *in vivo* da *Plathymenia reticulata* Benth. Dissertação de Mestrado, Universidade de Sorocaba, São Paulo.
- Assob JCN, Kanga HLF, Nsagha DS, Njunda AL.; Nde PF, Asonlajem EA, Njouendo AJ, Sandjon B, Penlap VB (2011). Antimicrobial and toxicological activities of five medicinal plant species from Cameroon Traditional Medicine. BMC Complementary and Alternative Medicine 11:70.
- Bannerman DM, Rawlins JN, Mchugh SB, Deacon RM, Yee BK, Bast T, Zhang WN, Pothuizen HH, Feldon J (2004). Regional dissociations within the hippocampus - memory and anxiety. Neurosci Biobehav Rev 28(3):273-83.
- Barha CK, Galea LA (2010). M. Influence of different estrogens on neuroplasticity and cognition in the hippocampus. Biochimica et Biophysica Acta 1800:1056–1067.
- Berlin EA, Berlin, B (2005). Some field methods in medical ethnobiology. Field Methods 17:235–268.
- Brasileiro, BG, Pizziolo VR, Matos DS, Germano AM, Jamal CM (2008). Plantas medicinais utilizadas pela população atendida no “Programa de Saúde da Família”, Governador Valadares, MG, Brasil. Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences 44(4).
- Broadhurst PL (1960). Experiments in psychogenetics. Em: Experiments in Personality. Routledge and Paul, Londres.
- Bush K (2004). Why it is important to continue antibacterial drug discovery. ASM News 70 (6): 282–287.
- Calixto JB (2005). Twenty-five years of research on medicinal plants in Latin America: a personal review. J. Ethnofarmacol 100:131-134.
- Chehregani A, Azimishad F, Alizade HH (2007). Study on antibacterial effect of some *Allium* species from Hamedan-Iran. Int J Agric Biol. 9(6):873-876.

Conrad CD, Lupien SJ, Thanasoulis LC, McEwen BS (1997). The effects of type I and type II corticosteroid receptor agonists on exploratory behavior and spatial memory in the Y-maze. *Brain Res* 759:76–83.

De Mello JCP, Santos SC (2004). Taninos. In: Simões, C.M.O et al. *Farmacognosia da planta ao medicamento*. Editora da UFSC/UFMS, 2007.

Della Torre A, Albuquerque LBL, Farrapo NM, Oshima-Franco Y, Santos MG, Tavares RVS, Rodas ACD, Dal Belo CA, Cardoso CRP, Varanda EA, Groppo FC, Lopes PS (2011). Mutagenicity induced by the hydroalcoholic extract of the medicinal plant *Plathymenia reticulata* Benth. *Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases* 17(2):190-198.

Denoble VJ, Repetti SJ, Gelpke LW, Wood LM, Keim KL (1986). Vinpocetine: nootropic effects on scopolamine-induced and hypoxia-induced retrieval deficits of a step-through passive avoidance response in rats. *Pharmacol Biochem Behav* 24 (4): 1123-1128.

Di Rosa M, Giroud J, Willoughby D (1971). Studies of the mediators of the acute inflammatory response induced in rats in different sites by carrageenan and turpentine. *J.Pathol.* 104,15–29.

D’Hooge R, De Deyn PP (2001). Applications of the Morris water maze in the study of learning and Memory. *Brain Research Reviews* 36:60-90.

Dunham, N.W.; Miya, T.S (1957). A note on a simple apparatus for detection neurological deficit in rats a mice. *Journal of the American Pharmaceutical Association* 46:208-209.

Falkenberg, MBP (2007). Epibatidina: uma breve revisão. *Lat am j Pharm*, 26: 614-618.

Farrapo NM, Silva GAA, Costa KN, Silva MG, Cogo JC, Dalbelo CA, Santos MG, Groppo FC, Franco YO (2011). Inhibition of *Bothrops jararacussu* venom activities by *Plathymenia reticulata* Benth extracts. *J Venom Res* 2:52.

Farsam H, Amanlou M, Dehpour AR, Jahaniani F (2000). Anti-inflammatory and analgesic activity of *Biebersteinia multifida* DC. root extract. *J Ethnopharmacol* 71: 443-447.

Fernandes, AT (2002). Atividade farmacológica dos extratos obtidos de *Plathymenia reticulata* Benth (Leguminosae). Dissertação (Mestrado em Clínica Médica). Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

Fernandes, T.T.; Santos, A.T.F.; Pimenta, F.C (2005). Atividade antimicrobiana das plantas *Plathymenia reticulata*, *Hymenae acourbarile*, *Guazuma ummifolia*. *Revista de Patologia Tropical*,34(2):113–122.

Ferreira FS, Santos SC, Barros TF, Rossi-Alva JC, Fernandez LG (2011). Atividade antibacteriana *in vitro* de extratos de *Rhizophora mangle* L. *Rev. Bras. Pl. Med., Botucatu*, 13(3):305-310.

