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

Estudo farmacognóstico e farmacológico de
***Leonurus japonicus* Houtt**

Elisângela Severina de Melo

Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE

Orientador:

Prof. Dra. Elfriede Marianne Bacchi

São Paulo

2006

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

Estudo farmacognóstico e farmacológico de
***Leonurus japonicus* Houtt**

Elisângela Severina de Melo

Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE

Orientador:

Prof. Dra. Elfriede Marianne Bacchi

São Paulo

2006

Elisângela Severina de Melo

**Estudo farmacognóstico e farmacológico de
Leonurus japonicus Houtt**

Comissão Julgadora
da
Dissertação para obtenção do grau de Mestre

Profa. Dra. Elfriede Marianne Bacchi
orientador/presidente

1º. examinador

2º. examinador

São Paulo, _____ de _____.

Pedi força e vigor, Deus me mandou dificuldades para me fazer forte,
Pedi sabedoria, recebi problemas para resolver,
Pedi prosperidade, recebi energia e o cérebro para trabalhar,
Pedi coragem, recebi situações para superar,
Pedi favores, recebi oportunidades,
Afim não recebi nada do que queria.
Recebi tudo o que precisava

Mestrado é sinônimo de força, sabedoria, prosperidade, coragem, favores...

MINHAS PRECES FORAM ATENDIDAS

AGRADECIMENTOS

A Deus, por sempre me mostrar que existe uma força maior além de nós e que apesar das dificuldades, nunca me deixa desistir.

À minha orientadora, prof^a Dra. Elfriede Marianne Bacchi, a quem tenho muito a agradecer, pelo grande apoio, por proporcionar-me a oportunidade desse mestrado, pela compreensão, pelos conhecimentos, ensinamentos, paciência e amizade. Também por ser um exemplo de organização e perseverança, uma pessoa que nunca desiste e está sempre pronta para atendermos, não importando o dia e a hora.

À prof^a Dra. Edna Tomiko Kato, pela amizade, sugestões e ensinamentos dados ao longo do trabalho e pela contribuição na caracterização farmacobotânica.

À prof^a Dra. Dominique Corinne Hermine Fischer, pela amizade, palavras de motivação nos momentos difíceis e pela ajuda na conquista da bolsa.

À prof^a Dra. Silvia Berlanga de Moraes Barros, pela orientação e disponibilidade do laboratório no ensaio antioxidante e em todos os momentos necessários.

Ao Professor Doutor Paulo Chanel D. Freitas pelo apoio, dicas e congressos que disponibilizou com grande amor e simpatia, aos quais sou muito grata.

Ao Professor Vicente O. Ferro pelas palavras de apoio e carinho.

À prof^a Dra. Elza Mamizuka, e seu pós-graduando Nilton Lincopan pela pronta disposição com que auxiliaram no ensaio antimicrobiano.

Ao técnico Roberto de Jesus Honório, pelo auxílio e amizade.

À funcionária Maria Lúcia Ferreira da Conceição, pela sua amizade e palavras de motivação em todos os momentos.

À secretária Elisabete Claro de Souza Paiva por todas as dicas, ajuda e simpatia.

Ao Dr. Pedro Melillo do Centro de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas da UNICAMP, pela orientação agrônômica.

Ao Professor Dr. José Rubens Pirani, do Departamento de Botânica do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, pela identificação do material vegetal.

Às bibliotecárias Leila de Carvalho Aranha e Adriana de Almeida Barreiros, pela orientação nas referências bibliográficas.

À Silvânia M. P. Neves e às técnicas do Biotério da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, pelos animais fornecidos para os ensaios antiúlcera.

À prof^a Dra. Meire Jorge Cunha, prof^o Dr Sérgio Faloni e Franceline Reynoud, que desde o início me incentivaram, apoiaram com a amizade e suas influências administrativas na Universidade do Oeste de Santa Catarina para que esse mestrado fosse realizado.

Apoio financeiro: Coordenação de aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

À sr^a Elaine Midori Ychico , sr. Jorge A. de Lima, da secretaria de pós-graduação pela solicitude e dedicação com que sempre nos atenderam.

Ao meu grande amigo, companheiro e namorado Eitor Soares de Abreu, pela ajuda, compreensão, carinho e motivação que soube demonstrar nesse tempo todo. Por alguns meses e fins de semana no computador sem reclamar, apenas ajudando.

À minha família, pais, irmãos e sobrinhos, pelo grande apoio financeiro, compreensão, paciência e palavras de auto estima.

Mara, Dani, Renata, Viviane, Sheila, Jaqueline, Margarete, que agüentaram as noites em claro e barulhos na casa, alteração de humor, quando necessário, para que esse momento se realizasse.

Aos meus amigos e parceiros do laboratório, Rogério, Ana, Larissa, Biba, Rosilene pela amizade e grande contribuição na execução da parte experimental.

Aos meus amigos e parceiros pelo apoio, André, Nzi, Roberto Adati, Raquel, Tati, Fabiana, Maria Carolina.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	1
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
3	OBJETIVOS	23
4	MATERIAL E MÉTODOS	24
4.1	CULTIVO	24
4.2	ANÁLISE DE SOLO	24
4.3	COLETA, IDENTIFICAÇÃO E PREPARO DO MATERIAL VEGETAL	24
4.4	CARACTERIZAÇÃO MACROSCÓPICA E MICROSCÓPICA	25
4.5	ASPECTOS QUÍMICOS	26
4.5.1	Elaboração dos extratos	26
4.5.2	Preparo das frações clorofórmica, acetato de etila, etanol e etanol 50%	26
4.5.3	Triagem fitoquímica	27
4.5.4	Quantificação de taninos na droga vegetal e no EHEL	34
4.5.5	Quantificação de flavonóides na droga vegetal e no EHEL	37
4.5.6	Perfil cromatográfico	40
4.6	ESTUDO FARMACOLÓGICO	42
4.6.1	Ação antiúlcera: modelo de indução aguda por etanol e ácido clorídrico	42
4.6.2	Atividade antibacteriana	45
4.6.3	Atividade antioxidante	47
5	RESULTADOS	49
5.1	ANÁLISE DO SOLO	49
5.2	RENDIMENTO DO EHEL E DAS FRAÇÕES	51
5.3	CARACTERIZAÇÃO MACROSCÓPICA E MICROSCÓPICA DA DROGA VEGETAL	52
5.4	ASPECTOS QUÍMICOS	61
5.4.1	Triagem fitoquímica da droga vegetal e do EHEL	61
5.4.2	Extração do óleos voláteis por hidrodestilação	63
5.4.3	Índice de espuma	63
5.4.4	Quantificação de taninos na droga vegetal e no EHEL	63
5.4.5	Quantificação de Flavonóides na droga vegetal e no EHEL	64
5.4.6	Perfil Cromatográfico	65
5.5	ESTUDO FARMACOLÓGICO	67
5.5.1	Ação antiúlcera: modelo de indução aguda por etanol e ácido clorídrico	67
5.5.2	Atividade antimicrobiana	81
5.5.3	Atividade antioxidante	83
6	DISCUSSÃO	90
7	CONCLUSÕES	105
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	107
9	ANEXOS OBRIGATÓRIOS	132

Lista de figuras

Figura 1. <i>L. japonicus</i> A) Vista frontal, ramos floridos; B e C) Hábito.....	56
Figura 2. <i>L. japonicus</i> – Macroscopia.....	57
Figura 3. <i>L. japonicus</i> – Microscopia da folha	58
Figura 4. Corte transversal da nervura da folha.	59
Figura 5. <i>L. japonicus</i> - Caule	60
Figura 6. Perfil Cromatográfico com sistema A.	65
Figura 7. Perfil Cromatográfico com sistema B	66
Figura 8. Imagens dos estômagos do grupo de ratos controle	67
Figura 9. Imagens dos estômagos do grupo de ratos tratados	68
Figura 10. Médias das Áreas Totais de Lesão (ATL).	68
Figura 11. Médias do Índice de Lesão Ulcerativa (ILU).....	69
Figura 12. Médias da Área Relativa de Lesão (ARL)	69
Figura 13. Imagens dos estômagos do grupo de ratos controle..	70
Figura 13. 1. Imagens dos estômagos do grupo de ratos tratados.	70
Figura 13. 2. Imagens dos estômagos do grupo tratado na fração acetato de etila..	71
Figura 13. 3. Imagens dos estômagos do grupo tratado com fração etanol 50%. ...	71
Figura 13. 4. Imagens dos estômagos do grupo tratado com etanol.	72
Figura 13. 5. Médias da Área Total de Lesão, utilizando as frações.....	72
Figura 13. 6. Redução percentual da área total das lesões nas frações.....	73
Figura 13. 7. Médias da Área Relativa de Lesão das frações	74
Figura 13. 8. Redução percentual da área relativa das lesões nas frações.....	74
Figura 13. 9. Médias do Índice de Lesão Ulcerativa nas frações.	75
Figura 13. 10. Redução percentual do ILU das frações.....	76

Figura 14. Médias do ILU nas doses 100, 200 e 400 mg/kg..	77
Figura 14. 1. Redução percentual do ILU nas doses de 100,200 e 400 mg/kg	78
Figura 14. 2. Médias do Área Relativa de Lesão, nas doses 100, 200 e 400 mg/kg	78
Figura 14. 3. Redução percentual da ARL nas doses de 100,200 e 400 mg/kg. ...	79
Figura 14. 4. Médias da ATL com as doses 100, 200 e 400 mg/kg.....	79
Figura 14. 5. Redução percentual da ATL nas doses de 100,200 e 400 mg/kg.....	80
Figura 14. 6. Redução percentual das úlceras nas doses de 100,200, 400 mg/kg.	80
Figura 15. Capacidade antioxidante do EHEL de <i>L. japonicus</i>	84
Figura 16. Valores utilizados para realização do EC ₅₀ , na fração clorofórmica	85
Figura 17. Valores utilizados para realização do EC ₅₀ , na fração acetato de etila ...	86
Figura 18. Valores utilizados para realização do EC ₅₀ , na fração do etanol.....	87
Figura 19. Valores utilizados para realização do EC ₅₀ , referente a vitamina E.	88
Figura 20. EC ₅₀ das frações de <i>L. japonicus</i> em relação à vitamina E.....	89

Lista de tabelas

Tabela 1. Revisão bibliográfica.....	3
Tabela 2. Valores de análises químicas de solos.....	49
Tabela 3. Resultados de análises de micronutrientes de solos.....	50
Tabela 4. Triagem Fitoquímica	62
Tabela 5. Porcentagem de taninos.....	63
Tabela 6. Porcentagem de flavonóides	64
Tabela 7. Ensaio antimicrobiano	82
Tabela 8. Capacidade antioxidante do EHEL.....	83
Tabela 9. Capacidade antioxidante da fração clorofórmica	85
Tabela 10. Capacidade antioxidante da fração acetato de etila	86
Tabela 11. Capacidade antioxidante da fração de etanol.....	87
Tabela 12. Capacidade antioxidante da vitamina E	88
Tabela 13. Comparação dos resultados das análises de solo.....	91
Tabela 14. Teor de flavonóides, segundo Wadt (2000).	93
Tabela 15. Comparação dos resultados da triagem química da droga.....	95
Tabela 16. Comparação dos resultados e metodologia do antimicrobiano	97
Tabela 17. Comparação dos resultados do ensaio antiúlcera	100
Tabela 18. Comparação dos resultados do ensaio antioxidante	103

RESUMO

L. japonicus, o popular “rubim”, pertence à família Lamiaceae. O presente trabalho tem como objetivo contribuir e complementar trabalho realizado anteriormente sobre a mesma espécie, em relação à caracterização farmacobotânica, aspectos químicos e farmacológicos, incluindo atividade antiúlcera, antioxidante e antimicrobiana.

A droga, constituída de folhas e caule, foi caracterizada macro e microscopicamente.

O extrato hidroetanólico 70% liofilizado (EHEL), preparado com as partes aéreas, obtido através de percolação, apresentou na triagem fitoquímica presença de flavonóides, taninos, saponinas e 0,06% de óleos essenciais. Os taninos presentes na droga vegetal e no extrato foram quantificados e os teores foram respectivamente de 0,06% e de 0,35%. O teor de flavonóides na droga vegetal foi de 0,76% e no EHEL, de 2,3%.

O extrato foi fracionado por solventes de polaridades diferentes como clorofórmio, acetato de etila, etanol 50% e etanol. Foi determinado o perfil cromatográfico para o extrato e frações. O extrato apresentou atividade antiúlcera extremamente significativa, no modelo de indução por etanol acidificado, administrado na dose de 400 mg/kg, por via oral, reduzindo Índice de Lesão, Área Total de Lesão e Área Relativa de Lesão, sendo mais evidente no próprio extrato e nas frações clorofórmica e acetato e etila, comparativamente ao controle. Não houve inibição de crescimento de *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Campylobacter coli* em uma concentração de até 2.000 µg/mL, verificado através da determinação da concentração mínima inibitória pelo método de difusão em placa. O extrato não apresentou resultado significativo em relação a atividade antioxidante testada através do método que reduz o radical 2,2'-difetil-1-picrilhidrazil (DPPH), e após o equilíbrio da reação, permite calcular a quantidade de antioxidante gasta para reduzir 50% do DPPH.

ABSTRACT

L. japonicus, popularly known as “rubim”, belongs to the Lamiaceae family. The objective of the present study is to contribute and complement previous investigations on the same species, in relation to pharmacobotanical characterization, chemical and pharmacological aspects, including antiulcer, antioxidant e antibiotic activities.

The drug, formed of leaves and stalk, was macro e microscopically qualified.

Flavonoids, tannins, saponins and 0.06% of essential oils are present in the lyophilized 70% hydroalcoholic extract (HE), obtained through percolation. Tannins are present at 0,06% in the vegetable drug and at 0,35% in the extract. The content of flavonoids in the drug was at 0,76% and in the extract (HE), at 2,3%.

The extract was fractioned by solvents of different polarities as chloroform, ethyl acetate, absolute ethanol and 50% ethanol. The chromatographic profile of the extract and fractions was determined. The extract, orally administered at the dose of 400 mg/kg, presented extremely significant antiulcer activity in the acidified ethanol induction model, by reduction of the Index of Lesion, Total Area of Lesion and Relative Area of Lesion. The values of the extract and of chloroformic and ethyl acetate fractions were most evident, in relation to control. There was no inhibition of growth of *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Campylobacter coli* at a concentration up to 2.000 µg/mL, verified through the the minimum inhibitory concentration by the plate diffusion method. The extract didn't present significant result in relation to antioxidant activity tested through the method that reduces the radical 2,2'-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), and after the balance of the reaction, it allows to calculate the amount of antioxidant necessary to reduce 50% of DPPH.

1 INTRODUÇÃO

As plantas medicinais constituem fonte inesgotável de substâncias potencialmente ativas como medicamento, e devem ser consideradas não apenas como matéria-prima, ponto de partida para descoberta de novas moléculas, mas também como um recurso natural com atividade potencial na forma de fitoterápico padronizado e eficaz (DI STASI, 1996).

Estima-se que 80% da população brasileira encontram nos produtos de origem natural, especialmente nas plantas medicinais, a única fonte terapêutica, já que os altos preços tornam proibitivo o acesso de grande parte da população aos medicamentos industrializados (DI STASI, 1996).

Nos Estados Unidos, em 1992, foram alcançados cerca de 4 bilhões de dólares com a venda de medicamentos antiúlcera (ALPER, 1993). Este índice indica a alta necessidade de desenvolvimento de novos medicamentos alternativos com maior acessibilidade da população para este tratamento e outros.

A população utiliza espécies vegetais, no tratamento de doenças, sem conhecimento da atividade farmacológica e da toxicidade, tendo, como consequência positiva, o aumento do número de pesquisas com espécies vegetais.

Leonurus japonicus Houtt. é espécie muito utilizada na região do Oeste do Estado de Santa Catarina. A espécie é confundida com *Leonurus sibiricus* L., que tem o cálice bem menor em relação a outras espécies tropicais do mesmo gênero. Verifica-se, portanto, que o nome correto da espécie previamente identificada como *Leonurus sibiricus* L., é *Leonurus japonicus* Houtt. (HARLEY, 2001).

Esta espécie, pertencente à família Lamiaceae, é originária da Sibéria, encontrando-se disseminada por todo o globo terrestre. Em nosso país, vegeta em quase todas as latitudes, adaptando-se perfeitamente às condições de clima e solo. Encontra-se nos terrenos baldios, com cerca de um metro de altura, com caules e ramos ambos quadrangulares, folhas opostas, simples, linear-lanceoladas, trilobadas discretamente na infância e acentuadamente na

fase adulta, com lobos ligeiramente longo acuminados e dentiformes nas laterais (CD ROOM – Epagri, 2000).

Este grupo de compostos é responsável pelos pigmentos amarelos, vermelhos e laranja das flores (TIMBERLAKE, 1986). Eles também são importantes para o crescimento, o desenvolvimento e a defesa das plantas. São importantes constituintes da dieta humana, encontrados nas frutas, nos vegetais e nas bebidas como o vinho tinto, chás, cafés e cerveja (KUHNAU, 1976). Esta grande interação entre flavonóides, humanos e animais tem estimulado muito interesse na atividade bioquímica e fisiológica desse grupo químico. São capazes de alterar a atividade de enzimas e afetar o funcionamento de muitas células, sugerindo que podem possuir significantes efeitos farmacológicos (DI CARLO, 1999).

Devido ao seu uso popular como antibiótico e antiinflamatório, existe a possibilidade da presença de flavonóides na espécie vegetal, pois estes princípios ativos vêm sendo estudados com muita frequência devido à variedade de efeitos como: ação antiinflamatória, antineoplásica, antibiótica, antiviral, antialérgica, antiúlcera, analgésica, hipoglicemiante, antioxidante, inseticida (PATHAK, 1991).

Rubim é o nome da espécie popularmente mais conhecido mas, devido a sua presença em diferentes regiões, possui as seguintes sinônimas: “amor-deixado, ana-da-costa, macaé, cardíaca, chá-de-frade, coração-de-frade, cordão-de-frade-menor, cordão-de-são-francisco, erva-das-lavadeiras, erva-de-macaé, erva-do-santo-filho, erva-dos-santos-filhos, erva-dos-zangões, erva-macaé, estrela, João-magro, lavadeira, lavanderia, lavantina, levantina, mamangava, mané-magro, mané-turé, marroio, pasto-de-abelha, pau-pra-tudo, quinino-dos-pobres, santos-filhos, sertão, totanga” (CD ROOM – Epagri, 2000).

O nome científico do gênero *Leonurus*, segundo Nascentes (1995), deriva do grego leon, leão e oura, cauda, ou seja, cauda de leão, sendo este termo empregado devido ao aspecto terminal da inflorescência.

A sinônimo científica é relatada como *Leonurus tartaricus* Burm., *Stachys artemisiae* Lour., *Panzeria multifida* Moench., *Panzeria sibirica* Hort., *Leonurus manshuricus* Yabe (MOREIRA, 1958).

Este trabalho pretende contribuir e complementar o trabalho de Wadt (WADT, 2000), no conhecimento da espécie em estudo em relação à

caracterização botânica, aspectos químicos e farmacológicos, incluindo atividade antiúlcera, antioxidante e antimicrobiana. No presente trabalho estão sendo estudados espécimes de local diverso da pesquisa anterior.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

A Tabela 1 refere-se à revisão bibliográfica foi elaborada em forma de tabela, de modo a facilitar a consulta.

