UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Fármaco e Medicamentos
Área de Insumos Farmacêuticos

Estudo farmacognóstico comparativo entre duas espécies da
família Tropaeolaceae que ocorrem na região sul do Brasil:
Tropaeolum majus L. e *Tropaeolum pentaphyllum* Lam. – em
busca de atividade anti-*Leishmania chagasi* e anticoagulante
sobre plasma humano

Ana Paula do Espírito Santo

Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE

Orientador:
Prof. Dr. Vicente de Oliveira Ferro

São Paulo
2007

Ana Paula do Espírito Santo

Estudo farmacognóstico comparativo entre duas espécies da
família Tropaeolaceae que ocorrem na região sul do Brasil:
Tropaeolum majus L. e *Tropaeolum pentaphyllum* Lam. – em
busca de atividade anti-*Leishmania chagasi* e anticoagulante
sobre plasma humano

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fármaco e Medicamentos da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Fármacos e Medicamentos, na Área de Insumos Farmacêuticos.

Orientador: Prof. Dr. Vicente de Oliveira Ferro.

São Paulo
2007

18.187

DEDALUS - Acervo - CQ

30100012579

Ficha Catalográfica

Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP

Espírito Santo, Ana Paula do
E77e Estudo farmacognóstico comparativo entre duas espécies da
família Tropaeolaceae que ocorrem na região sul do Brasil :
Tropaeolum majus L. e *Tropaeolum pentaphyllum* Lam. – em
busca de atividade anti-*Leishmania chagasi* e anticoagulante
sobre plasma humano / Ana Paula do Espírito Santo. -- São
Paulo, 2007.
103p.

Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas
da Universidade de São Paulo. Departamento de Farmácia.
Orientador: Ferro, Vicente de Oliveira

1. Produtos naturais : Farmacognosia 2. Anticoagulantes :
Farmacodinâmica 3. Tropaeolaceae : Farmacognosia I. T. II.
Ferro, Vicente de Oliveira, orientador.

615.321 CDD

Ana Paula do Espírito Santo

Estudo farmacognóstico comparativo entre duas espécies da família Tropaeolaceae que ocorrem na região sul do Brasil: *Tropaeolum majus* L. e *Tropaeolum pentaphyllum* Lam. – em busca de atividade anti-*Leishmania chagasi* e anticoagulante sobre plasma humano.

Comissão Julgadora
da
Dissertação para obtenção do grau de Mestre

Prof. Dr. Vicente de Oliveira Ferro
orientador/presidente

Dr^a. Ida Sigueko Sano Martins
1º. examinador

Prof^a. Dr^a Adriana Lenita Meyer Albiero
2º. examinador

São Paulo, 15 de março de 2007.

AGRADECIMENTOS

Pai do Céu, obrigada! Nada teria conseguido sem Vosso amoroso amparo.

À minha família, cujo apoio me deu forças.

Ao Professor e orientador Vicente de Oliveira Ferro, pela orientação e incentivo.

À Dra. Ida Sigueko Sano Martins do departamento de fisiopatologia do Instituto Butantan, pela ajuda inestimável nos estudos de atividade anticoagulante, e pelo exemplo de solidariedade científica que levarei para minha vida profissional.

À Annette e Jürgen Heuser da empresa Ervas Finas que cederam gentilmente as flores e folhas de *Tropaeolum majus*. Vielen danke!

Ao pesquisador Dr. Valdely Ferreira Kinupp, do departamento de fitotecnia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, pelo envio de flores e folhas de *T. pentaphyllum*.

À Professora do departamento de botânica da Universidade Federal do Paraná, Dra. Cleusa Bona, sempre tão disposta a me auxiliar nos estudos de morfo-anatomia.

À Profa. Valentina Porta que disponibilizou equipamento e materiais para as análises em CLAE; e a todos do Biofar-USP, em especial, à Eunice Kono por sua valiosa colaboração.

A todos do departamento de fisiopatologia do Instituto Butantan pela amizade, em especial, à Sandra Scorraro de Tomy, que pacientemente me ensinou o valor incrível dos segundos.

Ao Dr. André Tempone do departamento de parasitologia do Instituto Adolfo Lutz, por haver possibilitado os ensaios de atividade anti-leishmania.

À Profa. Dra. Dominique Corine Hermine Fisher, pela amizade e colaboração na análise morfo-anatômica de *T. majus*. Merci beaucoup!

À secretária Elizabeth Paiva, que sempre demonstrou sensibilidade e interesse em nos ajudar.

Às Professoras da Farmacognosia, Dras. Edna e Elfriede pela solicitude que sempre demonstraram.

Ao técnico do laboratório de Farmacognosia, Roberto Honório, que tantas vezes nos socorreu com boa vontade.

Aos colegas de pós-graduação: Larissa, Elisângela, Josseara, Fabiana, Valéria, N'zi, André, Tati e Carol e à aluna de iniciação científica Suzan, obrigada pela amizade.

“E se tivesse o dom da profecia e conhecesse todos os mistérios e toda a ciência, e se eu tivesse toda a fé, a ponto de transportar montanhas, mas não tivesse a caridade, não seria nada”.

(I Cor. 13, 2)

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1	Representação esquemática da molécula de trombina	9
FIGURA 2	Polímero de fibrina formando coágulo	9
FIGURA 3	Representação esquemática da cascata da coagulação sangüínea e do local de ação dos anticoagulantes	11
FIGURA 4	A cascata da coagulação e os alvos de ação de novos fármacos anticoagulantes	12
FIGURA 5	Local de ação dos anticoagulantes orais e o provável mecanismo de ação da vitamina K	15
FIGURA 6	Fórmulas estruturais da vitamina K e seus congêneres e de seus antagonistas, anticoagulantes orais	16
FIGURA 7	Distribuição dos tipos de leishmaniose pelo mundo	19
FIGURA 8	Ciclo de vida da <i>Leishmania sp</i>	20
FIGURA 9	Curva padrão de ácido gálico	37
FIGURA 10	Curva padrão de quercetina	38
FIGURAS 11 e 12	Plantação de <i>Tropaeolum majus</i> L. (Tropaeolaceae) na propriedade da empresa Ervas Finas em Campo Limpo Paulista	48
FIGURA 13	Exsicata de <i>T. majus</i>	48
FIGURAS 14 a 22	Folha e pecíolo de <i>Tropaeolum majus</i>	50
FIGURAS 23 a 30	Sépala e Pétala de <i>Tropaeolum majus</i>	53
FIGURAS 31 e 32	Cultivo de <i>Tropaeolum pentaphyllum</i> Lam. (Tropaeolaceae) em Porto Alegre (RS), onde foram feitas as coletas, sendo visitado por beija-flor (polinizador)	55
FIGURA 33	Detalhe do fruto maduro de <i>Tropaeolum pentaphyllum</i>	55

FIGURAS 34 a 37	Aspectos da morfologia externa de <i>T. pentaphyllum</i>	56
FIGURAS 38 a 43	Folhas de <i>Tropaeolum pentaphyllum</i>	58
FIGURAS 44 a 47	Pecíolo de <i>Tropaeolum pentaphyllum</i>	59
FIGURAS 48 a 51	Sépala de <i>Tropaeolum pentaphyllum</i>	61
FIGURAS 52 a 58	Cromatografia em camada delgada – comparação entre os extratos e as frações bioativas de <i>T. majus</i> e <i>T. pentaphyllum</i>	68
FIGURA 59	Núcleo fundamental dos flavonóides e sua numeração	73
FIGURA 60	Molécula de canferol; em perspectiva 3D.	73
FIGURA 61	Molécula de quercetina; em perspectiva 3D.	73
FIGURA 62	Rutina (quercetina 3-O-rutinósido)	74
FIGURA 63	Isoquercetrina (quercetina-3-O-glucosídeo).	74
FIGURA 64	Ácido cafeico; em perspectiva 3D.	75
FIGURA 65	Ácido clorogênico; em perspectiva 3D	75
FIGURA 66	Molécula de benzilglucosinolato; em perspectiva 3D.	76
FIGURA 67	Molécula de benzilisotiocianato; em perspectiva 3D.	76
FIGURA 68	Espectro obtido em cromatografia líquida de alta eficiência da droga constituída de folhas	77
FIGURA 69	Espectro obtido em cromatografia líquida de alta eficiência da flor vermelha	78
FIGURAS 70 a 72	Espectros no UV do composto isolado na folha de <i>T. majus</i>	79
FIGURAS 73 a 75	Espectros no UV do composto isolado na flor de <i>T. majus</i>	80
FIGURAS 76 a 80	Espectros obtidos por CLAE das frações bioativas de <i>T. majus</i> e <i>T. pentaphyllum</i>	83

FIGURA 81	Influência do tempo de incubação da solução de trombina 6U/mL com o controle ou com o extrato hidroetanólico das folhas de <i>Tropaeolum majus</i> (800µg/mL) sobre o tempo de trombina da solução de fibrinogênio (2mg/mL). Figura 82: Figura 83: Figura 84:	85
FIGURA 82	Influência do benzilisotiocianato, dos extratos e frações de <i>T. majus</i> (800µg/mL) sobre o tempo de trombina do pool de plasma, utilizando-se trombina 6U/mL.	87
FIGURA 83	Influência dos extratos e frações de <i>T. pentaphyllum</i> (800µg/mL) sobre o tempo de trombina do pool de plasma, utilizando-se trombina 6U/mL.	88
FIGURA 84	Influência da concentração do extrato hidroetanólico das folhas de <i>T. majus</i> e de <i>T. pentaphyllum</i> e das frações acetato de etila e n-butanólica sobre o Tempo de Coagulação do pool de plasma humano	90
FIGURA 85	Comparação entre os tempos de coagulação influenciados pelos extratos e suas frações bioativas das espécies <i>T. majus</i> e <i>T. pentaphyllum</i> . N = 10	91

LISTA DE QUADROS

QUADRO 1	Mortalidade proporcional em porcentagem de óbitos por grupo de causas segundo região brasileira, no período de 2004	5
QUADRO 2	Taxa de mortalidade específica por doenças do aparelho circulatório no período de 2004, por sexo, segundo região	6
QUADRO 3	Risco de doença coronariana segundo a American Heart Association	7
QUADRO 4	Algumas plantas medicinais para as quais foi observado, entre 1998 e 2006, algum efeito sobre a coagulação sangüínea	18
QUADRO 5	Distribuição geográfica das espécies de <i>Leishmania</i> e o tipo de doença que desenvolvem	21
QUADRO 6	Algumas plantas medicinais brasileiras para as quais foi observada, recentemente, atividade anti-leishmania.	22
QUADRO 7	Código das frações dos extratos hidroetanólicos das folhas	35
QUADRO 8	Comparação da morfologia externa das folhas e flores das duas espécies.	62
QUADRO 9	Comparação da morfologia interna das folhas e flores das duas espécies	63
QUADRO 10	Resultado da triagem fitoquímica nas folhas de <i>Tropaeolum majus</i> e <i>T. pentaphyllum</i>	64

RESUMO

O estudo farmacognóstico comparativo das folhas de duas espécies de capuchinha, *T. majus* e de *T. pentaphyllum*, constituiu o escopo deste trabalho. Artigos científicos sobre a espécie *T. majus* reportam a atividade antibacteriana, antifúngica, antiviral e antitumoral, devidas ao benzilisotiocianato, presente nos órgãos aéreos da espécie. Na medicina popular, também é utilizada para “afinar” o sangue. O efeito anticoagulante é de grande importância para indivíduos predispostos a distúrbios hemostáticos. No âmbito farmacológico, foram avaliadas, *in vitro*, as atividades anticoagulante sobre o plasma humano e antileishmania dos extratos e das frações. O benzilisotiocianato não apresentou atividade anticoagulante nem anti-leishmania. Foi observada atividade anticoagulante nos ensaios com os extratos e as frações hidrofílicas de *T. majus* e de *T. pentaphyllum* e a ausência de efeito destes sobre a viabilidade da forma promastigota de *Leishmania chagasi*. Os resultados apontam os flavonóides como os responsáveis pelo prolongamento do tempo de trombina provocado pelos extratos de *T. majus* e *T. pentaphyllum*.

Palavras chave: Tropaeolum, anticoagulante, antileishmania, capuchinha.

ABSTRACT

“Study comparative farmacognóstico among two species of the family Tropaeolaceae that happen in the south area of Brazil: *Tropaeolum majus* L. and *Tropaeolum pentaphyllum* Lam. - in search of activity anti-*Leishmania chagasi* and anticoagulant on human plasma”. The aim of this work was the pharmacognostic comparative study of leaves and flowers of nasturtium: *Tropaeolum majus* e *Tropaeolum pentaphyllum*. Scientific articles report the antibacterial, antiviral and antitumoral activity due to benzyl-isothiocyanate, wich is present in the aerial organs of both species. Folk medicine uses leaves extract of *T. majus* to “thin” the blood. Anticoagulant effect is of great importance for predisposed individuals to haemostatic disturbances. Hidroalcoholic extracts of leaves and flowers of *T. majus* and *T. pentaphyllum* were appraised for the anticoagulant and anti-leishmania activities. The benzyl-isothiocyanate neither presented anticoagulant activity nor anti-leishmania. Anticoagulant activity was observed in the essays with the extracts and the hidrofílic fractions of both species. The extracts and benzyl-isothiocyanate showed no activity against *Leishmania chagasi*. The results allowed conclude that flavonoids are responsible for the prolongation of thrombin time (TT), provoked by the extracts of *T. majus* e *T. pentaphyllum*.

Keywords: Tropaeolum, anticoagulant activity, antileishmania, nasturtium.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	VI
LISTA DE QUADROS	IX
RESUMO	XI
ABSTRACT	XII
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	5
2.1. Doenças do Aparelho Circulatório	5
2.2. Hemostasia	8
2.3. Fármacos com atividade anticoagulante	10
2.4. Anticoagulantes de origem natural	14
2.5. Leishmaniose	19
2.6. Família Tropaeolaceae	23
3. OBJETIVOS	27
3.1. Objetivos Gerais	27
3.2. Objetivos Específicos	27
4. MATERIAL	28
5. MÉTODOS	29
5.1. Estudo Botânico	29
5.2. Estudo Fitoquímico	30
5.2.1. Triagem para compostos do metabolismo secundário	30
5.2.2. Peso seco das folhas e flores frescas de <i>T. majus</i>	33
5.2.3. Peso seco das drogas constituídas de folhas e flores	34
5.2.4. Obtenção do extrato hidroalcoólico por percolação	34
5.2.5. Preparo das frações dos extratos hidroetanólicos das folhas	35
5.2.6. Doseamento de compostos fenólicos	35
5.2.7. Doseamento de flavonóides	37
5.2.8. Cromatografia em camada delgada (CCD)	38
5.2.9. Separação e verificação do perfil flavonoídico em CLAE e espectrofotometria em UV	40
5.2.10. Verificação do perfil flavonoídico das frações bioativas em CLAE	43
5.3. Estudo Farmacológico	44
5.3.1. Atividade anticoagulante	44
5.3.2. Atividade anti-leishmania	46
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO	47
6.1. Estudo Botânico	47
6.1.1. <i>Tropaeolum majus</i>	47

6.1.2. <i>Tropaeolum pentaphyllum</i>	54
6.2. Estudo Fitoquímico	64
6.2.1. Triagem para compostos do metabolismo secundário	64
6.2.2. Peso seco das folhas e flores frescas de <i>T. majus</i>	65
6.2.3. Perda por dessecação das drogas constituídas de folhas e flores	65
6.2.4. Rendimento dos extratos hidroetanólicos e das frações	65
6.2.5. Doseamento de compostos fenólicos e de flavonóides	66
6.2.6. Cromatografia em camada delgada (CCD)	68
6.2.7. Separação e verificação do perfil flavonoídico em CLAE e espectrofotometria em UV	77
6.2.8. Identificação das frações puras em espectrofotometria na região do UV	79
6.2.9. Perfil flavonoídico das frações bioativas em CLAE	81
6.3. Estudo Farmacológico	85
6.3.1. Influência do tempo de incubação da solução de trombina com a solução dos extratos	85
6.3.2. Identificação da fração com maior atividade anticoagulante	86
6.3.3. A menor concentração de extrato capaz de prolongar o TT	90
6.3.4. Confirmação da inibição da atividade coagulante da trombina através do teste de TT sobre plasma individual	91
6.3.5. Atividade anti-leishmania	92
7. CONCLUSÃO	93
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	95

1. INTRODUÇÃO

Entre os aforismos de Hipócrates, um deles parece ser a síntese de sua prática médica: “Nossa natureza é o médico das nossas doenças”. Este pensamento, quase sempre exposto à entrada das escolas de medicina, pode conter dois significados bastante plausíveis: o diagnóstico surge pela observação dos sinais e sintomas que o mal orgânico provoca, ou podemos encontrar, nos recursos naturais dos quais dispomos, o alívio das enfermidades.

No âmbito da farmacognosia, e da prática médica hipocrática, ambos os significados parecem encontrar guarida. O farmacognosta deve imbuir-se do ideal de encontrar na natureza uma aliada na descoberta de novas fontes de cura. O conhecimento dos processos patológicos é fundamental, mas não dispensa a sensibilidade de compreender que cada organismo é um universo de possibilidades para a saúde ou para a doença.

Este fato pode ser ilustrado pela aplicação de sanguessugas (*Hirudo medicinalis*) desde a remota antiguidade (900 d.C. até 1953) para a cura dos males mais diversos, como se elas fossem capazes de sugar a doença. No entanto, antes que se pudesse dominar a ação da hirudina e transformá-la num poderoso anticoagulante de origem animal, muitos morreram exangües, devido à sangria abundante, entre eles o rei Carlos II e Stálin, provocada pelo uso indiscriminado destes animais. Recentemente, as sanguessugas têm retornado ao arsenal terapêutico de modo mais racional, para a tranquilidade dos pacientes. Elas são aplicadas no tratamento de hematomas, em particular, os provocados por cirurgias plásticas (GORDON, 1997).

O trevo-doce (*Melilotus officinalis* Lam., Fabaceae), esteve envolvido em grande desastre e, em seguida, em grande descoberta. Quando o milho utilizado na alimentação animal foi substituído pelo trevo-doce, ocorreu envenenamento e morte por diátese hemorrágica de várias cabeças de gado em 1922, no Canadá. Assim como o *M. officinalis*, o *M. altissima*, *M. indica*, *M. alba*, *Anthoxanthum odoratum*, *Lespedeza stipulacea* e *Ferula communis* contêm cumarinas, que transformam-se em dicumarol tóxico (dicumarina ou dihidroxicumarina) pela ação de fungos do gênero *Aspergillus*, *Penicillium* e *Mucor* (BRITO et al., 2005 *apud* RADOSTITS et al. 2000). Novos derivados da cumarina têm sido sintetizados, após a descoberta do

dicumarol. Alguns derivados cumarínicos como a varfarina, fumarina, pindone, coumaclor, difenacum e bromadiolone foram, ou ainda são, empregados na produção de rodenticidas (RADOSTITS et al. 2000). Como reportado por Majerus e Tollefsen (2001), a varfarina foi introduzida na terapêutica, em 1953, para diminuir a coagulabilidade sanguínea e permanece, até hoje, o anticoagulante administrado por via oral mais prescrito no ocidente. Os cumarínicos, quando ingeridos em pequenas doses, são capazes de interferir na produção de protrombina no fígado e, conseqüentemente, aumentar o tempo de sangramento sem que ocorra alteração na concentração de fibrinogênio, no número ou função plaquetária (LUTZE et al., 2003). O incidente ocorrido na América do Norte em fazendas de criação de gado alimentado com trevo-doce produziu uma outra descoberta. A observação de que uma dieta rica em alfafa era capaz de reverter o quadro hemorrágico, levou ao isolamento da fitoquinona (vitamina K₁) deste vegetal em 1939 (GORDON, 1997).

A circulação sanguínea foi descrita em 1628 pelo inglês de Folkstone, Wiliam Harvey. Desde então, o entendimento científico sobre os processos envolvidos na circulação e hemostasia evoluíram, proporcionando condições mais favoráveis de pesquisa na área da terapia anticoagulante. No entanto, os danos à saúde provocados pelo sedentarismo aliado a uma dieta hipercalórica, hábitos típicos da sociedade pós-moderna, têm desafiado os avanços da farmacoterapia. Deste modo, a procura por novos compostos que apresentem atividade anticoagulante é de relevância, uma vez que são muitas e crescentes as condições que predispõe o indivíduo a distúrbios hemostáticos. Infecções graves e grandes cirurgias (MAJERUS & TOLLEFSEN, 2001); infarto agudo do miocárdio e acidente vascular cerebral (BITHELL et al, 1993) e (PAVONE et al, 1998); diabetes mellitus (PICKUP & WILLIAMS, 1994); tumores malignos sólidos (MEDEIROS et al, 2000) e (HAINES et al, 2005), entre outros fatores, requerem, na maioria dos casos, tratamento terapêutico para evitar a formação de trombos. Um fato preocupante é a incidência anual de tromboembolismo venoso (VTE) sintomático entre caucasianos, estimada em 117 casos por 100.000. No entanto, a verdadeira incidência de VTE é desconhecida, pois cerca de 50% da população em geral possui a doença clinicamente silenciosa (SILVERTEIN, 1998).

Por outro lado, há indícios significativos de que o consumo regular de alimentos ricos em compostos fenólicos, como os flavonóides presentes em frutas e hortaliças, reduz o risco de morte por doença arterial coronária (DAC) (HERTOG et

al., 1993), (KNEKT, 1996) e a incidência de derrame em idosos (KELI *et al.*, 1996). Estas observações provavelmente ligam-se ao fato de que os flavonóides seqüestram radicais livres evitando a peroxidação da lipoproteína de baixa densidade (LDL), (STEINBERG, 1995). A LDL oxidada pode desencadear a aterosclerose manifesta como DAC, AVC ou tromboembolismo de veias profundas (ARUOMA, 1998).