- Ferronato R, Marchesan ED, Pezenti E, Bednarski F, Onofre SB (2007). Atividade antimicrobiana de óleos essenciais produzidos por *Baccharis dracunculifolia* D.C. e *Baccharis uncinella* D.C. (Asteraceae). *Brazilian Journal of Pharmacognosy* 17 (2): 224–230.
- Huang S, Chiu CS, Lin TH, Lee M, Lee CY, Chang SJ, Hou WC, Huang GJ, Deng JS (2013). Antioxidant and anti-inflammatory activities of aqueous extract of *Centipeda minima*. *Journal of Ethnopharmacology* 147: 395–405.
- Humeera N, Kamili AN, Bandh SA, Amin S, Lone BA, Gousia N (2013). Antimicrobial and antioxidant activities of alcoholic extracts of *Rumex dentatus* L. *Microbial Pathogenesis* 57:17-20.
- Hunskar S, Hole K. (1987). The formalin test in mice: dissociation between inflammatory and non-inflammatory pain. *Pain* 30:103-119.
- Kullig B, Alleva E, Bignami G, Cohn J, Cory-Slechta D, Landa V, O'donoghue J, Peakall D (1996). Animal behavioral methods in neurotoxicity assessment: SGOMSEC joint report. *Environmental health perspectives* 104(2):193-204
- Kumari KDKP, Weerakoon TCS, Handunnetti SM, Samarasinghe K., Suresh TS (2014) Anti-inflammatory activity of dried flower extracts of *Aegle marmelos* in Wistar rats. *Journal of Ethnopharmacology* 151: 202–1208.
- Kummer CL, Coelho, TCRB (2002). Anti-inflamatórios não esteróides inibidores da ciclooxigenase - 2 (COX - 2): Aspectos atuais. *Rev. Bras Anestesiol*, p. 498 –512.
- Lodise, TP, Drusano GL (2011). Pharmacokinetics and pharmacodynamics: optimal antimicrobial therapy in the intensive care unit. *Critical Care Clinics* 27(1): 1-18.
- Lorenzini CA, Bucherelli C, Giachetti A (1984). Passive and active avoidance behavior in the light dark box test. *Physiology & Behavior* 32(4):687-689.
- Martin S, Jones M, Simpson E, Van Den BM (2003). Impaired spatial reference memory in aromatase-deficient (ArKO) mice. *Neuroreport* 14:1979–1982.
- Melo RF, Farrapo NM, Rocha-Junior DS, Silva MG, Cogo JC, Oshima-Franco Y, Rodrigues-Simioni L, Groppo FC (2009). Antiophidian mechanisms of medicinal plants. In: Raymond B. Keller. (Org.). *Flavonoids: Biosynthesis, Biological Effects and Dietary Sources*. New York: Nova Science Publishers, 249-262.
- Montgomery KC (1958). The elevated plus-maze. *Pharmac. Methodol. Ethology Psychopharmacol* 53(1):334–342.
- Morris M (1984). Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat. *Journal Neuroscience Methods* 11:47–60.
- Mota MLR, Thomas G, Barbosa FilhoJM (1985). Anti-inflammatory actions of tannins isolated from the bark of *Anacardium occidentale* L. *Journal of Ethnopharmacology*, 13: 289-300.

Moura VM, Sousa LAF, Oliveira RB, Silva AMM, Chalkidis HM, Silva MN, Pacheco S, Mourão RHV (2013). Inhibition of the principal enzymatic and biological effects of the crude venom of *Bothrops atrox* by plant extracts. *Journal of Medicinal Plants Research* 7(31):2330-2337.

NCCLS/CLSI - National Committee for Clinical Laboratory Standards (2006). Padronização dos Testes de Sensibilidade a Antimicrobianos por Disco-difusão: Norma Aprovada – 9ª Edição. Documento M2-A9 Vol.26 N° 1.

NCCLS/CLSI - National Committee for Clinical Laboratory Standards (2002). Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeast: approved standard. Document M27-A2, Villanova, Pennsylvania.

NCCLS/CLSI - National Committee for Clinical Laboratory Standards (2004). Metodologia dos Testes de Sensibilidade a Agentes Antimicrobianos por Diluição para Bactéria de Crescimento Aeróbico: Norma Aprovada – 6ª Edição. Documento M7-A7., Vol. 26 N° 2.

Nelson KE, Pell AN, Doane PH, Giner-Chavez BI, Schofield P (1997). Chemical and biological assays to evaluate bacterial inhibition by tannins. *Journal of Chemical Ecology* 23(4):1175-1194.

Newman DJ; Cragg GM (2007). Natural Products as Sources of New Drugs over the Last 25 Years. *Journal of Natural Products* 70: 461–477.

Okpo SO, Fatokun F, Adeyemi OO (2001). Analgesic and anti-inflammatory activity of *Crinum glaucum* aqueous extract. *Journal of Ethnopharmacology* 78: 207–211.

Oliveira RB, Nascimento MVM, Valadares MC, Paula JR, Costa EA, Cunha LC (2008). Avaliação dos efeitos depressores centrais do extrato etanólico das folhas de *Synadenium umbellatum* Pax. e de suas frações em camundongos albinos. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences* 44(3):485-491.

Oliveira RB, Nascimento MVM, Valadares MC, Paula JR, Costa EA, Cunha LC (2008). Avaliação dos efeitos depressores centrais do extrato etanólico das folhas de *Synadenium umbellatum* Pax. e de suas frações em camundongos albinos. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences* 44(3):485-491.

Oliveira RRB, Góis RMO, Siqueira RS, Almeida JRGS, Lima JT, Nunes XP, Oliveira, VR, Siqueira JS, Quintans-Júnir LJ (2009). Antinociceptive effect of the ethanolic extract of *Amburana cearensis* (Allemão) A.C. Sm., Fabaceae, in rodents. *Brazilian Journal of Pharmacognosy* 19(3): 672-676.

Parra LA, Yhebra RS, Sardiñas IG, Buela LI (2001). Comparative study of the assay of *Artemia salina* L. and the estimate of the medium lethal dose (LD50 value) in mice, to determine oral acute toxicity of plant extracts. *Phytomedicine* 8(5):395–400.

Prediger RDS (2008). Effects of acute administration of the hydroalcoholic extract of mate tea leaves (*Ilex paraguariensis*) in animal models of learning and memory. *Journal of Ethnopharmacology* 120:65–73.