Tabela 1. Revisão bibliográfica

Espécie Vegetal	Componentes químicos	Atividades biológicas/	Botânica	Geral	Referências
<i>L. sibiricus</i>			Descrição macroscópica folhas e flores		PHARMACOPEIA DOS ESTADOS UNIDOS DO BRASIL, 1926
<i>L. sibiricus</i>	Óleo essencial	Utilizado como antireumático e antiespasmódico			PEREIRA, 1929
<i>L. sibiricus</i>	Quantificação de leonurina: 0,05%				KUBOTA e NAKASHIMA, 1930
<i>L. sibiricus</i>	Identificação de saponinas e óleo				PATER, 1930

	essencial, quantificação de cinzas				
<i>L. sibiricus</i>		Testes farmacológicos em rãs, camundongos, gatos, coelhos			KUBOTA e NAKASHIMA, 1930
<i>L. sibiricus</i>	Doseamento de óleo				HSU, 1932
<i>L. sibiricus</i>	Isolamento de leonurina				HSU, 1934
<i>L. sibiricus</i>	Alcalóides				TANG e TSENG, 1934
<i>L. sibiricus</i>	Compostos químicos que eliminam a espécie				ANON, 1938
<i>L. sibiricus</i>	Isolamento de leonuridina				TANG e HSÜ, 1940
<i>L. sibiricus</i>	Isolamento de polissacarídeo: estaquiose				MURAKAMI, 1943
<i>L. sibiricus</i>			Classificação		MOREIRA, 1957

			botânica		
<i>L. sibiricus</i>				Solução para erradicação da semente	KOO, 1958
<i>L. sibiricus</i>			Estrutura macro e microscópica da raiz e caule		MOREIRA, 1958 a
<i>L. sibiricus.</i>			Estrutura macro e microscópica da folha e pecíolo		MOREIRA, 1958 b
<i>L. sibiricus</i>			Estrutura macro e microscópica da flor, pólen, fruto e semente		MOREIRA, 1958 c
<i>L. sibiricus</i>			Sinônimas	Origem e usos populares	MOREIRA, 1958 d
<i>L. sibiricus.</i>		Anti-hipertensivo			KARPOVICH, 1961
<i>L. sibiricus</i>	Leonurina				GOTO <i>et al</i> , 1962
<i>L. sibiricus</i>	0,1% de rutina e 0.03% de ácido fumárico				HAYASHI, 1962

<i>L. sibiricus</i>	Alcalóides	Aumenta o movimento e o tônus uterino			HE, YU e WANG, 1962
<i>L. sibiricus</i>	Percentual de taninos do grupo pirocatecol, 9.43% nas flores, 9.91% folhas e 5.24% caules				ZHELNOV e GRAZHDAN, 1962
<i>L. japonicus</i>	Percentual de alcalóides nas flores 0.218%, folhas 0.17%, caule 0.44%	Hipotensivo, sedativo			ZHELNOV e GRAZHDAN, 1962
<i>L. sibiricus</i>	Leonurina				HAYASHI, 1963
<i>L. sibiricus</i>	Leonurina				KISHI <i>et al</i> , 1968
<i>L. sibiricus</i>	Estrutura e síntese de leonurina				SUGIURA <i>et al</i> , 1969
<i>L. sibiricus</i>	Alcalóides, taninos, flavonóides e saponinas				REUTER e DIEHL, 1970
<i>L. sibiricus</i> , <i>L. glaucescens</i> e <i>L.</i>	Flavonóides 2.56-3.86, alcalóides 1.97-6.47,				CHULTEMSUREN e PETRENKO,

<i>deminutus</i>	taninos 6.02-12.58% e glicosídeos cardiotônicos 0.03-0.1%.					1971
<i>L. sibiricus.</i>	16% de óleo nas sementes, sendo, 42.1% ácido oleico, 20.8% linoleico, 19.3% palmítico, 5.8% ácido esteárico					BADAMI e PATIL, 1975
<i>L. sibiricus</i>	Isolamento o nitrato de leonurina					YU et al., 1981
<i>L. sibiricus</i>	Nitrato de Leonurina Isolamento de					SAVONA et al.,

	diterpenos labdanos: leosibirina, isoleosibirina, leosibiricina				1982
<i>L. sibiricus</i>			Sinonímia: <i>Leonurus sibiricus</i> L.; <i>Leonurus</i> <i>heterophyllus</i> Sweet, <i>Leonurus</i> <i>tartaricus</i> Burm, <i>Stachys</i> <i>artemisiae</i> Lour.		PENSO, 1983
<i>L. sibiricus</i>			Descrição macroscópica, sinonímia		CORREA, 1984
<i>L. sibiricus</i>	Isolamento dos componentes de óleo essencial por CCD e cromatografia gasosa	Diurese diminuída e causou movimentos espontâneos no útero			SHIN, 1984

<i>L. sibiricus</i>	Alcalóides: leonurina e saquidrina				LUO, 1985
<i>L. sibiricus</i>	Isolamento e quantificação de alcalóides				XU e DONG, 1985
<i>L. sibiricus</i>				Investigações sobre cromossomos somáticos	KUNDU e SHARMA, 1986
<i>L. sibiricus</i>		Ação depressora sobre o sistema nervoso central e baixa toxicidade do extrato			OGA <i>et al</i> , 1986
<i>L. heterophyllus</i> Sweet.	Doseamento de leonurina				TANG, 1987
<i>L. sibiricus</i> .	Doseamento de óleo essencial: sendo a espécie considerada pobre neste grupo				KOKKINI, VODOU e KAROUSOU, 1989

	químico					
<i>L. sibiricus</i>	Determinação de estaquidrina					TANG, WANG e LU, 1989
<i>L. sibiricus</i>	Estudo do oxalato de cálcio					WANG, 1989
<i>L. sibiricus</i>	Determinação de silício através de colorimetria					ZHAO <i>et al</i> , 1990
<i>L. heterophyllus</i> L.	Isolamento de Preispanolona (diterpeno labdano)					HON <i>et al</i> , 1991
<i>L. heterophyllus</i> Sweet.	Preispanolona	Antagonista do fator de ativação plaquetária				LEE <i>et al</i> , 1991
<i>L. sibiricus</i> .		Prevenção de tumores mamários em ratos				NAGAZAWA <i>et al</i> , 1991
<i>L. sibiricus</i>		Relação entre a importância da sinergia dos compostos e o				NAGAZAWA <i>et al</i> , 1992

		efeito quimiopreventivo			
<i>L. sibiricus</i>				Controle de germinação	TAKAKI, 1992
<i>L. heterophyllum</i> Sweet.	Isolamento de labdanos diterpênicos: preleoeterina e leoeterina,				HON <i>et al.</i> , 1993
<i>L. sibiricus</i>		Propriedades antimicrobianas, regulatório da menstruação e fluxo menstrual			HUANG, 1993
<i>L. sibiricus</i>	Presença de grupos químicos: alcalóides, taninos, óleos essenciais		Descrição macroscópica, tipos de solo, sinonímia	Uso popular	MARTINS <i>et al.</i> , 1995
<i>L. sibiricus</i>		Estimulante sobre o útero, atuando nos receptores H ₁ e			SHI <i>et al.</i> , 1995

		alfa adrenérgicos			
<i>L. sibiricus</i>		Contraceptivo e preventivo de doenças venéreas			LI <i>et al</i> , 1996
<i>L. heterophyllus</i> Sweet.	Identificação de cicloleuropeptídeos				MORITA <i>et al</i> , 1996
<i>L. sibiricus</i>		Atividade antibiótica			Wadt <i>et al</i> , 1996
<i>L. sibiricus</i>	Isolamento de ácido graxo				AITZETMÜLLER, TSEVEGSUREN e VOSMANN, 1997
<i>L. sibiricus</i>		Inibidor da lipoxigenase “radical scavenger”			KIM, 1998
<i>L. japonicus</i>				Fitotoxicidade dos fenólicos	KOBAYASHI e ITO, 1998
<i>L. japonicus</i>	Novos glicosídeos fenólicos: leonurisídeo				SUGAYA <i>et al</i> , 1998

	A e B				
<i>L. heterophyllus</i> Sweet.				Efeitos das diferentes frequências ultrassônicas na extração da leonurina	GUO e YANG, 1999
<i>L. japonicus</i>		Cosmético clareador de pigmentos da pele			TANAKA e UEBAYASHI, 1999
<i>L. japonicus</i>		Estimulante do crescimento e cabelo			TAKEDA, TSUJI e UEMURA, 2000
<i>L. sibiricus</i>				Refinamento e utilização dos ácidos graxos insaturados	LI e LU, 2000
<i>L. sibiricus</i>		Revisão da aplicação em tumores			NAGAZAWA, 2000

		mamários			
<i>L. sibiricus</i>				Método de identificação de constituintes de extratos vegetais	RASKIN, 2000
<i>L. sibiricus</i>		Componente de produto para diminuir a imunossupressão cutânea causada pela radiação ultravioleta.			TANAKA <i>et al</i> , 2000
<i>L. sibiricus</i>	Quantificação de antocianinas				BANERJEE e DE, 2001
<i>L. japonicus</i>	Quantificação de clorofila				CASTRILLO <i>et al</i> , 2001
<i>L. sibiricus</i>				Correção nome <i>Leonurus sibiricus</i> Linné	HARLEY e PATON, 2001
<i>L. sibiricus</i>	Isolados compostos				HAYASHI, IKOMA

	fenólicos e iridóides: (+)-Pinoresinol O-b-D- glicopiranosídeo, 8- acetilarpagídio, apigenina 7-O-b-D- glicopiranosídeo, apigenina-7- neoesperidósido e quercetina 3-neoesperidósido				e DEUAMA, 2001
<i>L. sibiricus</i>	Isolamento e quantificação de leonurina				HONG ¹ et al, 2001
<i>L. sibiricus</i>		Revisão da aplicação na cosmetologia			ITO, 2001
<i>L. japonicus</i>	Estaquidrina, determinada por cromatografia líquida de alta eficiência.				JIANG, 2001

<i>L. sibiricus</i>		Inibidor da 5-lipoxigenase; utilizado como preventivo de alergia.			KOSAKI <i>et al</i> , 2001
<i>L. sibiricus</i>			Atividade inseticida através da toxicidade dos constituintes voláteis		LEE <i>et al</i> , 2001
<i>L. japonicus</i>		Previne cabelos cinzas(através da ativação da tirosinase e inibição da redutase).			MIZUMOTO <i>et al</i> , 2001
<i>L. japonicus</i>	Adenosídeos para couro cabeludo e cabelo	Evita alopecia			NAKAZAWA, OGO e TAJIMA, 2001
<i>L. sibiricus</i>	alcalóides	Antiinflamatória e			LI e CAI, 2002

		antidismenorréia		
<i>L. japonicus</i>	Identificação de dois compostos pelos métodos de cromatografia em coluna, cromatografia líquida de alta eficiência métodos: 2,6-dimetil-2E,7-octadien-1,6-diol e ajuosídeo			WANG, YUE e ZHU, 2002
<i>L. sibiricus</i>			Preparações nanométricas	YANG, 2002
<i>L. sibiricus</i>			Preparações nanométricas, (pílulas, supositório, grânulos, filmes, cápsulas e outros)	YANG, 2002
<i>L. sibiricus</i>	Análises de			COMETTO et al,

	aminoácidos				2003
<i>L. japonicus</i>	Deteção do Antioxidante melatonina				CHEN <i>et al</i> , 2003
<i>L. sibiricus</i>	Isolamento da sitosterona	Ação antiarrítmica			HOTTA <i>et al</i> , 2003
<i>L. sibiricus</i>		Inibidor e neuramidase			LEE <i>et al</i> , 2003
<i>L. sibiricus</i>	Extração de alcalóides				MAO e MAO, 2003
<i>L. sibiricus</i>	Isolados furanoditerpenos lactônicos	Atividade antitumoral, atividade citotóxica contra células leucêmicas			SATOH <i>et al</i> , 2003
<i>L. japonicus</i>		Anti-rugas			OSUMI <i>et al</i> , 2003
<i>L. japonicus</i>		Revisão dos estudos químicos, farmacológicos e aplicações			RUAN <i>et al</i> , 2003

		clínicas			
<i>L. sibiricus</i> .		Componente promotor de penetração de tintura nos cabelos			YAGI <i>et al</i> , 2003
<i>L. sibiricus</i>	Estaquidrina				ZHAO <i>et al</i> , 2003
<i>L. japonicus</i> e <i>macranthus</i>	Determinação de estaquidrina e leonurina pelo método de cromatografia líquida de alta eficiência				CHAO, MA e ZHOU, 2004
<i>L. sibiricus</i>		Avaliação da capacidade antioxidante pelo método de microplacas			CHEN <i>et al</i> , 2004
<i>L. japonicus</i>	Identificados metais pesados				CHEN <i>et al</i> , 2004

<i>L. sibiricus</i>	Danos causados pelos métodos que utilizam ultrassom			GUO, 2004
<i>L. sibiricus</i>		Inibição da xantina oxidase		NGUYEN <i>et al</i> , 2004
<i>L. sibiricus</i>		Componente de cosmético antienvelhecimento: estimuladores da produção de ácido láctico e ácido hialurônico		SAKAI, NAKAGAWA e SUMITA, 2004
<i>L. japonicuse macranthus</i> L.		Componente de cosmético que contém acelerador de N-acetilglucosamina, glicosamina, retinol, retinol palmitato		SUMITA <i>et al</i> , 2004

<i>L. sibiricus</i>		Ação da leonurina na creatina quinase			WANG, ZHANG E YONG, 2004
<i>L. sibiricus</i>		Componente de cosmético oral: antiinflamatório			WATANABE, 2004
<i>L. japonicus</i>		Componente no dentífrico: antioxidante			WATANABE, 2004
<i>L. japonicus</i>		Componente de pomada contra acne			YASUDA e OGAWA, 2004
<i>L. sibiricus.</i>	Quantificação de canferol, rutina, hiperosideo, quercetrina, quercetina, por eletroforese capilar				XU et al, 2005
<i>L. sibiricus</i>	Novo flavonóide: quercetina-3-O-[3-(4-hidroxi-3,5-				YUE, WANG e LI, 2005

	dimetoxibenzoil)-a-L- ramnopiranosil]-(1,6)-β- D-galactopiranósido (I).				
--	---	--	--	--	--

|

3 OBJETIVOS

São objetivos do presente trabalho:

Pesquisa das ações antibiótica e antiúlcera de espécimes de *L. japonicus* do Estado de Santa Catarina, em comparação com espécimes do Estado de São Paulo

Dentro destes objetivos gerais, temos os seguintes objetivos específicos:

- Caracterização macro e microscópica das folhas, pecíolo e caule;
- Elaboração dos extratos das partes aéreas da espécie;
- Verificação dos principais grupos de princípios ativos, através da triagem fitoquímica e da determinação do perfil cromatográfico do EHEL e das frações clorofórmio, acetato de etila, etanol e etanol 50%;
- Quantificação de flavonóides na droga e no EHEL;
- Quantificação de taninos na droga vegetal e no EHEL;
- Ensaio da atividade antiúlcera no EHEL e nas frações clorofórmio, acetato de etila, etanol e etanol 50%;
- Ensaio da atividade antibiótica no EHEL;
- Ensaio da atividade antioxidante do EHEL e das frações clorofórmio, acetato de etila, etanol e etanol 50%;
- Comparação dos resultados dos espécimes cultivados em Santa Catarina com os de São Paulo (Wadt, 2000).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Cultivo

Folhas, caules e flores *L. japonicus* foram coletadas na região Oeste de Santa Catarina, no bairro Carboni em Videira, em terreno de campo aberto.

4.2 Análise de solo

A análise de solo foi realizada no setor de análise de solos na Esalq (Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz da Universidade de São Paulo), em Piracicaba.

4.3 Coleta, identificação e preparo do material vegetal

O material vegetal, partes aéreas de *L. japonicus*, foi coletado no período da manhã, no mês de Agosto de 2002 e submetido à secagem em estufa com circulação e ar a cerca de 45 °C. A seguir, foi reduzido a pó semifino, segundo a Farmacopéia Brasileira (1959), em moinho de facas e martelos, de marca Thomas. Os ramos floridos secos foram preparados visando a obtenção de exsicatas. A identificação do material vegetal foi realizada por Dr. José Rubens Pirani, do Departamento de Botânica do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo. A exsicata recebeu a identificação ESM 001.

4.4 Caracterização macroscópica e microscópica

A folha, o pecíolo e o caule foram observados quanto a dimensão, forma e aspectos de sua superfície, com auxílio de lupa de pequeno aumento. As mensurações foram feitas com auxílio de régua. A morfologia interna foi observada com o auxílio de microscópio óptico biocular Olympus® CH-2, com aumentos de 40, 100, 200 e 400 vezes.

Para a documentação foi empregado o fotomicroscópio Nikon FX35WA e filme ASA400 SUPRA, para as fotomicrografias.

Foram realizados cortes à mão livre nos sentidos transversal e longitudinal (Oliveira e Akisue, 2000) de caule e folha do vegetal, os quais foram clareados com solução aquosa de hipoclorito de sódio 60% (v/v). A seguir, foram corados com azul de Astra (Roeser, 1972) e/ou safranina 0,1%, tendo-se utilizado solução aquosa de glicerina 50% (v/v), como meio de montagem de preparações semipermanentes, segundo Oliveira e Akisue (2000).

Nos testes histoquímicos foram utilizados floroglucina clorídrica e safranina para lignina (Oliveira e Akisue, 2000; Sass, 1951), solução de Sudam III para materiais lipófilos, como lipídios, suberina e cutina (Sass, 1951), Azul de Astra para celulose (Roeser, 1972) e cloreto férrico para compostos fenólicos (Johansen, 1940), com o objetivo de verificar a constituição dos tecidos das drogas vegetais, segundo Johanssen (1940) e Sass (1951).

Dissociação de elementos celulares

O material, folha e caule, foi fragmentado e imerso em uma solução de ácido acético glacial e água oxigenada 20V, na proporção de 1:1. Submeteu-se o conjunto ao aquecimento a 60°C, por cerca de 15 horas (Franklin, 1945). Após a dissociação da epiderme, lavou-se com água e, posteriormente, efetuou-se coloração e montagem, de acordo com os procedimentos já descritos anteriormente para as preparações semipermanentes.

4.5 Aspectos químicos

4.5.1 Elaboração dos extratos

Extratos foram preparados a partir de 5000g das partes aéreas, contendo folhas, caules e flores, de *L. japonicus*. A droga (partes aéreas secas) foi umedecida com quantidade suficiente de líquido extrator, etanol a 70%, permanecendo a mistura em repouso por aproximadamente 15 minutos.

A droga foi submetida ao processo de percolação de acordo com o método A da Farmacopéia Brasileira (1959), permanecendo, inicialmente em maceração com etanol a 70%, por um período de 24 horas. A percolação ocorreu na velocidade de 4mL/minuto (80 gotas).

O álcool presente no extrato foi evaporado em rotaevaporador Büchi R-114, à pressão reduzida e temperatura limite de 45 °C. O extrato foi, a seguir, liofilizado em aparelho LK4, da marca Edwards do Brasil, para retirada da água residual.

As amostras foram acondicionadas em frascos de vidro fechado, em dessecador contendo sílica.

Este EHEL foi empregado na triagem fitoquímica, na determinação do índice de espuma, no doseamento de taninos, na avaliação do perfil cromatográfico e das atividades antimicrobiana, antioxidante e antiúlcera aguda.

4.5.2 Preparo das frações clorofórmica, acetato de etila, etanol e etanol 50%

Para o fracionamento, foram pesados 80,0g do EHEL e adicionados 800,0 mL de clorofórmio. A mistura foi mantida em agitador magnético por 30 minutos. Após agitação, a mistura foi filtrada. O filtrado (fração clorofórmica) foi concentrado, utilizando-se o banho-maria. Ao resíduo foram adicionados 800mL de acetato de etila; o conjunto foi mantido em agitador magnético por mais 30 minutos, repetindo-se exatamente o procedimento anterior até a obtenção do extrato concentrado. Foram realizadas ainda extrações com etanol

e com etanol 50% em água, sendo estes últimos concentrados e a água residual retirada por liofilização.

4.5.3 Triagem fitoquímica

Os ensaios foram feitos em duplicata, com o pó da droga e EHEL, referentes às partes aéreas de *L. japonicus*. Foram realizados também os mesmos ensaios para drogas padrão de cada grupo de princípios ativos em questão: para alcalóides foram utilizadas sementes de *Paullinia cupana* Kunth., conhecida popularmente como guaraná; para antraquinonas foram ensaiadas cascas de *Rhamnus purshiana*, conhecida popularmente como cáscara sagrada; para glicosídeos cardiotônicos, folhas de *Nerium oleander* L., conhecida popularmente como espirradeira; para flavonóides, frutos de *Dimorphandra mollis*, conhecido popularmente como faveiro; para saponinas, foram ensaiadas cascas de *Quillaja saponaria* Molina, conhecida popularmente como quilaia, para taninos, foram ensaiadas cascas de *Stryphnodendron barbatimão*, *barbatimão*; no intuito de, por comparação, obter-se resultados mais conclusivos. Os métodos empregados foram preconizados por Costa (1994, 2000), Bacchi (1998), Matos (1988), Wasicky (1969) e Farnsworth (1966), sendo os ensaios os seguintes:

4.5.3.1 Alcalóides

2,0g de amostra foram agitados com 20mL de ácido clorídrico a 1% e aquecidos por alguns minutos. A solução foi filtrada e alcalinizada com hidróxido de amônio a 10% e extraída duas vezes com 10,0mL de clorofórmio, cada. A seguir, foi filtrada, evaporada em banho-maria e redissolvida em 2,0mL de ácido clorídrico a 1%. Na solução foram realizados os testes de precipitação com os reativos de Bertrand (ácido silicotúngstico a 5%), Bouchardat (solução aquosa de iodo em iodeto de potássio), Dragendorff (solução aquosa de ácido nítrico 6%, subnitrato de bismuto 8% e iodeto de potássio 23%) e Mayer (solução de cloreto férrico a 1,3% e iodeto de potássio 5%).

O aparecimento de precipitado após a adição dos reagentes foi considerado como indicativo da presença de alcalóides nas drogas vegetais ou no EHEL.

4.5.3.2 Antraquinonas

A 0,2g de amostra foram adicionados 20,0 mL de ácido sulfúrico 2 N e o conjunto foi aquecido até a fervura por 2 minutos. O filtrado foi transferido para um funil de separação e extraído com 10,0 mL de éter etílico. A fase etérea foi transferida para um tubo de ensaio e foram adicionados 2 mL de solução aquosa de hidróxido de sódio 2 N.

O aparecimento de coloração vermelha intensa na fase aquosa após a agitação foi considerado como indicativo da presença de antraquinonas nas drogas vegetais ou no EHEL (Reação de Bornträger).

4.5.3.3 Glicosídeos Cardiotônicos

A 2,0g de amostra foram adicionados 20,0 mL de etanol 50% e o conjunto foi aquecido até fervura por 1 minuto e filtrado a seguir. O processo foi repetido por 2 vezes. Aos filtrados reunidos foram adicionados 10,0 mL de solução saturada de acetato básico de chumbo. Após agitação, a mistura permaneceu em repouso até sedimentação do precipitado formado. O sobrenadante foi transferido para um funil de separação e extraído com 2 porções de 15,0 mL de clorofórmio. A fração clorofórmica foi filtrada através de sulfato de sódio anidro e 3,0 mL foram concentrados em rotavapor Büchi. O resíduo foi retomado com cerca de 0,5 mL de ácido acético R e transferido para um tubo de ensaio contendo 1,0 mL de ácido sulfúrico concentrado.

O aparecimento de coloração vermelha-acastanhada na região de contato dos dois líquidos foi considerado reação positiva para a identificação do núcleo esteroidal (Reação de Liebermann-Burchard).