Dentre as plantas cujas flores compõem pratos sofisticados, a capuchinha ou chaguinha, nomes populares de *Tropaeolum majus* L. (Tropaeolaceae) chama atenção pela amplitude das atividades terapêuticas que lhe são atribuídas. As folhas, caule, flores e frutos da *T. majus* possuem sabor picante que lembra agrião, sendo utilizada na medicina popular no tratamento da acne, caspa, escorbuto, tosse, infecções das vias urinárias e respiratórias, na cicatrização de feridas, como fortalecedora do couro cabeludo e para “melhorar a circulação coronariana” (SALLÉ, 1996). A atividade antimicrobiana sobre diversos fungos e bactérias entre outros efeitos biológicos apresentados pelos extratos de *T. majus* foram relacionados à presença do benzilisotiocianato (BITC), um glucosinolato derivado da ação enzimática da mirosina sobre a glucotropaeolina presente nos órgãos aéreos da espécie. Medeiros *et al.* (2000), num ensaio de triagem, reportam indícios de elevada atividade antitrombínica *in vitro*, sobre fibrinogênio bovino, do extrato diclorometano de *Tropaeolum majus* em relação às demais plantas medicinais dos Açores, sem apontarem o possível grupo de compostos responsáveis por este efeito.

Outra espécie da família Tropaeolaceae também conhecida na medicina folclórica por capuchinha, chaguinha-miúda ou sapatinho de ia-ia, a *Tropaeolum pentaphyllum* Lam. possui, de um modo geral, as mesmas aplicações terapêuticas da *T. majus* (PIO CORRÊA, 1926). Apesar da espécie *T. majus* ser estudada há muito tempo, sobre a *T. pentaphyllum* existem poucos relatos de estudos a respeito das atividades biológicas que possa apresentar, provavelmente devido à ocorrência mais restrita desta espécie em relação àquela (SPARRE, 1972).

Este trabalho apresenta o estudo farmacognóstico comparativo das folhas e flores de *Tropaeolum majus* e *T. pentaphyllum*, nativas da América do Sul, o que implica na abordagem dos aspectos botânico, fitoquímico e farmacológico das espécies. No âmbito botânico e fitoquímico, foram comparadas as características peculiares a cada espécie que possam auxiliar na identificação da droga vegetal durante o processo de controle de qualidade. No âmbito farmacológico, através de

testes de Tempo de Trombina (TT), comparou-se a atividade anticoagulante sobre o plasma humano apresentada pelos extratos hidroetanólicos das duas capuchinhas, procurando identificar o grupo de compostos químicos responsáveis pela atividade antitrombina. E, uma vez que o BITC foi apontado até então como o responsável pela maioria dos efeitos terapêuticos apresentados pelos extratos de *T. majus*, também foi investigada a possível ação desta substância sobre a coagulação.

Além deste estudo, foram realizados ensaios com os extratos e com o benzilisotiocianato para verificar a possível atividade destes contra a forma promastigota de *Leishmania chagasi* L. Estes ensaios foram sugeridos pela atividade antifúngica apresentada pelos extratos de *T. majus* devida ao benzilisotiocianato (ZANETTI *et al.*, 2003). Os protozoários do gênero *Leishmania* são sensíveis aos fármacos que atuam sobre o ergosterol que compõe a membrana citoplasmática, como o fungicida anfotericina B e os antifúngicos azólicos, que impedem a síntese do ergosterol e tornam a membrana celular mais fluida, impedindo a replicação do parasito (OLLIARO & BRYCESON, 1993).

Em suma, o trabalho amplia o conhecimento farmacognóstico acerca das espécies *Tropaeolum majus* e *T. pentaphyllum*; o que pode beneficiar não apenas pacientes que necessitam de medicação anticoagulante, mas também, de forma indireta, aqueles que produzem e comercializam estas espécies de capuchinha.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Doenças do aparelho circulatório

Segundo dados da Organização Mundial de Saúde (WHO, 2006), as doenças cardiovasculares permanecem como as maiores consumidoras de recursos financeiros dos serviços de saúde e constituem a principal causa de óbito dos países industrializados.

O MINISTÉRIO DA SAÚDE (2006) divide as doenças do aparelho circulatório em doença isquêmica do coração e em doença cerebrovascular. O quadro 1 traz a taxa de mortalidade disponibilizada pelo DataSUS (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006) por grupos de causas.

Quadro 1: Mortalidade proporcional em porcentagem de óbitos por grupo de causas segundo região brasileira, no período de 2004

Região	Doenças infecciosas e parasitárias	Neoplasias	Doenças do aparelho circulatório	Doenças do aparelho respiratório	Afecções originadas no período perinatal	Causas externas	Demais causas definidas
Norte	7,52	12,43	23,54	9,87	8,94	19,73	17,97
Nordeste	6,43	12,00	29,97	9,65	6,54	15,89	19,52
Sudeste	4,99	15,97	32,37	11,91	2,75	14,48	17,53
Sul	4,09	18,88	33,64	11,64	2,53	12,30	16,92
Centro-Oeste	5,94	13,77	30,22	10,06	4,15	18,51	17,36
TOTAL	5,32	15,31	31,52	11,17	3,90	14,91	17,86

Fonte: Ministério da Saúde/SVS - Sistema de Informações sobre Mortalidade - SIM

Nota: Mortalidade proporcional: percentual dos óbitos informados.

Como é possível notar, as doenças do aparelho circulatório respondem pela maior taxa de óbitos em todas as regiões do Brasil, sendo maior naquelas mais industrializadas como as regiões sul e sudeste.

O quadro 2 reporta à taxa de mortalidade (referente a 2004) por doença isquêmica do coração e doença cerebrovascular no Brasil, disponibilizada pelo DataSUS no ano de 2006. Os dados dos quadros 1 e 2 são confirmados pela Organização Mundial de Saúde (WHO, 2006) que apontam a prevalência das doenças do aparelho circulatório nas regiões mais desenvolvidas do mundo, especialmente no sexo masculino.

Quadro 2: Taxa de mortalidade específica por doenças do aparelho circulatório no período de 2004, por sexo, segundo região

Região	Doença isquêmica do coração			Doença cerebrovascular		
	Masculino	Feminino	Total	Masculino	Feminino	Total
Norte	19,92	11,55	15,79	28,02	24,80	26,43
Nordeste	33,16	24,59	28,80	41,41	39,10	40,23
Sudeste	68,95	49,06	58,78	58,95	54,93	56,90
Sul	73,75	53,71	63,60	63,50	60,92	62,19
Centro-Oeste	44,84	27,48	36,12	44,08	36,93	40,49
TOTAL	54,06	38,58	46,20	51,21	47,87	49,51

Fonte: Ministério da Saúde/SVS - Sistema de Informações de Mortalidade (SIM) e IBGE

Nota: Taxa de mortalidade específica: óbitos por 100.000 habitantes.

Segundo a OMS, os principais critérios para a identificação de indivíduos com maior risco de desenvolver doenças do aparelho circulatório são: sexo (masculino > feminino); idade, histórico familiar, tabagismo, hipertensão arterial, diabetes mellitus e obesidade (sedentarismo ↔ alimentação). O quadro 3 foi construído conforme os fatores que predispõe ao risco de doenças coronarianas, conforme a American Heart Association, disponível em GIANNINI (1998).

A América Latina gasta em torno de 50 bilhões de dólares por ano somente em transtornos do aparelho circulatório em pacientes diabéticos. As doenças associadas ao tabagismo, em especial, as cardiovasculares, tem um custo global de 200 bilhões de dólares por ano (WHO, 2006). Dados fornecidos pela AMERICAN HEART ASSOCIATION (2006) mostram que pacientes idosos com baixo risco de doença cardiovascular custam cerca de 14mil dólares por ano em tratamentos médicos e os de alto risco, custam aproximadamente 38mil dólares/ano entre gastos públicos e privados. No entanto, a identificação precoce dos indivíduos predispostos ao infarto agudo do miocárdio ou acidente vascular cerebral, poderia custar 14 dólares/ano em medicação preventiva, o que inclui o uso adequado de anticoagulante e/ou antiagregante plaquetário (WHO, 2006). Sobretudo, os prejuízos individuais, familiares e sociais acarretados pelas doenças do aparelho circulatório extrapolam a apreciação meramente econômica e nos faz refletir sobre o valor da vida.

Quadro 3: Risco de doença coronariana segundo a American Heart Association (GIANNINI, 1998)

							Ponto
Fumo	Nunca fumou 0	Ex-fumante ou fumante de charuto ou cachimbo (sem inalar) 1	Menos de 10 cigarros por dia 2	10-20 cigarros por dia 8	21-30 cigarros por dia 9	31-40 cigarros por dia 10	
Idade / Sexo	Homem/ 20-30 anos Mulher/ até 50 anos 0	Homem/ 31-40 anos 1	Homem/ 41-45 anos Mulher/ 51 anos ou mais 2	Homem/ 46-50 anos Mulher/ sem ovário 3	Homem/ 51-60 anos Mulher/ com irmão infartado 5	Homem/ 61 anos ou mais; Mulher diabética 6	
Peso	Inferior em 5Kg ao peso normal 0	Peso normal 1	Acima do peso (5-10 Kg) 2	Acima do peso (11-19 Kg) 3	Acima do peso (20-25Kg) 7	26Kg ou mais, acima do peso 8	
Atividade física	Atividade intensa 0	Atividade moderada 1	Atividade leve 2	Atividade profissional sedentária/ esportiva moderada 3	Atividade profissional sedentária/ esportiva pouca 4	Inatividade física 6	
Antecedente familiar	Ausente 0	Pai ou mãe com mais de 60 anos, com doença coronariana 1	Pai e mãe com mais de 60 anos, com doença coronariana 2	Pai ou mãe com menos de 60 anos, com doença coronariana 3	Pai e mãe com menos de 60 anos, com doença coronariana 7	Pai e mãe e irmão de ambos com doença coronariana 8	
Pressão arterial sistólica	110-119 mmHg 0	120-130 mmHg 1	131-140 mmHg 2	141-160 mmHg 6	161-180 mmHg 9	180mmHg ou mais 10	
Glicemia (mg%)	Jejum abaixo de 80 0	Diabéticos na família 1	Jejum = 100 1ª hora = 160 2	Jejum = 120 1ª = 160 5	Diabetes tratado 6	Diabetes não controlado 10	
Colesterol (mg%)	Abaixo de 180 0	181-200 1	201-220 2	221-249 7	250-280 9	281-300 10	
0 = Sem risco; 8 = Risco Potencial; 40 = Risco Moderado; 59 = Risco alto; 67 = Faixa de perigo; 68 = Perigo máximo							Resultado

Neoplasias malignas sólidas constituem um bom modelo de hipercoagulabilidade que pode dizer da importância do tratamento com fármaco anti-trombina. Cerca de 50% dos pacientes com tumores sólidos apresentam trombose (MEDEIROS *et al.*, 2000). Acredita-se que a hipercoagulabilidade no câncer está relacionada ao aumento de Fator Tecidual nos pacientes. À medida em que o câncer cresce e se espalha, afeta o tecido normal expondo FT e ativando plaquetas. As células cancerosas também produzem FT, desta forma, trombina pode ser formada na superfície da célula tumoral. Células cancerosas formam complexos com plaquetas e fibrina na microcirculação dos pulmões. Estes complexos auxiliam as células cancerosas na adesão aos pulmões. Se as células tumorais não conseguirem se aderir ao endotélio vascular, diminuem as possibilidades de ocorrerem metástases, uma vez que as células oriundas de um tumor primário não conseguem sobreviver na circulação sangüínea. Desta forma, quanto menor a atividade da trombina, menor a coagulabilidade e assim, menor a possibilidade de metástases e formação de coágulos que geram acidentes vasculares em pacientes com câncer (MEDEIROS *et al.*, 2000).

2.2. Hemostasia

A trombina (fator IIa) é uma enzima chave da cascata da coagulação, desempenhando vários papéis na hemostasia como (CORRIVEAU & FRITSMA, 1998):

- Inicia a formação irreversível do tampão plaquetário;
- Aumenta a eficiência dos fatores V e VIII;
- Converte o fibrinogênio a fibrina;
- Ativa o fator XIII, a proteína C e o sistema fibrinolítico através do plasminogênio/plasmina;
- Cliva a protrombina para amplificar os níveis de trombina.

Além destas funções diretas sobre os componentes protéicos da coagulação, a trombina exerce uma gama de outros efeitos:

- Constitui o maior ativador das plaquetas (TOLLEFSEN *et al.*, 1974);
- Sinaliza para a mitogênese dos fibroblastos (CUNNINGHAM *et al.*, 1986);

- Exerce quimiotaxia para macrófagos (BAR-SHAVIT *et al.*, 1983);
- Estimula as células endoteliais para sintetizar e secretar prostaciclina (WESKLER *et al.*, 1978), para sintetizar o fator de ativação plaquetária (PAF) (PRESCOTT *et al.*, 1984) e para tornar-se adesiva para os leucócitos polimorfonucleares (ZIMMERMAN *et al.*, 1990).

Este conjunto de ações da trombina sobre as células endoteliais relaciona-se com a ativação da resposta inflamatória (PRESCOTT *et al.*, 1990).

Apesar da amplitude de efeitos biológicos exercidos ou influenciados pela trombina, ela apresenta alta especificidade. Sua conformação é típica das serinoproteases do tipo tripsina e, sua estrutura terciária encontra-se representada pela figura 1. A região catalítica da trombina situa-se entre dois pólos positivos chamados exossítios, também responsáveis pela regulação da atividade enzimática. O exossítio I é responsável pelo reconhecimento do fibrinogênio (figura 2) e pode interagir com a fibrina, a trombomodulina e a hirudina (STUBBS & BODE, 1993). O exossítio II, carregado positivamente, é conhecido como o sítio de ligação da heparina e, nos passos iniciais da coagulação, liga-se ao fragmento de protrombina F2 impedindo a inibição da trombina (STUBBS & BODE, 1993).

Figura 1: Representação esquemática da molécula de trombina. Distribuição de cargas na molécula: em azul as regiões com carga positiva e em vermelho as regiões com carga negativa. A região em verde simboliza o receptor Gplba da superfície das plaquetas. Fonte: www.ssrsl.slac.stanford.edu/research/images/thrombin_fig1.gif.

Figura 2: Polímero de fibrina formando coágulo. Fonte: www.core.org.cn/ocw_cn/biologycal_engineering_division/be_430jfall_2004.

O fibrinogênio é uma glicoproteína composta por dois pares de cadeias A α , B β e γ . Pela ação da trombina, os peptídeos A da cadeia α e B da cadeia β são removidos gerando monômeros de fibrina, capaz de se polimerizar e formar o arcabouço da coagulação (STUBBS & BODE, 1993). A teia de fibrina pode ser vista na figura 2, formando um coágulo.

O tromboembolismo venoso e a aterosclerose são ocasionados pela formação de coágulo em veias profundas e em artérias, respectivamente. O resultado final pode ser infarto agudo do miocárdio (IAM), acidente vascular cerebral (AVC) ou infarto pulmonar. Em todos estes casos à exceção do AVC hemorrágico, são prescritos anticoagulantes e/ou antiagregantes plaquetários, seja na manobra de emergência, ou no tratamento de manutenção a longo prazo (HAINES *et al.*, 2005).

2.3. Fármacos anticoagulantes

Um esquema geral do processo de coagulação sangüínea e da ação dos anticoagulantes comumente utilizados na clínica médica encontra-se na figura 3. Os anticoagulantes disponíveis, como a heparina e os cumarínicos, apesar de eficazes, apresentam inconvenientes significativos como estreita janela terapêutica e a expressiva variabilidade de dose-resposta (ANSELL *et al.*, 2000 *apud* OLIVEIRA & FRANCO, 2001). Em decorrência disto, os sangramentos podem ocorrer de modo significativo, o que exige a realização periódica de exames laboratoriais para ajuste da atividade anticoagulante.

Figura 3: Representação esquemática da cascata da coagulação sangüínea e do local de ação dos anticoagulantes. *a* = fator em sua forma ativada; *IIa* = trombina; *I_s* = fibrinogênio solúvel; *I_j* = fibrinogênio insolúvel; —————> transformações; - - - - -> interações (KOROLKOVAS & BURCKHALTER, 1988).

Nos últimos anos tem havido o interesse crescente sobre o desenvolvimento de fármacos antitrombóticos mais seguros, em especial, aqueles que inibem diretamente a trombina, ou bloqueiam sua geração ou o início da coagulação. Sob este prisma, os estudos têm focado a inibição da trombina (IIa), do fator Xa, do fator IXa, do complexo fator VIIa/fator tecidual e a atenuação da trombogênese através da ação sobre a via dos anticoagulantes naturais e sobre a fibrinólise (HIRSH & WEITZ, 1999). A figura 4 ilustra de modo simplificado as etapas da coagulação e os alvos de ação dos novos anticoagulantes (OLIVEIRA & FRANCO, 2001).

Figura 4: A cascata da coagulação e os alvos de ação de novos fármacos anticoagulantes (ANSELL et al., 2000 *apud* OLIVEIRA & FRANCO, 2001).

Os inibidores da trombina podem ser classificados em diretos e indiretos.

Os fármacos inibidores indiretos como o sulfato de dermatan, ativam um inibidor da trombina de ocorrência natural, o cofator II da heparina. Outros, como a heparina não fracionada (HNF) e as heparinas de baixo peso molecular (HBPM), agem por meio do aumento da taxa de ação do inibidor natural ATIII (antitrombina III), que inativa o fator Xa e trombina, assim como os fatores XIIa, IXa e XIa. Eles agem tanto *in vitro* quanto *in vivo* e devem ser administrados por via subcutânea ou intravenosa, apresentando rápido início de ação (KOROKOVAS & BURKHALTER, 1988).

O principal risco da administração da heparina é a hemorragia, que também pode ocorrer com as HBPM. Entre os efeitos tóxicos do tratamento com heparina e heparinóides estão a osteoporose, trombocitopenia e redução transitória da plaquetometria (Haines et al., 2005). Pelo fato da heparina ser proveniente de mamíferos (do pulmão de bovinos ou da mucosa intestinal de suínos), ela constitui um imunógeno em potencial e os pacientes podem desenvolver reações de hipersensibilidade à heparina ou resistência ao tratamento, (HAINES et al., 2005).

Outro inconveniente dos anticoagulantes de origem animal é a probabilidade, apesar de remota, de transmissão de prions (proteinaceous infectious particles) responsáveis por doenças neurodegenerativas como a síndrome de Creutzfeldt-Jacob, similar ao “scrapie” ou doença da “vaca-louca” que acometeu o gado bovino na Grã-Bretanha na década de 90 (MARTINS, 2000).

Os inibidores diretos da trombina possuem vantagens sobre as heparinas, pois podem inibir a trombina ligada à fibrina, importante no desenvolvimento do trombo. Além disto, não se ligam a proteínas plasmáticas ou são neutralizados pelo fator 4 plaquetário. Neste grupo encontram-se a hirudina, a bivalirudina, argatroban, lepirudina, desirudina e o ximelagrastan; apenas este último pode ser administrado por via oral e todos são produzidos pela tecnologia do DNA recombinante (OLIVEIRA & FRANCO, 2001); (HAINES et al, 2005).

De um modo geral, o fármaco ideal deverá apresentar máxima atividade antitrombótica e mínimo risco hemorrágico; deverá possibilitar a administração por qualquer via e a rápida neutralização em caso de intoxicação. Além dos aspectos de ação terapêutica, o anticoagulante ideal deverá ser de baixo custo, permitindo sua aquisição e uso pela maioria dos pacientes. Em suma, a relação custo-risco-

benefício deverá ser melhor do que as drogas ora disponíveis (WEITZ & HIRSH, 2001 *apud* MAFFEI, 2002).

O guia farmacoterapêutico (2003) do Hospital das Clínicas da Universidade de São Paulo padroniza a adoção de heparina não fracionada e heparinas de baixo peso molecular (enoxaparina, dalteparina, nandroparina) como anticoagulantes injetáveis e, a varfarina é o único anticoagulante via oral padronizado para o esquema terapêutico dentro da instituição.

2.4. Anticoagulantes de origem natural

No sentido de encontrar anticoagulantes eficazes, mais seguros e economicamente viáveis, muitas pesquisas têm sido realizadas na área de produtos de origem vegetal e animal.

Entre os de origem animal, a hirudina, um polipeptídeo de 65 aminoácidos retirado das glândulas salivares de sanguessuga (*Hirudo medicinalis*), pode ser obtida pela tecnologia de DNA recombinante. Outros fármacos similares à hirudina têm sido obtidos por meio da mesma tecnologia. Eles formam um complexo quase irreversível com a trombina no sítio de ligação do fibrinogênio, inibindo-a (HAINES et al, 2005). São fracamente imunogênicos e provocam pouco ou nenhum sangramento nas doses eficazes, ao contrário da heparina, mas ainda não possuem antídoto eficaz (OLIVEIRA & FRANCO, 2001).

Também de origem animal é o TAP, a antistatina e a lefaxina.

O TAP, isolado do carrapato *Ornithodoros moubata*, é um polipeptídeo que forma um complexo dose-dependente com o fator Xa, inibindo-o (WEITZ & HIRSH, 2001 *apud* MAFFEI, 2002).

Das glândulas salivares da sanguessuga *Haementeria officinalis*, é obtida a antistasina, também disponível na forma recombinante. Este fármaco inibe seletivamente o fator Xa, constituindo inibidor de reversão lenta. A lefaxina é isolada da saliva da *H. depressa*, ainda não disponível na forma recombinante, parece não agir como os outros inibidores do fator Xa (OLIVEIRA & FRANCO, 2001).

Os anticoagulantes de origem animal, seja obtido pela tecnologia de DNA recombinante ou não, ainda apresentam um custo elevado que não estimula a

adoção destes fármacos pelos serviços de saúde (WEITZ & HIRSH, 2001 *apud* MAFFEI, 2002).

Os anticoagulantes de origem vegetal apresentam a vantagem de um custo mais baixo em relação aos de origem animal além de poderem ser administrados por via oral.

Os disponíveis no mercado, atualmente, são derivados cumarínicos como a fenprocumona (Marcoumar®) e a varfarina (Marevan®) o anticoagulante mais prescrito administrado por via oral (KOROLKOVAS & FRANÇA, 2006). Estes são anticoagulantes de ação indireta que agem apenas *in vivo*, impedindo a interconversão cíclica da vitamina K no fígado, e, desta forma, interferem na γ - carboxilação dos fatores II, VII, IX e X da coagulação (HAINES et al., 2005), figura 5.