- Pott A, Pott VJ (1994). *Plathymenia reticulata*, Leguminosae. In: Brazilian Agricultural Research Corporation Plants of Pantanal. EMBRAPA-CPAP-SPI, Brasília, DF, Brazil.
- Reddy LJ, Jose B (2010). Evaluation of antibacterial activity of the bark, flower and leaf extracts of *Gliricidiasepium* from south India. *International Journal of Current Pharmaceutical Research* 2(3):18-20.
- Rios JL, Recio M (2005). Medicinal plants and antimicrobial plants. *Journal of Ethnopharmacology* 100:80-4.
- Rosland JH, Hunskaar S, Hole K (1990). Diazepam attenuates morphine antinociception test-dependently in mice. *Pharmacol. Toxicol* 66(5):382-386.
- Sanchez PM, Villarreal ML, Herrera-Ruiz M, Zamilpa M, Jiménez-Ferrer E, Trejo-Tapia G (2013). In vivo anti-inflammatory and anti-ulcerogenic activities of extracts from wild growing and in vitro plants of *Castilleja tenuiflora* Benth. (Orobanchaceae). *Journal of Ethnopharmacology* 150: 1032–1037.
- Sarrazin SLF, Oliveira RB, Barata LES, Mourão RHV (2012). Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Lippia grandis* Schauer (Verbenaceae) from the western Amazon. *Food Chemistry* 134:1474–1478.
- Scalbert A (1991). Antimicrobial properties of tannins. *Phytochemistry* 30:3875-3883.
- Shahat AA, Marzouk MS (2013). Tannins and Related Compounds from Medicinal Plants of Africa. *Medicinal Plant Research in Africa: Pharmacology and Chemistry*, 479-555.
- Silva MG, Oliveira FS, Quintans-Júnior LJ, Oliveira TML, Diniz MFFM (2005). Investigação do efeito analgésico central e antiinflamatório de *Conocliniopsis prasiifolia* (DC) R.M. King e H. Robinson em roedores. *Acta Farm. Bonaerense*, 24 (4): 533-537.
- Simões CMO, Schenkel EP, Gosmann G, Mello JCP, Mentz LA, Petrovick PR (2007). *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. Porto Alegre/Florianópolis, Ed da UFRGS/ED. da UFSC.
- Souza ET, Queiroz AC, Miranda GE, Lorenzo VP, Silva EF, Freire-Dias TLM, Cupertino-Silva YK, Melo GMA, Santos BVO, Chaves COM, Alexandre-Moreira MS. (2009). Antinociceptive activities of crude methanolic extract and phases, *n*-butanolic, chloroformic and ethyl acetate from *Caulerpa racemosa* (Caulerpaceae). *Brazilian Journal of Pharmacognosy* 19(1A): 115-120.
- Springfield EP, Eagles PKF, Scott G (2005). Quality assessment of South African herbal medicines by means of HPLC fingerprinting. *Journal of Ethnopharmacology* 101:75–83.
- Tekwu ME, Piene AC, Beng VP (2012). Investigations of antimicrobial activity of some Cameroonian medicinal plant extracts against bacteria and yeast with gastrointestinal relevance. *Journal of Ethnopharmacology* 142:265–273.
- Tjolsen A, Berge OG, Hunskaar S, Rosland JH, Hole K (1992). The formalin test: an evolution of the method. *Pain* 51:5-17.

Toledo CEM, Britta EA, Ceole LF, Silva ER, Mello JCP (2011). Antimicrobial and cytotoxic activities of medicinal plants of the Brazilian cerrado using Brazilian cachaça as extractor liquid. *Journal of Ethnopharmacology* 133:420–425.

Vieira LF de A, Reis MD dos S, Brandão ARA, Viana IMM, da Silva JP, Barreto E, Smariotto S (2013). Anxiolytic-like effect of the extract from *Bowdichia virgilioides* in mice. *Pharmacognosy* 23(4):680-686.

Wagner H, Bladt S. *Plant Drug Analysis – A thin layer Chromatography Atla*. 2ed. Springer, Berlin, 1996.

Wang I, Chen P, Tang C, Wang Y, Li Y, Zhang H (2014). Antinociceptive and anti-inflammatory activities of extract and two isolated flavonoids of *Carthamus tinctorius* L. *Journal of Ethnopharmacology* 151:944–950.

Walesiuk A, Nazaruk J, Braszko JJ (2010). Pro-cognitive effects of *Cirsium rivulare* extracts in rats. *Journal of Ethnopharmacology* 129:261–266.

Winter CA, Risley EA, Nuss GW (1962). Carragenin-induced edema in hind paw of the rat as an assay for anti-inflammatory drugs. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 111: 544– 547.

Whishaw IQ, Mittleman G (1986). Visits to starts, routes, and places by rats (*Rattus norvegicus*) in swimming pool navigation tasks. *Journal of Comparative Psychology* 100:422-31.

Xu Q, Wang Y, Guo S, Shen Z, Wang Y, Yang L (2014). Anti-inflammatory and analgesic activity of aqueous extract of *Flos populi*. *Journal of Ethnopharmacology* <http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2014.01.037i>.

Tabela 1. Perfil fitoquímico do extrato aquoso das cascas de *Plathymenia reticulata*.

Metabólitos Secundários	EAPR
Flavonoides	-
Cumarinas	-
Ácidos graxos	-
Alcaloides	-
Taninos	+

EAPR = Extrato aquoso de *Plathymenia reticulata*

(+) = presença

(-) = ausência

Tabela 2: Resultados da Concentração inibitória mínima e Concentrações bactericida e fungicida mínimas do extrato aquoso da casca de *Plathymenia reticulata* Benth.