O aparecimento de coloração violácea intensa no resíduo retomado com solução alcóolica a 1% de ácido 3,5-dinitrobenzóico e 2 gotas de solução de

hidróxido de potássio 1 N é indicativo de reação positiva para identificação do anel lactônico pentagonal, através da reação de Kedde.

O aparecimento de coloração alaranjada intensa, resultante da reação do resíduo retomado com solução aquosa a 0,5% de ácido pícrico (2,4,6-trinitrofenol) e 2 gotas de solução de hidróxido de potássio 1N é indicativo de reação positiva para identificação do anel lactônico pentagonal, através da reação de Baljet.

O aparecimento de anel de coloração vermelho acastanhada, resultante da reação do resíduo retomado com 1,0 mL de ácido acético glacial e 2 gotas de solução aquosa de cloreto férrico a 2% e 1 mL de ácido sulfúrico concentrado é indicativo de reação positiva para identificação de 2-desoxiaçúcares, através da reação de Keller-Killiani.

4.5.3.4 Flavonóides

A 2,0 g de amostra foram adicionados 15,0 mL de etanol 70% e o conjunto foi aquecido até fervura por 2 minutos e filtrado. Estas soluções foram utilizadas nas reações para identificação de flavonóides a seguir:

Reação com cloreto de alumínio

As soluções foram gotejadas em papel de filtro em duas áreas distintas. Em um das áreas foi adicionada uma gota de solução de cloreto de alumínio em etanol 5% (p/v). O papel de filtro foi observado sob luz ultravioleta no comprimento de onda de 366nm. O desenvolvimento ou a intensificação de fluorescência na zona de contato com a solução de cloreto de alumínio foram considerados como reação positiva para flavonóides.

Reação de Shinoda

Às soluções previamente obtidas foram adicionados 2 a 3 fragmentos de magnésio metálico e 1,0 mL de ácido clorídrico concentrado. O desenvolvimento de coloração rósea a vermelha foi considerado como indicativo da presença de flavonóides.

Reação com hidróxidos alcalinos

A 2,0 mL das soluções previamente obtidas foram adicionados 0,5 mL de solução de hidróxido de sódio 1 N. A intensificação da coloração amarela foi considerada reação positiva para flavonóides.

4.5.3.5 Óleos voláteis

As partes aéreas frescas de *L. japonicus*, foram coletadas no período da manhã, no mês de agosto e mantidas sob refrigeração até o momento da extração do óleo volátil.

Avaliação organoléptica

A droga vegetal e o EHEL foram triturados entre os dedos. O desprendimento de odor aromático foi considerado indicativo de presença de óleo volátil.

Avaliação do hidrodestilado com sudam III

Um anel metálico de 1,5 cm de diâmetro por 0,5 cm de altura, contendo a droga vegetal em pó umedecida, foi colocado sobre uma lâmina microscópica. Sobre o anel foi colocada outra lâmina e o conjunto foi levado ao

aquecimento em chapa. Ao condensado formado na lâmina superior foi adicionado Sudam III e uma lamínula foi sobreposta para observação microscópica.

O mesmo procedimento descrito foi realizado empregando-se o EHEL

A presença de gotículas vermelho-alaranjadas dispersas no meio aquoso foi considerada indicativa da presença de substâncias lipofílicas voláteis.

Extração do óleo volátil

O óleo volátil foi extraído utilizando o Método I da FARMACOPÉIA BRASILEIRA (1988), cujo processo consiste em hidrodestilação, com o auxílio do aparelho de Clevenger modificado por WASICKY (1969). As partes aéreas frescas foram cortadas e introduzidas no balão de destilação de boca esmerilhada. Foi adicionada água, de modo a ocupar pouco mais da metade do volume do balão. Acoplou-se o aparelho de Clevenger modificado, preenchendo com água fria a parte do tubo graduado e o tubo de retorno. Promoveu-se o aquecimento do balão até a fervura da água. A extração foi realizada por 8 horas. Após este tempo, foi medido no tubo graduado o volume de óleo obtido. Calculou-se a porcentagem em relação à droga (v/m).

4.5.3.6 Glicosídeos saponínicos

A 0,500 g de amostra foram adicionados 20,0 mL de água destilada e o conjunto foi aquecido até a fervura por 2 minutos. Após resfriamento, a solução foi filtrada para balão volumétrico de 50,0 mL, mantendo-se o sólido no béquer. O procedimento foi repetido com porções de 10,0 mL de água destilada até que o volume do balão fosse completado.

O extrato aquoso a 1% foi utilizado para a determinação do índice de espuma da droga e do EHEL.

Espuma

Em um tubo de ensaio provido de tampa foram colocados 5,0 mL da solução aquosa obtida a partir da droga vegetal. O tubo foi agitado vigorosamente por 15 segundos e deixado em repouso por 15 minutos.

O mesmo procedimento descrito acima foi realizado empregando-se a solução aquosa obtida do extrato liofilizado.

A observação de uma camada de espuma persistente de ao menos 1 cm foi considerada indicativa da presença de glicosídeos saponínicos.

Índice de espuma

Em 10 tubos de ensaio de iguais dimensões, numerados, foram colocados 5,0mL de água destilada em todos, exceto no primeiro. No primeiro e segundo tubos foram adicionados 5,0mL da solução aquosa a 1%, o tubo foi homogeneizado e transferidos 5,0mL deste para o terceiro tubo. O processo foi realizado seqüencialmente, até o décimo tubo. Cinco mililitros do décimo tubo foram desprezados, de forma que todos os tubos contivessem 5,0mL da solução em diferentes diluições (1/100; 1/200; 1/400; 1/800; 1/1.600; 1/3.200; 1/6.400; 1/12.800; 1/25.600; 1/51.200). Os tubos foram agitados no sentido longitudinal durante 15 segundos, permanecendo em repouso durante 15 minutos, observando-se qual dos tubos apresentava uma camada de espuma de 1 cm de espessura.

Hemólise

Dois mililitros da solução aquosa foram isotonzados com cloreto de sódio e colocados em um tubo de ensaio com 2 mL de uma suspensão de sangue bovino desfibrinado 2% em solução fisiológica.

O tubo foi homogeneizado e após 1 hora de repouso foi avaliada a não ocorrência de hemólise.

4.5.3.7 Taninos

A 1,0g de amostra foram adicionados 50,0mL de água destilada, a mistura foi aquecida, mantida em fervura por 5 minutos e filtrada.

Alíquotas das soluções obtidas a partir das drogas vegetais e do EHEL foram separadas para a realização dos ensaios de identificação descritos a seguir.

Reação com sais de ferro

A 2,0 mL de cada solução aquosa obtida foram adicionados 5,0 mL de água destilada e 2 a 3 gotas de solução de cloreto férrico 2%. O desenvolvimento de precipitado ou a mudança de coloração foram considerados reação positiva para compostos fenólicos.

Reação com acetato e chumbo

A 2,0 mL de cada solução aquosa obtida foram adicionadas 3 gotas de solução aquosa de acetato de chumbo 10%. O desenvolvimento de precipitado foi considerado reação positiva.

Reação com acetato de cobre

A uma alíquota de 2,0 mL de cada solução aquosa obtida foram adicionadas 2 a 3 gotas de solução aquosa de acetato de cobre 3%. O desenvolvimento de precipitado foi considerado reação positiva.

Reação com alcalóides

A uma alíquota de 2,0 mL de cada solução aquosa obtida foram adicionados 1 gota de ácido clorídrico a 10% e 5 gotas de solução aquosa de

sulfato de quinina a 0,1%. O desenvolvimento de precipitado foi considerado reação positiva.

Reação com gelatina

A 2,0 mL de cada solução aquosa obtida foram adicionados 1 gota de ácido clorídrico 10% e 0,5 mL de gelatina 2,5%, gota a gota. O desenvolvimento de precipitado foi considerado reação positiva.

4.5.4 Quantificação de taninos na droga vegetal e no EHEL

O doseamento de taninos na droga vegetal e no EHEL foi realizado conforme preconizado pela EUROPEAN PHARMACOPOEIA (2001). O resultado foi expresso em porcentagem de taninos e o método baseia-se na reação colorimétrica dos polifenóis com ácido fosfomolibdotúngstico, utilizando-se como referência o pirogallol (Sigma).

Reagente fosfomolibdotúngstico

Em um balão foram adicionados 70,0 mL de água destilada e dissolvidos 10,0 g de tungstato de sódio e 2,5 g de molibdato de sódio. Sob resfriamento, foram adicionados 10,0 mL de ácido clorídrico e 5,0 mL de ácido fosfórico. O balão foi aquecido sob refluxo com condensador de bolas durante 10 horas. Foram adicionados 15,0 g de sulfato de lítio, 5,0 mL de água e poucas gotas de bromo e a solução foi fervida durante 15 minutos para remoção do excesso de bromo. A solução foi resfriada, diluída com água destilada para 100,0 mL em balão volumétrico e em seguida, filtrada. O reagente deverá ser amarelo; se adquirir coloração verde estará insatisfatório para o uso, mas poderá ser regenerado fervendo com algumas gotas de bromo. O reagente preparado foi conservado em geladeira até o momento de uso.

Solução de carbonato de sódio

Em um balão volumétrico de 1 L, foram solubilizados 290,0g de carbonato de sódio, em água destilada.

Quantificação

Foram pesados 0,75 g de droga vegetal, adicionados 150,0 mL de água destilada. O conjunto foi aquecido em banho-maria por 30 minutos, resfriado e transferido quantitativamente para balão volumétrico de 250 mL. Após a decantação dos sólidos, o conjunto foi filtrado por papel de filtro. Foram descartados os 50,0 mL iniciais do filtrado (F1).

O mesmo procedimento descrito acima foi realizado utilizando-se 0,375 g de EHEL (F2).

Polifenóis totais

Cinco mililitros do filtrado obtido a partir da droga vegetal (F1) foram diluídos em água destilada em balão volumétrico de 25,0 mL. A 2,0 mL desta solução foram adicionados 1,0 mL de reagente fosfomolibdotúngstico e 10,0mL de água em balão volumétrico de 25,0 mL e o volume foi completado com a solução de carbonato de sódio. Após 30 minutos foi feita a leitura da absorbância a 760 nm (A1), usando água como branco.

O mesmo procedimento foi realizado, utilizando-se o filtrado obtido a partir do EHEL (F2).

Polifenóis não adsorvidos pelo pó de pele

A 10,0 mL do filtrado obtido a partir da droga vegetal (F1) foram adicionados 0,10 g de pó de pele (Merck). O conjunto foi levado à agitação em agitador magnético durante 1 hora e, em seguida, foi filtrado através de papel

de filtro. Cinco mililitros deste filtrado foram diluídos com água destilada em balão volumétrico de 25, 0mL. A 2,0 mL desta solução foram adicionados 1,0 mL de reagente fosfomolibdotúngstico e 10,0 mL de água em balão volumétrico de 25,0 mL e o volume foi completado com a solução de carbonato de sódio. Após 30 minutos foi feita a leitura da absorbância a 760 nm (A_2), usando água como branco.

O mesmo procedimento foi realizado, utilizando-se o filtrado obtido a partir dos EHEL (F2).

Padrão

Imediatamente antes do uso, 50,0 mg de pirogalol (Merck) foram diluídos em água em um balão volumétrico de 100,0 mL. A 2,0 mL desta solução foram adicionados 1,0 mL do reagente fosfomolibdotúngstico e 10,0 mL de água em balão volumétrico de 25,0 mL e o volume foi completado com a solução de carbonato de sódio. Após 30 minutos foi feita a leitura da absorbância a 760 nm (A_3), usando água como branco.

Cálculo

O teor de taninos foi calculado em porcentagem através da equação:

$$\% \text{ taninos} = \frac{62,5 (A_1 - A_2) m_2}{A_3 m_1}$$

Onde: A_1 = valor de absorbância dos polifenóis totais a 760nm;
 A_2 = valor de absorbância dos polifenóis não adsorvidos pelo pó de pele a 760nm; A_3 = valor de absorbância do padrão de pirogalol a 760nm; m_1 = massa

da amostra analisada (droga vegetal e EHEL) em gramas; m₂= massa do pirogalol em gramas.

4.5.5 Quantificação de flavonóides na droga vegetal e no EHEL

O doseamento de flavonóides na droga vegetal e no EHEL foi realizado conforme preconizado pela Farmacopéia Brasileira (Brasil, 2003). A porcentagem de flavonóides foi calculada em relação à quercetina.

Preparo da Solução de Metenamina

Dissolveu-se 0,1 g de metenamina em 20 mL de água.

Preparo da Solução de Cloreto de Alumínio

Dissolveram-se 2 g de cloreto de alumínio em 100 mL de metanol.

Preparo da Solução Metanólica de Ácido Acético

Cinco mililitros de ácido acético foram misturados a 100 mL de metanol.

Determinação de Água

Dois gramas das drogas vegetais e 2 gramas do EHEL foram aquecidos em estufa a 100-105° C, separadamente, por 5 horas. Após o resfriamento em dessecador, as drogas vegetais e os EHEL foram pesados até que a massa entre as pesagens não diferisse em mais de 5 mg em 3 pesagens consecutivas. O resultado da determinação de água foi calculado em porcentagem em relação à massa da amostra inicial através da fórmula:

$$Pd = \frac{mf \times 100}{mi}$$

Onde: Pd= determinação de água em porcentagem; mi= massa inicial da amostra em gramas; mf= massa final da amostra, após a secagem, em gramas.

Quantificação

Solução-mãe

Uma massa de 0,4 g da droga vegetal e 0,2g de EHEL, foram colocados separadamente em balão de fundo redondo de 100mL, a mistura aquecida à fervura sob refluxo durante 30 minutos, com 20 mL de acetona, 1 mL da solução de metenamina SR e 2 mL de ácido clorídrico. A mistura foi filtrada por algodão para um balão volumétrico de 100 mL. O resíduo da droga ou o extrato e o algodão foram extraídos mais duas vezes com porções de 20 mL de acetona e aquecimento à fervura sob refluxo por 10 minutos. Os filtrados foram reunidos no balão e o volume completado para 100 mL com acetona.

A 20 mL da solução obtida foram adicionados 20 mL de água e 15 mL de acetato de etila, em funil de separação. A fase de acetato de etila foi recolhida, sendo realizadas mais 3 extrações empregando-se porções de 10 mL de acetato de etila. Após a reunião das fases de acetato de etila, foram realizadas 2 lavagens com porções de 50 mL de água. A fase orgânica foi completada com acetato de etila em balão volumétrico de 50 mL.

Solução amostra

A 10 mL da Solução Mãe foi adicionado 1,0 mL da solução de cloreto de alumínio SR e o volume foi completado para 25 mL em balão volumétrico com a solução metanólica de ácido acético SR.

Solução branco

Foi preparada uma solução de comparação, diluindo-se 10 mL de Solução Mãe a 25 mL em balão volumétrico com solução metanólica de ácido acético SR.

Após 30 minutos foi lida a absorbância da amostra a 425 nm, utilizando-se a solução sem a adição do cloreto de alumínio como o branco.

Cálculo

O teor de flavonóides foi calculado em porcentagem como quercetina através da equação:

$$\% \text{ flavonóides} = \frac{A \times 62.500}{500 \times p \times (100 - Pd)}$$

Onde: A= absorbância da amostra a 425 nm; p= peso da amostra em gramas; Pd= determinação de água da amostra em porcentagem.

4.5.6 Perfil cromatográfico

Foi determinado o perfil cromatográfico em camada delgada do EHEL e das frações clorofórmio, acetato de etila, etanol e etanol 50%.

Através dos sistemas cromatográficos utilizados, descritos por Wagner e Bladt (1996), Mabry *et al* (1970) e Heftmann (1967), objetivou-se delinear o perfil cromatográfico e avaliar a presença de substâncias de interesse, sendo provavelmente, flavonóides, através da comparação com um padrão.

Nos sistemas cromatográficos selecionados, o EHEL e cada fração obtida foram diluídos a 10% (m/v) nos seus respectivos líquidos extratores. Como padrão foi utilizada quercetina (Merck), dissolvida a 0,05% em metanol (m/v).

Os sistemas cromatográficos utilizados encontram-se abaixo:

Sistema A

Fase estacionária: Silica gel GF254 (Merck);

Tamanho da placas: 15X20 cm;

Espessura da camada: 300 μ m;

Ativação: 110°C, por 1 hora;

Fase móvel: acetato de etila + ácido fórmico + ácido acético glacial + água (100:11:11:27);

Saturação da cuba: total;

Percurso: sentido ascendente;

Distância: 10 cm;

Amostra: EHEL e suas frações clorofórmica, acetato de etila, etanol e etanol 50%, sendo diluídos a 10% nos respectivos solventes extratores.

Quantidade aplicada: 5 μ L e 9 μ L

Padrões: quercetina e rutina 0,05 % em metanol

Quantidade aplicada: 3 μ L

Revelador: difenilboriloxietilamina a 1 % em metanol (NP) + polietilenoglicol 5% em metanol (PEG);

Visualização: UV 366 nm.

Sistema B

O sistema é idêntico ao sistema A, com exceção da fase móvel.

Quantidade aplicada: 9 µL

Fase móvel: acetato de etila + ácido fórmico + água (100:5:10)

4.6 Estudo farmacológico

4.6.1 Ação antiúlcera: modelo de indução aguda por etanol e ácido clorídrico

Ratos Wistar fêmeas, com peso entre 150,0 e 180,0g, foram utilizados no ensaio antiúlcera. O ensaio foi realizado segundo Mizui e Doteuchi (1983) e Matsumoto e Yamada (1991). Os animais permaneceram por uma semana em adaptação no local do experimento, com ciclo de 12 horas claro-escuro, e temperatura de 22 a 25°C. 24 horas antes do experimento foi retirada a ração, permanecendo os animais somente com água. O teste foi realizado com grupos de 8 animais, sendo os grupos: controle negativo, ao qual foi administrada salina no volume de 1mL/100g de massa corpórea, grupo tratado 1, ao qual foi administrado extrato hidroalcoólico a 70% liofilizado de *L. japonicus*, grupo tratado 2, fração clorofórmio, grupo tratado 3, fração acetato de etila, grupo tratado 4, ao qual foi administrada fração etanol 50% e grupo tratado 5, fração etanol, todos na dose de 400 mg/kg e volume de 1,0 mL/100g de massa corpórea. As amostras foram diluídas em água e tween (a 1% para frações de clorofórmio e acetato de etila e a 3,5% para as frações etanol e etanol 50%). Em outro ensaio, realizou-se avaliação com doses de 100, 200 e 400mg/kg de EHEL e controle positivo (100mg/kg de omeprazol). Para o ensaio com as frações e as doses de 100, 200 e 400mg/kg foram realizados novos grupos de controles negativos.

30 minutos após a administração de testes e controles, foi administrado a todos os animais, por via oral, como agente indutor, um mL/100g de massa corpórea de solução de ácido clorídrico a 0,3 M em etanol 60 %.

Ao final de uma hora, os animais foram mortos, retirados os estômagos, abertos pela curvatura maior, lavados com água corrente e colocados entre duas placas de vidro. As ulcerações hemorrágicas foram medidas por área, através do programa Image pro plus.

A análise destes resultados foi realizada segundo Gonzalez *et al* (2001) e Gonzalez (2004), considerando os seguintes parâmetros:

1. Área Total de Lesão Ulcerativa em mm^2 , calculada pela somatória das áreas de lesão individuais;
2. Área Relativa de Lesão, que se refere à porcentagem de área ulcerativa em relação à área total do estômago. Esta porcentagem foi transformada em arcoseno pela fórmula: $p' = \arcsen \sqrt{p}$, para se proceder à análise estatística adequada;
3. Índice de Lesão Ulcerativa (ILU). Para cálculos dos Índices de Lesão Ulcerativa (ILU), as úlceras foram classificadas em três níveis, de acordo com a severidade: nível 1 (n_1): úlceras com área menor que 1 mm^2 ; nível 2 (n_2): úlceras com área entre 1 e 3 mm^2 ; e nível 3 (n_3): úlceras com área maior que 3 mm^2 . Para cada estômago, o ILU foi calculado pela fórmula:

$$\text{ILU} = 1x (\text{n}^\circ \text{ de úlceras em } n_1) + 2x (\text{n}^\circ \text{ de úlceras em } n_2) + 3x (\text{n}^\circ \text{ de úlceras em } n_3)$$

Os resultados foram submetidos ao teste t de student e, para comparar mais de duas amostras, à análise de variância (ANOVA), com intervalo de confiança de $p < 0,05$, seguido de Tukey, sendo utilizados os programas Sigma stat e Instat 2.

ESQUEMA DO ENSAIO ANTIÚLCERA

Ratos Wistar (8 animais por grupo)

EHEL ou frações (tratado)
Controles positivo e negativo

(30min)

Agente indutor (HCl 0,3M/Etanol 60%)

(1h)

Óbito

Abertura dos estômagos (curvatura maior)

Mensuração de úlceras e estômagos

Análise de resultados (ATL, ARL e ILU)

Estatística

4.6.2 Atividade antibacteriana

Foram realizados testes de resistência microbiana aos agentes *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 35218 e ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Campylobacter coli* isolado, frente ao extrato de *L. japonicus*.