Figura 5: Local de ação dos anticoagulantes orais e o provável mecanismo de ação da vitamina K. Assim que são sintetizadas as cadeias peptídicas dos fatores II, VII, IX e X terem sido sintetizadas, a vitamina K em sua forma reduzida (hidroquinona) atua como co-fator na conversão do ácido glutâmico (Glu) a ácido carboxiglutâmico (Gla). Nesta reação a forma reduzida da vitamina K é convertida na forma epóxido, que, após ser reduzido a quinona, retorna à forma hidroquinona (RANG et al., 1997).

A estrutura química desses fármacos é semelhante à da vitamina K, como mostra a figura 6.

Figura 6: Fórmulas estruturais da vitamina K e seus congêneres e de seus antagonistas, anticoagulantes orais (MAJERUS & TOLLEFSEN, 2001).

Entre os efeitos indesejados constam o risco de hemorragia (que pode ser revertida pela administração de vitamina K), teratogênese e lesão hepática. Pode ocorrer, embora raramente, necrose dos tecidos moles decorrente da inibição da biossíntese de anticoagulantes endógenos vitamina K dependentes (MAJERUS & TOLLEFSEN, 2001).

Compostos anticoagulantes e/ou antitrombóticos não cumarínicos de origem vegetal tem sido descobertos através de diversas metodologias. No entanto, a maioria dos estudos aponta para a atividade do extrato bruto sem uma indicação dos compostos envolvidos no efeito sobre a coagulação ou não são levados adiante em ensaios *in vivo* em modelos animais ou pré-clínicos, quadro 4.

Quadro 4: Algumas plantas medicinais para as quais foi observado, entre 1998 e 2006, algum efeito sobre a coagulação sangüínea.

ESPÉCIE	COMPOSTO RESPONSÁVEL PELA ATIVIDADE	ATIVIDADE SOBRE A CIRCULAÇÃO SANGÜÍNEA	TIPO DE ESTUDO	REFERÊNCIAS
<i>Dendrostellera lessertii</i>	-	Antiagregante plaquetário	<i>In vitro</i>	Yazdanparast & Mianabadi, 2004
<i>Lycopersicon esculentum</i> (tomate)	Provável participação de flavonóides; principais responsáveis pela atividade permanecem não identificados	Antiagregante plaquetário	<i>In vitro</i> , <i>ex vivo</i>	O'Kennedy et al., 2006
<i>Viola tricolor</i> , <i>Glycyrrhiza glabra</i> , <i>Bidens tripartita</i> , <i>Quercus robur</i> , <i>Hypericum perforatum</i> , <i>Vaccinium vitis</i> , <i>Sanguisorba officinalis</i>	-	Anti-trombina	<i>In vitro</i>	Goun et al, 2002
<i>Anacardium spondias</i>	Ácidos graxos insaturados	Anticoagulante	<i>In vitro</i>	Wang et al., 1998
<i>Ocimum basilicum</i>	-	Antiagregante plaquetário	<i>In vitro</i> e <i>in vivo</i> (ratos)	Tohti et al, 2006
<i>Baccharis illinita</i>	-	Anticoagulante	<i>In vitro</i>	Neiva et al, 2004
<i>Geum japonicum</i>	Taninos	Anti-trombina	<i>In vitro</i>	Dong et al., 1998
<i>Ardisia crenata</i> , <i>Tetrapanax papyferus</i> , <i>Lagerstroemia indica</i> , <i>Callistemon lanceolatus</i> , <i>Antigonon leptopus</i> , <i>Magnólia virginiana</i> , <i>Myrica cerifera</i>	-	Anti-trombina	<i>In vitro</i>	Chistokhodova et al., 2002
<i>Hedychium gardneranum</i> , <i>T. majus</i> , <i>Gunnera tinctoria</i> , <i>Hedera helix</i> , <i>Festuca jubata</i> , <i>Laurus azorica</i>	-	Anti-trombina	<i>In vitro</i>	Medeiros et al, 2000
<i>Fucus vesiculosus</i> , <i>Ascophyllum nodosum</i>	Fucansulfato (polissacarídeo)	Anti-trombina	<i>In vitro</i> e <i>in vivo</i> (coelho)	Trento et al., 2001; Matsubara, 2004.
<i>Porana volubilis</i>	Polissacarídeo	Anti-trombina	<i>In vitro</i>	Yoon, 2002
<i>Glycyrrhiza glabra</i>	Glicirrizina	Anti-trombina	<i>In vivo</i> (rato)	Mendes-Silva et al., 2003

2.5. Leishmaniose

Leishmaniose é uma parasitose endêmica em países das Américas Central e do Sul, Ásia e África, figura 7. Causada por várias espécies do gênero *Leishmania*, da família Trypanosomatidae, a parasitose atinge cerca de 12 milhões de pessoas em todo o mundo, com elevado índice de morbidade e mortalidade (DUJARDIN, 2006). A leishmaniose visceral e a leishmaniose tegumentar americana ocorrem em todo o território brasileiro mas são endêmicas nas regiões norte e nordeste, principalmente devido às condições sócio-sanitárias da população (MINISTERIO DA SAUDE, 2000).

Figura 7 : Distribuição dos tipos de leishmaniose pelo mundo (Handman, 2001)

Os vetores da leishmaniose são dípteros hematófagos da família Psychodidae, pertencentes aos gêneros *Phlebotomus* (no velho mundo) e *Lutzomyia* (novo mundo). Os animais como o cão e roedores são reservatórios da doença (RATH et al., 2003). A figura 8 ilustra o ciclo de vida do protozoário.

Figura 8: As formas promastigotas metacíclicas presentes no vetor (*Lutzomyia* / *Phlebotomus*) transformam-se na forma amastigota dentro dos macrófagos do hospedeiro (homem). No próximo repasto sanguíneo sobre um indivíduo infectado, as formas amastigotas retomam a forma promastigota no inseto, completando seu ciclo de vida (www.dpd.cdc.gov/dpdx).

Dentre as formas de leishmaniose, a visceral, causada pela *L. donovani* e *L. chagasi*, é a mais severa e freqüentemente letal se não tratada, com uma taxa de mortalidade entre 5 e 15% dos casos. Os sinais e sintomas da doença são febre, vômito, diarreia e hepatoesplenomegalia. Infecções oportunistas como tuberculose e pneumonia, podem ocorrer levando o indivíduo à morte (CHOU, 2005). O quadro 5 relaciona as espécies de leishmania, com o tipo de doença que desenvolvem e o local de prevalência.

A leishmaniose cutânea, causada pelas *L. major*, *L. tropica*, *L. mexicana* ou *L. aethiopica*, é a mais prevalente e a mucocutânea pode deixar profundas cicatrizes e degeneração das cartilagens (REY, 2001).

Quadro 5: Distribuição geográfica das espécies de *Leishmania* e o tipo de doença que desenvolvem (REY, 2001); (CHOU, 2005).

Espécie	Distribuição geográfica
Leishmaniose cutânea	
<i>Leishmania aethiopica</i>	(África) Etiópia, Quênia
<i>L. major</i>	Em vários países da África e Ásia
<i>L. mexicana</i>	Países da América Central e do Sul
<i>L. tropica</i>	Europa mediterrânea, Ásia e norte da África
Leishmaniose mucocutânea	
<i>L. brasiliensis</i> ; <i>L. amazonensis</i>	Países da América Central e do Sul
<i>L. peruviana</i>	América do Sul
Leishmaniose visceral	
<i>L. chagasi</i>	América do Sul
<i>L. donovani</i>	Países da África e Ásia
<i>L. infantum</i>	Países do baixo mediterrâneo

O tratamento sistêmico da leishmaniose recomendado pela OMS são os antimoniais como o gluconato (V) de antimônio sódico (Pentostam ®) e o antimoniato de N-metil glucamina (Glucantime ®). Outros medicamentos empregados no tratamento de diversas formas de leishmaniose são a pentaminidina, a anfotericina B, paromomicina, interferon gama e miltefosine (RATH et al, 2003).

Antifúngicos azólicos têm sido testados com sucesso no tratamento da leishmaniose (OLLIARO & BRYCESON, 1993). Estes fármacos bloqueiam a enzima conversora do lanosterol a ergosterol provocando alterações na ultraestrutura da membrana celular que se torna mais fluida, impedindo a replicação do parasito, seja um fungo ou a *Leishmania*. Além da anfotericina B, outros antifúngicos como cetoconazol e itraconazol têm sido empregados como fármacos de segunda escolha. Entre os efeitos indesejados dos fármacos citados estão mialgias, dores abdominais, distúrbios hepáticos e cardíacos. (BALÃNA-FOURCE et al, 1998 apud CHAN-BACAB & PENA-RODRIGUEZ, 2001).

Além disto, o tratamento pode ser necessário por muitos meses, o que resulta em terapia descontínua por parte do paciente. Este fato juntamente com a prescrição de dose abaixo da eficaz e monoterapia por longos anos em determinada região, tem determinado o surgimento de formas resistentes dos parasitas (RATH et al, 2003).

Os efeitos tóxicos dos fármacos atualmente utilizados e o desenvolvimento de resistência das Leishmanias aos atuais tratamentos, têm estimulado inúmeros estudos em busca de novos fármacos anti-leishmania, em especial, aqueles de origem vegetal, como mostra o quadro 6.

Quadro 6: Algumas plantas medicinais brasileiras para as quais foi observada, recentemente, atividade anti-leishmania.

ESPÉCIE	COMPOSTO RESPONSÁVEL PELA ATIVIDADE ANTI-LEISHMANIA	ESPÉCIE DE LEISHMANIA E FASE DO CICLO DE VIDA	TIPO DE ESTUDO	REFERÊNCIAS
<i>Dichorisandra</i> sp; <i>Julocroton</i> triquer; <i>Tephrosi cinera</i>	--	<i>L. amazonensis</i> , promastigota	In Vitro	Bezerra et al, 2006
<i>Chromolaena hirsuta</i>	Flavonoides	<i>L. amazonensis</i> , promastigota	In vitro	Taleb-Contini et al., 2004
<i>Annona crassiflora</i> , <i>A. coriacea</i> , <i>Cissampelos ovalifolia</i> , <i>Guatteria australis</i>	Alcalóides	<i>L. chagasi</i> , promastigota	In vitro	Tempone et al., 2005
<i>Jacaranda copaia</i>	Quinona	<i>L. amazonensis</i> , promastigota	In vitro	Argüelo <i>apud</i> Chan-Bacab & Rodriguez, 2001
<i>Guatteria foliosa</i>	Acalóides	<i>L. donovani</i> ; <i>L. amazonensis</i> , promastigotas	In vitro	Chan-Bacab & Rodriguez, 2001
<i>Annona spinenscens</i> ; <i>Rollinea emarginata</i> ; <i>Pseudoxandra sclerocarpa</i> ; <i>Guatteria boliviana</i>	Alcalóides	<i>L. brasiliensis</i> ; <i>L. donovani</i> ; <i>L. amazonensis</i> , promastigotas	In vitro	Chan-Bacab & Rodriguez, 2001
<i>Passiflora incarnata</i>	Alcalóides indólicos	<i>L. amazonensis</i> , promastigota	In vitro	Chan-Bacab & Rodriguez, 2001
<i>Polyalthia macropoda</i>	Diterpenos	<i>L. donovani</i>	In vitro	Chan-Bacab & Rodriguez, 2001
<i>Annona glauca</i>	Acetogenina	<i>L. brasiliensis</i> ; <i>L. donovani</i> ; <i>L. amazonensis</i> , promastigotas	In vitro	Chan-Bacab & Rodriguez, 2001

Nas pesquisas por atividade anti-leishmania entre plantas medicinais, pode-se notar uma tendência à avaliação *in vitro* da susceptibilidade da forma promastigota de *L. amazonensis*, uma das responsáveis pela leishmaniose cutânea e muco-cutânea, como pode ser observado no quadro 6. No entanto, o homem é raramente atingido por esta espécie do parasito devido ao fato de o vetor (*Lutzomyia flaviscutellata*) ser pouco antrópico (REY, 2001). Assim, apesar destes estudos trazerem informações importantes sobre novos compostos anti-leishmania, quase não se tem relatos de continuidade dos estudos *in vivo*. Além disto, a espécie utilizada nos experimentos (*L. amazonensis*) expõe o indivíduo infectado a um menor risco de morte que as *L. donovani*, *L. infantum* e *L. chagasi*, responsáveis pela leishmaniose visceral, de maior gravidade (REY, 2001).

2.6. Família Tropaeolaceae

A família Tropaeolaceae pertence à ordem Geraniales e contém três gêneros: *Tropaeolum*, constituída por cerca de 95 espécies, *Trophaestrum* e *Magallana*, ambas contendo uma espécie.

A classificação taxonômica das espécies ora em estudo é a seguinte (JOLY, 1998), (SPARRE, 1972):

Divisão: Angiospermae

Classe: Dicotyledonae

Ordem: Geraniales

Subordem: Geraniineae

Família: Tropaeolaceae

Gênero: *Tropaeolum*

Espécies:

{ *Tropaeolum majus* L.

{ *Tropaeolum pentaphyllum* Lam.
subespécie: *pentaphyllum*

O nome genérico provém do grego *tropaion* devido à forma de escudo das folhas peltadas (PIO_CORRÊA, 1984).

As espécies da família Tropaeolaceae são, em sua maioria, nativas da América do Sul (Peru, Colômbia, Argentina e Brasil). Utilizada desde remota antigüidade pelos índios das montanhas peruanas, a capuchinha, nome popular da *Tropaeolum majus*, também conhecida como agrião de jardim, nasturtium, chaguinha, agrião índico foi introduzida na Europa pelos exploradores espanhóis e holandeses no século XVII (FONT QUER, 1981).

Também conhecida por capuchinha ou chaguinha-miúda, a espécie *Tropaeolum pentaphyllum* cresce em florestas de galerias nos estados de Santa Catarina, Rio Grande do Sul e ao longo da bacia do rio Paraná até a Argentina (SPARRE, 1972).

Propriedades Medicinais

Características químicas e biológicas de *Tropaeolum majus* foram revistas por Binet (1964) que apontou o benzil-isotiocianato como o responsável pelas atividades antibióticas, em especial contra cepas de *Staphylococcus aureus* e *Candida albicans*. Os estudos sobre a atividade antimicrobiana foram ampliados por Boyd et al. (1982) que mostraram atividade antibacteriana do extrato etanólico sobre espécies de *Salmonella*, Santa Cruz et al. (1991) que apontaram a atividade antifúngica do extrato etanólico sobre dermatófitos, e Zanetti et al. (2003) que apontaram atividade bactericida do extrato etanólico 70% sobre cepas de *Staphylococcus epidermidis* e *Klebsiella pneumoniae* em bioautografia. Vichanova et al. (1972) observaram atividade contra *Microsporum lanosum* e *Trichophyton gipseum*. Além de antimicrobiano, o benzilisotiocianato apresenta atividade inseticida (UNDERHILL et al, 1980), antiviral contra *Herpes Simplex Virus* I e II (GREEVE et al, 1985) e antineoplásica (PINTÃO et al, 1995). Christensen (1991) e Carlson & Kleiman (1993) apontaram as sementes de *T. majus* como fonte de ácido erúico, importante ácido graxo empregado no tratamento da adrenomielopatia ou Síndrome de Creutzfeld-Jacob. Sallé (1996) reportou os usos populares de *T. majus*, principalmente devidos à suas propriedades antimicrobianas.

Ritter et al. (2002) fizeram um levantamento etnofarmacológico de plantas medicinais no município de Ipê, no estado do Rio Grande do Sul, e observaram a

utilização de *Tropaeolum pentaphyllum*, pela população, que consome a raiz (conhecida como crem) e as folhas para alívio dos estados gripais e as flores para diabetes. No entanto, até 2006 não foram encontrados relatos de estudos que comprovem estes e outros possíveis efeitos biológicos da espécie.

Johns et al. (1982) observaram efeito anti-reprodutivo, antibiótico e nematocida dos extratos dos tubérculos de *Tropaeolum tuberosum*, conhecido como mashua pelos índios dos Andes, que a empregavam para evitar gravidez. Estes efeitos, segundo aqueles autores, são devidos aos glucosinolatos presentes no órgão vegetal em estudo.

Fitoquímica

Raymond e Delaveau (1961) indicaram a existência dos flavonóides isoquercetrina e um glucosídeo de canferol nas folhas e flores de *T. majus* respectivamente, enquanto em *T. peregrinum* encontraram a rutina como o flavonóide majoritário nas folhas. Picciarelli & Alpi (1987) reportam a presença de curcubitacinas tetracíclicas triterpênicas com atividade antineoplásica nos frutos imaturos da mesma espécie.

Niizu & Rodriguez-Amaya (2005) relatam a grande concentração dos carotenóides luteína e zeaxantina, importantes na proteção contra degeneração macular e redução do risco de catarata, nas folhas e flores de *T. majus*. O elevado teor de vitamina C (cerca de 37 mg/100g) encontrado nos órgãos comestíveis da espécie (FONT QUER, 1962), (JORGE et al., 1994) faz crescer o interesse pela inclusão da capuchinha na dieta, com função antiescorbútica.

Os componentes característicos da família são os glicosídeos senevólicos (glucosinolatos) que podem se acumular preferencialmente em algum órgão da planta. A *Tropaeolum majus* contém o benzilisotiocianato como o único produto da clivagem da glucotropaeolina pela enzima mirosinase. Esta enzima, contida em células especiais, é liberada quando o tecido vegetal sofre alguma lesão, como em um ataque de herbívoros, o que a põe em contato com seu substrato que logo é convertido em um isotiocianato cuja composição pode variar conforme a espécie (LYKKESFELDT & MØLLER, 1993). Em *T. tuberosum*, os isotiocianatos presentes são os feniletilisotiocianato, benzilisotiocianato e N,N-di(metoxi-4-benzil)tiouréia (JOHNS et al, 1982).

Não existem relatos sobre compostos do metabolismo secundário presentes em *T. pentaphyllum*, mas, a julgar pelo uso do tubérculo (crem) como sucedâneo da raiz forte japonesa (*Wasabia japonica*), pode-se dizer que há uma grande concentração de isotiocianatos neste órgão da planta.

Aspectos toxicológicos

A pesquisa de toxicidade aguda dos extratos aquoso e etanólicos de folhas de *T. majus* realizada por Zanetti *et al.* (2003) em camundongos mostrou que estes não apresentaram morte, estado de depressão, excitação, convulsão, salivação, piloereção, lacrimejamento e anormalidades quanto a defecação, respiração e locomoção mesmo na dose de 5000mg/Kg, o que caracteriza estes extratos como pouco tóxicos, abrindo uma promissora possibilidade de utilização destes extratos na saúde humana.

Segundo Pintão *et al.* (1995), em estudo de atividade anticancerígena, o benzilisotiocianato mostrou-se relativamente pouco tóxico (LD₅₀ 140mg/Kg) em camundongos, em relação ao LD₅₀ fármacos antitumorais padrão: cisplatina (11mg/Kg), taxol (33mg/Kg) e etoposido (21mg/Kg).

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivos Gerais

Estudo farmacognóstico comparativo de duas espécies da família Tropaeolaceae: *Tropaeolum majus* L. e *Tropaeolum pentaphyllum* Lam. ssp. *pentaphyllum*.

3.2. Objetivos Específicos

- ❖ Comparar a morfo-anatomia das folhas de *Tropaeolum majus* L. e de *Tropaeolum pentaphyllum* Lam ssp. *pentaphyllum*, através de técnicas de coloração de cortes histológicos e observação ao microscópio ótico, a fim de ressaltar características peculiares às espécies que possam ser utilizadas para identificação das drogas vegetais.
- ❖ Avaliar a atividade anticoagulante dos extratos hidroetanólicos das folhas e flores de *Tropaeolum majus* e de *Tropaeolum pentaphyllum*, bem como do benzilisotiocianato.
- ❖ Comparar o perfil cromatográfico das drogas vegetais em cromatografia em camada delgada e cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).
- ❖ Analisar a influência dos extratos hidroetanólicos das drogas vegetais e do benzilisotiocianato sobre a viabilidade de formas promastigotas de *Leishmania chagasi*.

4. MATERIAL

O material botânico de *Tropaeolum majus* L. (Tropaeolaceae) foi coletado no início do mês de março de 2005 na empresa Ervas Finas LTDA, situada no município de Campo Limpo Paulista a cerca de 60 Km de São Paulo, capital.

As folhas e flores de *Tropaeolum pentaphyllum* Lam ssp. *pentaphyllum* foram coletadas, de plantas cultivadas, no mês de janeiro de 2006, em Porto Alegre, capital do Rio Grande do Sul, pelo pesquisador Valdely F. Kinnupp do Departamento de Fitotecnia da Faculdade de Agronomia da UFRGS, em um sítio de propriedade particular.

Para os estudos de morfo-anatomia, fitoquímica e de atividades biológicas, foram coletadas as folhas e flores bem desenvolvidas situadas entre o 9º e 12º nós de vários indivíduos.

As exsicatas dos materiais botânicos foram identificadas pelo professor Dr. José Rubens Piranni e depositadas no herbário do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo sob os códigos: APÉspirito_Santo01 (*T. majus* L.) e APÉspirito_Santo02 (*T. pentaphyllum* Lam ssp. *pentaphyllum*).

5. MÉTODOS

5.1. Estudo Botânico

Para o estudo anatômico, foram selecionadas folhas e flores bem desenvolvidas. Algumas folhas foram conservadas em frascos contendo solução de álcool etílico a 70% enquanto outras, e também as flores, foram analisadas quando ainda frescas.

Foram preparados cortes transversais e paradérmicos do terço médio da lâmina foliar. O pecíolo foi seccionado nas regiões proximal e distal em sentidos transversal e longitudinal. As nervuras de maior porte das folhas foram seccionadas na altura do terço médio. Os cortes foram diafanizados em hipoclorito de sódio 50% e corados com azul de astra 1% e safranina 1%. Em alguns cortes foram realizados testes histoquímicos com os reativos de cloreto férrico a 3%, lugol e Sudam III para identificar a presença de compostos fenólicos, amido e substâncias lipídicas, respectivamente (KRAUS & ARDUIN, 1997). Lâminas semi-permanentes foram montadas com água glicerizada (1:1) com os cortes corados.

Além destes procedimentos, comuns no tratamento de ambas espécies, secções do terço médio das folhas, sépalas e espóra de chaguinha-miúda (*T. pentaphyllum*) foram desidratadas em série etanólica e emblocadas em historresina Leica®. Cortes de 5 µm foram obtidos em micrótomo, corados com solução de azul de toluidina 5% e montados em lâmina com água glicerizada (1:1).