Microrganismos	Extrato aquoso		Antibiótico padrão					
	CIM ( $\mu\text{l/mL}$ )	CBM/CFM ( $\mu\text{l/mL}$ )	Norfloxacina		Ampicilina		Fluconazol	
			CIM ( $\mu\text{l/mL}$ )	CBM ( $\mu\text{l/mL}$ )	CIM ( $\mu\text{l/mL}$ )	CBM ( $\mu\text{l/mL}$ )	CIM ( $\mu\text{l/mL}$ )	CBM ( $\mu\text{l/mL}$ )
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	0,23	3,75	0,05	0,11	0,05	0,05	nr	nr
<i>S. epidermidis</i> ATCC 12228	0,11	0,93	0,05	0,11	0,05	0,05	nr	nr
<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	0,0008	7,5	0,10	0,11	0,05	0,05	-	-
<i>E. coli</i> ATCC 35218	1,87	3,75	0,05	0,11	0,05	0,11	nr	nr
<i>K. pneumoniae</i> ATCC (13883)	0,0004	0,93	0,05	0,11	0,05	0,05	nr	nr
<i>C. albicans</i> ATCC (10231)	> 120	nr	nr	nr	nr	nr	0,46	>15
<i>C. tropicalis</i> (ATCC 13803)	>120	nr	nr	nr	nr	nr	0,46	>15
<i>C. parapsilosis</i> (ATCC 22019)	>120	nr	nr	nr	nr	nr	0,05	0,11