O ensaio de atividade antimicrobiana foi realizado através de 3 repiques consecutivos das bactérias aeróbicas nos meios ágar sangue (*S. aureus*) e Mac Conkey (*E.coli*, *P. aeruginosa*), a partir de uma amostra bacteriana mantida em 80°C. A seguir, realizou-se o estudo de resistência *in vitro*, através de misturas de meio de cultura e extrato em placa de *petri*, contendo 90% de ágar Mueller-Hinton e 10% do EHEL de *L. japonicus*, em diversas concentrações. Sendo o resultado positivo em até 2000µg/mL, para a continuação da análise, com o objetivo de suplementar a necessidade das bactérias exigentes, adiciona-se 5% sangue de carneiro. O inóculo foi ajustado na escala 0.5 de Mac Farland, correspondente a 1×10^8 células/mL. Foram depositados 5µL do inóculo bacteriano diluído 1:10 em caldo Mueller-Hinton, equivalente a 1×10^4 células/mL. As placas foram incubadas a 37°C por 24 horas em atmosfera de aerobiose. A placa cuja menor concentração inibiu o crescimento macroscópico, comparado ao controle positivo, foi considerada a concentração inibitória mínima. A bactéria microaeróbica (5% CO₂), *Campylobacter coli*, foi incubada em atmosfera microaerófila.

A técnica utilizada descreve o volume e a composição do meio de cultura sólido, a concentração da espécie bacteriana, cuja sensibilidade deseja-se conhecer, a concentração dos antimicrobianos (extratos) e a temperatura e o tempo de incubação padronizados; o método é adaptado de Kirby-Bauer, reconhecido pelo comitê nacional para padronizações de técnicas de laboratórios clínicos, segundo NCCLS (1990, 2000).

ESQUEMA DO ENSAIO ANTIBACTERIANO

4.6.3 Atividade antioxidante

A atividade antioxidante foi determinada pela reação com DPPH. O método foi inicialmente descrito por Brand - Williams *et al* (1995), e tem por base a redução do radical 2,2'-difetil-1-picril-hidrazil (DPPH), o qual apresenta um máximo de absorção em 517nm. Através do decaimento da absorbância pode-se avaliar a presença de compostos capazes de doar hidrogênios ou seqüestrar o radical que, após o equilíbrio da reação permite calcular a quantidade de antioxidante gasta para reduzir 50% do DPPH.

Preparo do DPPH

Como seqüestrante de radical livre foram utilizados 1,6 mg de 2,2'-difetil-1-picril-hidrazil (DPPH), acrescentados de 100mL de MeOH. A solução foi agitada com bastão de vidro e armazenada em ambiente escuro até o momento da utilização.

Preparo do padrão

A vitamina E foi utilizada como padrão, devido a sua atividade antioxidante. Para tanto, foi estabelecida uma curva de calibração com cinco pontos.

Preparo das amostras (extrato e frações)

Os extratos a serem testados foram preparados em concentrações específicas, conforme limites de absorbância aceitos para confiabilidade do teste (mínimo de 0,100 e máximo de 1,0).

Verificação da atividade antioxidante

Foram pesados 2,5mg de cada amostra e diluídos em 10 mL de metanol, sucessivamente, até ser encontrada a concentração necessária para o respectivo extrato. Foram realizadas 5 diluições em metanol, responsáveis pelos cinco pontos de concentrações necessários para constituir a curva de absorbância, como no exemplo abaixo:

EHEL: 2,5mg do extrato / 10mL metanol. Diluir em tubos:

1:9 (solução do extrato:metanol) = 0.025mg/mL

0.8:0.2 (solução do extrato:metanol) = 0.020 mg/mL

0.6:0.4 (solução do extrato:metanol) = 0.015 mg/mL

0.4:0.6 (solução do extrato:metanol) = 0.01mg/mL

0.25:0.75 (solução do extrato:metanol) = 0.005 mg/mL

A cada tubo foi adicionado 1 mL da solução de extrato com metanol e 3mL da solução de DPPH, deixado reagir em ambiente escuro por uma 1 hora, para que a reação se completasse, sendo realizada a leitura no comprimento de onda de 517 nm, no espectrofotômetro. O metanol foi usado como branco.

O percentual de inibição do DPPH foi calculado de acordo com a fórmula de Yen and Duh (1994), assim demonstrada: %redução DPPH (Capacidade antioxidante) = $[(\text{Abs controle} - \text{Abs amostra}) / \text{Abs controle}] \times 100$.

Os valores de EC₅₀ (effective concentration) foram calculados por regressão linear dos gráficos, onde a abscissa representa as concentrações dos testes dos extratos de *L. japonicus*, e a ordenada, o percentual de atividade antioxidante resultante de três determinações.

Análise estatística

Os resultados são expressos como a média mais ou menos desvio padrão de cada amostra em triplicata. “One-way” análise de variância (ANOVA) foi usado para comparar mais que duas amostras (RUNYON e HABER, 1984), com intervalo de confiança de $p < 0,05$ (MENSOR *et al*, 2001).

5 RESULTADOS

5.1 Análise do solo

As Tabela 2 e Tabela 3 referem-se aos resultados da análise de solo, realizada no setor de análise de solos na Esalq (Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz), em Piracicaba, em novembro de 2002, sendo o responsável, professor Dr. Godofredo Cesar Vitti.

Tabela 2. Valores de análises químicas de solos referentes ao terreno Carboni, localizado em Videira, no estado de Santa Catarina contendo a espécie vegetal *L. japonicus*, coletado em 01/11/2002.

Amostra	pH	M.O	P	S	K	Ca	Mg	Al	H+Al	SB	T	V	m
		g dm ⁻³	mg dm ⁻³					mmolc dm ⁻³				%	
1	4,71	31	43	6	3,1	70	19	1	64	92,1	156,1	59	1
2	4,8	30	70	58	11,5	74	40	1	58	125,5	183,5	68	1

Legenda:

Amostra 1 e 2: diferentes locais do terreno com 3 metros de distância entre os mesmos.

pH: Acidez ativa

M.O: Matéria orgânica (g de matéria orgânica/dm³ de solo)

P: Fósforo

S: Enxofre

Ca: Cálcio

Mg: Magnésio

Al: Alumínio

H+Al: Acidez potencial

SB: Soma de bases

T: Capacidade de troca de cátions do solo

V: Saturação de bases

M: Saturação de alumínio

mmolc = Milimol de carga meq(miliequivalente)

Tabela 3. Resultados de análises de micronutrientes de solos referentes ao terreno Carboni, localizado em Videira, no estado de Santa Catarina contendo a espécie vegetal *L. japonicus*, coletado em 01_11_2002.

Amostra	B	Cu	Fe	Mn	Zn
mg dm ⁻³					
1	3,37	10,1	206	164,0	6,0
2	2,18	9,9	307	50,4	9,0

Legenda:

Amostra 1 e 2: diferentes locais do terreno

B: Boro

Cu: Cobre

Fe: Ferro

Mn: Manganês

Zn: Zinco

Segundo o agrônomo Dr. Pedro Melillo, através dessas análises de fertilidade foi interpretado que o solo é considerado de baixa-média fertilidade.

5.2 Rendimento do EHEL e das frações

O EHEL apresentou um rendimento de 16,3%, partindo-se de 5.000,0g de droga pulverizada, contendo folhas, caules e flores, correspondendo a 817,0g de extrato liofilizado.

Característica do EHEL da droga: pó, não homogêneo em relação à consistência higroscópico, verde-acastanhado.

No fracionamento, os extratos obtidos a partir de 80,0g de EHEL, após a concentração e secagem, forneceram um rendimento de:

9,45g (clorofórmio)	11,81%
2,54g (acetato de etila)	3,14%
3,52 (etanol)	4,4%
20,54 (etanol 50%)	25,67%

5.3 Caracterização macroscópica e microscópica da droga vegetal

Descrição macroscópica da espécie

A espécie vegetal *L. japonicus* é de porte herbáceo, apresenta cerca de 60 cm a 2 m de altura, com caules e ramos quadrangulares, duros, eretos, sulcados e glabros. Figura 1 mostra o aspecto geral da espécie florida.

Folha

Descrição macroscópica

A espécie possui folhas opostas, simples, completas, decíduas, medindo de 4 a 11cm de comprimento.

Quanto à morfologia do limbo foliar, podem apresentar o contorno oval-arredondado no início da germinação; com o desenvolvimento do espécime vai se tornando linear-lanceolado e trilobado até tripartido (Figura 2A), predominando o tripartido na fase adulta do crescimento. A base é simétrica levemente reentrante, o ápice é longo-acuminado e a margem é denteada.

Possui nervação penínervia, sendo plana ou sub-impressa na face adaxial e saliente na face abaxial. As nervuras secundárias dispõem-se em ângulo de 45°.

A coloração é verde, ligeiramente mais pálida na face dorsal, com consistência flexível e membranácea, superfície lisa e glabra.

Quando trituradas entre os dedos, as folhas desprendem odor aromático característico. São moderadamente adstringentes.

As folhas secas (Figura 2B) apresentam-se foscas, na forma retorcida, com os bordos recurvados no sentido da face adaxial, com coloração verde acinzentada.

Descrição microscópica

Observou-se através do corte paradérmico que a epiderme possui tricomas glandulares com a cabeça unicelular, bicelular, multicelular, com pedicelo unicelular.

Tricomas tectores unicelulares, bicelulares e unisseriados (Figura 3A).

A superfície abaxial possui maior quantidade de tricomas tectores sobre as nervuras principal e secundárias. Estômatos anomocíticos.

No corte transversal são encontrados idioblastos arredondados, contendo inclusão celular inorgânica, composta por oxalato de cálcio, denominada areia cristalina. Ocorrem, principalmente, nas células mais externas, próximas à epiderme adaxial, no parênquima paliçádico (Figura 3B).

Substâncias de caráter polifenólico, detectadas com solução de cloreto férrico, podem ser observadas em algumas células no córtex da nervura mediana, em quantidade reduzida, comparado ao mesofilo. São mais abundantes na face adaxial, principalmente, no parênquima paliçádico. Na Figura 4 observa-se imagem do corte transversal da nervura da folha.

A epiderme das folhas, em corte transversal, apresenta-se uniestratificada, constituída por células de contorno retangular, alongadas no sentido periclinal, revestida por cutícula lisa.

O mesofilo heterogêneo, assimétrico, caracterizado como dorsiventral, é formado por uma camada de parênquima paliçádico, ocupando 1/3 da espessura do mesofilo e até 6 camadas de células de parênquima lacunoso, com dimensões, formas variáveis e membranas delgadas, delimitando espaços intercelulares de tamanhos diversos com as células deste tecido (Figura 3B).

Há presença de três camadas de colênquima lamelar na região da nervura, tanto na superfície adaxial como abaxial e 3 a 5 camadas de células nas faces laterais (Figura 3C).

Pecíolo

Descrição macroscópica

O pecíolo possui inserção lateral, longo, aspecto reto, secção transversal quadrangular. Coloração verde-acinzentada. Apresenta de 3,0 a 4,0 cm de comprimento e, aproximadamente, 0,1cm de largura e superfície lisa.

O contorno externo é irregular e mostra uma concavidade ligeiramente pronunciada.

Descrição microscópica

No corte paradérmico são encontrados tricomas tectores unicelulares, bicelulares e unisseriados; também possui tricomas glandulares com a cabeça unicelular, bicelular, multicelular, com pedicelo unicelular, com estômatos anomocíticos.

No corte transversal, a epiderme é constituída por uma única camada de células alongadas no sentido tangencial, com as membranas externas levemente cutinizadas. Encontram-se estômatos em pequenas elevações epidérmicas.

Na face inferior próximo às faces laterais, o colênquima desaparece completamente, aparecendo então um parênquima de células com grandes espaços intercelulares e células ovais com membranas delgadas, havendo na epiderme desta região maior concentração de estômatos.

Endoderma possui único estrato de células alongadas tangencialmente.

O periciclo é formado por uma a cinco camadas de células.

Os feixes vasculares são colaterais. O câmbio é formado por uma estreita faixa, não formando anel contínuo. O xilema possui apenas uma série de células dispostas no sentido radial, parenquimatosas e com as paredes levemente lignificadas.

Caule

Descrição macroscópica

Quanto à forma, o caule é sub-quadrangular, com quatro cantos e quatro sulcos longitudinais, quanto ao porte é herbáceo, com 0,5 cm de espessura, coloração esverdeada, sabor amargo e adstringente (Figura 1A).

Descrição microscópica

A epiderme é constituída por uma camada de células, sendo a parte epidérmica externa recoberta por cutina e a interna celulósica e mais ou menos reta (Figura 5A).

Os estômatos são pouco freqüentes. Foram observados tricomas tectores bicelulares, unicelulares e unisseriados, tricomas glandulares com cabeça e pedicelo unicelulares (Figura 5 A e 5C).

Na Figura 5C observa-se o corte transversal do caule.

Possui colênquima angular, com 6 camadas de células (Figura 5B), nos cantos, diminuindo à medida que se aproxima dos sulcos longitudinais, onde ocorre apenas uma camada (Figura 5C).

Os parênquimas externo e interno possuem em média 4 camadas de células, grandes e pequenas, com formas variadas e membranas delgadas, separadas por espaços intercelulares.

O periciclo é formado por duas a três camadas de células.

O feixe é do tipo colateral aberto (Figura 5A). Inúmeros raios medulares comunicam-se com a medula até o periciclo. A medula é bastante desenvolvida, com células arredondadas e membranas delgadas. O caule mais antigo possui xilema secundário com grande quantidade de fibras. A camada externa ao floema se apresenta esclerificada (Figura 5B).

Figura 1. *L. japonicus* A) Vista frontal, ramos floridos; B e C) Hábito.

Figura 2. *L. japonicus* – Macroscopia A) Morfologia do limbo foliar apresentando o contorno oval-arredondado no início da germinação, tornando-se linear-lanceolado com o desenvolvimento e trilobado até tripartido, predominando o tripartido, na fase adulta do crescimento; B) Folha adulta seca com 7 cm de comprimento; C) Folha fresca no início da germinação; D) Folha fresca na fase adulta.

Figura 3. *L. japonicus* – Microscopia da folha A) Corte paradérmico da superfície abaxial da folha: Visão: aumento 100 X, Escala = 40 μ m. Coloração Azul de Astra 1- tricoma tector bicelular e unisseriado, 2- tricoma glandular

B) Corte transversal da folha: visão: aumento 40X, escala = 100 μ m.

Mesofilo dorsiventral

C) Corte transversal da nervura da folha: Visão: aumento 400X, escala = 100 μ m – 1- Colênquima corado com Azul de Astra

D) Corte transversal da nervura da folha: Visão: aumento 100X, Escala = 40 μ m. Coloração dupla = Astra de Astra/safranina

Figura 4. Corte transversal da nervura da folha. Visão: aumento 40 X, escala = 100 μ m.

Figura 5. *L. japonicus* - Caule A) Corte transversal do caule. Visão: aumento 100 X, escala = 40 μ m Coloração dupla = Azul de Astra /safranina 1- endoderme, 2- xilema.

B) Corte transversal do caule: Visão: aumento 200 X, escala = 20 μ m. Seta: Esclerênquima corado com safranina.

C) Corte transversal do caule, evidenciando apenas dois cantos. Visão: aumento 40 X, escala = 100 μ m.

5.4 Aspectos químicos

5.4.1 Triagem fitoquímica da droga vegetal e do EHEL

Os resultados da triagem fitoquímica da droga vegetal e do EHEL estão expressos na Tabela 4. Em ambos foram detectados flavonóides, saponinas, taninos e óleo volátil.

Tabela 4. Triagem Fitoquímica realizada com o pó da droga e com o EHEL das partes aéreas, caule, folhas e flores de *L. japonicus*.

Grupo Químico	Reação de Caracterização	Resultados	
		Droga	EHEL
Alcalóides	Mayer	(-)	(-)
	Bertrand	(-)	(-)
	Dragendorff	(-)	(-)
	Bouchardat	(-)	(-)
Antraquinonas	Borntraeger	(-)	(-)
Glicosídeos	Lieberman-Burchard	(+)	(+)
Cardiotônicos	Kedde	(-)	(-)
	Baljet	(-)	(-)
	Keller-Killiani	(-)	(-)
Flavonóides	Cloreto de Alumínio	(+)	(+)
	Shinoda	(+)	(+)
	Hidróxidos alcalinos	(+)	(+)
Óleos Essenciais	Odor característico	(+)	(+)
	Microdestilado	(+)	(+)
	Hidrodestilação	(+)	(-)
		planta fresca	
Saponinas	Espuma persistente	(+)	(+)
	Hemólise	(-)	(-)
Taninos	Acetato de Chumbo	(+)	(+)
	Cloreto Férrico	(+)	(+)
	Gelatina	(+)	(+)
	Acetato de Cobre	(+)	(+)
	Alcalóides	(+)	(+)

Legenda: (+) Reação Positiva; (-) Reação Negativa.

5.4.2 Extração do óleos voláteis por hidrodestilação

Foi pesada uma massa inicial de 172g de caules, folhas e flores frescos, tendo sido obtido um volume de óleo essencial final de 0,1mL.

Rendimento ou teor de óleos essenciais: 0,06%.

5.4.3 Índice de espuma

O índice de espuma foi de 400 para a droga vegetal e 800 para o EHEL

5.4.4 Quantificação de taninos na droga vegetal e no EHEL

Os resultados da quantificação de taninos na droga vegetal e no EHEL encontram-se na Tabela 5.

Tabela 5. Porcentagem de taninos no pó da droga e no EHEL de partes aéreas de *L. japonicus*

		Droga Vegetal	EHEL
%	de	0,06	0,35
taninos nas			
Partes aéreas			

5.4.5 Quantificação de Flavonóides na droga vegetal e no EHEL

Os resultados da quantificação de flavonóides na droga vegetal e no EHEL encontram-se na Tabela 6.

Tabela 6. Porcentagem de flavonóides no pó da droga e no EHEL de partes aéreas de *L. japonicus*

Droga Vegetal		EHEL
%	de	
		0,76
		2,3
flavonóides		
nas partes		
aéreas		

5.4.6 Perfil Cromatográfico

Foi realizado perfil cromatográfico prévio de partes aéreas de *L. japonicus*, verificando presença de flavonóides em diferentes coletas, caracterizada por reação específica de coloração. O resultado encontra-se na Figura 6.

Figura 6. Perfil Cromatográfico de *L. japonicus* com sistema A, tendo como fase móvel acetato de etila + ácido fórmico + ácido acético glacial + água (100:11:11:27); (A) Coleta realizada em Agosto 2002 de partes aéreas de *L. japonicus*: flores, folhas e caules, com 5 µl. (B) Coleta realizada em Julho 2002 de partes aéreas do *L. japonicus*: folhas, flores e caule com 5 µl. (C) Droga de Folhas, flores e caule da coleta de Agosto 2002, com 9 µl. (D) Droga de folhas sem flores da coleta de Agosto 2002, com 9 µl. (E) Padrão: Quercetina.

As diferentes amostras foram reunidas para facilitar a verificação da igualdade dos extratos.

O perfil cromatográfico foi definido para o EHEL e para as frações clorofórmica, acetato de etila, etanólica 50%, etanólica 100% de *L. japonicus*.

Foi verificada a possível presença de quercetina em todas as amostras de *L. japonicus*, conforme pode ser observado na Figura 7.

Figura 7. Perfil Cromatográfico com sistema B: acetato de etila: ácido fórmico: água (100:5:10), (A) Padrão Quercetina (B) EHEL das partes aéreas do *L. japonicus*: folhas, flores e caule (C) Fração clorofórmica (D) Fração acetato de etila, (E) Fração etanol 50% (F) Fração etanol.

5.5 Estudo farmacológico

5.5.1 Ação antiúlcera: modelo de indução aguda por etanol e ácido clorídrico

5.5.1.1 Extrato de *L. japonicus* na dose de 400mg/kg e frações

As Figura 8 e Figura 9 apresentam as imagens dos estômagos dos animais controle e tratados com o EHEL de *L. japonicus*.

Figura 8. Imagens dos estômagos do grupo de ratos controle referente ao teste com o EHEL de *L. japonicus*, que receberam água por via oral no ensaio antiúlcera agudo com modelo de indução por etanol(60%) e ácido clorídrico (HCl 0,3M) com administração de 1mL/100g de massa corpórea. As partes escuras representam as lesões ulcerativas e algumas estão indicadas pelas setas.

Figura 9. Imagens dos estômagos do grupo de ratos tratados com EHEL de *L. japonicus*, na dose de 400mg/kg por via oral no ensaio antiúlcera agudo com modelo de indução por etanol 60% e ácido clorídrico (0,3M), com administração de 1mL/100g de massa corpórea.

As Figura 10, Figura 11 e Figura 12 apresentam os parâmetros utilizados para mensuração dos resultados do ensaio antiúlcera através da área total de lesão, área relativa de lesão e índice de lesão ulcerativa.

Figura 10. Médias das Áreas Totais de Lesão, utilizando EHEL no ensaio antiúlcera agudo pelo modelo Etanol/HCl, na dose de 400mg/kg. Os valores são expressos como a média e seus respectivos erros padrão (controle: $137,73 \pm 16,346$ e tratado: 0,0); o número de animais está entre parênteses. $P < 0.001$ = resultado extremamente significativo (***), em relação ao controle.

Figura 11. Médias do Índice de Lesão Ulcerativa utilizando EHEL, no ensaio antiúlcera agudo pelo modelo Etanol/HCl na dose de 400mg/kg. Os valores são expressos como a média e seus respectivos erros padrão (controle: $42,25 \pm 5,045$ e tratado: $0,0$), o número de animais está entre parênteses. $P < 0.001$ = resultado extremamente significativo(***), em relação ao controle.

Figura 12. Médias da Área Relativa de Lesão utilizando EHEL, no ensaio antiúlcera agudo pelo modelo Etanol/HCl na dose de 400mg/kg. Os valores são expressos como a média e seus respectivos erros padrão (controle: $18,33 \pm 1,054$ e tratado: $0,0$); o número de animais está entre parênteses. $P < 0.001$ = resultado extremamente significativo (***), em relação ao controle.