O registro fotomicrográfico foi realizado com auxílio dos microscópios Nikon-Eclipse 600 e Zeiss equipados com sistema de fotodocumentação.

O estudo da morfologia externa dos órgãos vegetais foi realizado à vista desarmada e/ou com emprego de lupa. As mensurações macroscópicas foram feitas com régua comum.

Os caracteres macroscópicos das espécies vegetais foram descritos conforme terminologia empregada por Oliveira & Akisue (1998), observando-se os seguintes caracteres microscópicos:

- ❖ Lâmina Foliar: mesofilo, epidermes, tecido vascular, inclusões celulares (se presentes).
- ❖ Pecíolos: epidermes e seus anexos, tecidos mecânicos de sustentação (colênquima e esclerênquima), parênquima, tecido vascular, inclusões celulares (se presentes).
- ❖ Flor: mesofilo, epidermes, tecido vascular e inclusões celulares (se presentes) de pétalas e sépalas de *T. majus* e de sépalas de *T. pentaphyllum*.

5.2. Estudo Fitoquímico

O material vegetal foi separado em seus órgãos vegetais e colocado para secar em estufa com circulação de ar a temperatura entre 40-45°C. Uma vez secos, as drogas vegetais foram reduzidas a pó semifino em moinho de facas e martelos, havendo-se passado o pó por tamis 80 mesh, conforme Farmacopéia Brasileira 2ª edição.

5.2.1. Triagem para compostos do metabolismo secundário

Os compostos do metabolismo secundário foram determinados nas drogas vegetais da seguinte forma:

Alcalóides:

Extraiu-se 5g de droga vegetal constituída de folhas e pecíolo com 60ml de solução de ácido acético a 10% por meia hora em banho-maria à 40°C. A solução foi filtrada através de papel de filtro e o filtrado foi alcalinizado com hidróxido de amônio até pH entre 8 e 9, verificado com papel indicador universal. A solução básica foi dividida em quatro tubos de ensaio e extraída, sob agitação suave por 15 minutos, com 15ml de clorofórmio em cada tubo. A fração clorofórmica resultante foi seca passando-a através de sulfato de sódio anidro, através de funil, e recolhida numa cápsula de porcelana. Metade do filtrado foi transferida para um pequeno recipiente de vidro. O conteúdo da

cápsula e do frasco foi evaporado em banho-maria até a secura. O resíduo da cápsula de porcelana foi homogeneizado com duas gotas de HCl 1%. Em quatro lâminas de vidro foram colocadas gotas da solução ácida e, ao lado destas, foram depositadas gotas dos seguintes reativos gerais de alcalóides: reativo de Bertrand, de Dragendorff, de Bouchardat e de Mayer. A formação de precipitado indica a presença de alcalóide. (FARMACOPÉIA BRASILEIRA 2ª ed., DOMINGUEZ, 1973).

Saponinas:

Uma amostra de 5g do pó da droga (folhas e pecíolo) foi fervida em 20ml água e a seguir submetida à filtração. O extrato aquoso obtido foi transferido para tubo de ensaio que, uma vez arrolhado, foi submetido à vigorosa agitação por 1 minuto com o intuito de verificar atividade afrogênica (DOMINGUEZ, 1973; COSTA, 1982).

Cumarinas:

Cerca de 3g do pó da droga constituída de folhas e pecíolo foram extraídos em 30ml de clorofórmio num balão com sistema de refluxo sob aquecimento até fervura durante cerca de dez minutos. A mistura foi filtrada e a solução obtida, evaporada até que o volume estivesse reduzido a aproximadamente 5ml. Três gotas desta solução foram depositadas em papel filtro em duas posições diferentes. Em seguida, adicionou-se uma gota de solução de hidróxido de sódio a 5% a uma das posições de aplicação das gotas, observando o desenvolvimento ou não de fluorescência nas duas manchas à 254nm e 366nm.

A prova confirmatória foi realizada partindo-se de 3g do pó da droga que foi lavado em béquer com 30ml de éter de petróleo a frio. A fração etérea foi descartada e o pó resultante foi extraído com solução de hidróxido de sódio a 5% a quente. A mistura foi filtrada observando-se a coloração da solução. Em seguida, o extrato foi acidificado com solução de HCl, notando-se a coloração da solução resultante seguindo-se de extração com éter etílico. O extrato etéreo obtido foi concentrado e tratado em cápsula de porcelana com uma gota de solução alcoólica de KOH, aquecendo-se a mistura até fervura. Após resfriamento, adicionou-se 1 gota de ácido clorídrico 0,5N e após, uma gota

de cloreto férrico a 1%, observando-se a coloração (DOMINGUEZ, 1973; COSTA, 1982).

Antraderivados:

Uma amostra de 0,5g de cada uma das drogas foi levada à fervura breve com 10mL de solução hidroetanólica a 25%. Os extratos hidroalcoólicos, filtrados por papel de filtro, foram aquecidos com 2mL de solução aquosa de ácido sulfúrico a 10%. Os extratos hidrolisados foram agitados com 10mL de benzeno. Foram adicionados 5mL de hidróxido de amônio à alíquotas de 5mL da fase benzênica de cada uma das extrações. O desenvolvimento de coloração vermelha foi considerado reação positiva para antraderivados (DOMINGUEZ, 1973; COSTA, 1982).

Taninos:

Verificou-se inicialmente, o possível sabor adstringente das drogas.

Uma amostra de 2g do pó de cada uma das drogas foi extraída com 15ml de solução metanólica 50%, a quente, por duas vezes. A solução obtida foi filtrada e, uma vez fria, foi dividida em cinco tubos de ensaio. O extrato foi testado adicionando-se, nos diferentes tubos, gotas de acetato de chumbo 10%, gotas de acetato de cobre 5%, gotas de cloreto férrico 2%, 2ml de sulfato de quinina 2% e, no tubo restante, adicionou-se 5ml de solução de gelatina. A formação de precipitado, especialmente na adição de solução de gelatina, confirma a presença de taninos (COSTA, 1982).

Flavonóides:

Uma amostra de 1g do pó de cada uma das drogas foi fervida em 15mL de solução hidroetanólica a 70% por 2 minutos em tubo de ensaio. A mistura foi filtrada e o extrato obtido foi submetido à reação de Shinoda na qual à 5ml do extrato é adicionado um fragmento de magnésio metálico e 1ml de HCl. Aplicou-se a solução resultante em dois lugares distintos num papel filtro. A uma das manchas adicionou-se cloreto de alumínio 5%. A presença de flavonoides pode ser observada pela fluorescência em UV 254 e 366nm (DOMINGUEZ, 1973; COSTA, 1982).

Esteróides:

Uma amostra de 1g de cada uma das drogas foi fervida durante 2 minutos com 10mL de solução hidroetanólica a 50%. Aos extratos hidroetanólicos foram adicionados 10mL de solução de acetato básico de chumbo a 10% e 5mL de água destilada. Os extratos, uma vez filtrados, foram extraídos com 3 porções de 20mL de clorofórmio. As frações clorofórmicas foram levadas à secura em rotaevaporador. Os resíduos foram retomados em 1mL de anidrido acético e transferidos para tubos de ensaio contendo 1mL de ácido sulfúrico concentrado. Observou-se a região de contato entre os líquidos. O desenvolvimento de coloração castanha nesta região seria indicativo da presença de compostos esteroidais (DOMINGUEZ, 1973; COSTA, 1982).

Óleo essencial:

A pesquisa por óleos voláteis foi realizada apenas nas folhas e flores de *Tropaeolum majus*, pois não havia material vegetal fresco ou em forma de droga vegetal das folhas e flores de *T. pentaphyllum* em quantidade suficiente. Desta forma, realizou-se hidrodestilação por arraste a vapor de 100g de flores frescas e 100g de folhas frescas com pecíolo, em balões distintos, com auxílio do aparelho de Clevenger modificado.

Óleos fixos:

Cerca de 0,5g de cada droga vegetal foi extraído, sob agitação, com 5mL de éter etílico. Os filtrados foram concentrados até cerca de ¼ do volume inicial. Foram depositadas sobre papel filtro, gotas destes extratos. A verificação de mancha translúcida após evaporação do solvente indica a presença de óleos fixos (DOMINGUEZ, 1973; COSTA, 1982).

5.2.2. Peso seco das folhas e flores

Este ensaio foi realizado, em triplicata, apenas nos órgãos frescos de *T. majus*, pois não foi possível obter os órgãos frescos de *T. pentaphyllum*. O método gravimétrico (perda por dessecação) utilizado foi aquele descrito pela FARMACOPÉIA BRASILEIRA 4ª ed., também preconizado pela OMS (WHO, 1998). Em balança

analítica, foi pesado 1g de folhas e flores frescas finamente divididas em cadinhos previamente pesados e mantidos em dessecador. As amostras foram mantidas em estufa à 105°C até que a diferença entre duas pesagens consecutivas fosse inferior a 0,001g. Os resultados foram expressos em porcentagem.

5.2.3. Peso seco das drogas constituídas de folhas e de flores

Este ensaio foi realizado nas drogas vegetais de *T. majus* e de *T. pentaphyllum* como o descrito no item anterior, pelo método gravimétrico que consta na Farmacopéia Brasileira 4ª ed.

5.2.4. Obtenção do extrato hidroalcoólico por percolação

Para obtenção dos extratos hidroetanólicos das drogas constituídas de folhas de *T. majus*, seguiu-se o processo de percolação conforme preconizado pela Farmacopéia Brasileira 2ª ed. e por Prista *et al.* (1983). Foram extraídos 130g da droga utilizando-se, como líquido extrator, solução hidroetanólica a 60°GL. A percolação, que foi precedida de um período de maceração de 48 horas, ocorreu a um fluxo de 80 gotas por minuto e prosseguiu até o esgotamento da droga pelo líquido extrator.

O extrato hidroetanólico das folhas de *T. pentaphyllum* foi obtido através de maceração sob ciclos de agitação devido à pequena quantidade de droga disponível. Cerca de 20g da droga constituída de folhas de *T. pentaphyllum* foram extraídos, até o esgotamento, por maceração sob ciclos de agitação, em erlenmeyer, utilizando-se solução hidroetanólica a 60°GL como líquido extrator. Os extratos hidroetanólicos de cerca de 5g de drogas constituídas de flores de *T. majus* e de *T. pentaphyllum* foram obtidos da mesma forma.

Os extratos foram concentrados em rotaevaporador da marca Büñch à 40°C. Os concentrados aquosos foram liofilizados em liofilizador Edwards modelo L4KR, sob pressão de 0,1mbar e temperatura aproximada de congelamento de – 40°C.

Os extratos liofilizados foram guardados em frascos âmbar e mantidos em geladeira. Os rendimentos foram calculados e expressos em porcentagem.

5. 2.5. Preparo das frações dos extratos hidroetanólicos das folhas

Foram colocados em dois funis de separação, 5g de extratos brutos das folhas de *T. majus* e *T. pentaphyllum* ressuspensos em 50mL água destilada. Os extratos foram fracionados por partição com 3 porções de 20mL de n-hexano que foram recolhidas, concentradas em rotaevaporador e liofilizadas. Da solução aquosa restante foi retirado o n-hexano residual em rotaevaporador para proceder ao fracionamento seguinte com 3 porções de 20mL de clorofórmio. As frações acetato de etila e n-butanólica foram obtidas do mesmo modo. A fração restante foi denominada fração aquosa. As frações receberam os códigos conforme apresentado no quadro 7.

Quadro 7: Código das frações dos extratos hidroetanólicos das folhas

Espécie	n-Hexânica	Clorofórmica	Acetato de etila	n-Butanólica	Aquosa
<i>T. majus</i>	Tma-hex	Tma-clor	Tma-acet	Tma-but	Tma-aq
<i>T.pentaphyllum</i>	Tpe-hex	Tpe-clor	Tpe-acet	Tpe-but	Tpe-aq

5.2.6. Doseamento de compostos fenólicos

Para doseamento de compostos fenólicos, realizou-se o método proposto por Waterman & Mole (1994) e AOAC (2000), que se baseia na reação de óxido-redução entre o íon fenolato e o complexo fosfotúngstico-fosfomolibdico do reagente Folin-Denis o qual, uma vez reduzido, desenvolve intensa coloração azul (cromóforo) que absorve a 760nm. O reagente de Folin-Denis foi preparado conforme monografia do barbatimão que consta na Farmacopéia Brasileira 4^a ed.

O doseamento de compostos fenólicos foi realizado em triplicata, pesando-se 3mg dos extratos hidroetanólicos liofilizados de folhas e flores de *T. majus* e *T. pentaphyllum*, além das frações acetato de etila e butanólica liofilizadas dos extratos das folhas. Os extratos e as frações foram colocados em balões volumétricos de 50mL com cerca de 30mL de água destilada. Após solubilização das amostras,

adicionou-se 2,5mL do reagente de Folin-Denis. Agitou-se e aguardou-se 2 minutos para adição de 5,0mL de solução saturada de Na_2CO_3 . Em seguida, o volume foi ajustado para 50mL com água destilada. Após homogenização por inversões sucessivas, a solução no balão volumétrico permaneceu em repouso por 30 minutos, à temperatura ambiente e ao abrigo da luz, para realizar a leitura da absorbância em 760nm. O resultado foi confrontado com os dados de uma curva padrão construída com soluções de ácido gálico em concentração de 0 a 500 $\mu\text{g/mL}$, conforme figura 9.

Para construção da curva padrão, 10mg de ácido gálico foram dissolvidos em 100ml de água destilada, fornecendo uma solução de concentração igual a 100 $\mu\text{g/mL}$. Colocou-se 30mL de água destilada em nove balões volumétricos de 50mL, adicionando-se a cada um deles, alíquotas de 0,5 a 5,0 mL da solução de ácido gálico padrão. Em seguida, foram acrescentados 2,5ml de reagente de Folin-Denis e, após 2 minutos, 5,0mL de solução saturada de Na_2CO_3 , nessa ordem. O volume foi ajustado para 50mL com água destilada. Após agitação, as soluções foram deixadas em repouso, à temperatura ambiente e ao abrigo da luz, por 30 minutos. As absorbâncias foram lidas a 760 nm em espectrofotômetro Beckman modelo DU 70.

Figura 9: Curva padrão de ácido gálico

5.2.7. Doseamento de flavonóides

Esta análise foi desenvolvida conforme AOAC (2000) e Mabry & Markhan (1970). Para esta determinação, foi construída uma curva padrão de quercetina, figura 10, pesando-se exatamente 10mg de quercetina e dissolvendo-a completamente com metanol em balão volumétrico de 100mL. Exatamente 10mL da solução foram transferidos para um balão volumétrico de 50mL, completando-se o volume com metanol, fornecendo uma solução com concentração igual a 20µg/mL. Foram realizadas diluições em tubos de ensaio adicionando-se de 0 a 8mL da solução de quercetina a volumes de 8 a 0mL de metanol. A cada um dos tubos, foram adicionados 2mL de solução de cloreto de alumínio a 2%, obtendo-se um volume final de 10mL. A leitura foi realizada, após repouso de 30 minutos, em espectrofotômetro Beckman modelo DU 70 a 425nm.

Foi realizada, em triplicata, a avaliação da concentração de flavonóides das soluções a 100µg/mL em metanol 80% dos extratos hidroetanólicos liofilizados de folhas e flores de *T. majus* e *T. pentaphyllum*, além das frações acetato de etila e butanólica liofilizadas dos extratos das folhas de ambas espécies. Uma alíquota de 2mL foi transferida para um tubo de ensaio acrescentando-se, em seguida, 2mL de solução de cloreto de alumínio a 2% e 6mL de metanol. As leituras de absorbância foram realizadas, após repouso de 30 minutos à temperatura ambiente e ao abrigo da luz, a 425nm em espectrofotômetro. Os valores de absorbância obtidos das amostras foram comparados àqueles da curva padrão de solução de quercetina, procedendo-se ao cálculo de teor de flavonóides.

Figura 10: Curva padrão de quercetina

5.2.8. Cromatografia em Camada Delgada (CCD)

Para determinação do perfil cromatográfico de cada extrato e das frações foram empregadas cromatoplasmas com fase estacionária de sílica gel GF₂₅₄, ativadas à 110°C por 1 hora. Após aplicação de aproximadamente 1µL de amostra, as placas foram colocadas em cuba pré-saturada com fase móvel. O desenvolvimento foi simples e ascendente em corridas de 10, 12 ou 15 cm.

As fases móveis e os reveladores foram escolhidos entre os propostos por Wagner & Bladt (1996), Santa Cruz *et al* (1991), Delaveau (1965) e Markham (1982) com algumas modificações.

Os padrões utilizados foram: canferol, quercetina, quercetrina, rutina, naringenina, apigenina, hesperidina, ácido cafeico, ácido clorogênico, ác. p-cumárico, ác. ferúlico, ác. cinâmico e benzilisotiocianato.

Sistema cromatográfico 1, (WAGNER & BLADT, 1996)

Fase móvel para glicosídeos flavonoídicos: acetato de etila: ác. fórmico: ác. acético glacial: água, (100:11:11:26)

Revelador: NP (solução metanólica a 1% de éster difenilbórico ácido-β-etilamino)

Visualização à luz natural e à luz UV, 366nm.

Sistema cromatográfico 2, conforme Wagner & Bladt (1996) modificado

Fase móvel para glicosídeos flavonoídicos: acetato de etila: ác. fórmico: ác. acético glacial: água, (100:11:11:20)

Revelador: NP (solução metanólica a 1% de éster difenilbórico ácido-β-etilamino)

Visualização à luz natural e à luz UV, 366nm.

Sistema cromatográfico 3, (WAGNER & BLADT, 1996)

Fase móvel para agliconas: tolueno: dioxano: ác. acético glacial, (90: 25: 4)

Revelador: NP (solução metanólica a 1% de éster difenilbórico ácido-β-etilamino)

Visualização à luz natural e à luz UV, 366nm.

Sistema cromatográfico 4, (DELAVEAU, 1965); (MARKHAM, 1982)

Fase móvel para glicosídeos flavonoídicos: n-butanol: ác. acético glacial: água (60: 15: 75)

Revelador: NP (solução metanólica a 1% de éster difenilbórico ácido-β-etilamino)

Visualização à luz natural e à luz UV, 366nm.

Sistema cromatográfico 5, Wagner & Bladt (1996)

Fase móvel para glucosinolatos: n-butanol: n-propanol: ác. acético glacial: água (30: 10: 10: 10)

Revelador 1: aplicar ácido tricloroacético a 25% em clorofórmio e, aquecer a 140°C por 10 minutos. Em seguida, aplicar o Revelador 2: ferricianeto de potássio a 1% em água e FeCl₃ a 5% em água, numa mistura recém preparada a 1:1.

Visualização à luz natural e ao UV em 258nm, antes e após aplicação dos reveladores.

Sistema cromatográfico 6, (SANTA CRUZ et al, 1991)

Fase móvel para benzilisotiocianato: n-hexano: clorofórmio (80: 40)

Revelador: vanilina sulfúrica 2% em metanol e aquecimento a 110°C por 5 minutos.

Visualização à luz natural e ao UV em 258nm, antes e após aplicação do revelador.

Sistema cromatográfico 7, (SANTA CRUZ et al, 1991)

Fase móvel para benzilisotiocianato: metanol: clorofórmio (60: 80)

Revelador: vanilina sulfúrica 2% em metanol e aquecimento a 110°C por 5 minutos.

Visualização à luz natural e ao UV em 258nm, antes e após aplicação do revelador.

5.2.9. Separação e Verificação do Perfil Flavonoídico em cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e espectrofotometria em UV

A separação e avaliação do perfil flavonoídico de droga constituída de folhas e droga constituída de flores vermelhas de *T. majus* foi realizada durante a disciplina Identificação de Metabólitos Secundários com Importância Taxonômica, ministrada pela professora Dr^a Maria Luiza Salatino no Instituto de Biociências da USP. Foram empregados os métodos de Markham (1982) e Mabry & Markham (1970) para identificação de flavonóides, com algumas adaptações.

I) Extração:

- Para esta análise, foram pesados 1,53g de droga vegetal composta por folhas e 1,53g de droga vegetal composta por flores vermelhas.
- As amostras foram transferidas para balões de extração (125mL) e 25mL de metanol 80% foi adicionado. O sistema ficou em refluxo por 30 minutos.
- Após resfriado, o sobrenadante foi separado, filtrando-o para um balão de fundo redondo.
- Foram acrescentados 25mL de metanol 80% ao resíduo do balão, colocando o sistema sob refluxo por mais 30 minutos.
- Os sobrenadantes dos dois processos foram reunidos, evaporando-se o solvente em seguida, com auxílio de rotaevaporador da marca Büch.

II) Purificação:

- Os extratos brutos obtidos no processo anterior foram ressuspensos com 2mL de metanol, usando ultra-som para completa dissolução.

- Transferiu-se 1mL de cada extrato para tubos eppendorf e evaporou-se o metanol em banho-maria a 67°C. Os passos seguintes foram os mesmos para cada extrato.
- Uma vez seco, foi acrescentado ao tubo 1mL de tolueno. O extrato foi homogeneizado através de ultra-som e deixado por 10 minutos em banho-maria, centrifugando-se o tubo eppendorf a 10.000g por 10 minutos.
- O sobrenadante foi descartado.
- O processo de limpeza do resíduo com tolueno foi repetido por mais três vezes, descartando-se os sobrenadantes.
- O resíduo remanescente nos tubos foi retomado em 1mL de metanol, homogeneizado com auxílio de ultra-som e deixado em banho-maria por 10 minutos a 67°C.
- Após centrifugação dos tubos a 10.000g por 10 minutos, o sobrenadante foi recolhido em frascos etiquetados (fração metanólica).
- O processo foi repetido por mais três vezes, reunindo-se o sobrenadante.
- No frasco, o metanol foi totalmente evaporado em banho-maria.