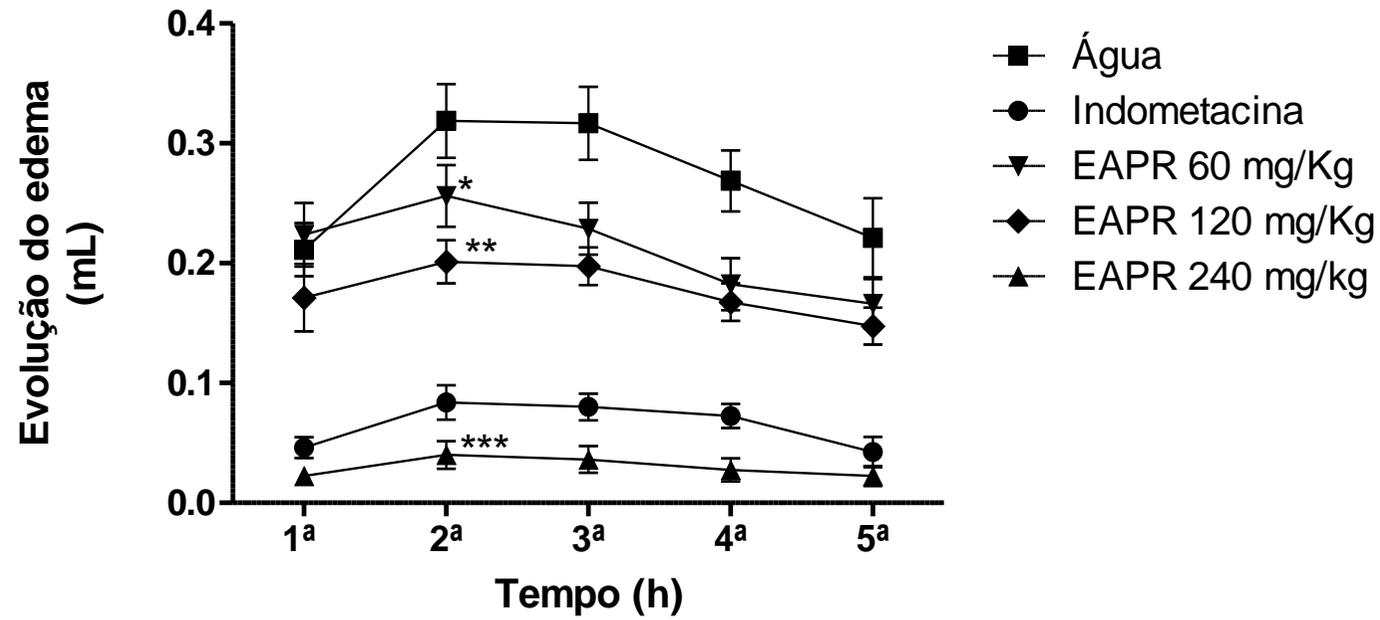
ATCC – American Type Culture Collection

CIM – Concentração inibitória mínima

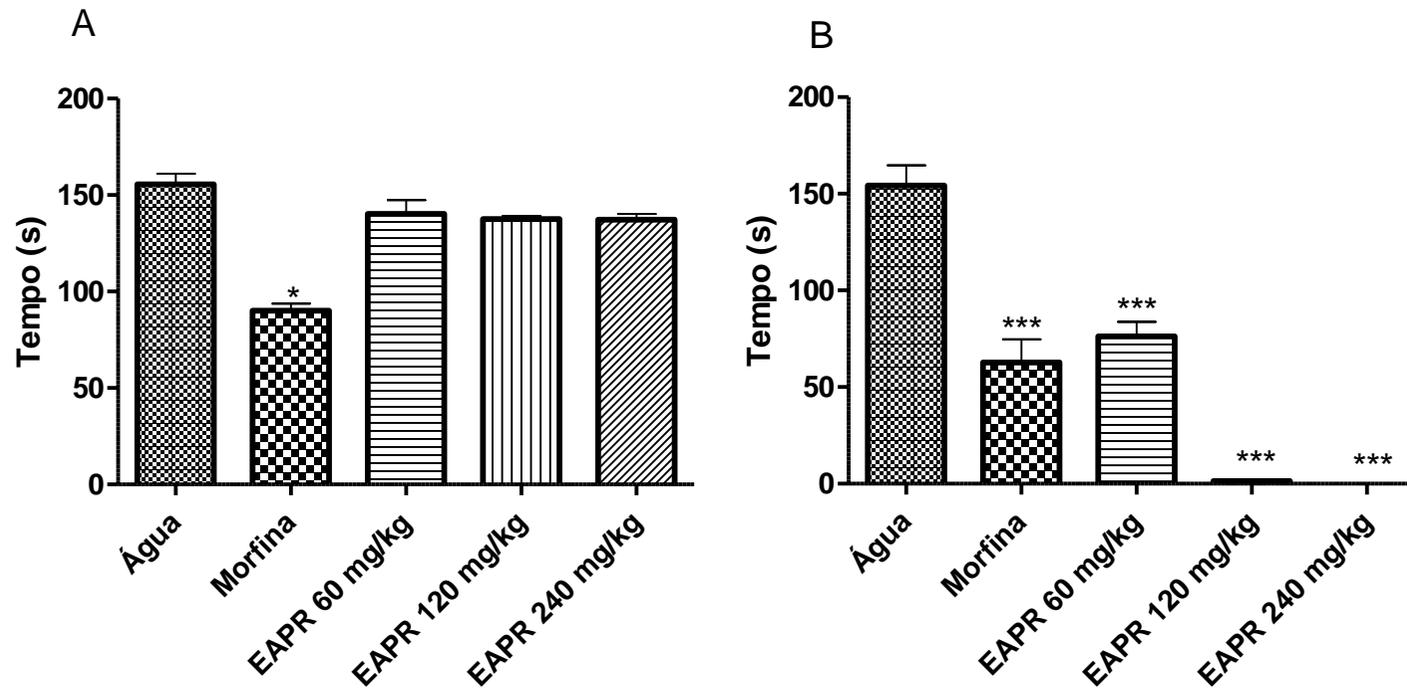
CBM – Concentração bactericida mínima

CFM – Concentração fungicida mínima

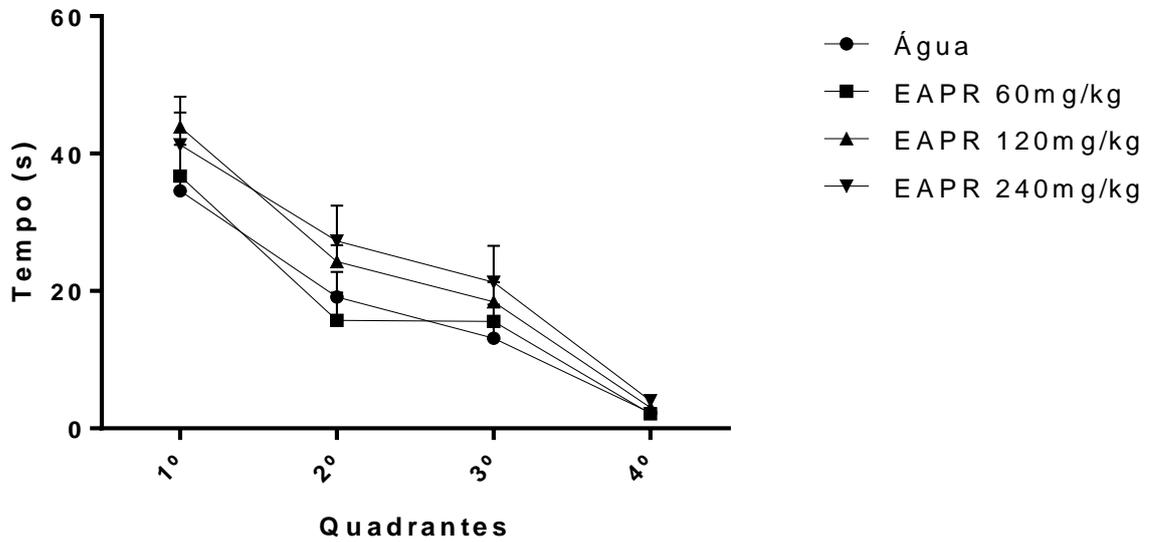
nr – não realizado



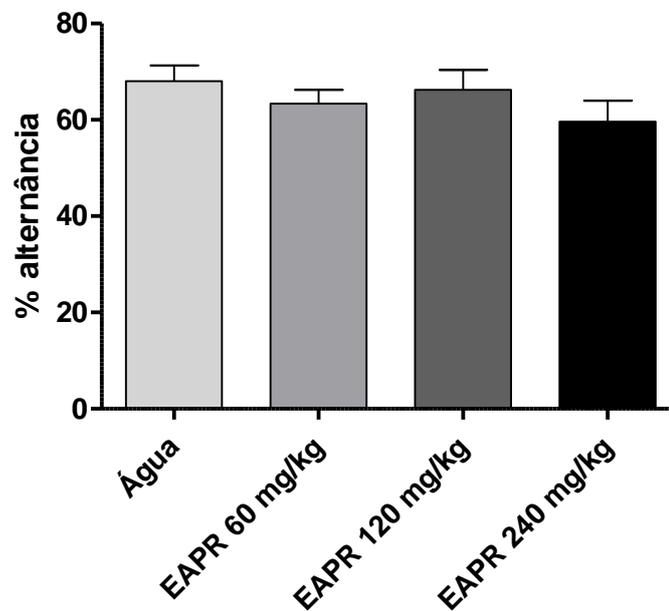
**Figura 01.** Efeito antiedematogênico do extrato aquoso de *Plathymenia reticulata* no teste de edema de pata induzido por carragenina em ratos. EAPR = extrato aquoso de *Plathymenia reticulata*. \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ .



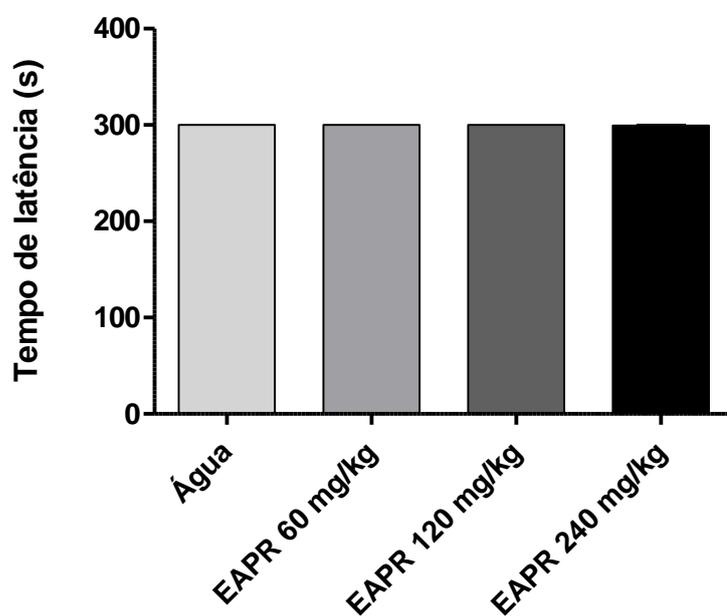
**Figura 02.** Efeito antinociceptivo do extrato aquoso de *Plathymenia reticulata* sobre a nociceção induzida por formalina em ratos. A: Fase neurogênica. B: Fase inflamatória. Os asteriscos demonstram o nível de significância em comparação com o grupo controle. EAPR = extrato aquoso de *Plathymenia reticulata*. \* $p < 0.05$ , \*\*\*  $p < 0.001$ .



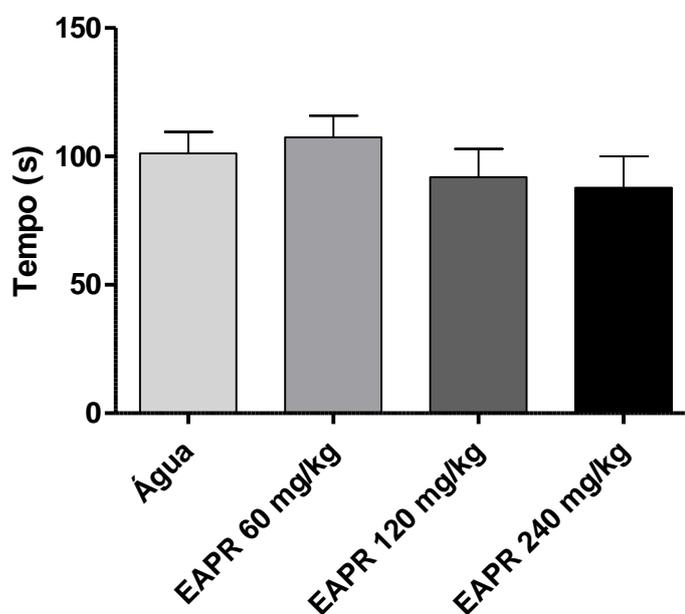
**Figura 3.** Efeito da administração por via oral do extrato aquoso das cascas de *Plathymenia reticulata* em ratos no labirinto aquático de Morris. Os valores representam a média  $\pm$  erro padrão. EAPR = extrato aquoso de *Plathymenia reticulata*.



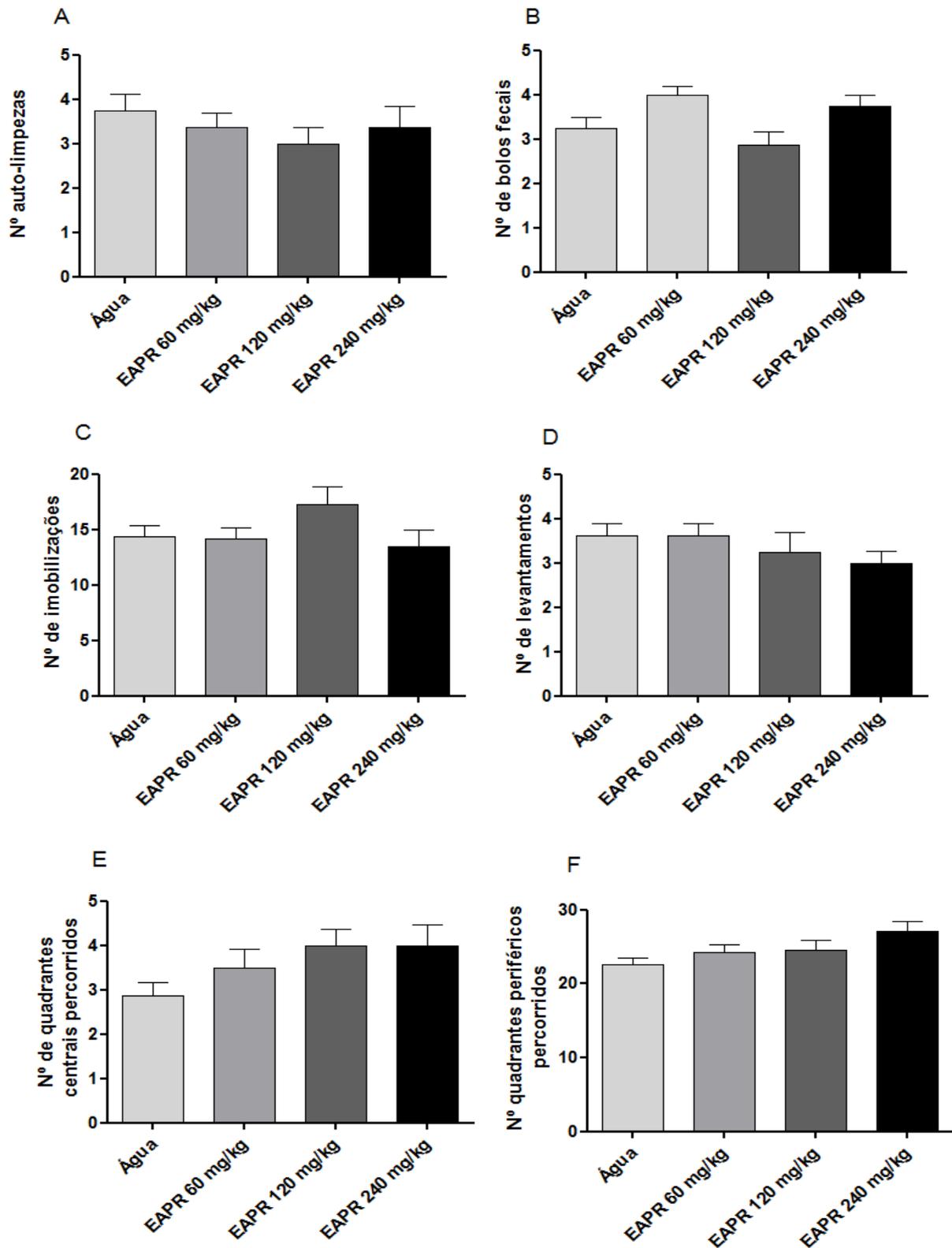
**Figura 4.** Efeito da administração por via oral do extrato aquoso das cascas de *Plathymenia reticulata* em ratos no labirinto em Y. Os valores representam a média  $\pm$  erro padrão. EAPR = extrato aquoso de *Plathymenia reticulata*.