As Figura 13 a Figura 13 4, apresentam as imagens dos estômagos dos animais controle e tratados com as frações clorofórmica, acetato de etila, etanol e etanol 50%, obtidas a partir do EHEL de *L. japonicus*.

Figura 13. Imagens dos estômagos do grupo de ratos controle referente ao teste com as frações do EHEL de *L. japonicus*, que receberam água por via oral no ensaio antiúlcera agudo pelo modelo Etanol/HCl na dose de 400mg/kg. As partes escuras representam as lesões ulcerativas e algumas estão indicadas pelas setas.

Figura 13. 1. Imagens dos estômagos do grupo de ratos tratados com fração clorofórmica de EHEL de *L. japonicus*, no ensaio antiúlcera agudo pelo modelo Etanol/HCl na dose de 400mg/kg. A parte escura representa a lesão ulcerativa e está indicada pela seta.

Figura 13. 2. Imagens dos estômagos do grupo de ratos tratados com fração acetato de etila do EHEL de *L. japonicus*, no ensaio antiúlcera agudo pelo modelo Etanol/HCl na dose de 400mg/kg. As partes escuras representam as lesões ulcerativas e algumas estão indicadas pelas setas.

Figura 13. 3. Imagens dos estômagos do grupo de ratos tratados com fração etanol 50% do EHEL de *L. japonicus*, no ensaio antiúlcera agudo pelo modelo Etanol/HCl na dose de 400mg/kg. As partes escuras representam as lesões ulcerativas e algumas estão indicadas pelas setas.

Figura 13. 4. Imagens dos estômagos do grupo de ratos tratados com fração etanol do EHEL de *L. japonicus*, no ensaio antiúlcera agudo pelo modelo Etanol/HCl na dose de 400mg/kg. As partes escuras representam as lesões ulcerativas e algumas estão indicadas pelas setas.

As Figura 13. 5 a Figura 13. 10, apresentam os parâmetros utilizados para mensuração dos resultados do ensaio antiúlcera através da área total de lesão, área relativa de lesão e índice de lesão ulcerativa e os seus respectivos percentuais de redução das lesões ulcerativas.

Figura 13. 5. Médias da Área Total de Lesão, utilizando as frações clorofórmica, acetato de etila, etanol e etanol 50%, no ensaio antiúlcera agudo pelo modelo Etanol/HCl na dose de 400mg/kg. Os valores são expressos como a média e seus respectivos erros padrão (clorofórmio: $13,83 \pm 9,27$; acetato de etila: $29,89 \pm 15,33$; etanol 50%: $60,44 \pm 16,20$; etanol: $75,27 \pm 25,75$; controle: $169,65 \pm 17,83$), o número de animais está entre

parênteses. $P < 0,05$ = resultado significativo (*). $P < 0,01$ = resultado muito significativo(**), $P < 0.001$ = resultado extremamente significativo(***), em relação ao controle.

Figura 13. 6. Redução percentual da área total das lesões nas frações de *L. japonicus* em relação ao controle, pelo método do etanol e ácido clorídrico.

Figura 13. 7. Médias da Área Relativa de Lesão (porcentagem de área ulcerativa em relação à área total do estômago) das frações utilizando as frações clorofórmica, acetato de etila, etanol e etanol 50%, no ensaio antiúlcera agudo pelo modelo Etanol/HCl na dose de 400mg/kg. Os valores são expressos como a média e seus respectivos erros padrão (clorofórmio: $5,25 \pm 1,85$; acetato de etila: $7,88 \pm 2,66$; etanol 50%: $14,75 \pm 2,24$; etanol $13,84 \pm 2,93$; controle: $23,52 \pm 1,04$), a quantidade de animais está entre parênteses. A figura demonstra a Área Relativa de Lesão. $P > 0,05$ = resultado não significativo (ns), $P < 0,05$ = resultado significativo (*), $P < 0.001$ = resultado extremamente significativo(***), em relação ao controle.

Figura 13. 8. Redução percentual da área relativa das lesões nas frações de *L. japonicus* em relação ao controle, pelo método do etanol e ácido clorídrico.

Figura 13. 9. Médias do Índice de Lesão Ulcerativa utilizando as frações clorofórmica, acetato de etila, etanol e etanol 50%, no ensaio antiúlcera agudo pelo modelo Etanol/HCl na dose de 400mg/kg. . Os valores são expressos como a média e seus respectivos erros padrão (clorofórmio: $7,25 \pm 2,49$; acetato de etila: $8,50 \pm 2,34$; etanol 50%: $24,75 \pm 3,25$; etanol : $29,63 \pm 6,33$; controle: $38,63 \pm 3,58$), o número de animais está entre parênteses. $P > 0,05$ = resultado não significativo(ns), $P < 0.001$ = resultado extremamente significativo(***) ,em relação ao controle.

Figura 13. 10. Redução percentual do índice de lesão ulcerativa das frações de *L. japonicus* em relação ao controle, pelo método do etanol e ácido clorídrico.

5.5.1.2 Extrato de *L. japonicus* na dose de 100, 200 e 400 mg/kg

As Figura 14 a Figura 14.6, apresentam os parâmetros utilizados para mensuração dos resultados do ensaio antiúlcera através da área total de lesão, área relativa de lesão e índice de lesão ulcerativa e os seus respectivos percentuais de redução das lesões ulcerativas, as doses 100, 200 e 400mg/kg de EHEL de *L. japonicus*.

Figura 14. Médias do Índice de Lesão Ulcerativa utilizando as doses 100, 200 e 400mg/kg de EHEL de *L. japonicus* controle positivo (omeprazol) e controle negativo, no ensaio antiúlcera agudo pelo modelo Etanol/HCl. Os valores são expressos como a média e seus respectivos erros padrão (100mg: 35,00 ± 3,134; 200 mg: 20,39 ± 2,75; 400 mg: 9,00 ± 2,00; omeprazol: 13,39 ± 1,48; controle: 35,39 ± 3,99), o número de animais está entre parênteses. P>0,05= resultado não significativo(ns), P<0,01 = resultado muito significativo(**), P<0.001 = resultado extremamente significativo(***), em relação ao controle.

Figura 14. 1. Redução percentual do Índice de Lesão Ulcerativa nas doses de 100,200 e 400 mg/kg de *L. japonicus* e omeprazol, em relação ao controle, pelo método do etanol/HCl.

Figura 14. 2. Médias do Área Relativa de Lesão Área Relativa de Lesão (porcentagem de área ulcerativa em relação à área total do estômago), utilizando as doses 100, 200 e 400mg/kg, controle positivo (omeprazol) e controle negativo, de EHCL de *L. japonicus*, no ensaio antiúlcera agudo pelo modelo Etanol/HCl. Os valores são expressos como a média e seus respectivos erros padrão (100mg: $13,53 \pm 1,11$; 200 mg: $10,80 \pm 1,04$; 400 mg: $5,05 \pm 0,98$; omeprazol: $9,06 \pm 1,40$; controle: $29,60 \pm 1,46$), o número de animais está entre parênteses. $P < 0.001$ = resultado extremamente significativo(***) em relação ao controle.

Figura 14. 3. Redução percentual da Área Relativa de Lesão nas doses de 100,200 e 400 mg/kg de *L. japonicus* e omeprazol, em relação ao controle, pelo método do etanol/HCl.

Figura 14. 4. Médias da Área Total de Lesão com as doses 100, 200 e 400mg/kg de EHEL, controle positivo (omeprazol) e controle negativo, no ensaio antiúlcera agudo pelo modelo Etanol/HCl. Os valores são expressos como a média e seus respectivos erros padrão (100mg: $81,53 \pm 11,98$; 200 mg: $41,04 \pm 7,43$; 400 mg: $9,06 \pm 2,39$; omeprazol: $28,13 \pm 5,10$; controle: $320,51 \pm 34,02$), o número de animais está entre parênteses. $P < 0.001$ = resultado extremamente significativo(***) em relação ao controle.

Figura 14. 5. Redução percentual da Área Total de Lesão nas doses de 100,200 e 400 mg/kg de *L. japonicus* e omeprazol, em relação ao controle, pelo método do etanol/HCl.

Figura 14. 6. Comparação da redução percentual das lesões ulcerativas nas doses de 100,200, 400 mg/kg, de *L. japonicus* e omeprazol em relação ao controle negativo pelo método do etanol/HCl.

5.5.2 Atividade antimicrobiana

O EHEL de *L. japonicus* não apresentou atividade antibacteriana frente a *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Campylobacter coli* em uma concentração de até 2.000 µg/mL, no ensaio para determinação da concentração inibitória mínima.

A Tabela 7 apresenta os resultados do ensaio antimicrobiano (CIM - Concentração Inibitória Mínima) realizado com EHEL de *L. japonicus*.

Tabela 7. Ensaio antimicrobiano (CIM - Concentração Inibitória Mínima) realizado com EHEL de *L. japonicus*.

1.1.1 Bactérias		CIM(μ g) Extrato EtOH 70%
GRAM +	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	>2000
	Controle negativo (sem extrato)	Houve crescimento bacteriano
	Controle de contaminação do EHEL(extrato sem bactéria)	Não houve crescimento bacteriano
GRAM -	<i>Escherichia coli</i> ATCC 35218 e ATCC 25922	>2000
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	>2000
	<i>Campylobacter coli</i> isolado	>2000
	Controle negativo (sem extrato)	Houve crescimento bacteriano
	Controle de contaminação do EHEL (extrato sem bactéria)	Não houve crescimento bacteriano

Legenda:

Controle negativo: meio de cultura com a bactéria, mas sem a adição do antibiótico, ou seja, o EHEL.

Controle de contaminação do EHEL: meio de cultura sem a bactéria, mas contendo o antibiótico, ou seja, o EHEL.

>2000: concentração de até 2.000 μ g/mL

5.5.3 Atividade antioxidante

As Tabela 8, 9 10, 11, 12, representam as concentrações utilizadas e a capacidade antioxidante CAOx(%) do EHEL e das frações das partes aéreas de *L. japonicus* e as Figuras 15, 16, 17, 18 e 19, representam as médias de três determinações da capacidade antioxidante de cada amostra, utilizadas para calcular as regressões lineares e a concentração de antioxidante, necessária para reduzir em 50% a concentração inicial de substrato (EC₅₀) ou DPPH.

EC₅₀ obtidos da regressão linear mostraram um bom coeficiente de correlação ($r > 0.90$). Análise estatística: ANOVA, dos resultados das três determinações ($p > 0,05$).

Tabela 8. Capacidade antioxidante CAOx (%) do EHEL das partes aéreas de *L. japonicus*.

Concentração ($\mu\text{g/mL}$)	Capacidade Antioxidante CAOx(%)	1/Concentração do extrato ($\mu\text{g/mL}$)	1/CAOx%
0,25	51,35 $\pm$ 0,00	2,00	0,01
0,20	41,74 $\pm$ 0,01	2,50	0,02
0,15	32,71 $\pm$ 0,03	3,33	0,03
0,10	23,16 $\pm$ 0,03	5,00	0,04
0,05	10,64 $\pm$ 0,00	10,00	0,09

Figura 15. Capacidade antioxidante do EHEL de *L. japonicus*. Cada ponto representa a média de 3 determinações.

Equação da reta: $y = a + bx$

$$a = 0,0002$$

$$b = 0,0047$$

$$\text{Regressão linear} = 0,9971$$

Cálculo de $Q_{1/2}$ (concentração necessária para atingir 50% da capacidade antioxidante)

$$y = 1/50 = -0,0002 + 0,0047x$$

$$EC_{50} = 237,37 \mu\text{g/mL}$$

Tabela 9. Capacidade antioxidante CAOx(%) da fração clorofórmica das partes aéreas de *L. japonicus*.

Concentração ($\mu\text{g/mL}$)	Capacidade Antioxidante CAOx(%)	1/Concentração do extrato ($\mu\text{g/mL}$)	1/CAOx%
0,5	$44,05 \pm 0,06$	2,00	0,02
0,4	$37,99 \pm 0,06$	2,50	0,02
0,3	$30,49 \pm 0,07$	3,33	0,03
0,2	$20,46 \pm 0,08$	5,00	0,05
0,1	$11,72 \pm 0,08$	10,00	0,09

Figura 16. Média de 3 determinações de cada concentração em relação a absorvância, referente a fração clorofórmica, sendo utilizado para realização do EC_{50} .

Equação da reta: $y = a + bx$

$a = 0,0029$

$b = 0,009$

Regressão linear = 0,9963

Cálculo de $Q_{1/2}$ (concentração necessária para atingir 50% da capacidade antioxidante)

$$y = 1/50 = 0,0029 + 0,009x$$

$$EC_{50} = 526,32 \mu\text{g/mL}$$

Tabela 10. Capacidade antioxidante CAOx(%) da fração acetato de etila das partes aéreas de *L. japonicus*.

Concentração ($\mu\text{g/mL}$)	Capacidade Antioxidante CAOx(%)	1/Concentração do extrato ($\mu\text{g/mL}$)	1/CAOx%
0,5	$50,14 \pm 0,02$	2,00	0,02
0,4	$43,25 \pm 0,02$	2,50	0,02
0,3	$33,60 \pm 0,03$	3,33	0,03
0,2	$22,22 \pm 0,02$	5,00	0,04
0,1	$10,70 \pm 0,01$	10,00	0,09

Figura 17. Média de 3 determinações de cada concentração em relação a absorbância, referente a fração de acetato de etila, sendo utilizado para realização do EC_{50} .

Equação da reta: $y = a + bx$

$a = 0,0003$

$b = 0,0095$

Regressão linear = 0,9994

Cálculo de $Q_{1/2}$ (concentração necessária para atingir 50% da capacidade antioxidante)

$$y = 1/50 = 0,0003 + 0,0095x$$

$$EC_{50} = 482,23 \mu\text{g/mL}$$

Tabela 11. Capacidade antioxidante CAOx(%) da fração de etanol das partes aéreas de *L. japonicus*.

Concentração ($\mu\text{g/mL}$)	Capacidade Antioxidante CAOx(%)	1/Concentração do extrato ($\mu\text{g/mL}$)	1/CAOx%
0,025	$13,82 \pm 0,11$	40,00	0,07
0,02	$11,35 \pm 0,12$	50,00	0,08
0,015	$9,11 \pm 0,12$	66,67	0,11
0,01	$5,83 \pm 0,12$	100,00	0,17
0,005	$3,57 \pm 0,13$	200,00	0,34

Figura 18. Média de 3 determinações de cada concentração em relação a absorvância, referente a fração do etanol, sendo utilizado para realização do EC_{50} .

Equação da reta: $y = a + bx$

$$a = 0,0007$$

$$b = 0,0017$$

$$\text{Regressão linear} = 0,9989$$

Cálculo de $Q_{1/2}$ (concentração necessária para atingir 50% da capacidade antioxidante)

$$y = 1/50 = 0,0007 + 0,0017x$$

$$EC_{50} = 88,08 \mu\text{g/mL}$$

Tabela 12. Capacidade antioxidante CAOx(%) da vitamina E .

Concentração ($\mu\text{g/mL}$)	Capacidade Antioxidante CAOx(%)	1/Concentração do extrato ($\mu\text{g/mL}$)	1/CAOx%
0,025	68,83 $\pm$ 0,02	40,00	0,01
0,020	55,33 $\pm$ 0,02	50,00	0,01
0,015	45,59 $\pm$ 0,00	66,67	0,02
0,010	34,52 $\pm$ 0,00	100,00	0,02
0,005	23,34 $\pm$ 0,01	200,00	0,04

Figura 19. Média de 3 determinações de cada concentração em relação a absorvância, referente a Vitamina E, sendo utilizado para realização do EC_{50} .

Equação da reta: $y = a + bx$

$$a = 0,0102$$

$$b = 0,002$$

$$\text{Regressão linear} = 0,9737$$

Cálculo de $Q_{1/2}$ (concentração necessária para atingir 50% da capacidade antioxidante)

$$y = 1/50 = 0,00102 + 0,002x$$

$$EC_{50} = 20,41 \mu\text{g/mL}$$

A Figura 20, compara a EC_{50} das partes aéreas de *L. japonicus* com vitamina E.

Figura 20. EC_{50} das frações em relação à vitamina E, utilizada como padrão, expressos em $\mu\text{g/mL}$.

6 DISCUSSÃO

O país com a maior diversidade genética vegetal do mundo é o Brasil, contribuindo com cerca de 120.000 espécies (DI STASI e HIRUMA-LIMA, 2002; GUERRA e NODARI, 2002). Acredita-se que apenas 10% das 2.000 espécies com ocorrência no Brasil e empregadas na medicina popular, foram estudadas do ponto de vista químico-farmacológico (DI STASI e HIRUMA-LIMA, 2002).

Para se obter uma droga com confiabilidade para ser utilizada no preparo de medicamentos deve-se proceder indispensavelmente à identificação e avaliação de seus princípios ativos (OLIVEIRA e AKISUE, 2000).

A identificação possui a idéia de comparação, a qual é realizada comparando a amostra com uma droga padrão, com descrições pormenorizadas existentes nas farmacopéias ou em literatura especializada (OLIVEIRA *et al.*, 1998).

No presente trabalho foram estudadas as partes aéreas de *L. japonicus*, tendo como base o uso popular (COIMBRA, 1958).

O nome correto da espécie previamente identificada como *L. sibiricus*, é *L. japonicus* (HARLEY, 2001), sendo este o nome adotado durante todo o trabalho.

A observação anatômica permite verificar se as estruturas analisadas se encaixam dentro de um padrão geral, havendo variações de um tipo de folha, flor, pecíolo para outro, em função da posição taxonômica do vegetal, ou de adaptações evolutivas aos diferentes meios onde elas ocorrem (OLIVEIRA e AKISUE, 2000).

De acordo com a descrição morfológica, realizada por alguns autores (MOREIRA, 1958b; FARMACOPÉIA, 1929), *L. japonicus* apresenta as folhas inicialmente com um formato oval-arredondado, as quais, com o envelhecimento, tornam-se trilobadas até tripartidas. A espécie é uma planta herbácea anual, com cerca de 1,0 a 1,20m de altura, caule e ramos quadrangulares (EPAGRI, 2000). Folhas opostas, simples, linear-lanceoladas, até leve ou profundamente trilobadas, base longo-cuneiforme, lobos mais ou menos longo-acuminados e dentiformes nas laterais.

Resultados semelhantes também puderam ser observados no presente trabalho, havendo uma discordância em relação à descrição da EPAGRI, referente à altura e ao ciclo de vida. Martins *et al* (1995) afirma que a espécie floresce no Brasil, apenas em setembro, mas foi constatado por Wadt (2000), que a planta possui ciclo semestral, desde o plantio, até a propagação das sementes, e floresce cerca de três meses após o plantio, em condições ideais, ocorrendo assim por todo o período do ano.

As condições apresentadas através da análise de solo demonstraram teores mais elevados de fósforo, potássio, enxofre e magnésio. Estando o manganês em quantidade baixa, sendo este fato positivo. Esse elemento é crítico e em maior quantidade pode ser tóxico para a maioria das espécies, sendo o solo considerado de baixa-média fertilidade. Em relação à análise de solo de Wadt (2000) o mesmo possui, uma média-alta fertilidade, voltada a alta fertilidade com boa quantidade de matéria orgânica e saturação de bases dentro de bom nível.

Sendo um dos objetivos do trabalho comparar o espécime de São Paulo através do trabalho de Wadt (2000) com a de Santa Catarina, é necessário acrescentar as tabelas comparativas 13, 14, 15, 16, 17 e 18 em relação a análise de solo, estudo químico e farmacológico.

Tabela 13. Comparação dos resultados das análises de solo obtidos no trabalho de Wadt (2000) e nos espécimes cultivados em Santa Catarina.

Resultados São Paulo	Resultados Santa Catarina
Solo com média-alta fertilidade (voltado a alta fertilidade com boa quantidade de matéria orgânica e saturação de bases dentro de bom nível).	Solo com baixa-média fertilidade

Resultados importantes foram obtidos no estudo anatômico do presente trabalho, no qual foram detectadas várias estruturas da espécie *L. Japonicus*.

Podem ser citados como exemplo, nas folhas, a presença de tricomas glandulares e tectores na face abaxial, inclusão celular inorgânica, composta

por oxalato de cálcio (Figura 3A). O mesofilo é caracterizado como dorsiventral acompanhado de camadas de colênquima, o caule possui feixe do tipo colateral aberto (Figura 5A). A camada externa ao floema se apresenta esclerificada (Figura 5B).

Resultados semelhantes à descrição anatômica foram observados no trabalho de Moreira (1958), com uma discordância em relação ao número de camadas de células da estrutura do limbo, onde o autor afirma que *L. japonicus* possui três camadas e nós observamos a presença de seis camadas.

A padronização de extratos e a determinação de métodos de controle de qualidade são exigidos por lei para produtos fitoterápicos comercializados.

O controle de qualidade deve ser realizado, no mínimo, através da análise farmacobotânica da droga vegetal e da análise química qualitativa, por exemplo, através do perfil cromatográfico em camada delgada.

Apesar dos resultados apresentados neste trabalho quanto às características macro e microscópicas de *L. japonicus*, devem ser realizados estudos químicos complementares desta espécie, visto que é de fundamental importância não só a correta identificação da droga vegetal, mas também, sua caracterização química, visando as substâncias ativas.

A triagem fitoquímica da droga vegetal e do EHEL forneceu indicativo da presença de flavonóides, óleo volátil, saponinas e taninos. Estes compostos são responsáveis por muitas atividades farmacológicas, dentre elas a antiulcerogênica (LEWIS e HANSON, 1991; MARTIN *et al.*, 1998; SCHENKEL *et al.*, 1999; MELLO e SANTOS, 2002; HARBORNE e WILLIAMS, 2000; LEWIS e SHAW, 2001).