III) Verificação do perfil flavonoídico em cromatografia líquida de alta eficiência:

As frações metanólicas de cada droga obtidas no processo anterior foram retomadas em 0,5mL de metanol grau HPLC. Os extratos foram filtrados por membrana de acetato de celulose e 25µL de cada um deles foi injetado no cromatógrafo líquido HP series II 1090; coluna Zorbax SB C18 (250 x 4,6 mm; 5µm). Detecção a 352nm. O seguinte gradiente de solventes foi utilizado: 0-5 min., 12% de B em A; 5-8 min, 12-20% de B em A; 8-28 min, 20% de B em A; 28-38 min, 20-50% de B em A; 38-48 min, 50-65% de B em A; 48-50 min, 65-100% de B em A; 50-55 min, 100% de B; 55-56 min, 100-12% de B em A; 56-60 min, 12% de B em A. Sendo: A – água miliQ; B – acetonitrila. Fluxo: 0-48 min, 0,5mL/min; 48-56 min, 1,0mL/min; 56-60 min, 0,5 mL/min.

IV) Isolamento dos picos presentes no cromatograma:

- Os extratos obtidos na etapa de purificação, ressuspensos em metanol, foram depositados em papel cromatográfico (60 x 12cm).
- Utilizou-se ácido acético a 15% em água como fase móvel e corrida de 50cm.
- Após a cromatografia e secagem do papel, foram identificadas, sob luz ultravioleta (366nm), as faixas de flavonóides. Para auxiliar a identificação, utilizou-se vapor de amônia, que torna amarela a cor da mancha de flavonóide ao UV. Comparou-se o perfil cromatográfico obtido em CLAE àquele apresentado pela cromatografia em papel, para avaliar a posição, no papel cromatográfico, dos picos mais proeminentes.
- As manchas de flavonóides foram marcadas, recortadas e eluídas em borel de vidro com metanol a quente por 15 minutos.
- O processo foi repetido por mais três vezes, filtrando e juntando os solventes.
- As frações flavonoídicas foram concentradas em rotaevaporador e banho-maria.
- O grau de pureza das frações foi verificado através de cromatografia em camada delgada de celulose microcristalina, usando como fase móvel ácido acético 15%.

V) Hidrólise dos glicosídeos:

- As frações flavonoídicas purificadas foram ressuspensas em 2mL de metanol, colocadas em tubo de ensaio e completamente secas em banho-maria.
- Um volume de 5mL de HCl 1N foi colocado no tubo de ensaio. Este foi deixado sob fervura por 1 hora.
- Procedeu-se a separação de glicosídeos e agliconas através da partição com acetato de etila em funil de separação. A fração superior de acetato de etila contém as agliconas, enquanto a fração aquosa contém os glicosídeos.

VI) Perfil espectrofotométrico das frações purificadas:

As frações purificadas, suspensas em pequeno volume de metanol, foram lidas em espectrofotômetro UV/visível (240 a 500nm) e submetidas a testes para

auxiliar na possível elucidação da estrutura química dos flavonóides, conforme Mabry & Markham (1970) e Markham (1982).

- 1 Foi acrescentada à alíquota da solução flavonoídica na cubeta, duas gotas de KOH 5%, seguida de nova leitura.
- 2 À nova alíquota da solução inicial foram adicionadas duas gotas de cloreto de alumínio procedendo-se nova leitura.
- 3 Algumas gotas de HCl 5% foram adicionadas à cubeta; realizou-se nova leitura.
- 4 Uma outra alíquota da solução flavonoídica foi acrescentada de um pouco de acetato de sódio, procedendo-se nova leitura.
- 5 Na mesma solução do item anterior, foi adicionado um pouco de ácido bórico, realizando-se outra leitura.

5.2.10. Verificação do perfil flavonoídico das frações bioativas em cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

Para esta análise, as frações acetato de etila e n-butanólicas dos extratos hidroetanólicos das folhas de *T. majus* (Tma-acet e Tma-but) e de *T. pentaphyllum* (Tpe-acet e Tpe-but) foram ressuspensas em metanol grau HPLC nas concentrações de 1mg/mL e 3mg/mL, filtradas através de membrana Millipore® (0,22µm) e um volume de 25µL de cada uma delas foi injetado em cromatógrafo líquido Shimadzu; coluna C-18, modelo Shim-Pack CLC-ODS (M) com dimensões de 250 x 4,6mm, como fase estacionária. A fase móvel empregada foi a mesma descrita para verificação do perfil flavonoídico da droga constituída de folhas de *T. majus*, no item anterior. Os picos foram detectados em UV a 352 e 358nm. Buscou-se comparar os tempos de retenção das amostras aos tempos de retenção das substâncias de referência.

5.3. ESTUDO FARMACOLÓGICO

5.3.1. Atividade Antitrombínica

A inibição da atividade coagulante da trombina foi avaliada através da medição do tempo de trombina (TT) na presença e ausência dos extratos brutos, e suas frações, de *T. majus* e de *T. pentaphyllum*. Para realização dos testes de TT, foram feitas adaptações no método descrito por Thomson (1980) e aplicados por Tanaka (2002) para avaliar a atividade anticoagulante do veneno de *Bothrops jararaca* no Instituto Butantã, onde este estudo foi realizado.

Os ensaios preliminares de TT incluíram:

1. A determinação da influência do tempo de incubação da solução de trombina com a solução dos extratos.
2. A identificação da fração com maior atividade anticoagulante.
3. A verificação da menor concentração de extrato (ou fração) capaz de prolongar o tempo de trombina.

Estes testes foram realizados sobre pool de plasma de 10 doadores, homens e mulheres, clinicamente saudáveis ou sobre solução de fibrinogênio bovino na concentração de 2mg/mL de proteína coagulável.

Foi preparada uma solução de trombina 6U/mL adicionando 0,03mL de solução estoque de trombina (720U/mL) Sigma T4648, suspensa em glicerol, à 3,57mL de solução de cloreto de sódio 0,9% (solução fisiológica). A solução de trombina 6U/mL, foi mantida em banho de gelo e sua concentração final, no tubo de ensaio, foi de 1,5U/mL.

5.3.1.1. Influência do tempo de incubação sobre o tempo de trombina

A solução de trombina 6U/mL foi incubada com solução de extrato hidroetanólico liofilizado das folhas de *Tropaeolum majus* (1mg/mL em solução de cloreto de sódio 0,90%), na proporção de 1:1, por intervalos de 1 a 5 minutos em banho de gelo. Decorrido o tempo determinado em cada ensaio, foi adicionado 200µL da solução trombina/extrato a 200µL de pool de plasma (mantido previamente por 1 minuto em banho-maria a 37°C), marcando-se o tempo de coagulação (expresso em segundos) com auxílio de cronômetro; o final do teste ocorre quando

um coágulo estável é formado. O controle foi feito com solução de trombina incubada com solução fisiológica 0,90%, na proporção 1:1. O tempo de incubação, em banho de gelo, da trombina com solução controle ou solução teste foi ajustado àquele em que se observou o maior prolongamento do tempo de trombina.

5.3.1.2. Identificação da fração responsável pelo prolongamento do TT

A solução de trombina 6U/mL foi incubada com solução de cada uma das frações dos extratos hidroetanólicos liofilizados (1mg/mL em solução de cloreto de sódio 0,90%), na proporção de 1:1, por 5 minutos em banho de gelo. Após o tempo de incubação, foi adicionado 200µL da solução trombina/extrato a 200µL de fibrinogênio bovino na concentração de 2mg/mL de proteína coagulável (mantido a 37°C por 1 minuto). O final do teste ocorre quando pequenos grumos de fibrina podem ser visualizados no tubo de ensaio, sob leve movimentação, marcando-se o tempo de coagulação com auxílio de cronômetro. O controle foi da mesma forma mas a solução de trombina foi incubada com solução fisiológica 0,90%, na proporção 1:1.

Para avaliar a possível influência do princípio ativo sobre o fibrinogênio (fator I), incubou-se uma solução de fibrinogênio bovino com extrato hidroetanólico das folhas a 800µg/mL, na proporção de 1:1, por 1 a 5 minutos. Decorrido o tempo de incubação, foi adicionado 100µL de solução de trombina a 6U/mL a 400µL da solução fibrinogênio/extrato e cronometrado o tempo de coagulação.

5.3.1.3. Influência da concentração da solução teste sobre o TT

As soluções dos extratos hidroetanólicos e das frações bioativas foram preparadas nas seguintes concentrações: 1mg/mL, 800µg/mL, 700µg/mL, 600µg/mL, 500µg/mL, 200µg/mL, 100µg/mL, 50µg/mL e 25µg/mL. O que corresponde à concentração final, no tubo de ensaio, de: 250; 200; 175; 150; 125; 50; 25; 12,5 e 6,25µg/mL respectivamente.

5.3.2. ATIVIDADE ANTILEISHMANIA

Os ensaios de sensibilidade da *Leishmania* frente aos extratos foram realizados conforme Tempone *et al* (2005). Para determinar a concentração eficaz 50% (EC₅₀) sobre as formas promastigotas de *Leishmania chagasi* (cepa M6445), os extratos e o benzilisotiocianato (BZT) foram dissolvidos em dimetil-sulfóxido (DMSO) e diluídos em meio M199 numa microplaca contendo 96 poços de forma que a maior concentração foi de 100µg/mL. O BZT e os extratos hidroetanólicos foram testados em duplicata em 8 concentrações decrescentes. Os promastigotas foram contados numa câmara de Neubauer e semeados a 1×10^6 / poço com volume final de 150µL. Os controles consistem em poços contendo DMSO sem BZT ou extratos. A pentamidina foi utilizada como droga de referência. A microplaca foi incubada por 24 horas a 24°C. Após incubação, a viabilidade dos promastigotas foi observada, com auxílio de microscópio ótico, através de possíveis alterações ultraestruturais e confirmada pelo ensaio do difeniltetrazolium – MTT (TADA *et al*, 1986). Rapidamente, 20 µL de MTT (5mg/mL em PBS) foram adicionados a cada poço, após haverem passado por membrana de 0,22 µm. Em seguida, incubou-se a microplaca por 4h a 37°C. A extração de formazan foi realizada empregando-se SDS a 10% por 18 horas (100 µL/poço) a 24°C e a densidade ótica foi determinada numa Multiskan MS (Uniscience) a 570nm. A análise dos dados foi feita com auxílio do software Graph Pad Prism 3.0. O 100% de viabilidade foi determinado com base no desvio ótico dos promastigotas controle, após normalização.

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1. Estudo Botânico

6.1.1. *Tropaeolum majus*

Conforme reportado por Metcalfe & Chalk (1950), Font Quer (1962), Sparre (1972), Zurlo & Brandão (1989), Jorge *et al.* (1994) e Joly (1998), o material botânico coletado apresentou as características morfológicas correspondentes à espécie *Tropaeolum majus* L. da família Tropaeolaceae.

A planta constitui-se de erva trepadeira escandente, com flores vistosas, axilares, cíclicas, hermafroditas e com simetria claramente zigomorfa. Foram observadas folhas alternas, peltadas que apresentam o fenômeno da heterofilia durante seu desenvolvimento, segundo Cutter (1987). A lâmina foliar, das folhas entre os 3º e 10º nós, contando-se do ápice em direção à base, mostrou diâmetro entre 5 e 10cm, possuindo de 7 a 10 nervuras principais (de maior porte) não ramificadas; a margem apresentou-se levemente ondulada.

Os pecíolos apresentaram-se compridos, com 12 a 21 cm de comprimento entre os 3º e 10º nós, contando-se do ápice em direção à base.

Nas flores foram observados pedúnculos tão compridos quanto os pecíolos da folhas. O cálice, pentâmero, é composto de lobos lanceolados de ápices agudos, com 12 a 17 mm de comprimento e 8mm de largura, amarelos com pequenas máculas de cor magenta na face interna. Uma das sépalas forma uma espora com cerca de 35 mm de comprimento, verde-amarelada, rígida, ligeiramente recurvada em direção a base. A corola mostrou-se formada por 5 pétalas sendo 3 delas, as superiores, cuneadas e as duas outras, inferiores, unguiculadas. As pétalas possuíam, em diferentes indivíduos, cores variadas: laranja e vermelha (as mais comuns), amarela e branca. As pétalas com base unguiculada apresentaram fimbrias em sua metade inferior. O androceu mostrou-se composto por 8 estames e o gineceu apresentou-se formado por ovário súpero, tricarpelar e trilocular, possuindo um óvulo em cada lóculo. Foram observados frutos esquizocárpicos que se separam em frutículos quando carnosos e maduros. O aspecto geral da *Tropaeolum majus* pode ser visto nas figuras 11 a 13.

11

12

13

Figuras 11 e 12: Plantação de *Tropaeolum majus* L. (Tropaeolaceae) na propriedade da empresa Ervas Finas em Campo Limpo Paulista **Figura 13:** Exsicata de *T. majus*, barra = 5cm. fr = fruto; es = espora.

De um modo geral, a anatomia da folha confere com o descrito em literatura (METCALFE & CHALK, 1950); (JORGE *et al*, 1994). Em cortes paradérmicos, as epidermes abaxial e adaxial apresentaram células de contorno sinuoso com freqüentes estômatos anomocíticos, em particular na epiderme abaxial, figuras 14 e 15. Foi observado um extrato de parênquima paliçádico com células alongadas no sentido periclinal que ocupam de $\frac{1}{3}$ a $\frac{1}{2}$ do mesófilo. O parênquima lacunoso mostrou-se composto por 5 a 7 extratos de células de contorno brachiforme, levemente alongadas no sentido periclinal, figuras 16 e 17. Tricomas tectores unisseriados compostos por 3 a 7 células foram observados em ambas as faces da folha, mas em maior número na face abaxial, figuras 16 e 17. Castellani (1996) e Zanetti *et al* (2004), que, na coloração dos cortes de folhas, utilizaram o azul de metileno, corante mais apropriado à identificação de conteúdo mucilaginoso (KRAUS & ARDUIN, 1997) reportam a presença de 1 a 3 camadas de esclerênquima na região inferior dos feixes porém, nas amostras de lâmina foliar analisadas no presente trabalho, não foi encontrado esclerênquima. No entanto, foi observada a presença de parênquima floemático bem desenvolvido, mais evidente nos feixes vasculares de maior porte, entre o xilema e o floema, não documentado por aqueles autores que apontam a região de floema como sendo esclerênquima. Neste caso, o emprego de fucsina básica 1% e azul de astra 1% (BRITO & ALQUINI, 1997) ou com azul de astra 1% e safranina 1% (KRAUS & ARDUIN, 1997) na coloração dos cortes evita este equívoco, pois facilita a distinção entre as células que possuem parede com espessamento de celulose (coradas em azul) daquelas que possuem espessamento de lignina (coradas em vermelho), figura 18. Duas a três camadas de colênquima do tipo angular ocorrem na região subepidérmica, como mostram as figuras 18 e 19.

O pecíolo apresentou epiderme simples formada por células isodiamétricas seguida de 1 a 2 camadas de colênquima do tipo angular. Numerosos grãos de amido foram observados no parênquima fundamental. Na porção distal ocorrem 1 a 2 extratos de esclerênquima. Na região de feixe vascular ocorre parênquima floemático bem desenvolvido, como nas nervuras das folhas, figuras 20 e 21. Metcalfe & Chalk (1950) haviam relatado a ausência de tecido mecânico no pecíolo, o que não se confirma, como se observa nas figuras 20, 21 e 22.

Folha de *Tropaeolum majus* L. Figuras 14 e 15: Secções paradérmicas da lâmina foliar, coradas com azul de astra (4) epiderme adaxial. Barra = 50µm e (5) epiderme abaxial. Barra = 100µm. **Figuras 16 e 17:** Secções transversais da lâmina foliar, coradas com azul de astra. Barra = 100µm. **Figura 18:** Secção transversal de nervura de maior porte, corada com safranina e azul de astra. Barra = 200µm. **Figura 19:** Secção transversal de nervura de maior porte corada pelo azul de astra. Barra = 100µm. (ed) epiderme adaxial; (eb) epiderme abaxial; (pp) parênquima paliádico; (pl) parênquima lacunoso; (pfa) parênquima floemático aerífero; (pc) parênquima clorofiliano; (cl) colênquima angular; (f) floema; (x) xilema; (tt) tricoma tector.

Pecíolo de *Tropaeolum majus* L. **Figura 20:** Secção transversal do pecíolo na porção proximal. **Figura 21:** Secção transversal do pecíolo de na porção distal. **Figura 22:** Secção longitudinal do pecíolo de na porção distal. Barras = 200μm. Coloração pelo azul de astra 1% e safranina 1%. (ep) epiderme; (cl) colênquima angular; (ec) esclerênquima; (fb) fibra; (ev) elementos de vaso; (pfa) parênquima floemático aerífero; (pm) parênquima medular; (f) floema; (x) xilema.

Nas sépalas, em corte paradérmico, foram observadas células epidérmicas de contorno poligonal, alongadas junto às nervuras. As faces adaxial, figura 23, e abaxial, figura 24, apresentaram cutícula lisa e estômatos anomocíticos e raros tricomas tectores unisseriados pluricelulares, com predomínio dos tricelulares. O mesofilo, em corte transversal, figura 25, apresentou células parenquimáticas com parede delgada, densamente agrupadas, contendo numerosos xantoplastídeos. Não foram notados tecidos mecânicos de sustentação. Foram observados feixes vasculares frouxamente organizados, esparsos, apresentando um parênquima floemático muito evidente.

Nas esporas, foram observadas células da epiderme externa quadrangulares e alongadas no sentido periclinal, com cutícula lisa. O mesofilo, figura 26, homogêneo, apresentou seis feixes vasculares. Na epiderme interna, figuras 27 e 28, notaram-se numerosos tricomas secretores unicelulares alongados, com cutícula estriada e secreção não reativa ao sudam III, especialmente na extremidade distal ao cálice.

As pétalas apresentaram epiderme adaxial composta por células epidérmicas papilionadas, de contorno levemente sinuoso, revestidas com cutícula estriada, ocorrendo raros estômatos anomocíticos. O mesofilo apresentou células de paredes delgadas, com arranjo compacto, contendo numerosos xantoplastídios e vacúolos contendo antocianinas, figura 29. Foram observadas, na epiderme abaxial, células de parede sinuosa e cutícula lisa. As nervuras exibiram, como nas sépalas, parênquima floemático bem desenvolvido, figura 30.

Sépala e pétala de *Tropaeolum majus* L. **Figura 23:** Secção paradérmica da epiderme adaxial de sépala; barra = 100µm. **Figura 24:** Secção paradérmica da epiderme abaxial de sépala; barra = 200µm. **Figura 25:** Secção transversal de sépala; barra = 100µm. **Figura 26:** Secção transversal da espóra; barra = 200µm. **Figuras 27 e 28:** Secção transversal da espóra, epiderme interna; barra = 50µm. **Figura 29:** Secção transversal de pétala, região de nervura, corada pelo azul de astra 1%. **Figura 30:** Secção transversal de pétala fresca, sem coloração artificial. Barras = 50µm. (et) estômato; (ev) elemento de vaso; (ed) epiderme adaxial; (eb) epiderme abaxial; (me) mesofilo; (x) xilema; (f) floema; (ee) epiderme externa; (ei) epiderme interna; (ts) tricoma secretor. (me) mesofilo; (vl) vacúolo; (pfa) parênquima floemático aerífero.

6.1.2. *Tropaeolum pentaphyllum*

As figuras 31 a 33 mostram o cultivo da espécie no local onde foram realizadas as coletas.

Os estudos botânicos da espécie consideraram os aspectos da morfologia, figuras 34 a 37, e da anatomia interna, figuras 38 a 51.

A análise da morfologia da espécie concordou com o descrito por Sparre (1972). As amostras de *T. pentaphyllum* estudadas possuem características de erva escandente de caule delgado, com 3 a 5 m de comprimento.

As folhas são desprovidas de estípulas e o pecíolo é mais curto em relação ao pedúnculo floral, figuras 34 a 37. A lâmina foliar apresentou-se peltada, dividida até a base em 5 folíolos unguiculados, de formato elíptico ou ovalado, com ápice mucronado, figura 37. O limbo dos folíolos apresentou face adaxial lisa, glabra e de tonalidade verde escuro; a face abaxial mostrou-se lisa, glabra e com coloração verde acinzentado, figuras 34 e 37. Os pecíolos possuem secção transversal circular e algumas vezes formam gavinhas.

As flores são zigomorfas, axilares e possuem pedúnculo longo, entre 6 a 10 cm. O cálice é composto por 5 lobos triangulares, agudos, de coloração esverdeada que torna-se púrpura escura quando envelhece. Três dos lobos formam uma espora cônica com cerca de 25 mm de comprimento, figuras 34 a 37. A corola é composta por 2 pétalas de tonalidade vermelha-violácea, menores que os lobos do cálice, com unguícula muito curta (cerca de 1mm). Estas características observadas colocam a planta estudada na subespécie *pentaphyllum*, diferindo da subespécie *megapetalum* devido às pétalas mais curtas em relação a esta (SPARRE, 1972).

Figuras 31 e 32: Cultivo de *Tropaeolum pentaphyllum* Lam. (Tropaeolaceae) em Porto Alegre (RS), onde foram feitas as coletas, sendo visitado por beija-flor (polinizador). **Figura 33:** Detalhe do fruto maduro.

Figura 34: Exsicata da espécie *Tropaeolum pentaphyllum* ssp *pentaphyllum*; **Figura 35:** Flores em estágio de desenvolvimento dos frutos e frutos maduros de *T. pentaphyllum*. **Figura 36:** Flores bem desenvolvidas, coletadas para o preparo da droga vegetal; **Figura 37:** Aspecto da droga constituída de folhas de *T. pentaphyllum*; Barras = 5cm. **fr** = fruto; **es** = espóra.

Quanto à morfologia interna, as folhas de *T. pentaphyllum* apresentaram, em ambas as faces, epiderme uniestratificada com cutícula lisa e espessa. Pio Corrêa (1926) reporta o aspecto pelúcido da face abaxial. No entanto, as folhas apresentaram-se completamente glabras, conforme mostram as figuras 38 a 43, concordando com o descrito por Sparre (1972). Os estômatos são do tipo anomocítico e ocorrem apenas na epiderme abaxial, o que caracteriza a folha como hipoestomática. Logo abaixo das epidermes, na região da nervura central, ocorre uma a duas camadas de colênquima do tipo angular, seguido de duas a três camadas de parênquima fundamental. A nervura central apresenta disposição colateral e o parênquima do floema, ao contrario do que ocorre com esta estrutura em *T. majus*, não forma aerênquima, figuras 38 e 39. O mesofilo é bifacial, composto por um extrato de parênquima paliádico com células densamente agrupadas, alongadas no sentido periclinal e por três a cinco extratos de parênquima lacunoso composto por células pequenas, de contorno circular, onde idioblastos contendo drusas podem ser encontrados com relativa freqüência, figuras 40 e 43.