**Figura 5.** Efeito da administração por via oral do extrato aquoso de *Plathymenia reticulata* em ratos submetidos ao teste da caixa clara-escura. Os valores representam a média  $\pm$  erro padrão. EAPR = extrato aquoso de *Plathymenia reticulata*.



**Figura 6.** Efeito da administração por via oral do extrato aquoso das cascas de *Plathymenia reticulata* no desempenho de ratos no teste da barra giratória. Os valores representam a média  $\pm$  erro padrão. EAPR = extrato aquoso de *Plathymenia reticulata*.



**Figura 7b.** Efeito da administração do extrato aquoso de *Plathymenia reticulata* em ratos no teste do campo aberto. A: Número de autolimpezas. B: Quantidade de Bolos fecais. C: Número de imobilizações. D: Número de levantamentos. E: Número de quadrantes centrais percorridos e F: Número de quadrantes periféricos percorridos. Os valores representam a média  $\pm$  erro padrão. ( $p \leq 0,05$ ). EAPR = extrato aquoso de *Plathymenia reticulata*.

### 3 SÍNTESE INTEGRADORA

Os resultados obtidos em neste trabalho corroboram com pesquisas já realizadas em outras regiões do Brasil, bem como por nosso grupo de pesquisa, o que demonstra que a espécie *Plathymenia reticulata*, encontrada nas savanas amazônicas apresentam potencial antimicrobiano, analgésico e anti-inflamatório promissor para uso como recurso terapêutico, confirmando as indicações etnobotânicas dessa espécie. Em relação à avaliação dos efeitos sobre o comportamento e aprendizagem, não observamos nenhuma alteração na memória, aprendizagem, coordenação motora e ansiedade nos testes realizados com os animais, no entanto, é importante ressaltar que é necessária a continuação desta pesquisa para uma melhor avaliação dos efeitos tóxicos da espécie.

A seleção de uma espécie vegetal para pesquisa baseada em indicações de um determinado efeito farmacológico em humanos constitui um valioso atalho para a descoberta de novos fármacos, sendo o uso tradicional considerado uma triagem quanto à aplicação terapêutica. Portanto, os resultados obtidos a partir dessa pesquisa servem de base para estudos futuros que devem contribuir para a elucidação dos mecanismos de ação dos constituintes químicos, da eficácia e segurança para o uso medicinal de *Plathymenia reticulata* Benth e, possivelmente, inclusão dessa espécie na RENISUS, o que significa a garantia do acesso seguro e racional de plantas medicinais e fitoterápicos em nosso país e o uso sustentável da biodiversidade brasileira .

## **ANEXOS**

ANEXO A: Normas do Journal of Medicinal Plants Research

ANEXO B: Autorização comitê de ética para uso de animais.

## Instruction For Authors

The Journal of Medicinal Plants Research (ISSN 1996-0875) is an open access journal that provides rapid publication (weekly) of articles in all areas of Medicinal Plants research, Ethnopharmacology, Fitoterapia, Phytomedicine etc. The Journal welcomes the submission of manuscripts that meet the general criteria of significance and scientific excellence. Electronic submission of manuscripts is strongly encouraged, provided that the text, tables, and figures are included in a single Microsoft Word file (preferably in Arial font).

### Regular articles

All portions of the manuscript must be typed double-spaced and all pages numbered starting from the title page.

The Title should be a brief phrase describing the contents of the paper. The Title Page should include the authors' full names and affiliations, the name of the corresponding author along with phone, fax and E-mail information. Present addresses of authors should appear as a footnote.

The Abstract should be informative and completely self-explanatory, briefly present the topic, state the scope of the experiments, indicate significant data, and point out major findings and conclusions. The Abstract should be 100 to 200 words in length. Complete sentences, active verbs, and the third person should be used, and the abstract should be written in the past tense. Standard nomenclature should be used and abbreviations should be avoided. No literature should be cited.

Following the abstract, about 3 to 10 key words that will provide indexing references should be listed.

A list of non-standard Abbreviations should be added. In general, non-standard abbreviations should be used only when the full term is very long and used often. Each abbreviation should be spelled out and introduced in parentheses the first time it is used in the text. Only recommended SI units should be used. Authors should use the solidus presentation (mg/ml). Standard abbreviations (such as ATP and DNA) need not be defined.