Apesar da não detecção de alcalóides em nosso trabalho, assim como no trabalho de Wadt (2000), a presença destes foi confirmada na espécie, através da detecção de leonurina por Kubota e Nakashima (1930), Hayashi (1962), Martins *et al.* (1995).

A não detecção de alcalóides pode ser devida a alguns fatores, como: sensibilidade do método para quantidade de alcalóides presente na amostra, interações entre os macro e micro nutrientes do solo (KABATA - PENDIAS e PENDIAS, 1985), parte da planta que foi analisada (TANG e TSENG, 1934), a variação genotípica dos espécimes (KUNDU e SHARMA, 1986).

Segundo Wadt (2000), através da cromatografia líquida de alta eficiência, há indicação da presença de glicosídeos flavonoídicos, com tempos de retenção abaixo da rutina e entre rutina e neoesperidina, indicando que os compostos flavonoídicos deveriam estar acoplados a moléculas de açúcar, por serem os padrões heterosídeos. Os flavonóides não foram identificados, somente detectada a sua presença.

No presente trabalho, este grupo de compostos também foi detectado. A literatura também confirma sua presença nas espécies *L. sibiricus*, *L. tartaricus*, *L. lanatus*, *L. macranthus*, *L. quinquelobatus* (REUTER e DIEHL, 1970), e no gênero (CHULTEMSUREN e PETRENKO, 1971 e POPOV *et al.*, 1992). Recentemente foi isolada a flavona genkwanina, como marcador taxonômico do gênero *L.* (BOALINO *et al.*, 2004).

Através do perfil cromatográfico do EHEL e de todas as frações, foi verificada a presença de um composto (Figura 6), com Rf e coloração semelhantes aos da quercetina. Foram detectadas manchas amarelas na presença da luz UV (366nm), sugerindo a presença de flavonóides (WAGNER *et al.*, 1996). Estes poderão servir como marcadores dos extratos. Este grupo de substâncias pode ser parcialmente responsável pelas ações farmacológicas dos extratos. Para confirmação da presença de quercetina, seria necessária sua determinação estrutural, através de ressonância nuclear magnética e espectro de massas.

Wadt (2000) verificou a provável presença de rutina; em nosso trabalho, quercetina parece estar presente. Sendo a quercetina a genina da rutina, os dados de ambos estudos são parcialmente coincidentes.

Os flavonóides, presentes na droga vegetal e no EHEL foram quantificados, obtendo-se os teores, respectivamente, de 0,76% e de 2.3%. Estes valores são relativamente parecidos, comparando-se a Wadt (2000), com uma média de 0,65% na droga.

Tabela 14. Teor de flavonóides (em % de hiperósidos) em amostras de *L. japonicus*, referente a diversas coletas e cultivos por Wadt (2000).

Amostra	% de hipérosido
Cultivo (época de plantio)/fase	

I / 1	0,92
I / 2	0,91
I / 3	0,68
II / 1	0,81
II / 2	0,62
II / 3	0,52
III / 1	0,56
III / 2	0,55
IV / 1	0,71
IV / 2	0,66
IV / 3	0,89
V / 1	0,70
V / 2	0,81
V / 3	0,95
V / 4	0,49
VI / 1	0,43
VI / 2	0,29
VI / 3	0,15

Legenda:

Cultivo: I(12/93), II(01/94) , III(06/94), IV(07/94) ,V(03/95), VI(05/95),
plantio nas determinadas datas do ano.

Fase: 1- coleta um mês após plantio

2- coleta dois meses após plantio

3- coleta três meses após plantio

4- coleta quatro meses após plantio

Além dos flavonóides, outros compostos fenólicos vêm recebendo destaque na terapia antiulcerogênica, os taninos. Este grupo químico tem apresentado inúmeras atividades biológicas e farmacológicas, entre as quais se destacam as ações bactericida, anti-helmíntica, anti-hepatotóxica, de inibição da replicação do HIV e, principalmente, de complexação com macromoléculas (proteínas e polissacarídeos), antioxidante e seqüestrante de radicais livres (HASLAM, 1996).

Os taninos, presentes na droga vegetal e no EHEL, foram quantificados, obtendo-se os teores, respectivamente, de 0,06% e de 0,35%. Estes valores são relativamente baixos, comparando-se aos teores de 2,14% encontrados por Tariverdieva (1946) e 3,5%, por Arustmova (1962), na espécie *Leonurus cardiaca* L. Também foi constatada a presença de taninos no gênero, de acordo com Peyer e Vollmer (1935) e Varlakov (1944) e na espécie (REUTER

e DIEHL, 1970; MARTINS *et al.*, 1995). O trabalho de Wadt (2000) também foi positivo para presença de taninos, estes não tendo sido quantificados.

O gênero foi classificado como tendo baixo teor de óleo essencial nas partes aéreas, segundo Pater (1930) e Kokkini *et al.* (1989). Wadt (2000) encontrou 0,08% de óleo essencial nas folhas da espécie em estudo. Esse teor reduzido foi confirmado em nosso trabalho, no qual foi encontrado 0,06%.

Saponinas foram detectadas por nós, confirmando assim a citação da literatura em relação à presença das saponinas no gênero (PATER, 1930; TARIVERDIEVA, 1946; ZINCHENKO, 1956; ARUSTAMOVA, 1962; REUTER e DIEHL, 1970; PULATOVA, 1972). Em contradição, Wadt (2000) não confirma a presença deste grupo químico em seus experimentos, o que pode ser atribuído a diferenças devidas a local de cultivo.

Na **Tabela 15** é mostrada a comparação dos resultados da triagem fitoquímica e dos doseamentos de *Leonurus japonicus* Houtt. de São Paulo (Wadt, 2000) e de Santa Catarina.

Tabela 15. Comparação dos resultados da triagem química da droga (D) e do EHEL (E) de espécimes cultivados em São Paulo por Wadt (2000) e em Santa Catarina.

Grupo Químico	Reação de Caracterização	Resultados São Paulo		Resultados Santa Catarina	
		D	E	D	E
Alcalóides	Mayer	(-)	(-)	(-)	(-)
	Bertrand	(-)	(-)	(-)	(-)
	Dragendorff	(-)	(-)	(-)	(-)
	Bouchardat	(-)	(-)	(-)	(-)
Antraquinônicos	Borntraeger	(-)	(-)	(-)	(-)
Cardiotônicos	Lieberman-Burchard	(+)	(+)	(+)	(+)
	Kedde	(+)	(+)	(-)	(-)
	Baljet	(+)	(+)	(-)	(-)
	Keller-Killiani	(+)	(+)	(-)	(-)

Flavonóides	teor	Média 0,65%	Não realizado	0,76 %	2,3%
	Cloreto de Alumínio	(+)	(+)	(+)	(+)
	Shinoda	(+)	(+)	(+)	(+)
	Hidróxidos alcalinos	(+)	(+)	(+)	(+)
	Pew	(-)	(-)	Não realiz ado	Não realizado
Taninos	teor	Não realizad o	Não realizado	0,06 %	0,35%
	Cloreto Férrico	(+)	(+)	(+)	(+)
	Acetato de Chumbo	(+)	(+)	(+)	(+)
	Gelatina	(+)	(+)	(+)	(+)
	Acetato de Cobre	(+)	(+)	(+)	(+)
	Alcalóides	não realiza do	não realizado	(+)	(+)
Saponinas	Espuma persistente	(-)	(-)	(+)	(+)
	Hemólise	não realiza do	não realizado	(-)	(-)
Óleos	Odor	(+)	(+)	(+)	(+)
Essenciais	característico				
	Microdestilado	Fraca ment e +	(+)	(+)	(+)
Doseamento de óleos essenciais	Hidrodestilação	0.08 % planta fresca		0,05% planta fresca	

A avaliação da atividade antimicrobiana do EHEL de *L. japonicus* foi realizada através da determinação da concentração mínima inibitória, pelo método de difusão em placa.

As saponinas, em geral, apresentam capacidade de complexar com esteróides e freqüentemente apresentam ação antifúngica (SCHENKEL, GOSMANN e ATHAYDE, 2002). No extrato de *L. japonicus* foram detectadas algumas classes de substâncias com potencial atividade antimicrobiana (WADT, 2000). No modelo experimental ensaiado, EHEL não se mostrou efetivo contra *Escherichia. coli*, *Staphylococcus. aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Campylobacter coli*, em concentração de até 2.000 µg/mL. A metodologia utilizada foi diferente, sendo uma possível resposta para a diferença nos resultados.

Tabela 16. Comparação dos resultados e metodologia do ensaio antimicrobiano de espécimes cultivados em São Paulo (Wadt, 2000) e em Santa Catarina.

Ensaio Antimicrobiano	EHEL 0,5 mg/mL	EHEL 2000 µg/mL
metodologia	(FARM. BRAS., 1959; MATSUNAGA <i>et al.</i> , 1995; WADT <i>et al.</i> , 1996)	(NCCLS, 1990, 2000)
<i>Staphylococcus aureus</i>	Houve inibição microbiológica (0,5 mg/mL)	Não houve inibição microbiológica (>2000 µg/mL)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Houve inibição microbiológica (0,5 mg/mL)	Não houve inibição microbiológica (>2000 µg/mL)

A úlcera péptica gastroduodenal é uma doença resultante da perda circunscrita de tecido da mucosa, ocorrendo nas regiões do trato digestivo que entram em contato com a secreção ácida do estômago (LÜLLMANN *et al.*,

1993). A úlcera é uma lesão do revestimento da mucosa gástrica (MIZUI e DOTEUCHI, 1983).

Embora a patogenia da úlcera péptica não esteja totalmente esclarecida, são reconhecidos três fatores principais, como a infecção com o gram-negativo *Helicobacter pylori*, aumento da secreção de ácido clorídrico e a defesa deficiente da mucosa contra o ácido gástrico (MYCEK, 1998).

A patogenia da úlcera péptica pode ser resultante de desequilíbrio entre as funções agressoras e protetoras. A proteção da mucosa do aparelho digestivo contra a ação do suco gástrico está relacionada à produção de muco, de bicarbonato, o aumento de fluxo sanguíneo e à restituição das células parietais. As prostaglandinas produzidas localmente estimulam a secreção tanto de muco quanto de bicarbonato. Como fatores agressores são importantes o excesso de ácido, pepsina, álcool, antiinflamatórios não esteroidais, estresse (RANG e DALE, 2004), síndrome de Zollinger-Ellison, que é um tumor pancreático estimulador da produção de gastrina, e a bactéria *Helicobacter pylori* (LÜLLMANN *et al.*, 1993).

O tratamento está relacionado aos bloqueadores H₂, inibidores da bomba protônica, neutralizantes gástricos, citoprotetores gástricos e fármacos utilizados no tratamento do *Helicobacter pylori* (LÜLLMANN *et al.*, 1993; MYCEK, 1998 e RANG e DALE, 2004).

Temos como exemplo de citoprotetor a carbenoxolona, derivado sintético do ácido glicirrético, extraído das raízes do alcaçuz ou *Glycyrrhiza glabra* L., que estimula a produção de muco (LÜLLMANN *et al.*, 1993). Segundo Borrelli e Izzo (2000), aquele foi o primeiro fármaco utilizado para acelerar a cura da úlcera gástrica, através de um mecanismo que não envolvia a inibição da secreção de ácido.

Um dos métodos para averiguar a atividade antiúlcera foi baseado em modificações de Mizui e Doteuchi (1983) e Matsumoto e Yamada (1991), utilizando como modelo a indução aguda pelo etanol acidificado, que ocorre por uma ação local, entre outros fatores.

A administração de etanol induz a uma rápida e forte venoconstrição seguida por uma dilatação arteriolar, ocasionando isquemia e reperfusão, levando, segundo Salim (1990) a hipóxia e então ao aumento da concentração de íons superóxido.

Os radicais livres (O_2^- , OH) atacam constituintes essenciais da célula como ácidos nucleicos, proteínas, lipídeos, induzem a peroxidação dos lipídeos da membrana, levando a formação de compostos tóxicos como os oxiradicais, epóxidos, aldeídos e radicais livres novos, podendo ocorrer a morte celular, devido a sua extrema reatividade (GLAVIN e SZABO, 1992; KAHRAMAN, 2003). Estes compostos tóxicos também contribuem para a ação oxidante, por possuírem a enzima NADPH oxidase, que transforma oxigênio molecular em ânion superóxido, favorecendo a formação de lesão na mucosa gástrica (LA CASA, 2000).

Segundo Marhuenda *et al.* (1993), o responsável pela necrose na mucosa gástrica é o etanol, devido a modificação da composição de glicoproteínas, redução do bicarbonato e do muco e, segundo Mizui e Doteuchi (1983), a acidificação do etanol acelera e agrava a severidade da lesão gástrica.

A indução da lesão gástrica pelo etanol ou pelo etanol acidificado ocorre devido a redução do fluxo sangüíneo na mucosa gástrica, seguida de estase sangüínea, que contribui para o desenvolvimento de hemorragias e necrose de tecidos (GUTH, 1984).

Estas disfunções podem ser prevenidas através do uso de substâncias antioxidantes, capazes de se estabelecerem na membrana e se contraporem à formação de peróxidos (DE GROOT, DEHMLOW e RAUEN, 1996; HALLIWELL, 1996). Alguns agentes possuem ação citoprotetora, assim como as sulfidrilas (SH), que limitam a produção de radicais livres (KONTUREK *et al.*, 1990), as prostaglandinas, que mantêm o fluxo sangüíneo alto, sendo importante para a rápida reparação tecidual (SZABO, PIHAN e DUPUY, 1987), a enzima antioxidante glutathione peroxidase (GSH-Px), com a função da eliminação de peróxidos de hidrogênio e lipídeos oxidados (LA CASA, 2000). Os flavonóides, através da estimulação da produção de muco e secreção de bicarbonato (CRISTONI, MALANDRINO e MAGISTRETTI, 1989; LEWIS e SHAW, 2001), possuindo também ação seqüestrante de radicais livres (BOMBARDELLI e MORAZZONI, 1993; WOLF, CHRISTA e MANFRED, 1994; CATAPANO, 1997), conduzem à atividade antioxidante.

Segundo Mizui e Doteuchi (1983), a prostaglandina E_2 não afeta a secreção ácida e previne a formação de lesões gástricas nos ratos, induzidas

pela administração de etanol acidificado, confirmando a demonstração de Robert *et al.* (1979), onde a citoproteção das prostaglandinas é independente da inibição da secreção de ácido gástrico. Sendo assim, as ulcerações que são induzidas por etanol não são inibidas por substâncias que interferem na secreção de ácido, como a cimetidina, mas são inibidas por agentes que aumentam os fatores de defesa da mucosa, como as prostaglandinas.

No modelo utilizado, o EHEL das partes aéreas de *L. japonicus*, na dose de 400mg/kg, via oral, diminuiu significativamente os níveis de lesão em relação ao grupo que recebeu apenas etanol e ácido clorídrico, reduzindo em 100% a área total de lesão (ATL), o índice de lesão ulcerativa (ILU) e a área relativa de lesão (ARL) como pode ser observado nas Figura 8 a Figura 12. Nas frações clorofórmica e acetato de etila houve redução em 92%, 82% na ATL, no ILU 81% e 78% e no ARL 78% e 66% respectivamente, como pode ser observado nas Figura 13 a Figura 13 10.

Nas dosagens 100, 200 e 400mg/kg de EHEL, foi possível verificar uma maior redução em relação aos ILU e ARL, no parâmetro Área Total de Lesão, de 74%, 87% e 97%, respectivamente (Figura 14 a Figura 14. 6). A redução na dose de 100mg/kg no parâmetro de Índice de Lesão Ulcerativa foi não significativa, sendo esta, portanto, a menor dosagem ensaiada.

Estas observações são diferentes daquelas citadas por Wadt (2000), que constatou uma redução de 59% no número de ulcerações de grande extensão com o extrato hidroalcólico 70%, comparado com 100% em nosso trabalho.

Esta diferença pode ser devida a alguns fatores relevantes, como a presença de saponinas, as quais foram detectadas em nosso trabalho, não tendo sido detectadas no trabalho de Wadt (2000) já o teor de taninos não pode ser comparado, por não ter sido determinado por Wadt (2000).

Tabela 17. Comparação dos resultados do ensaio antiúlcera de espécimes cultivados em São Paulo por Wadt (2000) e em Santa Catarina.

Ensaio Antiúlcera	São Paulo	Santa Catarina
dosagem	EHEL	EHEL
	400 mg/kg	400 mg/kg

metodologia	(MIZUI DOTEUCHI, 1983)	e (MIZUI DOTEUCHI, 1983)	e
Redução das úlceras em relação ao controle	60%	100%	

Muitos estudos, incluindo flavonóides e taninos, têm demonstrado inúmeras atividades farmacológicas no trato gastrointestinal, como ação antioxidante (YOKOZAWA, 1998). É afirmado por La Casa (2000), que a ação gastroprotetora da rutina, em úlcera induzida por etanol 50%, é consequência do efeito anti-lipoperoxidante devido ao aumento da atividade da enzima antioxidante glutathione (GSH-Px). Atribuem-se, também, aos flavonóides, o aumento do conteúdo local de prostaglandinas, a diminuição da secreção de histamina, a inibição da bomba de prótons e a inibição do *H. pylori*.

Apresentaram ação antiúlcera naringina, quercetina, rutina e canferol (DI CARLO, 1999).

Desta forma, estes dados, juntamente com aqueles da triagem fitoquímica qualitativa (Tabela 4), sugerem que os flavonóides e os taninos possam ser os possíveis princípios ativos, visto que são potentes compostos antioxidantes, capazes de inibir a peroxidação lipídica e de inativar os ânions superóxido (HASLAM, 1996; ARTS *et al.*, 2001), produzindo assim um significativo efeito antiulcerogênico.

Diante de todo este contexto e da significativa atividade antiúlcera apresentada pelo EHEL da espécie vegetal em estudo, realizamos o ensaio de atividade antioxidante.

Uma substância antioxidante inibe o processo de oxidação, e assim protege os sistemas biológicos contra os efeitos danosos de processos ou reações que promovem a oxidação de macromoléculas ou estruturas celulares (ABDALA, 1996).

O organismo possui substâncias que impedem a geração de espécies reativas, ou sequestram-nas, de forma a impedir sua interação com células alvo, bloqueando, assim, a etapa de iniciação da cadeia radicalar. Exemplos são as enzimas antioxiantes, quelantes e proteínas, como a transferrina e a

ceruloplasmina, que transportam ferro e cobre, impedindo que esses metais sejam liberados e catalisem a formação de espécies oxidantes; substâncias não enzimáticas, como ascorbato, carotenóides, bilirrubina, que seqüestram radicais superóxido e hidroxila, ou suprimem oxigênio singlete (DE BONO, 1994).

Esses antioxidantes geralmente são compostos fenólicos ou aminas aromáticas, como α -tocoferol, flavonóides e vários antioxidantes sintéticos (ABDALA, 1996; LARSON, 1988).

Os ácidos graxos poliinsaturados fazem parte das estruturas de células e organelas e são suscetíveis aos danos oxidativos (CARE, 1994).

Foi verificada por Husain *et al.* (1987) a capacidade dos flavonóides de captar radicais hidroxila (OH), decrescendo a capacidade na seguinte ordem: miricetina > quercetina > ramnetina > morina > diosmetina > naringenina > apigenina > catequina > 5,7-diidroxi-3',4',5'-trimetoxiflavona > robinina > canferol > flavona. Foi observado que a atividade aumenta com o aumento do número de grupos hidroxila substituídos no anel aromático B.

Quercetina, rutina, isoquercetina, possuidores da estrutura com grupos orto-hidroxil no anel B, apresentaram atividade antioxidante (YOKOZAWA, 1998). O grupo orto-hidroxil pode ser considerado a estrutura mais importante nos flavonóides e taninos para a inibição da atividade dos radicais livres (YOKOZAWA, 1998).

No presente trabalho a atividade antioxidante foi detectada através do reativo 2,2'-difetil-1-picril-hidrazil (DPPH). Este método permite a utilização de grande número de amostras, em curto período de tempo, sendo suficientemente sensível para detectar princípios ativos em baixas concentrações (YOKOZAWA, 1998).

A atividade antioxidante foi detectada através do reativo 2,2'-difetil-1-picril-hidrazil (DPPH). O método utilizando este reativo pode ser realizado com grande número de amostras, em curto período de tempo, sendo suficientemente sensível para detectar princípios ativos em baixas concentrações (YOKOZAWA, 1998).

Os flavonóides com múltiplas substituições hidroxila mostraram ação anti-radicaux peroxila, muitas vezes maior que o Trolox, que é um análogo hidrossolúvel da vitamina E (JOVANOVIC *et al.*, 1994).

Os resultados obtidos para o EHEL e frações, de *L. japonicus*, não foram significativos no ensaio de atividade antioxidante. Estes extratos apresentaram EC₅₀ (coeficiente de inibição referente à concentração efetiva necessária para diminuir em 50% a oxidação em presença do liofilizado) de 237 µg/mL EHEL, 526 µg/mL (Clorofórmio), 482 µg/mL (Acetato de Etila), 169 µg/mL (etanol 50%), 88 µg/mL (etanol). Os resultados foram comparados com os valores de Vit E, de 20 µg/mL (tabelas 8 a 12 e figuras 15 a 20).

O valor encontrado por Wadt (2000) foi de 53 µg/mL, de *L. japonicus*.

Tabela 18. Comparação dos resultados do ensaio antioxidante de espécimes cultivados em São Paulo Wadt (2000) e em Santa Catarina.