Conforme as figuras 44, 45 e 47, o pecíolo mostrou-se formado por epiderme uniestratificada, com cutícula espessa, seguida de uma a duas camadas de colênquima do tipo angular e duas a três camadas de parênquima. Na porção distal, uma a duas camadas de esclerênquima ocorre entre os feixes vasculares, os quais se apresentam em número de quatro. Na porção proximal do pecíolo o esclerênquima está ausente ou em início de desenvolvimento. Drusas infreqüentes ocorrem no parênquima fundamental, figuras 44 e 46.

Folhas de *Tropaeolum pentaphyllum*. **Figura 38:** Corte transversal da folha fresca evidenciando a região de nervura, corado pelo azul de astra 1%; **Figura 39:** Secção transversal da folha emblocada em historresina evidenciando a região de nervura, corado pelo azul de toluidina 1%; **Figura 40:** Secção transversal da folha emblocada em historresina evidenciando a amina foliar, corado pelo azul de toluidina 1%; **Figura 41:** Corte paradérmico na face adaxial da folha, corado pelo azul de astra 1%; **Figura 42:** Corte paradérmico na face abaxial da folha, corado pelo azul de astra 1%; **Figura 43:** Corte transversal da folha fresca evidenciando a lâmina foliar, corado pelo azul de astra 1%. Barras = 100µm. (ed) epiderme adaxial; (eb) epiderme abaxial; (pp) parênquima paliçádico; (pl) parênquima lacunoso; (cl) colênquima angular; (f) floema; (x) xilema; (dr) drusa; (et) estômato.

Pecíolo de *Tropaeolum pentaphyllum*. Figura 44: Corte transversal na porção proximal corado pelo azul de astra 1%, barra = 200 μ m. **Figura 45:** Corte transversal na porção distal corado pelo azul de astra 1% e safranina 1%, barra = 100 μ m. **Figura 46:** Secção transversal corada pelo azul de astra 1%, evidenciando drusas, barra = 100 μ m. **Figura 47:** Corte transversal na porção distal corado pelo azul de astra 1% e safranina 1%, barra = 100 μ m. (ep) epiderme; (pf) parênquima fundamental; (cl) colênquima angular; (f) floema; (x) xilema; (dr) drusa; (et) estômato.

Aspectos da anatomia interna das flores de *T. pentaphyllum* foram abordados por Fabbri & Valla (1998), visando à identificação do nectário presente na espora.

A epiderme externa da espora mostrou-se composta por células de formato poligonal coberta por espessa cutícula lisa e espessa, podendo ocorrer estômatos anomocíticos, figura 49. A epiderme interna do cálice apresentou-se glabra, formada por cutícula estriada, espessa e células de contorno ondulado (figuras 48, 50 e 51); os estômatos, especializados na liberação do néctar, ocorrem em pequena quantidade apenas na região terminal da espora, o que concorda com Fabbri & Valla (1998) e torna esta característica de menor importância para um controle microscópico. A secção transversal da espora apresentou uma camada de epidermes externa e interna e um mesofilo composto por parênquima lacunoso, cujas células de contorno circular mostraram-se agrupadas de modo mais denso em relação ao parênquima lacunoso do mesofilo da folha. Na espora, as nervuras anficrivais são em número de seis e apresentam-se em conformação semelhante às encontradas na espora de *T. majus*, ou seja, xilema pouco desenvolvido, envolto por parênquima aerífero do floema. Formando agrupamentos, acima da epiderme interna, encontram-se idioblastos cujo conteúdo se cora intensamente pelo azul de toluidina, figura 48. Ao longo do mesofilo das sépalas, surgem idioblastos contendo drusas em maior quantidade em relação ao encontrado no mesofilo das folhas, figura 51.

Sépala de *Tropaeolum pentaphyllum*. Figura 48: Secção transversal do terço médio da espóra corada pelo azul de toluidina 1%, evidenciando a região de nervura. **Figura 49:** Corte paradérmico da epiderme externa, corado com azul de astra 1%. **Figura 50:** Corte paradérmico da epiderme interna, corado com azul de astra 1%. **Figura 51:** Secção transversal corada pelo azul de toluidina 1%.

Barras = 100μm. (ee) epiderme externa, (ei) epiderme interna, (f) floema, (x) xilema, (pfa) parênquima floemático aerífero, (ne) nervura, (id) idioblasto, (dr) drusa, (et) estômato.

Os quadros 8 e 9 apresentam um resumo comparativo entre as morfologias externa e interna das duas espécies de capuchinha.

Quadro 8: Comparação da morfologia externa das folhas e flores das duas espécies.

ÓRGÃO E CARACTERÍSTICAS		<i>T. majus</i>	<i>T. pentaphyllum</i>
Folha	Consistência	Membranosa	Membranosa
	Superfície adaxial	Lisa; verde escuro	Lisa; verde escuro
	Superfície abaxial	Lisa; verde acinzentado	Lisa; verde acinzentado
	Composição	Simples	Compostas, 5 folíolos
Pecíolo	Inserção	Central	Central
	Secção transversal	Circular	Circular
	Comprimento	12 a 21 cm	4 a 8 cm
Flor	Número e cor das sépalas	5; amarelas com traços de vermelho	5; amarelas esverdeadas com traços de vermelho a totalmente púrpura quando em fase de frutificação
	Número e cor das pétalas	5; podendo ser alaranjadas, amarelas, vermelhas, brancas.	2; vermelha-violáceas a púrpuras.
	Comprimento da espora	Cerca de 35mm	Cerca de 25mm

Quadro 9: Comparação da morfologia interna das folhas e flores das duas espécies.

ÓRGÃO E CARACTERÍSTICAS		<i>T. majus</i>	<i>T. pentaphyllum</i>
Folha	Epiderme e anexos	Tricomas tectores unisseriados e pluricelulares em ambas as faces	Ambas as faces glabras
	Inclusões no mesofilo	Ausência de inclusões características	Presença de idioblastos contendo drusas no parênquima lacunoso
	Nervura	Presença de parênquima floemático aerífero bem evidente	O parênquima aerífero do floema pouco desenvolvido
Pecíolo	Tecido de sustentação	Colênquima angular; esclerênquima forma um anel contínuo após parênquima cortical	Colênquima angular; esclerênquima entre os feixes vasculares.
	Inclusões	Ausência de inclusões características	Idioblastos contendo drusas no parênquima medular
Flor	Pétala	Células papilionadas na epiderme adaxial, cutícula estriada, raros estômatos anomocíticos.	—
	Sépala	Cutícula fina em ambas as faces; tricomas tectores pluricelulares, unisseriados.	cutícula espessa em ambas as faces; glabra
	Espora	Muitos tricomas tectores revestidos por cutícula estriada da epiderme interna; 3 a 5 mm de diâmetro na região mediana	Epidermes interna e externa desprovidas de tricomas; 5 a 8 mm de diâmetro na região mediana

6.2. Estudo Fitoquímico

6.2.1. Triagem dos Compostos do Metabolismo Secundários

Conforme o quadro 10, a triagem fitoquímica de compostos do metabolismo secundário presentes nas drogas constituídas de folhas de *Tropaeolum majus* e *T. pentaphyllum* apresentou os seguintes resultados:

Quadro 10: Resultado da triagem fitoquímica nas folhas de *Tropaeolum majus* e *T. pentaphyllum*

TESTE	<i>Tropaeolum majus</i>	<i>Tropaeolum pentaphyllum</i>
Alcalóides	Negativo	Negativo
Saponinas	Negativo	Negativo
Cumarinas	Negativo	Negativo
Antraderivados	Negativo	Negativo
Taninos	Negativo	Negativo
Flavonóides	Positivo	Positivo
Esteróides	Negativo	Negativo
Óleos essenciais	Positivo	Não avaliado
Óleos fixos	Negativo	Negativo

Alcalóides: os testes com os reativos gerais de alcalóides revelou reação negativa frente ao reativo de Draggendorf, mas fracamente positiva frente aos reativos de Bouchardat, Mayer e Bertrand. Provavelmente trata-se de falso positivo devido à presença de grande quantidade de proteínas (mirosina). Purificações sucessivas eliminam qualquer traço de precipitado.

Taninos: As reações com acetato de chumbo a 10%, cloreto férrico 2% e acetato de cobre 2% foram claramente positivas, formando precipitado abundante. Já as reações com sulfato de quinina 2% e solução de gelatina, mais específicas para determinar a presença de taninos que as primeiras, foram negativas, o que leva a crer que se trata de falso positivo nas reações com metais, não específicas, que poderiam precipitar também proteínas.

Óleo essencial: Este ensaio foi realizado apenas com as folhas e flores frescas de *T. majus*. A destilação por arraste a vapor em Clevenger foi capaz de mostrar que folhas e flores da planta possuem óleo volátil. Segundo Kjaer (1963), o benzilisotiocianato constitui o único componente do óleo essencial.

6.2.2. Peso seco de folhas e flores frescas de *T. majus*

As folhas frescas de *T. majus* apresentaram perda por dessecação de $78,72(\pm 0,34)\%$ m/m e as flores frescas, de $88,35(\pm 0,14)\%$ m/m.

6.2.3. Perda por dessecação das drogas constituídas de folhas e flores

Nesta análise, as amostras de drogas constituídas de folhas de *T. majus* apresentaram uma perda por dessecação de $9,25\pm 0,85\%$ (m/m) e as constituídas de flores, $12,64\pm 0,34\%$ (m/m).

As drogas constituídas de folhas de *T. pentaphyllum* mostraram perda por dessecação de $10,43\pm 0,859\%$ (m/m) e as constituídas de flores, $8,49\pm 0,55\%$ (m/m).

Os valores de perda por dessecação das drogas vegetais analisadas encontram-se dentro dos limites especificados pela Farmacopéia Brasileira (1997) e pela WHO (1998), que situam o teor máximo de umidade aceitável entre 8 a 14%.

6.2.4. Rendimento dos extratos hidroetanólicos e das frações

As drogas extraídas com álcool 60°GL e as frações dos extratos hidroalcoólicos das folhas apresentaram rendimento conforme apresenta a tabela 1.

Tabela 1 : Rendimento dos extratos brutos de flores, folhas e suas frações.

Drogas vegetais			Rendimento (%)
<i>Tropaeolum majus</i>	Extrato hidroalcoólico 60°GL	FOLHAS	41,48
		FLORES	23,05
	Frações do extrato hidroalcoólico 60°GL das folhas	n - Hexânica	0,12
		Clorofórmica	0,36
		Acetato de etila	1,04
		n – Butanólica	11,66
		Aquosa	86,82
<i>Tropaeolum pentaphyllum</i>	Extrato hidroalcoólico 60°GL	FOLHAS	31,03
		FLORES	27,20
	Frações do extrato hidroalcoólico 60°GL das folhas	n - Hexânica	0,05
		Clorofórmica	0,12
		Acetato de etila	0,5
		n – Butanólica	7,56
		Aquosa	91,77

6.2.5. Doseamento de compostos fenólicos e de flavonóides

O teor de compostos fenólicos e de flavonóides nos extratos hidroetanólicos de flores, de folhas e das frações deste, encontram-se na tabela 2.

Tabela 2: Resultados das análises de fenóis totais e flavonóides totais

Análise	Teor (%) [*]							
	<i>Tropaeolum majus</i>				<i>Tropaeolum pentaphyllum</i>			
	Extratos etanol 60°GL		Frações dos Extratos etanol 60°GL das folhas		Extratos etanol 60°GL		Frações dos Extratos etanol 60°GL das folhas	
	Flor	Folha	Acetato de etila	n-Butanólica	Flor	Folha	Acetato de etila	n-Butanólica
Fenóis totais ¹	22,13 ± 0,32	30,34 ± 0,33	69,52 ± 4,24	64,19 ± 0,99	40,20 ± 0,77	30,96 ± 0,89	53,39 ± 0,59	62,38 ± 0,84
Flavonóides totais ²	15,06 ± 0,33	14,63 ± 0,14	61,46 ± 5,23	50,30 ± 1,72	16,34 ± 2,13	20,57 ± 0,81	27,25 ± 2,52	35,51 ± 0,28

Nota: * Média ± Desvio Padrão

1. Expressos em equivalentes de ácido gálico

2. Expressos em equivalentes de quercetina di-hidratada

Os métodos empregados para doseamento de compostos fenólicos e flavonóides fornecem valores aproximados (MABRY & MARKHAM, 1970). Apesar de o método de doseamento de flavonóides por HPLC ser o mais sensível e reprodutível (HOLLMAN & ARTS, 2000), o objetivo desta análise no presente trabalho foi verificar a possível relação entre teor de compostos fenólicos e de flavonóides e o efeito anticoagulante apresentado pelo extrato das flores e das folhas e suas frações.

Dentre as plantas edulas que possuem os maiores teores de flavonóides, avaliados por HPLC, encontram-se: cebola (300 mg.Kg⁻¹), couve (450 mg.Kg⁻¹), maçãs (50 mg.Kg⁻¹) e brócolis (100 mg.Kg⁻¹), (HOLLMAN & ARTS, 2000).

O teor calculado de flavonóides presentes nas folhas frescas de *T. majus* foi de 0,056% (equivalente a 560mg.Kg⁻¹) e nas folhas frescas de *T. pentaphyllum* foi de, aproximadamente, 0,032% (equivalente a 320mg.Kg⁻¹). Estes valores sobre a concentração de flavonóides apesar de estarem, provavelmente, superestimados, podem aumentar o interesse pela inclusão destas espécies na dieta, uma vez que estes compostos são apontados como grandes responsáveis pela atividade

antioxidante apresentada por certos alimentos de origem vegetal (HARBORNE & WILLIAMS, 2000).

6.2.6. Cromatografia em Camada Delgada (CCD)

Os seguintes sistemas cromatográficos foram os que melhor revelaram o perfil cromatográfico das drogas vegetais em estudo:

Sistema cromatográfico 1 (Wagner & Bladt, 1996)

Fase estacionária: cromatoplaça de sílica gel 60 GF₂₅₄

Fase móvel: acetato de etila: ac. fórmico: ac. acético glacial: água, (100:11:11:26)

Saturação completa da cuba

Percurso de 12 cm com desenvolvimento simples e ascendente

Revelador: NP (solução metanólica a 1% de éster difenilbórico ácido-β-etilamino)

Visualização à luz natural e à luz UV, 366nm.

Figuras 52 a 55.

52

53

Cromatografia em camada delgada.

Figura 52: (1) *T. majus*, extrato hidroalcoólico das flores. (2) *T. majus*, extrato hidroalcoólico das folhas. (3) Tma-n-hexano. (4) Tma-clorofórmica. (5) Tma-acetato de etila. (6) Tma-n-butanólica. (7) Tma-aquosa. (8) Canferol. (9) Ac. cafeico. (10) Ac. clorogênico.

Figura 53: (1) *T. pentaphyllum*, extrato hidroalcoólico das flores. (2) *T. pentaphyllum*, extrato hidroalcoólico das folhas. (3) Tpe-n-hexano. (4) Tpe-clorofórmica. (5) Tpe-acetato de etila. (6) Tpe-n-butanólica insolúvel em água. (7) Tpe-n-butanólica solúvel em água. (8) Tpe-n-butanólica. (9) Tpe-aquosa. (10) Rutina. (11) Ac. cafeico. (12) Ac. clorogênico.

Cromatografia em camada delgada – comparação entre os extratos e as frações bioativas de *T.majus* e *T. pentaphyllum*.

Figura 54: (1) *T.majus*, extrato hidroalcoólico das folhas. (2) *T.pentaphyllum*, extrato hidroalcoólico das folhas. (3) Tma-acetato de etila. (4) Tpe-acetato de etila. (5) Rutina. (6) Ac. clorogênico. (7) Ac. cafeico. (8) Tpe-fração butanólica insolúvel em água. (9) Tpe-butanólica solúvel em água. (10) Tma-butanólica. (11) Canferol.

Figura 55: (1) *T.majus*, extrato hidroalcoólico das folhas. (2) *T.majus*, extrato hidroalcoólico das flores. (3) *T.pentaphyllum*, extrato hidroalcoólico das folhas. (4) *T.pentaphyllum*, extrato hidroalcoólico das flores. (5) Rutina. (6) Ác. Clorogênico. Visualização: luz natural

Sistema cromatográfico 2 (Wagner & Bladt, 1998)

Fase estacionária: cromatoplaça de sílica gel 60 GF₂₅₄

Fase móvel: acetato de etila: ac. fórmico: ac. acético glacial: água, (100:11:11:20)

Saturação completa da cuba

Percurso de 12 cm com desenvolvimento simples e ascendente

Revelador: NP

Visualização à luz natural e à luz UV, 366nm.

Figuras 56 a 57.

56

57

Cromatografia em camada delgada.

Figura 56: (1) *T.pentaphyllum*, extrato hidroalcoólico das folhas. (2) Tpe-clorofórmica. (3) Tpe-n-butanólica solúvel em água. (4) Tpe-n-butanólica insolúvel em água. (5) Tpe- acetato de etila. (6) Rutina.

Figura 57: (1) *T.majus*, extrato hidroalcoólico das folhas. (2) *T.majus*, extrato hidroalcoólico das flores. (3) *T.pentaphyllum*, extrato hidroalcoólico das folhas. (4) *T.pentaphyllum*, extrato hidroalcoólico das flores. (5) Rutina. (6) Ác. Cafeico. Visualização: luz natural.

Cromatografia em camada delgada – comparação entre os extratos e as frações bioativas de *T. majus* e *T. pentaphyllum*

Figura 58: (1) *T. majus*, extrato hidroalcoólico das flores. (2) *T. pentaphyllum*, extrato hidroalcoólico das flores. *T. majus*, extrato hidroalcoólico das flores. (3) *T. majus*, extrato hidroalcoólico das folhas. (4) *T. pentaphyllum*, extrato hidroalcoólico das folhas. (5) *T. majus*, fração acetato de etila (6) *T. pentaphyllum*, fração n-butanólica. (7) Rutina (8) Ác. Clorogênico.

Com estes resultados, foi elaborada a tabela 3 em que são comparados os cromatogramas obtidos por CCD dos extratos hidroetanólicos das folhas e das flores, bem como das frações que apresentaram a maior atividade anticoagulante de *T. majus* e *T. pentaphyllum*.

Tabela 3: Cor, intensidade e Rf obtidos em CCD dos extratos hidroetanólicos e das frações bioativas de *Tropaeolum majus* (TMA) e *T. pentaphyllum* (TPE).

Manchas	A		B		C		D	E
	TMA	TPE	TMA	TPE	TMA	TPE		
1	Verde (+) 0,72	Verde (++) 0,51	Amarela (+) 0,72	Amarela (++) 0,55	Verde (+) 0,78	Verde (+) 0,51	Verde (+) 0,92	Amarela (++) 0,76
2	Amarela (++) 0,64	Amarela (++) 0,45	Amarela (+) 0,52	Azul * (+) 0,29	Amarela (+) 0,72	Amarela (++) 0,43	Verde (+) 0,85	Amarela (+++ 0,67
3	Verde (++) 0,51	Amarela (+) 0,25	Vermelha * (++) 0,33	Vermelha * (+) 0,15	Amarela- esverdeada (++) 0,40		Amarela (++) 0,75	Verde (++) 0,51
4			Azul * (++) 0,14				Amarela (+++ 0,64	
5							Verde (++) 0,51	
Rutina		Amarela (++) 0,45		Amarela (++) 0,55				Amarela (+++ 0,55
Canferol			Amarela (+++ 0,98					
Ac. clorogênico	Verde (++) 0,51	Verde (++) 0,51		Amarela clara (+) 0,55		Verde (++) 0,51	Verde (++) 0,51	Verde (++) 0,51
Ac. cafeico							Verde (+++ 0,92	

Nota: **A** - Extrato hidroetanólico das folhas, sistema 1, ao UV $_{366nm}$. **B** - Extrato hidroetanólico das flores, sistema 2, à luz natural. **C** - Extrato hidroetanólico das flores, sistema 1, UV $_{366nm}$. **D** - Fração acetato de etila do extrato das folhas de *T. majus*, sistema 1, ao UV $_{354nm}$. **E** - Fração n-butanólica do extrato das folhas de *T. pentaphyllum*, sistema 1, ao UV $_{366nm}$. (*) a mancha evanescente.

Os outros sistemas testados não ofereceram boa definição do perfil cromatográfico.

Através da cromatografia em camada delgada foi possível inferir a presença de canferol no extrato das flores de *T. majus*, mas não no das flores de *T. pentaphyllum*. Nesta, ocorre o glicosídeo flavonoídico rutina, figuras 53, 54, 56 e 58, nos extratos das folhas e flores e, em maior quantidade na fração n-butanólica, em especial, na fração n-butanólica insolúvel em água, conforme figuras 52 a 58. As estruturas dos flavonóides encontram-se nas figuras 59 a 63.

Figura 59: Núcleo fundamental dos flavonóides e sua numeração

Figura 60: Molécula de canferol; em perspectiva 3D.

Figura 61: Molécula de quercetina; em perspectiva 3D.

Ocorre um flavonóide em maior quantidade em *T. majus* num Rf de 0,64 quando utilizada a fase móvel: acetato de etila: ac. fórmico: ac. acético glacial: água, (100:11:11:26). Quando o perfil é formado pela fase móvel butanol: ác. acético: água (60: 15: 75), este flavonóide apresenta um Rf de 0,70, o que leva a crer tratar-se da isoquercetrina (figura 65), encontrada por Delaveau (1964) nesta mesma fase móvel. A isoquercetrina diferencia-se da rutina por não conter uma ramnose ligada à glicose. Conforme Delaveau (1964), este flavonóide, de ocorrência menos freqüente que a rutina entre as espécies vegetais, está presente também em espécies das famílias Equisetaceae, Filicaceae, Polygonaceae, Malvaceae e Leguminosaceae.

Um outro flavonóide, ainda não identificado, parece ocorrer em Rf (0,75) logo acima da isoquercetrina, como pode ser observado pelas figuras 52 e 54.

A fração acetato de etila do extrato de *T. pentaphyllum*, revelou a presença de pelo menos mais um flavonóide além da rutina que, a julgar pelo valor de Rf (0,64) pode tratar-se também da isoquercetrina, figuras 52 e 54.

Figura 62: Rutina (quercetina 3-O-rutinósido)

Figura 63: Isoquercetrina (quercetina-3-O-glucosídeo).