The Introduction should provide a clear statement of the problem, the relevant literature on the subject, and the proposed approach or solution. It should be understandable to colleagues from a broad range of scientific disciplines.

Materials and methods should be complete enough to allow experiments to be reproduced. However, only truly new procedures should be described in detail; previously

published procedures should be cited, and important modifications of published procedures should be mentioned briefly. Capitalize trade names and include the manufacturer's name and address. Subheadings should be used. Methods in general use need not be described in detail.

Results should be presented with clarity and precision. The results should be written in the past tense when describing findings in the authors' experiments. Previously published findings should be written in the present tense. Results should be explained, but largely without referring to the literature. Discussion, speculation and detailed interpretation of data should not be included in the Results but should be put into the Discussion section.

The Discussion should interpret the findings in view of the results obtained in this and in past studies on this topic. State the conclusions in a few sentences at the end of the paper. The Results and Discussion sections can include subheadings, and when appropriate, both sections can be combined.

The Acknowledgments of people, grants, funds, etc should be brief.

Tables should be kept to a minimum and be designed to be as simple as possible. Tables are to be typed double-spaced throughout, including headings and footnotes. Each table should be on a separate page, numbered consecutively in Arabic numerals and supplied with a heading and a legend. Tables should be self-explanatory without reference to the text. The details of the methods used in the experiments should preferably be described in the legend instead of in the text. The same data should not be presented in both table and graph form or repeated in the text.

Figure legends should be typed in numerical order on a separate sheet. Graphics should be prepared using applications capable of generating high resolution GIF, TIFF, JPEG or Powerpoint before pasting in the Microsoft Word manuscript file. Tables should be prepared in Microsoft Word. Use Arabic numerals to designate figures and upper case letters for their parts (Figure 1). Begin each legend with a title and include sufficient description so that the figure is understandable without reading the text of the manuscript. Information given in legends should not be repeated in the text.

References: In the text, a reference identified by means of an author's name should be followed by the date of the reference in parentheses. When there are more than two authors, only the first author's name should be mentioned, followed by 'et al'. In the event that an author cited has had two or more works published during the same year, the reference, both in the text and in the reference list, should be identified by a lower case letter like 'a' and 'b' after the date to distinguish the works.

#### Examples:

Abayomi (2000), Agindotan et al. (2003), (Kelebeni, 1983), (Usman and Smith, 1992), (Chege, 1998; Chukwura, 1987a,b; Tijani, 1993,1995), (Kumasi et al., 2001)

References should be listed at the end of the paper in alphabetical order. Articles in preparation or articles submitted for publication, unpublished observations, personal communications, etc. should not be included in the reference list but should only be mentioned in the article text (e.g., A. Kingori, University of Nairobi, Kenya, personal communication). Journal names are abbreviated according to Chemical Abstracts. Authors are fully responsible for the accuracy of the references.

#### Examples:

Ogunseitan OA (1998). Protein method for investigating mercuric reductase gene expression in aquatic environments. *Appl. Environ. Microbiol.* 64:695–702.

Gueye M, Ndoye I, Dianda M, Danso SKA, Dreyfus B (1997). Active N<sub>2</sub> fixation in several *Faidherbia albida* provenances. *Ar. Soil Res. Rehabil.* 11:63-70.

Charnley AK (1992). Mechanisms of fungal pathogenesis in insects with particular reference to locusts. In: Lomer CJ, Prior C (eds) *Biological Controls of Locusts and Grasshoppers: Proceedings of an international workshop held at Cotonou, Benin.* Oxford: CAB International, pp 181-190.

Mundree SG, Farrant JM (2000). Some physiological and molecular insights into the mechanisms of desiccation tolerance in the resurrection plant *Xerophyta viscosa* Baker. In Cherry et al. (eds) *Plant tolerance to abiotic stresses in Agriculture: Role of Genetic Engineering*, Kluwer Academic Publishers, Netherlands, pp 201-222.

Babalola OO (2002). Interactions between *Striga hermonthica* (Del.) Benth. and fluorescent rhizosphere bacteria Of *Zea mays*, L. and *Sorghum bicolor* L. Moench for *Striga* suicidal germination In *Vigna unguiculata* . PhD dissertation, University of Ibadan, Ibadan, Nigeria.

#### Short Communications

Short Communications are limited to a maximum of two figures and one table. They

should present a complete study that is more limited in scope than is found in full-length papers. The items of manuscript preparation listed above apply to Short Communications with the following differences: (1) Abstracts are limited to 100 words; (2) instead of a separate Materials and Methods section, experimental procedures may be incorporated into Figure Legends and Table footnotes; (3) Results and Discussion should be combined into a single section.

**Proofs and Reprints:** Electronic proofs will be sent (e-mail attachment) to the corresponding author as a PDF file. Page proofs are considered to be the final version of the manuscript. With the exception of typographical or minor clerical errors, no changes will be made in the manuscript at the proof stage. Because JMPR will be published freely online to attract a wide audience), authors will have free electronic access to the full text (in both HTML and PDF) of the article. Authors can freely download the PDF file from which they can print unlimited copies of their articles.

**Copyright:** Submission of a manuscript implies: that the work described has not been published before (except in the form of an abstract or as part of a published lecture, or thesis) that it is not under consideration for publication elsewhere; that if and when the manuscript is accepted for publication, the authors agree to automatic transfer of the copyright to the publisher.

**Fees and Charges:** Authors are required to pay a \$600 handling fee. Publication of an article in the Journal of Medicinal Plant Research is not contingent upon the author's ability to pay the charges. Neither is acceptance to pay the handling fee a guarantee that the paper will be accepted for publication. Authors may still request (in advance) that the editorial office waive some of the handling fee under special circumstances.