Ensaio Antioxidante	São Paulo	Santa Catarina
	EHEL	EHEL
metodologia	(BRAND-WILLIAMS,1995)	(LISSI, CÁCERES e VIDELA,1986; BARROS <i>et al.</i> ,1996; BOVERIS <i>et al.</i> ,1983)
EC₅₀	53 µg/mL	237 µg/mL

Devido a esta diferença nos resultados dos extratos, pode se considerar alguns fatores, como a diferença de metodologia utilizada. Os espécimes de São Paulo foram analisados através da preparação do homogenato de cérebro, de acordo com Lissi *et al* (1986); Barros *et al* (1996); Boveris *et al* (1983). Outros fatores que devem ser considerados são o local do cultivo, a quantidade de taninos e flavonóides e a diferença na composição dos extratos. Também pode ter ocorrido devido a diferença de solo, o qual apresentou maior fertilidade.

É importante verificar que, enquanto a atividade antiúlcera foi mais evidente no nosso trabalho, a atividade antioxidante foi menor. Já no trabalho de Wadt (2000), a atividade antiúlcera foi menor e a atividade antioxidante foi mais evidente.

Através destes resultados, pode-se constatar que a atividade antiúlcera não está diretamente ligada à atividade antioxidante. Flavonóides e taninos

presentes no extrato de *Leonurus japonicus* Houtt possivelmente atuam contra as lesões gástricas, pelo fato de aumentarem os fatores de proteção e a atividade antioxidante, através do conjunto destes mecanismos. No gênero *Leonurus* foram encontrados os flavonóides quercetina, isoquercetina, canferol, apigenina (KARTNING *et al.*, 1985; TOMAS-BARBERAN, KRESTOVSKAYA e GIL, 1993).

Através dos resultados obtidos, comprova-se a atividade antiúlcera do extrato das partes aéreas de *L. japonicus*, no modelo ensaiado. É necessário que outras doses e outros modelos sejam ensaiados. Através de isolamento biodirecionado pode-se chegar ao composto ativo.

7 CONCLUSÕES

Nas observações morfológicas e anatômicas das folhas, pecíolo e caule, foram verificadas algumas estruturas importantes para a identificação da espécie como, folhas opostas, simples, linear-lanceoladas, até leve ou profundamente trilobadas, base longo-cuneiformes, lobos mais ou menos longo-acuminados e dentiformes nas laterais, planta herbácea, com cerca de 60cm a 2m de altura, com caules e ramos quadrangulares, duros, eretos, sulcados e glabros, tricomas glandulares com a cabeça unicelular, bicelular, multicelular, com pedicelo unicelular, tricomas tectores unicelulares, bicelulares e unisseriados, estômatos anomocíticos, areia cristalina, substâncias de caráter polifenólico, mesofilo dorsiventral, feixes vasculares colaterais e colênquima lamelar na nervura.

O EHEL representou um rendimento de 16,34%, as frações clorofórmica, de 11,81%, acetato de etila de 3,14%, etanol 50%, de 4,4% e etanol, de 25,67%.

A triagem fitoquímica da droga vegetal e do EHEL, forneceu indicativo da presença de flavonóides, óleo volátil, taninos e saponinas. No perfil cromatográfico foi verificado um composto químico com semelhante coloração e distância de percurso ao padrão de quercetina. Foi encontrado um teor reduzido de óleos essenciais, de 0,06%, de taninos, na droga vegetal, de 0,06% e no extrato (EHEL) de 0,35% e de flavonóides na droga vegetal, de 0,76% e no extrato (EHEL), de 2,3%.

O extrato bruto apresentou atividade antiúlcera extremamente significativa no modelo de indução por etanol acidificado, administrado na dose de 400 mg/kg, por via oral, reduzindo o Índice de Lesão, Área Total de Lesão e Área Relativa de Lesão em 100%, principalmente do extrato e das frações clorofórmica e acetato e etila, comparativamente ao controle, o EHEL reduziu em 100% a área total de lesão(ATL), índice de lesão ulcerativa (ILU), área relativa de lesão(ARL). Nas frações clorofórmica e acetato de etila houve redução em 92%, 82% na ATL, no ILU 81% e 78% e no ARL 78% e 66% respectivamente.

Nas dosagens 100, 200 e 400mg/kg de EHEL, foi possível verificar uma maior redução em relação aos ILU e ARL, no parâmetro Área Total de Lesão, de 74%, 87% e 97%, respectivamente.

Na avaliação antimicrobiana o EHEL não se mostrou efetivo contra *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Campylobacter coli* em uma concentração de até 2.000 µg/mL utilizado.

O extrato não apresentou resultado significativo em relação a atividade antioxidante testada através do método que reduz o radical 2,2'-difeníl-1-picrilhidrazil (DPPH), tendo os extratos apresentado EC₅₀ (coeficiente de inibição referente à concentração efetiva necessária para diminuir em 50% a oxidação em presença do liofilizado), do EHEL foi de 237 µg/mL, da fração clorofórmio, de 526 µg/mL, da fração acetato de etila, de 482 µg/mL, etanol 50%, de 169 µg/mL e etanol, de 88 µg/mL. Os valores foram comparados com o valor da vit E, de 20 µg/mL.

Comparando os resultados dos extratos de São Paulo (Wadt, 2000) com os de Santa Catarina, concluímos que os grupos químicos encontrados são os mesmos com exceção das saponinas. A ação antiúlcera foi mais evidente das amostras de Santa Catarina e a atividade antioxidante, nas amostras de São Paulo.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDALA, D.S.P. Radicais livres e antioxidantes. In: OGA, S.; CHASIN, A.A.M.; MACHADO-SANTELLI, G.M. **Fundamentos de toxicologia**. São Paulo: Atheneu, 1996. cap.1.4, p.37-58.

AITZETMULLER, K.; TSEVEGSUREN, N.; VOSMANN, K. A new allenic fatty acid in *Phlomis* seed oil. **Fett/Lipid**, v.99, p.74-78, 1997.

ALPER, J. Ulcers as an infectious disease. **Science**, v.260, n.9, p.159-160, 1993.

ANON. The efficiency of two weed – killing sprays. **Agricultural Journal (Bridgetown)**, v.7, p.13-17, 1938.

ARTS, M.J.T.J.; HAENEN, G.R.M.M.; VOSS, H.P.; BAST, A. A masking of antioxidant capacity by the interaction of flavonoids with protein. **Food and Chemical Toxicology**, v.39, n.8, p.787-91, 2001.

ARUSTAMOVA, F.A. The chemical composition of *Leonurus cardiaca* from Azerbidzhan. **Biologicheskije Nauki**, v.15, n.5, p.77-82, 1962. *apud* *Chemical Abstract*., Columbus, v.57, abstr.n.12901f, 1962.

BACCHI, E.M.; FREITAS, P.C.D.; FERRO, V.O. **Práticas de farmacognosia**. São Paulo: Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, 1998. 109p. [Apostila].

BADAMI, R.C.; PATIL, K.B. Minor seed oils. X: Physico-chemical characteristics and fatty acid composition of seven minor oils. **Journal of the Oil Technologist's Association of India**, v.7, n.3, p.82-4, 1975. *apud* SciFinder Scholar. American Chemical Society, c2005. [acesso on line].

BANERJEE, A.; DE, B. Anthocyanins in some flowers of West Bengal. **Journal of Medicinal and Aromatic Plant Sciences**, v.23, n.4, p.600-604, 2001.

BARROS, S. B. M., TEIXEIRA, D. S., AZNAR, A. E., MOREIRA, A. J., ISHII, I., FREITAS, P. C. D. Antioxidant activity of ethanolic extracts of *Photomorphe umbellata* L. Miq. (Pariparoba). **Ciência e Cultura**, São Paulo, v. 48, 114 – 116, 1996.

BOALINO, D.M.; McLEAN, S.; REYNOLDS, W.F.; TINTO, W.F. Labdane Diterpenes of *Leonurus sibiricus*. **Journal of Natural Products**, v. 67, n. 4, p. 714 -717, 2004.

BOMBARDELLI, E.; MORAZZONI, P. The flavonoids: new perspectives in biological activities and therapeutics. **Chimica Oggi**, v.11, p.25-28, 1993.

BORRELLI, F.; IZZO, A.A. The plant kingdom as a source of anti-ulcer remedies. **Phytotherapy Research**, v.14, p.581-591, 2000.

BOVERIS, A., FRAGA, C. G., VARSAVSKY, A. I., KOCH, O. R. Increased chemiluminescence and superoxide. Production in the liver of chronically ethanol treated rats. **Arch. Biochem. Biophys.** New York, v. 227, n. 2, p. 534 – 541, 1983.

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

CARE, E. Free radicals, antioxidants and preventive geriatrics. **Australian Family Physician**, v.23, n.7, p.1297-1305, 1994.

CASTRILLO, M.; VIZCAINO, D.; MORENO, E.; LATORRACA, Z. Chlorophyll content in some cultivated and wild species of the family Lamiaceae. **Biologia Plantarum**, v.44, n.3, p.423-425, 2001.

CATAPANO, A.L. Antioxidant effects of flavonoids. **Angiology**, v.48, p.39-44, 1997.

CHAO, Z.; MA, L.; ZHOU, X. Determination of stachydrine and leonurine in *Herba leonuri* by ion-pair reversed-phase high-performance liquid chromatography. **Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao**, v.24, n.11, p.1223-1226, 2004. *apud* SciFinder Scholar. American Chemical Society, c 2005. [acesso on line].

CHEN, G.; HUO, Y.; TAN, D.X.; LIANG, Z.; ZHANG, W.; ZHANG, Y. Melatonin in Chinese medicinal herbs. **Life Sciences**, v.73, n.1, p.19-26, 2003.

CHEN, J.; HUANG, C.; FAN, X.; ZHOU, F.; GUO, S. Study on contents of four heavy metals in *Leonurus japonicus* and soil in Jinhua suburb. **Zhej Lang Shi Fan Da Xue Xue Bao, Ziran Ke Xue Ban**, v.27, n.3, p.276-278, 2004. *apud* SciFinder Scholar. American Chemical Society, c 2005. [acesso on line].

CHEN, I.C.; CHANG, H.C.; YANG, H.W.; CHEN, G.L. Evaluation of total antioxidant activity of several popular vegetables and Chinese herbs: a fast approach with ABTS/H₂O₂/HRP system in microplates. **Yao Wu Shi Pin Fen Xi**, v.12, n.1, p.29-33, 2004. *apud* SciFinder Scholar. American Chemical Society, c 2005. [acesso on line].

CHULTEMSUREN, M.; PETRENKO, V.V. Levels of some active substances in *Leonurus* growing in Mongolia. **Farm. Zh.**, v.26, n.3, p.60-4, 1971. *apud* Chemical Abstract., Columbus, v.75, abstr.n.106125h, 1971.

COIMBRA, R. **Notas de fitoterapia**: catálogo dos dados principais sobre plantas utilizadas em medicina e farmácia. 2.ed. Rio de Janeiro: Silva Araújo, 1958. 173 p.

COMETTO, P.M.; FAYE, P.F.; DI PAOLA NARANJO, R.D.; RUBIO, M.A.; ALDAO, M.A.J. Comparison of free amino acids profile in honey from three argentinian regions. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.51, n.17, p.5079-5087, 2003.

CORREA, M.P. **Dicionário de plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas**. Rio de Janeiro: Imprensa Nacional, 1984. v.4, pt.1, p.137-138.

COSTA, A.F. **Farmacognosia**. 4.ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbekian, 1994. v.2.

COSTA, A.F. **Farmacognosia**. 3.ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbekian, v.3, 3v., 2000.

CRISTONI, A.; MALANDRINO, M.J.; MAGISTRETTI, M.J. Effect of a natural falvonoid on gastric muscosal barrier. **Drug Research**, v.39, n.1, p.590-592, 1989.

DE BONO, D.P. Free radicals and antioxidante in vascular biology: the roles of reaction kinetics, enviroment and substrate turnover. **Quarterly Journal of Medicine**, v.87, p.445-458, 1994.

DE GROOT, H.; DEHMLow, C.; RAUEN, U. Tissue injury by free radicals and the protective effects of flavonoids. **Methods and findings in Experimental and Clinical Pharmacology**, v.18, p.23-25, 1996.

DI CARLO, G.; MASCOLO, N.; IZZO, A.A.; CAPASSO, F. Flavonoids: old and new aspects of a class of natural therapeutic drugs. **Life Sciences**, v.65, n.4, p.337-353, 1999.

DI STASI, L.C.; HIRUMA-LIMA, C.A. **Plantas medicinais na Amazônia e na Mata Atlântica**. 2.ed. São Paulo: UNESP, 2002. 604p.

DI STASI, L.C., org. **Plantas medicinais: arte e ciência: um guia de estudos interdisciplinar**. São Paulo: UNESP, 1996. 230p.

Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina. Version 1.0. For Windows. EPAGRI, 2000. CD-ROM.

EUROPEAN Pharmacopoeia: supplement 2001. 3.ed. Strasbourg: Concil of Europe, 2001. 1705p.

FARMACOPÉIA dos Estados Unidos do Brasil. São Paulo: Nacional, 1929.

FARMACOPÉIA dos Estados Unidos do Brasil. 2.ed. São Paulo: Siqueira, 1959. 1265p. (Código farmacêutico brasileiro, v.1).

FARMACOPÉIA Brasileira. 4.ed. São Paulo: Atheneu, 1988.

FARMACOPÉIA Brasileira, 4.ed, Fascículo 4 parte ii, monografia 182, 2003.

FARNSWORTH, N.R. Biological and pytochemical screening of plants. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.55, n.3, p.225-276, 1966.

FRANKLIN, G.L. Preparation of thin seccions of synthetic resins and wood-resin composities, and a new macerating method for wood. **Nature**, v.155, p.51, 1945.

GLAVIN, G.B.; SZABO, S. Experimental gastric mucosal injury: laboratory models reveal mechanisms of pathogenesis and new therapeutic strategies. **FASEB Journal**, v.6, n.3, p.825-831, 1992.

GONZALEZ F.G.; PORTELA T.Y.; STIPP, E.J.; DI STASI, L.C. Antiulcerogenic and analgesic effects of *Maytenus aquifolium*, *Sorocea*

bomrlandii and *Zolernia ilicifolia*. **Journal of Ethnopharmacology**, v.77, p.41-47, 2001.

GONZALEZ, F.G. **Estudo farmacognóstico e farmacológico de *Ceasalpinia ferrea* Martius**. São Paulo, 2004. 137p. Tese de Doutorado - Faculdade Ciências Farmacêuticas - Universidade de São Paulo.

GOTO, T.; KATO, N.; HIRATA, Y.; HAYASHI, Y. The structure of leonurine. **Tetrahedron Letters**, v.3, n.13, p.545-548, 1962.

GUERRA, M.P.; NODARI, R.O. Biodiversidade: aspectos biológicos, geográficos, legais e éticos. In: SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R., orgs. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 4.ed. Porto Alegre: UFRGS; Florianópolis: UFSC, 2002. 833p.

GUO, X.; YANG, R. Effect of different ultrasonic frequencies on extraction rate of leonurine from *Leonurus heterophyllus*. **Zhong Guo Yiy Uan Yao Xue Za Zhi**, v.19, n.8, p.465-466, 1999.

GUO, X. Relation between ultrasonic deduced damage on *Leonurus heterophyllus* stem tissues with production rate of Leonurine. **Sha An Xi Shi Fan Da Xue Xue Bao, Ziran Ke Xue Ban**, v.32, n.4, p.56-58, 2004. *apud* Chemical Abstract *apud* SciFinder Scholar. American Chemical Society, c 2005. [acesso on line].

GUTH, P.H. Histologic and microcirculatory changes in alcohol - induced gastric lesions in the rat: effect of prostaglandin cytoprotection. **Gastroenterology**, v.87, p.1083-1090, 1984.

HALLIWELL, B. Antioxidants in human health and disease. **Annual Review of Nutrition**, v.16, p.33-50, 1996.

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

HARLEY, R.; PATON, A. *Leonurus japonicus* Houtt (Labiatae): correct name for a common tropical weed. **Kew Bulletin**, v.56, p.243-244, 2001.

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

HAYASHI, Y. Ingredientes of *Leonurus sibiricus*. II. **Yakugaku Zasshi**, v.82, p.1025-7, 1962. *apud* Chemical Abstract., Columbus, v.58, abstr.n.4605h, 1963.

HAYASHI, Y. Ingredients of *Leonurus sibiricus*. III. Structure of leonurine. 3. **Yakugaku Zasshi**, v.83, p.271-4, 1963.

HAYASHI, K.; IKOMA, R.; DEUAMA, T. Phenolic compounds and iridoids from *Leonurus sibiricus*. **Natural Medicines**, v.55, n.5, p.276, 2001. *apud* Chemical Abstract *apud* SciFinder Scholar. American Chemical Society, c 2005. [acesso on line].

HE, C.S.; YU, C.F.; WANG, H. Chemical studies on the chinese drug, I-mu-tsao. I. Structure of alkaloid A. **Scientia Sinica (English Edition)**, v.11, p.1341-52, 1962.

HEFTMANN, E. **Chromatography**. 2.ed. New York: Van Nostrand Reinhold, 1967. 851p. (Reinhold chemistry textbook series).

HON, P.M.; LEE, C.M.; SHANG, H.S.; CUI, Y.X.; WONG, H.N.C.; CHANG, H.M. Prehispanolone, a labdane diterpene from *Leonurus heterophyllus*. **Phytochemistry**, v.30, n.1, p.354-356, 1991.

HON, P.M.; WANG, E.S.; LAM, S.K.M.; CHOY, Y.M.; LEE, C.M.; WONG, H.Y. Preleoheterin and leoheterin, two labdane diterpenes from *Leonurus hetereophyllus*. **Phytochemistry**, v.33, n.3, p.639–641, 1993.

HONG, S.S.; HWANG, J.S.; LEE, S.A.; HWANG, B.Y.; HA, K.W.; ZE, K.R.; SEUNG, R.S.; RO, J.S.; LEE, K.S. Isolation and quantitative analysis of leonurine from Leonuri Herba. **Saengyak Hakhoechi**, v.32, n.4, p.322-326, 2001. *apud* SciFinder Scholar. American Chemical Society, c 2005. [acesso on line].

HOTTA, K.; NOGUCHI, Y.; MATSUNAGA, M.; NISHIBE, K.; UCHIDA, K.; SHIMIZU, K.; KONO, T.; SUMIO, A. Leonurus heterophyllus extracts and b-sitostenone as antiarrhythmics. **Jpn. Kokai Tokkyo Koho**, 8 pp., 18 Apr 2003. *apud* SciFinder Scholar. American Chemical Society, c 2005. [acesso on line].

HSU, C.F. A chemical study of the seed of *Leonurus sibiricus* L. (I-maotsao) and the composition of its oil. **Acad. Sinica Mem. Natl. Res. Inst Chem.**, v.8, p.1-32, 1932. *apud* Chemical Abstract., Colombus, v.27, abstr.n.32875, 1933.

HSU, C.F. The alkaloid of the seed of *Leonurus sibiricus* L. (I-maotsao). **J. Chinese Chem. Soc.**, v.2, p.337-9, 1934. *apud* Chemical Abstract., Colombus, v.29, abstr.n.26594, 1935.

HUANG, K.C. **The pharmacology of chinese herbs**. Boca Raton: CRC Press, 1993. 249p.

HUSAIN, S.R.; CILLARD, J.; CILLARD, P. Hidroxyl radical scavenging activity of flavonoids. **Phytochemistry**, v.26, n.9, p.2489-2491, 1987.

ITO, M. Application of the labiatae plants in cosmetics. **Fragrance Journal**, v.29, n.5, p.77-80, 2001.

JIANG, S. HPLC analysis of stachydrine in *Leonurus japonicus*. **Yao Wu Fen Xi Za Zhi**, v.21, n.4, p.243-247, 2001. *apud* SciFinder Scholar. American Chemical Society, c 2005. [acesso on line].

JOHANSEN, D.A. **Plant microtechnique**. New York, London: McGraw–Hill, 1940. 523p. (McGraw–Hill publications in the botanical sciences).

JOVANOVIĆ, S.V.; STEENKEN, S.; TOSIC, M.; SIMIC, M.G.; MAYANOVIĆ, B. Flavonoids as antioxidants. **Journal of the American Chemical Society**, v.116, p.4846-4851, 1994.

KABATA-PENDIAS, A.; PENDIAS, H. **Trace elements in soils and plants**. 2.ed. Boca Raton: CRC Press, 1985. p.67-68.

KAHRAMAN, A. The antioxidative and antihistaminic properties of quercetin in ethanol-induced gastric lesions. **Toxicology**, v.183, p.133-142, 2003.

KARPOVICH, V.N. Preliminary investigation of plants found in Eastern recipes used in cardiovascular disease. **Trudy Leningradskogo Khimiko-Farmatsevticheskogo Instituta**, v.12, p.195-200, 1961. *apud* SciFinder Scholar. American Chemical Society, c 2005. [acesso on line].

KARTNING, T.; GRUBER, A.; MENZINGER, S. Flavonoid – O – glycosides from the herbs of *Leonurus cardiaca*. **Journal of Natural Products**, Columbus, v.48, n.3, p.494-507, 1985.

KIM, H.J.; CHUNG, S.K.; CHOI, S.W. Lipoxygenase inhibitor from defatted nutmeg seed. **Journal of Food Science and Nutrition**, v.3, n.3, p.216-220, 1998. *apud* SciFinder Scholar. American Chemical Society, c 2005. [acesso on line].

KISHI, Y.; SUGIURA, S.; INOUE, S.; HAYASHI, Y.; GOTO, T. Synthesis of leonurine. **Tetrahedron Letters**, n.5, p.637-40, 1968.