Entre os possíveis ácidos fenólicos encontrados tanto em *T. majus* quanto em *T. pentaphyllum*, estão os ácidos cafeico e clorogênico, evidentes nas frações acetato de etila. No entanto, no extrato de flores de *T. majus* parece não ocorrer ácido clorogênico, enquanto o ácido cafeico não ocorre no extrato de flores de *T. pentaphyllum* (figuras 52 a 58). As estruturas dos ácidos fenólicos observados encontram-se representadas nas figuras 64 e 65.

Figura 64: Ácido cafeico; em perspectiva 3D.

Figura 65: Ácido clorogênico; em perspectiva 3D.

O benzilisotiocianato (BITC), na ausência de revelador para glucosinolatos, apareceu no sistema cromatográfico 6, em que foi empregada a fase móvel composta por n-hexano: clorofórmio (80: 40), como uma mancha púrpura visualizada ao UV 258nm, com Rf de 0,78. Após aplicação do revelador, o perfil cromatográfico é composto por manchas azuis num fundo amarelo pálido, o BITC mostrou um Rf de 0,78 no sistema 4 e de 0,56 no sistema cromatográfico 7. A figura 66 representa a estrutura do benzilglucosinolato, precursor do benzilisotiocianato (figura 67).

Figura 66: Molécula de benzilglucosinolato; em perspectiva 3D.

Figura 67: Molécula de benzilisotiocianato; em perspectiva 3D.

6.2.7. Separação e identificação dos flavonóides de *Tropaeolum majus*

Foram preparados extratos em metanol 80% de droga constituída de folhas, e de droga constituída flores vermelhas. Após o processo de purificação, foi observado o perfil cromatográfico em CLAE, conforme método descrito no ítem 5.2.9 (III). As figuras 68 e 69 apresentam os cromatogramas.

Figura 68: Espectro obtido em cromatografia líquida de alta eficiência da droga constituída de folhas. A seta indica o provável composto isolado na cromatografia em papel, em etapa posterior.

O espectro na CLAE mostrou um pico expressivo no tempo de retenção de 20.767 minutos, indicado pela seta. Este composto foi isolado na cromatografia em papel, na qual surgiu como uma faixa larga e marrom ao UV que se torna amarela quando exposta aos vapores amoniacais, indicando tratar-se de flavonóide.

Figura 69: Espectro obtido em cromatografia líquida de alta eficiência da flor vermelha. A seta indica o provável composto isolado na cromatografia em papel, em etapa posterior.

A substância indicada pela seta, que mostrou um tempo de retenção de 21,013 minutos, parece ser a separada através da cromatografia em papel. A julgar pela cor da mancha ao UV_{366nm}, púrpura que se torna amarela quando exposta aos vapores amoniacaais, trata-se de um flavonóide diferente do isolado do extrato das folhas (tempo de retenção de 20.767 minutos).

6.2.8. Identificação das frações puras em espectrofotometria na região do UVvisível

Os compostos apontados no item anterior foram isolados e purificados procedendo-se, em seguida, à análise espectrofotométrica.

Como apresentam os espectros no UV, foram isolados compostos distintos nos extratos das folhas (figuras 70 a 72) e das flores (figuras 73 a 75).

Espectros do composto isolado na folha

Figura 70: A seta contínua indica a substância em metanol. A seta tracejada indica a substância em metanol após adição de KOH.

Figura 71: A seta contínua indica a substância diluída em metanol após adição de AlCl_3 . A seta tracejada indica a mesma substância indicada pela seta azul, após adição de HCl tracejada

Figura 72: A seta contínua indica a substância diluída em metanol após adição de acetato de sódio. A seta tracejada indica a mesma substância indicada pela seta azul, após adição de ácido bórico.

Espectro do composto isolado na flor.

Figura 73: A seta contínua indica a substância em metanol. A seta tracejada indica a substância em metanol após adição de KOH.

Figura 74: A seta contínua indica a substância diluída em metanol após adição de $AlCl_3$. A seta tracejada indica a mesma substância indicada pela seta azul, após adição de HCl.

Figura 75: A seta contínua indica a substância diluída em metanol após adição de acetato de sódio. A seta tracejada indica a mesma substância indicada pela seta azul, após adição de ácido bórico.

Os espectros da genina do flavonóide isolado da folha, figuras 70 a 72, são compatíveis com o que reportam Mabry *et al.* (1970) para a quercetina, cuja estrutura está representada na figura 61. Na flor foi isolado o canferol, conforme os espectros das figuras 73 a 75 (MABRY *et al.*, 1970). A molécula de canferol consta na figura 60.

6.2.9. Perfil flavonoídico das frações bioativas em cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

Nesta análise, foram avaliados os perfis cromatográficos das frações com maior atividade anticoagulante: a acetato de etila do extrato das folhas de *T. majus* (Tma) e n-butanólica do extrato das folhas de *T. pentaphyllum* (Tpe). O extrato hidroetanólico das flores de *T. pentaphyllum* foi lavado com 3 porções de n-butanol que foram recolhidas e liofilizadas. Esta fração n-butanólica foi utilizada para CLAE. A fração n-butanólica do extrato das folhas de *T. pentaphyllum* forneceu uma sub-fração insolúvel em água que, como mostram as figuras 53, 54, 56, 70 e 71, possui uma maior quantidade de rutina.

As figuras 76 e 77 mostram os perfis cromatográficos das frações bioativas das drogas constituídas de folhas das duas espécies. A fração acetato de etila de Tma possui um pico proeminente, cerca de 63% da área total dos picos, num tempo de retenção de 24,583 minutos.

Já a fração n-butanólica de Tpe apresentou dois picos importantes. Um deles, num tempo de retenção de 22,152 minutos, parece tratar-se da substância que surge, na CCD, num R_f logo inferior ao da rutina, como pode ser observado nas figuras 54 e 56. O outro pico, responsável por cerca de 55% da área dos picos totais, surge num tempo de retenção de 24,983. Este fato leva a crer tratar-se da rutina cujo padrão apresentou um tempo de retenção de 25,092, Figura 71. A rutina presente na fração n-butanólica pode ter eluído ligeiramente mais depressa devido à influência dos demais compostos. O mesmo parece ter ocorrido com a fração n-butanólica do extrato das flores de Tpe, que mostrou um pico pronunciado num tempo de retenção de 25,074 minutos, Figura 80.

Espetros obtidos por CLAE. Figura 76: fração acetato de etila (a 1mg/mL em metanol) do extrato das folhas de *T. majus*. **Figura 77:** fração n-butanólica de *T. pentaphyllum* (3mg/mL). Detecção a 358nm. —————> Provável pico da isoquercetrina; - - - - -> Provável pico do canferol, — — —> provável pico da rutina.

Espectros obtidos por CLAE. Figura 78: fração n-butanólica insolúvel em água (a 1mg/mL em metanol) do extrato das folhas de *T. pentaphyllum*. **Figura 79:** padrão de rutina (1mg/mL). Detecção a 358nm.

As figuras 78 e 79 revelam que a rutina é o flavonóide mais provável presente na fração bioativa do extrato das folhas e flores de *T. pentaphyllum* e surge como composto majoritário, o que sugere sua participação na ação inibidora da atividade da trombina.

Figura 80: Fração butanólica do extrato das flores de *T. pentaphyllum*. (a 1mg/mL em metanol). Detecção a 358nm. — —> Pico correspondente à rutina

6.3. Estudo Farmacológico

6.3.1. Influência do tempo de incubação da solução de trombina com a solução dos extratos.

Para análise da influência do tempo de incubação da solução de trombina 6U/mL com a solução do extrato hidroetanólico das folhas, foi empregado o extrato de *T. majus*. O tempo de trombina foi avaliado sobre uma solução de fibrinogênio bovino na concentração de 2mg/mL de proteína coagulável. Desta forma, foram obtidos os tempos de trombina, em segundos, como apresentado na figura 81

Figura 81: Influência do tempo de incubação da solução de trombina 6U/mL com o controle ou com o extrato hidroetanólico das folhas de *Tropaeolum majus* (800µg/mL) sobre o tempo de trombina da solução de fibrinogênio (2mg/mL).

Este teste permitiu observar que o tempo de incubação da solução de trombina 6U/mL com a solução do extrato hidroetanólico de *T. majus* (800µg/mL) está diretamente relacionado ao prolongamento do tempo de trombina. No entanto, a partir de 8 minutos, o tempo de incubação parece não provocar um prolongamento adicional no TT.

Os valores de TT da solução de fibrinogênio levam a crer que o princípio ativo deve agir diretamente sobre a trombina, uma vez que no ensaio estavam ausentes outros fatores da coagulação que não a trombina e o fibrinogênio.

A avaliação da influência do princípio ativo contido no extrato sobre o fibrinogênio, através da incubação de ambos por períodos de tempo variáveis, confirma que os extratos agem diretamente sobre a trombina e não exercem influência sobre o fibrinogênio. O TT observado para o controle (solução de fibrinogênio incubada com NaCl 0,9%) foi de 15 segundos e os tempos de coagulação do fibrinogênio incubado com extrato das folhas de *T. majus* e sua fração acetato de etila, foram de 22 e 23 segundos respectivamente. Os tempos de coagulação do teste realizado com o extrato de folhas de *T.pentaphyllum* e sua fração n-butanólica foram de 20 e 22 segundos, respectivamente.

Para os ensaios seguintes foi escolhido o tempo de incubação de 5 minutos por não ser prolongado em demasia e por encontrar-se num ponto da reta que guarda uma relação direta de proporcionalidade com o prolongamento no tempo de trombina.

6.3.2. Identificação da fração com maior atividade anticoagulante.

Conforme as figuras 82 e 83, os extratos hidroetanólicos e as frações acetato de etila (800µg/mL) de *T. majus* e a fração n-butanólica (800µg/mL) de *T.pentaphyllum* apresentaram o maior prolongamento do tempo de trombina sobre o pool de plasma.

Figura 82: Influência do benzilisotiocianato, dos extratos e frações de *T. majus* (800µg/mL) sobre o tempo de trombina do pool de plasma, utilizando-se trombina 6U/mL.

Figura 83: Influência dos extratos e frações de *T. pentaphyllum* (800µg/mL) sobre o tempo de trombina do pool de plasma, utilizando-se trombina 6U/mL.

Medeiros et al. (2000), em ensaios de triagem utilizando um agente cromogênico como indicador da coagulação, reportaram o maior efeito anticoagulante da fração diclorometano, em relação à fração metanólica, das folhas de *T. majus*, indicando que o(s) composto(s) responsável por esta atividade biológica deve(m) ter caráter lipofílico. Os resultados ora apresentados corroboram o reportado por aqueles autores e mostram que o princípio ativo possui uma lipofilicidade intermediária, pois nem os solventes mais apolares (n-hexano), nem o mais polar (água), foram capazes de retê-lo em quantidade suficiente para prolongar o tempo de trombina.

Conforme a figura 82, os extratos hidroetanólicos liofilizados de folhas e de flores de *T. majus* prolongaram o tempo de trombina avaliado sobre pool de plasma.

No entanto, o benzilisotiocianato, responsável por tantas atividades biológicas dos órgãos aéreos da capuchinha (UNDERHILL ET AL, 1980), (GREEVE ET AL, 1985), (PINTÃO ET AL, 1995), não demonstrou qualquer influência sobre a coagulação, em relação ao controle. Dentre as frações testadas, as que apresentaram maior influência sobre o TT foram a acetato de etila de *T. majus* e a n-butanólica de *T. pentaphyllum* (figura 83). A fração clorofórmica de *T. majus* apresentou menor influência sobre o tempo de trombina, em relação ao controle constituído de solução fisiológica e DMSO na proporção 19:1(v/v). As frações n-hexânicas não prolongaram o tempo de coagulação do pool de plasma.

Quando confrontados os dados da tabela 2 e as figuras 82 e 83, pode-se notar que as frações acetato de etila do extrato das folhas de *T. majus* e a n-butanólica de *T. pentaphyllum*, que apresentaram a maior atividade anticoagulante, foi também as que mostraram a maior concentração de compostos fenólicos e de flavonóides bem como maior valor da relação flavonóide/compostos fenólicos. Estes resultados sugerem que a inibição da atividade coagulante da trombina seja devida aos flavonóides.

Derivados da quercetina e canferol foram apontados por Chung et al. (1993) como inibidores da agregação de plaquetas de coelho, induzida por trombina e colágeno. Além disto, há indícios significativos de que o consumo regular de alimentos ricos em flavonóides reduz o risco de morte por doença cardíaca coronariana (HERTOG ET AL., 1993), (KNEKT, 1996) e a incidência de acidente vascular cerebral em idosos (KELI et al, 1996).

6.3.3. A menor concentração de extrato (ou fração) capaz de prolongar o tempo de trombina.

Este teste revelou que a concentração mínima da solução do extrato das folhas de *T. majus* e de *T. pentaphyllum* capaz de inibir a atividade coagulante da trombina, em pool de plasma, é de 100 μ g/ml (figura 84). A fração acetato de etila do extrato das folhas de *T. majus* prolongou o tempo de trombina até a concentração mínima de 25 μ g/mL. A fração n-butanólica do extrato das folhas de *T. pentaphyllum* mostrou atividade até a concentração mínima 50 μ g/mL, conforme mostra a figura 84.

Figura 84: Influência da concentração do extrato hidroetanólico das folhas de *T. majus* e de *T. pentaphyllum* e das frações acetato de etila e n-butanólica sobre o Tempo de Coagulação do pool de plasma humano .

6.3.4. Confirmação da inibição da atividade coagulante da trombina através do teste de TT sobre plasma individual

Os dados de tempo de trombina dos plasmas individuais mostraram diferença significativa ($p < 0,001$) entre aqueles realizados com extrato hidroetanólico das folhas e de suas frações, em relação ao controle.

O extrato hidroetanólico das folhas de *Tropaeolum majus* (800µg/mL) e sua fração acetato de etila (800µg/mL) apresentaram um tempo de trombina de $31,80 \pm 1,70$ s; $51,70 \pm 2,76$ s respectivamente, e diferem significativamente ($p < 0,001$) entre si, e em relação ao controle que mostrou um tempo de trombina de $23,80 \pm 1,32$ s, conforme mostra a figura 85.

Utilizando a mesma metodologia, os testes realizados com extrato hidroetanólico das folhas de *T. pentaphyllum* (800µg/mL) e a fração n-butanólica (800µg/mL) prolongaram significativamente ($p < 0,001$) o tempo de trombina do plasma dos doadores. O controle (solução de NaCl 0,9%) apresentou um TT de $23,60 \pm 1,44$ segundos, enquanto o extrato hidroetanólico de folhas e a fração n-butanólica apresentaram um TT de $29,80 \pm 1,09$ s e $46,80 \pm 2,49$, respectivamente, figura 85. A análise de variância e o teste Tukey-Kramer mostraram que os grupos controle não diferem significativamente entre si ($p > 0,05$), mas os grupos teste sim ($p < 0,001$).

Figura 85: Comparação entre os tempos de coagulação influenciados pelos extratos e suas frações bioativas das espécies *T. majus* e *T. pentaphyllum*. N = 10. * $p < 0,001$

Foi possível observar que a fração acetato de etila de *T. majus* foi a que apresentou maior atividade anticoagulante, seguida da fração n-butanólica de *T. pentaphyllum*, do extrato hidroetanólico de *T. majus* e do extrato hidroetanólico das folhas de *T. pentaphyllum*. Dentro das condições em que o ensaio foi realizado, as soluções teste influenciaram significativamente ($p < 0,001$) os tempos de coagulação.

Até o momento, nenhuma atividade biológica havia sido estudada para os extratos das folhas e flores de *T. pentaphyllum*. Além disto, apenas o ácido erúico, presente nas sementes, e o benzilisotiocianato foram apontados até então como responsáveis pelos efeitos biológicos induzidos por extratos de *T. majus* (BINET, 1965), (UNDERHILL et al, 1980), (GREEVE et al, 1985), (PINTÃO et al, 1995), (CARLSON & KLEIMAN, 1993). No entanto, os resultados ora apresentados apontam para os flavonóides, presentes nos extratos de folhas e de flores da capuchinha, como responsáveis pela atividade anticoagulante e oferecem subsídios para uma possível comprovação *in vivo* do uso popular desta espécie vegetal nas doenças cardiovasculares.

6.3.5. ATIVIDADE ANTILEISHMANIA

Ao final dos experimentos, todas as formas promastigotas da *Leishmania chagasi* permaneceram viáveis, mesmo à concentração mais elevada (100µg/mL) dos extratos hidroetanólicos e do benzilisotiocianato. Os resultados mostraram que nem os extratos brutos de folhas e flores de *T. pentaphyllum* e de *T. majus*, nem o benzilisotiocianato (BITC) apresentaram atividade antileishmania contra a cepa testada.

Este resultado sugere que a atividade antifúngica devida ao BITC, provavelmente não está relacionada à ação sobre o ergosterol da membrana dos fungos, uma vez que os protozoários do gênero *Leishmania* são sensíveis aos fármacos que atuam sobre o ergosterol que compõe a membrana citoplasmática, como reportado por RATH et al (2003) e OLLIARO & BRYCESON (1993).

7. CONCLUSÃO

O estudo de morfo-anatomia comparada das flores e folhas de *T. majus* e *T. pentaphyllum* revelou que as diferenças morfológicas são mais evidentes que as anatômicas.

Entre as diferenças morfológicas mais importantes para identificação das espécies num controle de qualidade da droga vegetal, ressalta-se:

- A folha de *T. pentaphyllum* é composta por cinco folíolos e a de *T. majus*, também peltada, é inteira;
- As flores de *T. majus*, com pétalas bem vistosas, são maiores que as de *T. pentaphyllum*, cuja espóra é responsável pela maior parte do volume da flor.

As seguintes características da anatomia interna de ambas as espécies, destacam-se:

- Presença de tricomas tectores nas folhas de *T. majus* enquanto as folhas de *T. pentaphyllum* são glabras;
- Em *T. pentaphyllum* ocorrem drusas no mesofilo das sépalas, no parênquima lacunoso da lâmina foliar e no parênquima fundamental do pecíolo;
- Nas regiões de nervura da lâmina foliar e pecíolo de *T. majus* ocorre um parênquima floemático aerífero bem desenvolvido;
- Na região distal do pecíolo de *T. majus* ocorre, circundando a região de feixes vasculares, uma faixa contínua de fibras esclerenquimáticas, enquanto em *T. pentaphyllum* o esclerênquima ocorre entre os feixes;
- A epiderme interna da espóra de *T. pentaphyllum* é glabra e a de *T. majus* é revestida por tricomas secretores, particularmente no terço médio inferior da espóra.

No âmbito fitoquímico, os perfis cromatográficos e espectrométricos obtidos consistem num passo importante para a identificação dos compostos do metabolismo secundário que ocorrem nas duas espécies estudadas. Foi observada a presença de:

- Ácido cafeico no extrato das folhas e flores de *T. majus*, que ainda não havia sido notado;
- Ácido clorogênico foi observado nos extratos de *T. majus* e *T. pentaphyllum*;

- Rutina é o flavonóide predominante nas folhas e flores de *T. pentaphyllum*, mas não ocorre em *T. majus*;
- Os pigmentos antocianínicos das flores de ambas as espécies, de acordo com o observado nas cromatografias em camada delgada, são diferentes.

As observações referentes aos compostos do metabolismo secundário de *Tropaeolum pentaphyllum* são importantes, uma vez que existe uma lacuna a respeito de informações neste sentido.

Em relação ao estudo de atividade anti-leishmania, apesar de o benzilisotiocianato apresentar atividade antifúngica, nem ele, nem os extratos hidroetanólicos das drogas vegetais apresentaram qualquer efeito sobre a viabilidade das formas promastigotas de *Leishmania chagasi*.

A avaliação da atividade anticoagulante revelou que os extratos hidroetanólicos das folhas e das flores de *Tropaeolum majus* e de *T. pentaphyllum*, devido à presença de flavonóides, apresentam efeito inibidor da atividade coagulante da trombina. Em relação aos indivíduos que sofrem de distúrbios hemostáticos com tendência à formação de trombos, o presente trabalho traz informações que podem ampliar o interesse pela inclusão na dieta e pelo uso medicinal das duas espécies de capuchinha.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMERICAN HEART ASSOCIATION. www.americanheart.org/presente.jhtml?identifier=3053. Acesso em novembro de 2006.

ANSELL, J.E.; WEITZ, J.I.; COMEROTA, A.J. Advances in therapy and the management of antithrombotic drugs for venous thromboembolism. In: AMERICAN SOCIETY OF HEMATOLOGY - Education Program Book. San Francisco, p.266-284, 2000. *apud* OLIVEIRA, L.C.O.; FRANCO, R.F. Novas drogas anticoagulantes. **Hemostasia e trombose.**, cap. IV, 34: 276-281, 2001.

ARGÜELO, C. **Av. Perspectiva.** v.14, p.21, 1995. *apud* CHAN-BACAB, M.J.; PEÑA-RODRIGUEZ, L.M. Plant natural products with leishmanicidal activity. **Nat. Prod. Rep.**, v.18, p.674-688, 2001.

ARUOMA, O.I. Free radicals, oxidative stress and antioxidants in human health and disease. **J. Am. Oil Chem. Soc.**, v. 75, p. 199-212, 1998.

AOAC. ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS (Washington, Estados Unidos). **Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists.** 17.ed. Gaithersburg, 2000. p. 457.

BALANÃ-FOURCE, R.; REGUERA, R.M.; CUBRÍA, C.; ORDOÑÉZ, D. **Gen. Pharmacol.** 30: 435-437, 1998. *apud* CHAN-BACAB, M.J.; PEÑA-RODRIGUEZ, L.M. Plant natural products with leishmanicidal activity. **Nat. Prod. Rep.** v.18, p.674-688, 2001.

BAR_SHAVIT, R.; KAHN, A.; WILNER, G.D.; FENTON, J.W. Monocyte chemotaxis: stimulation by specific exosite region in thrombin. **Science**, v.220, p.728-731, 1983.

BEZERRA, J.L.; COSTA, G.C.; LOPES, T.C.; CARVALHO, I.C.D.S.; PATRICIO, F.J.; SOUSA, S.M.; AMARAL, F.M.M.; REBELO, J.M.; GUERRA, R.N.M.; RIBEIRO, M.N.S.; NASCIMENTO, F.R.F. Avaliação da atividade leishmanicida in vitro de plantas medicinais. **Rev. Bras. Farmacognosia.** v.16, supl.1, p. 631-637, 2006.

BINET, L. Un médecin biologiste à la campagne. **Biol. Med.**, v.53 (I). p.5-28. 1964.

BITHELL TC. Blood coagulation. In: LEE, G.R.; BITHELL, T.C.; FOERSTER, J.; ATHENS, J.W.; LUKENS, J.N. **Wintrobe's clinical haematology.** 9 ed. London: Lea & Febiger, 1993. cap.19, p.566-601.

BOYD, J.C.; MILLERSHIP, J.S.; WOOLFSON, A.D. **J. Pharm. Pharmacol.** v.34, p.158-161, 1982.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. <http://tabnet.datasus.gov.br>. Acesso em novembro de 2006.

BRITO, C.J.A.; ALQUINI, Y.A. A new method for staining botanical material embedded in glycol methacrylate (GMA). **Arq. Biol. Tecnol.** v.4, n.39, p. 949-950, 1997.

BRITO, M. F.; SEIXAS, J.N.; JABOUR, F.F.; ANDRADE, G.B.; CUNHA, B.R.M.; FRANÇA, T.N.; PEIXOTO, P. V. Sobre um surto de envenenamento por derivado cumarínico em bovinos. **Pesq. Vet. Bras.** v.25, n.3, p.143-149, 2005.

CARLSON, K.D.; KLEIMAN, R. Chemical survey and erucic acid content of commercial varieties of nasturtium, *Tropaeolum majus* L. **JAOCS.** v.70, n.11, p. 1145-1148, 1993.

CASTELLANI, D. C. **Crescimento, anatomia e produção de ácido erúico em *Tropaeolum majus* L.** 108 f. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa. 1997.

CHAN-BACAB, M.J.; PEÑA-RODRIGUEZ, L.M. Plant natural products with leishmanicidal activity. **Nat. Prod. Rep.** v.18, p.674-688, 2001.

CHISTOKHODOVA, N.; NGUYEN, C.; CALVINO, T.; KACHIRSKAIA, I.; CUNNINGHAM, G.; MILES, D.H. Antithrombin activity of medicinal plants from central Florida. **J. Ethnopharmacology.** 81: 277-280, 2002.

CHOU, M.-N. Tese. Disponível em www.theses.ulaval.ca/2005/22822/ch01.html, 2005. Université Laval, Canadá. 123p. Acesso em: 21 de novembro de 2006.

CHRISTENSEN, E. **The Norwegian Cancer Society: peroxisomal β -oxidation of fatty acids.** 1991. 83p.

CHUNG, F.L.; WANG, M.; HECHT, S.S. **Carcinogenesis.** V. 6. p. 539-543. 1985.

CORRIVEAU, D.; FRITSMA, G.A. **Hemostasis and thrombosis in the clinical laboratory.** Philadelphia: lippincott Company, p. 28-65, 1988.

CORE. Cardiovascular diseases. Disponível em: www.core.org.cn/ocw_cn/biologycal_engineering_division/be_430fall_2004. Acesso em 01 de novembro de 2006.

COSTA, A.F. **Farmacognosia**, 4.ed. v.3, Lisboa: Fundação Calouste Gulbekian, 1994.

CUNNINGHAM, D.D.; FARREL, D.H. **Ann. N.Y. Acad. Sci.**, v.485, p. 240-248, 1986. *apud* PRESCOTT, S.M.; SEEGER, A.R.; ZIMMERMAN, G.A.; MCINTYRE, T.M.; MARAGONORE, J.M. Hirudin – based peptides block the inflammatory effects of thrombin on endothelial cells. **J. Biol. Chem.**, v.265, p.9614-9616, 1984.

CUTTER, E.G. **Plant anatomy.** Part 2. Organs. London: Edward Arnold, 1987.

DELAVEAU, P.G. Essai de localisation de la biogénese des flavonoïdes dans le genre *Tropaeolum*. Isolement de rutósido du *T. peregrinum* L. **Comptes rendus**, v.258, p.318-321, 1964.

DELAVEAU, P.G. Sur la repartition des pigments flavoniques chez la grande capucine (*Tropaeolum majus* L.). **Comptes rendus**, v.260, p.1469-1471, 1965.

DOMINGUEZ, X.A. **Métodos de investigación fitoquímica**. México: Limusa, 1973. 281p.

DONG, H.; CHEN, S-X; KINI, R.M.; XU, H-X. Effects of tannins from *Geum japonicum* on the catalytic activity of thrombin and factor Xa of blood coagulation cascade. **J. Nat. Prod.** 61: 1356-1360, 1998.

DUJARDIN, J.C. Risk factors in the spread of leishmaniasis: towards integrated monitoring? **Trends Parasitol**, 22:4-6, 2006.

DUKE JA; BOGENSCHUTZ_GODWIN MJ; DUCCELLIER J; DUKE PAK. **Handbook of Medicinal Herbs**. London: CRC Press, 2002; p.521.

FABBRI, L.T.; VALLA, J.J. Aspectos de la biología reproductiva de *Tropaeolum pentaphyllum* (Tropaeolaceae). **Darwiniana**. 36(1-4): 51-58. 1998.

FARMACOPÉIA Brasileira. 2.ed. São Paulo: Siqueira, 1959. 1265p.

FARMACOPÉIA Brasileira. 4.ed. Atheneu, 1996. pt.2, p.16.1

FARMACOPÉIA Brasileira. 4.ed. São Paulo: Ateneu, 1997.v.2.

FONT QUER, P. **Plantas medicinales: el dioscórides renovado**. 7.ed. Barcelona: Ed. Labor, 1981. p.420 e 421.

GIANNINI, S.D. **Aterosclerose e dislipidemias**. São Paulo: Ed. BG, 1998, p.15-16.

GOUN, E.A.; PETRICHENKO, V.M.; SOLODNIKOV,S.U.; SUHININA,T.V.; KLINE, M.A.; CUNNINGHAM, G.; NGUYEN, C.; MILES, H. Anticancer and antithrombin activity of Russian plants. **J. Ethnopharmacology**. 81: 337-342, 2002.

GORDON, R. **The alarming history of medicine**. London: Sinclair-Stevenson. 1997, 223 p.

GREVE, R.; GREVE, H.; DRIESEN, G. **Ger. Offen. D. E. V.** 3. p. 415-418. 1985.

HAINES ST, ZEOLLA M, WITT DM. In: DiPiro JT, Talbert RL, Yee GC, Matzke GR, Well BG. **Pharmacotherapy – a pathophysiologic approach**. New York: McGraw-Hill, 6th edition, p.373-411, 2005

HANDMAN, E. Leishmaniasis: current status of vaccine development. **Clin. Microbiol. Rev.** 14: 229-243, 2001.

HARBORNE, J.B.; WILLIAMS, C.A. Advances in flavonoid research since 1992. **Phytochemistry**, v.55, p.481-504, 2000.

HERTOG, M.G.L.; FESKENS, E.J.M.; KROMHOT, D.; HOLLMAN, P.C.H.; KATAN, N.M.B. Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart disease: the Zutphen elderly study. **The Lancet**. v.342, p.1007-1011, 1993.

HIRSH, J.; WEITZ, J.I. New antithrombotic agents. **The Lancet**, 353: 1431-1436, 1999. *apud* OLIVEIRA, L.C.O.; FRANCO, R.F. Novas drogas anticoagulantes. **Hemostasia e trombose**. cap. IV, v.34, p. 276-281, 2001.

HOLLMAN, P.C.H; ARTS, I.C.W. Flavonols, flavones and flavanols – nature, occurrence and dietary burden. **J. Science of Food and Agriculture**. v.80, p.1081-1093, 2000.

JOHANSEN, D.A. **Plant microtechnique**. New York: Mac Graw-Hill Book, 1940. 560p.

JOLY, A. B. **Botânica – introdução à taxonomia vegetal**. 12 ed. São Paulo: Companhia Editora Nacional, 1998. p.384 - 392.

JORGE, LUZIA I. F.; INOMATA, EMIKO I.; MAIO, F.D.; TIGLEA, P. Características de duas hortaliças do Brasil: “chaguinha” (*Tropaeolum majus* L.) e “vinagreira”. **Bol. SBCTA**, v.28, n.2, p. 86-96, 1994.

KELI, S.O; HERLOG, MGL; FESKENS, EJM; KROMHOUT, D. Dietary flavonoids, antioxidant vitamins, and incidence of stroke; the Zutphen study. **Arch. Internal Medicine**, v.156, p.637-641, 1996.

KJAER, A. Mass spectra of isothiocyanates. **Acta Chem. Scandinavica**. v. 17, p. 2143-2154. 1963.

KNEKT, P.; JÄRVINEN, R.; REUNANEN, A.; MAATELA, J. Flavonoid intake and coronary mortality in Finland: a cohort study. **Brit. Med. J.**, v.312, p. 478-481, 1996.

KOROLKOVAS, A.; BURCKHALTER, J.H. Agentes antiprotozoários. In:_____. **Química farmacêutica**. Rio de Janeiro: Guanabara, 1988. cap. 30, p.522-546.

KRAUS, J.E.; ARDUIN, M. **Manual básico de métodos em morfologia vegetal**. Seropédica: EDUR, 1997. 3v.

LUTZE, G.; ROMHILD, W.; ELWERT, J.; LEPPERT, J.; KUTSCHMANN, K. Case report - Phenprocoumon (Marcumar_, Falithrom_) as an unusual reason for coumarin poisoning in a dog. **Dtsch. Tierärztl. Wochenschr.** 110(1):31- 33, 2003.

LYKKESFELDT, J.; MØLLER, B.L. Synthesis os benzylglucosinolate in *Tropaeolum majus* L. **Plant Physiol.** 102: 609-613, 1993.

MABRY, T.J.; MARKHAN, K.R.; THOMAS, M.B. **The systematic identification of flavonoids**. Berlim: Springer-Velag, 1970.

MAJERUS PW, TOLLEFSEN DM. In: Hardmam JG, Limbird LE, Gilman AG., editors. Goodman and Gilman's the pharmacological basis of therapeutics. 10 ed New York: McGraw-Hill, 2001. p. 1519-1537.

MARKHAN, K.R. **Techniques of flavonoid identification**. London: Academic Press, 1982.

MARTINS, V.R. Prion celular e infeccioso. **Biotecnologia ciência & desenvolvimento**. Disponível em: http://www.biotecnologia.com.br/4hp_10.htm, maio de 2000.

MATSUBARA, K. Recent advances in marine algal anticoagulants. **Curr. Med. Chem. Cardiovasc. Hematol. Agents**. 2(1): 13-19, 2004.

MEDEIROS, J.M.R.; MACEDO, M.; CONSTANCIA, J.P.; NGUYEN, C.; CUNNINGHAM, G.; MILES, D.H. Antithrombin activity of medicinal plants of the Azores. **J. of Ethnopharmacology**. V. 72. p. 157-165. 2000.

MENDES-SILVA, W.; ASSAFIM, M.; RUTA, B.; MONTEIRO, R.Q.; GUIMARÃES, J. A.; ZINGALIA, R.B. Antithrombotic effect of Glycyrrhizin, a plant-derived thrombin inhibitor. **Thrombosis Research**. 112: 93-98, 2003.

METCALFE, C.R.; CHALK, L. **Anatomy of the dicotyledons**. v.1. Clarendon Press. Oxford, 1950.

NEIVA, T.J.C.; MORAES, A.C.R.; PIZZOLATTI, M.G.; RAMOS, L.F.S.; ROCHA, T.R.F.; D'AMICO, E.A. Atividade in vitro da *Baccharis illinita* na coagulação sangüínea e função plaquetária. **RBAC**. v.36, n.2, supl.1, p.34B, 2004.

O'KENNEDY, N.; CROSBIE, L.; VAN LIESHOUT, M.; BROMM, J.I.; WEBB, D.J.; DUTTARROY, A.K. Effects of antiplatelet components of tomato extract on platelet function in vitro and ex vivo: a time-course cannulation study in healthy humans. **Am. J. Clin. Nutr**. 84: 570-579, 2006.

OLLIARO, P.L.; BRYCESON, A.D.M. Practical progress and new drugs for changing patterns of leishmaniasis. **Parasitol Today**, 9: 323-328, 1993.

OLIVEIRA, F.; AKISUE, G.; AKISUE, M.K. **Farmacognosia**. São Paulo: Atheneu, 1998. 412p.

PAVONE, V.; DE_SIMONE, G.; NASTRI, F.; GALDIERO, S.; STAIANO, N.; LOMBARDI, A.; PEDONE, C. Multiple binding mode of reversible synthetic thrombin inhibitors. A comparative structural analysis. **Biol. Chem.**, v.379, p.987-1006, 1998.

PICCIARELLI, P.; ALPI, A. Embryo suspensor of *Tropaeolum majus*: identification of gibberellin A₆₃. **Phytochemistry**, v. 26, n.2, p. 329-330, 1987.

PICKUP JC, WILLIAMS SG. **Chronic complications of diabetes**. Oxford: Blackwell Scientific Pub. p. 3 – 41. 1994.

PINTÃO, A.M.; PAIS, M.S.S.; COLEY, H.; KELLAND, L.R.; JUDSON, I.R. In vitro and in vivo antitumor activity of benzil isotiocianato: a natural product from *Tropaeolum majus*. **Planta Med.**, v. 61, p.233-236, 1995.

PIO_CORRÊA, M. **Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas**. Rio de Janeiro: Imprensa Nacional. Ministério da Agricultura, v. 1, 1984, p.669-674.

PRESCOTT, S.M.; SEEGER, A.R.; ZIMMERMAN, G.A.; MCINTYRE, T.M.; MARAGONORE, J.M. Hirudin – based peptidides block the inflammatory effects of thrombin on endothelial cells. **J. Biol. Chem.**, v.265, p.9614-9616, 1984.

PRISTA, N.L.; ALVES, A.C.; MORGADO, R. **Técnica farmacêutica e farmácia galênica**. 3.ed. v.2. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 1983.

RADOSTITS D.M, GAY C.C., BLOOD, D.C. & HINCHCLIFF, K. W. **Veterinary Medicine**. 9 ed. London: W.B. Saunders, 2000, 687p.

RANG, H.P.; DALE, M.M.; RITTER, J.M. **Farmacologia**. Ed. Guanabara_Koogan, 4 ed., cap. 16, 2001.

RATH, S.; TRIVELIN, I.A.; IMBRUNITO, T.R.; TOMAZELA, D.M.; JESUS, M.N.; MARZAL, P.C.; ANDRADE JUNIOR, H.F.; TEMPONE, A.G. Antimoniais empregados no tratamento da leishmaniose: estado da arte. **Química Nova**. v.26, p. 550-553, 2003.

RAYMOND, R.; DELAVEAU, P. Isolement d'un flavonoside, identifié à l'isoquercetrin, à partir des feuilles de la capucine (*Tropaeolum majus* L.). **Comptes Rendus**, v. 252, p.1510-1511, 1961.

REY, L. **Parasitologia**. Leishmania e leishmaníases: os parasitos. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001, p. 215-265.

RITTER, M.R; SOBIERAJSKI, G.R.; SCHENKEL, E.P.; MENTZ, L.A. Plantas usadas como medicinais no município de Ipê, RS, Brasil. **Rev. Bras. Farmacognosia**. v. 12, n. 2, p. 51-62, 2002.

SALLÉ JL. O totum em fitoterapia. São Paulo: Robe, 1996. p.118.

SANTA CRUZ, N.C.; AYALA, M.I.G.; CASTILLO, V.B.; RUITÓN, C.M.F. Avances en la investigacion de tioglicosidos em plantas del genero *Tropaeolum*, actividad antibacteriana y antifungica. **Bol. Soc. Quím. Perú**, v.57, p. 235-245, 1991.

SILVERSTEIN, M.D.; HEIT, J.A.; MOHR, D.N. **Arch Intern Med.**, v.158, p.585-593, 1998.

SPARRE, B. **Flora ilustrada catarinense. Tropaeoláceas**. ITAJAÍ: Pub. Herbário Barbosa Rodrigues, p. 3-25, 1972.

STANDFORD University. Coagulation research. Disponível em: www.ssrl.slac.stanford.edu/research/images/thrombin_fig1.gif. Acesso em 01 de setembro de 2006.

STEINBERG, D. Clinical trials of antioxidants in arterioesclerosis: are we doing the right thing? **Lancet**, v.346, p. 36-38, 1995.

STUBBS, M.T., BODE, W. A player of many parts: a spotlight on thrombin structure. **Thromb. Res.** v.69, p.1-58, 1993.

TADA, H.; SHIHO, O.; KUROSHIMA, K.; KOYAMA, M.; TSUKAMOTO, K. An improved colorimetric assay for interleukin 2. **J. Immunol. Methods.** 93: 157-165, 1986.

TALEB-CONTINI, S.H.; SALVADOR, M.J.; BALANCO, J.M.F.; ALBUQUERQUE, S.; OLIVEIRA, D.C.R. Antiprotozoal effect of crude extracts and flavonoids isolated from *Chromolaena hirsuta* (Asteraceae). **Phytother. Res.** v.18, p. 250-254, 2004.

TANAKA, A.M. **Isolamento e caracterização de um inibidor da atividade coagulante da trombina do sangue da serpente *Bothrops jararaca* (Wied, 1824).** Tese de doutorado. Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo. 2002.

TEMPONE, A.G.; BORBOREMA, S.E.T.; ANDRADE JR, H.F.; AMORIM_GUALDA, N.C.; YOGI, A.; CARVALHO, C.S.; BACHIEGA, D.; LUPO, F.N.; BONOTTO, S.V.; FISCHER, D.C.H. Antiprotozoal activity of Brazilian plant extracts from isoquinoline alkaloid-producing families. **Phytomedicine.** v.12: 382-390, 2005.

THOMPSON, J.M. **Blood coagulation and haemostasis – a practical guide.** 2ed. Edinburg: Churchill Living Stone, 1980. 369p.

TOLLEFSEN, D.M., FEAGLER, J.R.; MAJERUS, P.W. **J. Biol. Chem.**, v.249, p. 2646-2651, 1974.

TOHTI, I.; TURSUN, M.; UMAR, A.; TURDI, S.; IMIN, H.; MOORE, N. Aqueous extracts of *Ocimum basilicum* L. (sweet basil) decrease platelet aggregation induced by ADP and thrombin in vitro and rats arterio-venous shunt thrombosis in vivo. **Thrombosis Research**, v.118, p.733—739, 2006.

TRENTO, F.; CATTANEO, F.; PESCADOR, R.; PORTA, R.; FERRO, L. Antithrombin activity of an algal polysaccharide. **Thrombosis research.** 102: 457-465, 2001.

UNDERHILL, E.W. Secondary plant products. **Encyclopedia of Plant Physiology.** Ed. New Series. New York. V. 8. p. 493-511. 1980.

VICHANOVA, S.A.; ADGINA, V.V.; IZOSIMOVA, S.B. Essential oils as source of new antifungal preparations. **Phytochemistry.** v.27, 1972, p.1993-1998.

WAGNER, H.; BLADT, S. **Plant drug analysis: a thin layer chromatography atlas.** 2.ed. London: Springer-Verlag, 1996. 384p.

WANG, D.; GIRARD, T.J.; KASTEN, T.P.; LACHANCE, R.M.; MILLER-WIDEMAN, M.A.; DURLEY, R.C. Inhibitory activity of unsaturated fatty acids and Anacardic acids toward soluble tissue factor-factor VIIa complex. **J. Nat. Prod.** 61: 1352-1355, 1998.

WATERMAN, P.G.; MOLE, S. **Analysis of phenolic plant metabolites**. London: Blackwell Scientific Pub., 1994. 445p.

WEITZ JI.; HIRSH, J. New antithrombotic drugs. In: COLMAN, RW; HIRSH J; MARDER VJ; CLOWES AW & GEORGE JN, eds. **Hemostasis and thrombosis. basic principles and clinical practice**. 4 ed., Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2001, p.1529-1544.

WEITZ, J.I.; HIRSH, J. New anticoagulant drugs. **Chest**. 119, suppl 1:95-107, 2001.
apud MAFFEI, F.H.A. A evolução do tratamento anticoagulante do tromboembolismo venoso. **J Vasc Br.** v. 1, n.2, 2002. p.85-86.

WESKLER, B.B.; LEY, C.W.; JAFFE, E.A. **J. Clin. Invest.** 62: 923-930.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. WHO. **Quality control methods for medicinal plant materials**. Geneva: World Health Organization, 1998. 115p.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. The leishmaniasis and Leishmania HIV co-infections. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs116/en>. Acesso em 12 de julho de 2006.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Atlas of cardiovascular diseases. Disponível em: http://www.who.int/cardiovascular_diseases/resources/atlas/en/index.html. Acesso em 03 de setembro de 2006.

YAZDANPARAST, R.; MIANABADI, M. The effect of the active of *Dendrostellera lessertii* on the adhesive property of human platelets and HL-60 cells. **Life Sciences**. 75: 733-739, 2004.

YOON, S-J.; PEREIRA, M.S.; PAVÃO, M.S.G.; HWANG, J-K.; PYUN, Y-R.; MOURÃO, P.A.S. The medicinal plant *Porana volubilis* contains polysaccharides with anticoagulant activity mediated by heparin cofactor II. **Thrombosis Research**. 106: 51– 58, 2002.

ZANETTI, G.D.; MANFRON, M.P.; HOELZEL, S.C.S.M.; PAGLIARIN, V.P.; MOREL, A.F. Toxicidade aguda e atividade antibacteriana dos extratos de *Tropaeolum majus* L. **Acta Farm. Bonaerense**, v.22, n.2, p.159-162. 2003.

ZANETTI, G.D.; MANFRON, M.P.; HOELZEL, S.C.S. Análise morfo-anatômica de *Tropaeolum majus* L. (Tropaeolaceae). **IHERINGIA, Sér. Bot.**, v. 59, n. 2, p.173-178, 2004.

ZIMMERMAN, G.A. MCINTYRE, T.M.; MEHRA, M.; PRESCOTT, S.M. **J. Cell Biol.**, v.110, p.529-550, 1990.

ZURLO, C.; BRANDÃO, M. **As ervas comestíveis**. Rio de Janeiro: Globo Rural, 1989. p. 50-2 e 149-52.