KOBAYASHI, Y.; ITO, M. Valuation of phytotoxic activity of naturally occurring phenolic compounds. **Zasso Kenkyu**, v.43, n.4, 1998. *apud* SciFinder Scholar. American Chemical Society, c 2005. [acesso on line].

KONTUREK, P.K.; BRZOZOWSKI, T.; KONTUREK, S.J.; DEMBINSKI, A. Role of epidermal growth factor, prostaglandin and sulphhydryls in stress-induced gastric lesions. **Gastroenterology**, v.99, p.1607-1615, 1990.

KOKKINI, S.; VODOU, D.; KAROUSOU, R. Essential oil yield of Lamiaceae plants in Greece. In: Proceedings of the 11th International Congress of Essential Oils, Fragrances and Flavours. **New Delhi**, 12 – 16 November, 1989. *apud* Horticultural Abstr., v.60, abstr.n.4272, 1990.

KOO, K.W. Spraying with 2,4-D solution for the eradication of weeds. **Nong Ye Xue Bao**, v.9, p.369-72, 1958. *apud* SciFinder Scholar. American Chemical Society, c 2005. [acesso on line].

KOSAKI, M.; KUSANO, S.; OKADA, A.; SEKIYA, K. 5-Lipoxygenase inhibitor of plant for control and prevention of allergy. **Jpn. Kokai Tokkyo Koho**, 10 pp., 28 Aug 2001. *apud* SciFinder Scholar. American Chemical Society, c 2005. [acesso on line].

KUBOTA, S.; NAKASHIMA, S. The study of *Leonurus sibiricus* L. Chemical study of alkaloid "leonurine" isolated from *Leonurus sibiricus* L. **Folia Pharmacol. Japon**, v.11, n.2, p.153-158, 1930. *apud* Chemical Abstract., Columbus, v.25, abstr.n.771.

KUBOTA, S.; NAKASHIMA, S. The study of *Leonurus sibiricus* L. II. Pharmacological study of alkaloid "leonurine" isolated from *Leonurus sibiricus* L. **Folia Pharmacol.**, v.11 n.2, p.159-67, 1930. *apud* Chemical Abstract., Columbus, v.25, abstr.n.12856, 1931.

KUNDU, A.K.; SHARMA, A.K. Intraespecific variations in motherwort (*Leonurus sibiricus* L.): chromosome structure and amount of nucleic acid.

Proceedings of Indian National Science Academy Part B Biological Sciences, v.52, n.4, p.484-490, 1986.

KUHNAU.J. *World Rev. Nutr. Diet*, 24 117- 191, 1976.

LA CASA, C.; VILLEGAS, I.; ALARCON DE LA LASTRA, C.; MOTILVA, V.; CALERO, M.J.M Evidence for protective and antioxidant properties of rutin, a natural flavone, against ethanol induced gastric lesions. **Journal of Ethnopharmacology**, v.71, p.45-53, 2000.

LARSON, R.A. The antioxidantes of higher plants. **Phytochemistry**, v.27, n.4, p.969-978, 1988.

LEE, C.M.; JIANG, L.M.; SHANG, H.; HON, P.M.; HE, Y.; WONG, H.N.C. Prehispanolone, a novel platelet activating factor receptor antagonist from *Leonurus heterophyllus*. **Br. J. Pharmacol.**, v.103, n.3, p.1719-24, 1991. *apud* SciFinder Scholar. American Chemical Society, c 2005. [acesso on line].

LEE, S.E.; LEE, B.H.; CHOI, W.S.; PARK, B.S.; KIM, J..G.; CAMPBELL, B.C. Fumigant toxicity of volatile natural products from Korean spices and medicinal plants towards the rice weevil, *Sitophilus oryzae* (L.). **Pest Management Science**, v.57, n.6, p.548-553, 2001.

LEE, C.H.; KIM, S.I.; LEE, K.B.; YOO, Y.C.; RYU, S.Y.; SONG, K.S. Neuraminidase inhibitors from *Reynoutria elliptica*. **Archives of Pharmacal Research**, v.26, n.5, p.367-374, 2003. *apud* SciFinder Scholar. American Chemical Society, c 2005. [acesso on line].

LEWIS, D.A.; SHAW, G.P. A natural flavonoid and synthetic analogues protect the gastric mucosa from aspirin-induced erosions. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v.12, p.95-100, 2001.

LEWIS, D.A.; HANSON, P.J. Anti-ulcer drugs of plant origin. **Progress Medicinal Chemistry**, v.28, p.201-231, 1991.

LI, K.; WU, B.; LI, H.; ZHAO, X. Contraceptive and disease-preventing vaginal sponges. **Faming Zhuanli Shenqing Gongkai Shuomingshu**, 9 pp., 25 Sep 1996. *apud* SciFinder Scholar. American Chemical Society, c 2005. [acesso on line].

LI, W.; CAI, Y. Pharmacological studies of total alkaloids from *Leonurus heterophyllus*. **Hua Zhong Keji Da Xue Xue Bao, Yi Xue Ban**, v.31, n.2, p.168-170, 2002. *apud* SciFinder Scholar. American Chemical Society, c 2005. [acesso on line].

LI, W.; LU, W. Refined polyunsaturated fatty acid and calcium salts thereof as medicinal product and preparing process thereof and preparation. **Faming Zhuanli Shenqing Gongkai Shuomingshu**, 11 pp., 2000. *apud* SciFinder Scholar. American Chemical Society, c 2005. [acesso on line].

LISSI, E. A; CÁCERES, T., VIDELA, L.A. Visible chemiluminescence from rat brain homogenates undergoing autoxidation. I. Effect of additives and products accumulation. **Free radical Biol. Med.**, New York, v.2, p. 63 -69, 1986.

LÜLLMANN, H.; MOHR, K.; ZIEGLER, A.; BIEGER, D.; **Pocket atlas of pharmacology**. New York: Thieme Medical Publishers, 1993. 369p. (Thieme flexibook).

LUO, S.R. Separation and determination of alkaloids of *Leonurus sibiricus*. **Zhong Yao Tong Bao**, v.10, n.1, p.32-5, 1985. *apud* SciFinder Scholar. American Chemical Society, c 2005. [acesso on line].

MABRY, T.J.; MARKHAM, K.R.; THOMAS, M.B. **The systemic identification of flavonoids**. New York: Springer-Verlag, 1970. 354p.

MAO, Y.; MAO, X. Process for extracting total alkaloid of *Leonurus heterophyllus* and its medical preparation. **Faming Zhuanli Shenqing Gongkai Shuomingshu**, 2003. *apud* SciFinder Scholar. American Chemical Society, c 2005. [acesso on line].

MARTIN, M.J.; LA CASA, C.; LA LASTRA, C.A.; CABEZA, J.; VILLEGAS, I.; MOTILVA, V. Anti-oxidant mechanisms involved in gastroprotective effects of quercetin. **Zeitschrift für Naturforschung, C: Journal of Biosciences**, v.53, n.1/2, p.82-88, 1998.

MARTINS, E.R.; CASTRO, D.M.; CASTELLANI, D.C.; DIAS, J.E. **Plantas medicinais**. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 1995. p.142-143.

MARHUENDA, E.; MARTIN, M.J.; LA LASTRA, C.A. Antiulcerogenic activity of aescine in different experimental models. **Phytotherapy Research**, v.7, p.13-16, 1993.

MATOS, F.J.A. **Introdução à fitoquímica experimental**. Fortaleza: Universidade Federal do Ceará, 1988. 126p.

MATSUMOTO, T.; YAMADA, H. Effects of a polysaccharide fraction from the roots of *Bupleurum falcatum* L. on experimental gastric ulcer models in rats and mice. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v.43, p.699-704, 1991.

MATSUNAGA, C. K.; IZUMISAWA, C. M.; SAKUDA, T. M., OHARA, M. T.; KATO, M. J. **Determinação de atividade antimicrobiana de lignanas**. In: 1st INTERNATIONAL SYMPOSIUM OF LATIN AMERICAN AND CARIBBEAN SECTION AOAC INTERNATIONAL. São Paulo, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, 1995.

MELLO, J.C.P.; SANTOS, S.C. Taninos. In: SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R., orgs. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 4.ed. Porto Alegre: UFRGS; Florianópolis: UFSC, 2002. 833p.

MENSOR, L.L.; MENEZES, F.S.; LEITÃO, G.G.; REIS, A.S.; SANTOS, T.C.; COUBE, C.S.; LEITÃO, S.G. Screening of Brazilian plant extracts for antioxidant activity by the use of DPPH free radical method. **Phytotherapy Research**, v.15, p.27-130, 2001.

MIZUI, T.; DOTEUCHI, M. Effects of polyamines on acidified ethanol induced gastric lesions in rats. **Japanese Journal of Pharmacology**, v.33, p.939-945, 1983.

MIZUMOTO, D.; TSUJI, Y.; OTA, N.; IFUKU, O.; UEMURA, M. Gray hair-preventing hair preparations containing tyrosinase activity promoters and 5a-reductase inhibitors. **Jpn. Kokai Tokkyo Koho**, 2001. *apud* SciFinder Scholar. American Chemical Society, c 2005. [acesso on line].

MOREIRA, H.F. Contribuição ao estudo da *Leonurus sibiricus* L. **Tribuna Farmacêutica**, v.11, p.185-187, 1957.

MOREIRA, H.F. Contribuição ao estudo a *Leonurus sibiricus* L. Erva de Macaé II. **Tribuna Farmacêutica**, v.2, p.21-28, 1958 a.

MOREIRA, H.F. Contribuição ao estudo a *Leonurus sibiricus* L. Erva de Macaé III. **Tribuna Farmacêutica**, v.3, p.37-42, 1958 b.

MOREIRA, H.F. Contribuição ao estudo a *Leonurus sibiricus* L. Erva de Macaé IV. **Tribuna Farmacêutica**, v.4, p.56-60, 1958 c.

MOREIRA, H.F. Contribuição ao estudo a *Leonurus sibiricus* L. Erva de Macaé V. **Tribuna Farmacêutica**, v.5, p.73-76, 1958 d.

MOREIRA, H.F. Contribuição ao estudo a *Leonurus sibiricus* L. **Tribuna Farmacêutica**, v.11, p.185-187, 1958 e.

MORITA, H.; GONDA, A.; TAKEYA, K.; ITOKAWA, H. Cyclic peptides from higher plants. 29. Cycloleonuripeptides from *Leonurus heterophyllus*. **Biorg. Med. Chem. Lett.**, v.6, n.7, p.767-70, 1996.

MURAKAMI, S. Investigations on the carbohydrates of Labiates. V The distribution of stachyose in the underground organs of Labiates. **Acta**

Phytochim., v.13, p.161-84, 1943. *apud Chem. Abstr.*, Colombus, v.45, abstr.n.8599c, 1943.

MYCEK, M.J.; HARVEY, R.A.; CHAMPE, P.C. **Farmacologia ilustrada**. 2.ed. Porto Alegre: Artmed, 1998. 478p.

NAGASAWA, H.; SENSUI, N.; GOTTO, Y.; ONOYAMA, T.; INATOMI, H. Effect of chronic oral administration of L-dopa on pituitary prolactin secretion in mice. **Meiji Daigaku Nogakubu Kenkyu Hokoku**, v.90, p.17-20, 1991. *apud Chem. Abstr.* Columbus, v.116, abstr.n.116793, 1992.

NAGASAWA, H.; INATOMI, H.; SUZUKI, M.; MORI, T. Further study on the effects of motherwort (*Leonurus sibiricus* L.) on preneoplastic and neoplastic mammary gland growth in multiparous GR/A mice. **Anticancer Res.**, v.12, n.1, p.141-143, 1992.

NAGASAWA, H. Comparison of several characteristics of high and low mammary tumor strains of mice (SHN and SLN) established from the same basal stock and their significance in animal models: autobiographical research review. **Meiji Daigaku Nogakubu Kenkyu Hokoku**, v.125, p.1-77, 2000. *apud SciFinder Scholar*. American Chemical Society, c 2005. [acesso on line].

NAKAZAWA, Y.; OGO, M.; TAJIMA, M. Compositions containing adenosines for scalp and hair. *Jpn. Kokai Tokkyo Koho*, 2001. *apud SciFinder Scholar*. American Chemical Society, c 2005. [acesso on line].

NASCENTES, A. **Dicionário etimológico da língua portuguesa**. Rio de Janeiro: Francisco Alves, 1995.

NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS. **Methods for antimicrobial susceptibility testing of anaerobic bacteria**: approved standard. 3.ed. Villanova: National Committee for Clinical Laboratory Standards, 1990. 23p. (NCCLS document M11-A3) (Working Group on Antimicrobial Susceptibility Testing of Anaerobic Bacteria).

NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS.
Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically: approved standard. 3.ed. Wayne: NCCLS, 2000. (NCCLS document, M7-A5) (NCCLS document, v.20, n.2).

NGUYEN, M.T.T.; A, SURESH; T.; YASUHIRO; T, Q.; WATANABE, H.; KADOTA, S. Xanthine oxidase inhibitory activity of vietnamese medicinal plants. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v.27, n.9, p.1414-1421, 2004. *apud* SciFinder Scholar. American Chemical Society, c 2005. [acesso on line].

OGA, S.; AKISUE, G.; LOPES, E.A.; Kose, G.; YOKOTO, S.Y. Efeito do EHEL de *Leonurus sibiricus* L. no sistema nervoso central de ratos. **Revista de Farmácia e Bioquímica da Universidade de São Paulo**, v.22, n.1, p.131-134, 1986.

OLIVEIRA, F.; AKISUE, G.; AKISUE, M.K. **Farmacognosia**. São Paulo: Atheneu, 1991. 412 p.

OLIVEIRA, F.; AKISUE, G. **Fundamentos de farmacobotânica**. 2.ed. São Paulo: Atheneu, 2000. 178p.

OSUMI, K.; MATSUSHITA, H.; MASHIMA, Y.; SAKAIDA, T; KOSUGI, N.; KATADA, T. Antiwrinkle, skin-lightening, and antiaging cosmetics. **Jpn. Kokai Tokkyo Koho**, 8 pp., 2003. *apud* SciFinder Scholar. American Chemical Society, c 2005. [acesso on line].

PATER, B. *Leonrus cardiaca* L. **Pharm Monatshefte**, v.11, p.154-6, 1930. *apud* Chemical Abstract., Columbus, v.25, n.10314, 1931.

PATHAK, K.; SIGLA, H.K. Flavonoids as medicinal agents, recent advances. **Fitoterapia**, v.5, p.371-389, 1991.

PENSO, G. **Index plantarum medicinalium totius mundi eorumque synonymorum**. Milano: O.E.M.F., 1983. p.562-562.

PEYER, W.; VOLLMER, H. *Leonurus cardiaca*. **Pharm. Zentralhalle**, v.76, p.98-102, 1935. *apud Chemical Abstract.*, Columbus, v.29, abstr.n.34625, 1935.

PEREIRA, H. **Pequena contribuição dicionário das plantas úteis do Estado de São Paulo**. São Paulo: Typographia Brasil de Rothschild, 1929. 408p.

PHARMACOPEIA dos Estados Unidos do Brasil. São Paulo: Nacional, 1926. p.505.

POPOV, D.M.; PASHCHINSKAYA, E.V.; KOVALENKO, L.I. Quality control of raw materials and preparations of motherwort (*Leonurus L.*) by spectrophotometric technique. **Farmatisya**, Moscow, v.41, n.4, p.27-31, 1992. *apud Chemical Abstract.*, Columbus, v.119, abstr.n.56280, 1992.

PULATOVA, T.P. Terpene compounds of several plants of the Labiatae family that grow in Uzbekistan. **Mater. Yubileinoi. Resp. Nauchn. Konf. Farm.**, Sep., p.34-5, 1972. *apud Chemical Abstract.*, Columbus, v.82, abstr.n.167489w, 1975.

QIAN, H.; NIHORIMBERE, V. Antioxidant power of phytochemicals from *Psidium guajava* leaf. **Journal of Zhejiang University Science**, v.5, n.6, p.676-683, 2004

RANG, H.P.; DALE, M.M.P. O Trato gastrintestinal. In: RANG, H.P.; DALE, M.M.; RITTER, J.M. **Farmacologia**. Rio de Janeiro: Elsevier, 2004. p.419-425.

RASKIN, I. A method of identifying and recovering products exuded from
a
plant. PCT Int. Appl. WO 2000007437. 2000. 78p.

REUTER, G.; DIEHL, H.J. Medicinal plants of the genus *Leonurus* and their active principles. **Pharmazie**, v.25, n.10, p.586-9, 1970.

ROBERT, A.; NEZAMIS, J.E.; LANCASTER, C.; HANCHAR, A.J. Cytoprotection by prostaglandins in rats: prevention of gastric necrosis produced by alcohol, HCL, NaOH, hypertonic NaCl, and thermal injury. **Gastroenterology**, v.77, p.433-443, 1979.

ROESER, K.R. Die nadel der schwarzkiefer. Massenprodukt und kunstwerk der natur. **Mikrokosmos**, v.61, p.33-36, 1972.

RUAN, J.; DU, J.; ZENG, Q.; QIAN, Z. Advance in studies on chemical components, pharmacological effect and clinical application of *Leonurus japonicus*. **Zhong Cao Yao**, v.34, n.11, 2003. *apud* SciFinder Scholar. American Chemical Society, c 2005. [acesso on line].

RUNYON, R.P.; HABER, A. **Fundamentals of behavioral statistics**. 7.ed. New York: Addison-Wesley, 1991. 603p.

SAKAI, S.; NAKAGAWA, N.; SUMITA, Y. Cosmetics containing lactate and hyaluronate production stimulants. **Jpn. Kokai Tokkyo Koho**, 2004. *apud* SciFinder Scholar. American Chemical Society, c 2005. [acesso on line].

SALIM, A.S. Removing oxygen-derived free radicals stimulates healing of ethanol induced erosive gastritis in rat. **Digestion**, v.47, p.24-8, 1990.

SANTOS, S.C; MELLO, J.P.C. Taninos. In: SIMÕES, C.M.O. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Porto Alegre: UFSC, 1999. p.517-544.

SASS, J.E. **Botanical microtechnique**. 2.ed. Ames: Iowa State College Press, 1951. 228p.

SATOH, M.; SATOH, Y.; ISOBE, K.; FUJIMOTO, Y. Studies on the constituents of *Leonurus sibiricus* L. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, v.51, n.3, p.341-342, 2003.

SAVONA, G.; PIOZZI, F.; BRUNO, M.; RODRIGUEZ, B. Diterpenoids from *Leonurus sibiricus* L. **Phytochemistry**, v.21, n.11, p.2699-2701, 1982.

SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; ATHAYDE, M.L. Saponinas. In: SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R., eds. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Porto Alegre: Editora UFSC, 1999. p.597-622.

SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; ATHAYDE, M.L. Saponinas. In: SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 4.ed. Porto Alegre: UFRGS; Florianópolis: UFSC, 2002. 833p.

SHI, M.; CHANG, L.; HE, G. Stimulating action of *Carthamus tinctorius* L., *Angelica sinensis* (Oliv.) Diels and *Leonurus sibiricus* L. on the uterus. **Zhong Guo Zhong Yao Za Zhi**, v.20, n.3, p.173-175, 1995. *apud* Medline, PMID: 7646782, 1995.

SHIN, S.H. Studies on active principles of *Leonurus sibiricus*. **Saeng Yak Hak Hoe Chi**, v.15, p.104-107, 1984. *apud* Chemical Abstract., Colombus, v.101, abstr.n.183476f, 1984.

SUGAYA, K.; HASHIMOTO, F.; ONO, M.; ITO, Y.; MASUOKA, C.; NOHARA, T. Antioxidative constituents from Leonurii Herba (*Leonurus japonicus*). **Food Sci. Technol. Int.**, v.4, n.4, p.278-281, 1998. *apud* SciFinder Scholar. American Chemical Society, c 2005. [acesso on line].

SUGIURA, S.; INOUE, S.; HAYASHI, Y.; KISHI, Y.; GOTO, T. Structure and synthesis of leonurine. **Tetrahedron**, v.25, n.21, p.5155-61, 1969.

SUMITA, Y; SAKAI, S.; NAKAGAWA, N.; TANNO, O. Cosmetics containing nicotinamide and hyaluronic acid production accelerators. **Jpn. Kokai Tokkyo Koho**, 2004. *apud* SciFinder Scholar. American Chemical Society, c 2005. [acesso on line].

SZABO, S.; PIHAN, G.; DUPUY, D. The biochemical pharmacology of sulphhydryl compounds in gastric mucosal injury and protection. In: SZABO, S.; MÓZSIK, G., eds. **New pharmacology of ulcer disease**: experimental and new therapeutico approaches. New York: Elsevier, 1987. p.424-446.

TAKAKI, M. Weed seed germination. II. *Leonurus sibiricus* (Labiatae). **Arquivos de Biologia e Tecnologia**, v.35, n.4, p.641-646, 1992.

TAKEDA, S.; TSUJI, Y.; UEMURA, M. Hair growth-stimulating compositions. **Jpn. Kokai Tokkyo Koho**, 2000. *apud* SciFinder Scholar. American Chemical Society, c 2005. [acesso on line].

TANAKA, Y.; UEBAYASHI, H. Skin-lightening cosmetics containing ellagic acid derivatives and plant extracts. **Jpn. Kokai Tokkyo Koho**, 1999. *apud* SciFinder Scholar. American Chemical Society, c 2005. [acesso on line].

TANAKA, H.; YAMABA, H.; MONONOBE, A.; OKADA, T. Scutellaria and/or Leonurus extracts for improving cutaneous immunosuppression caused by UV radiation. **Jpn. Kokai Tokkyo Koho**, 2000. *apud* SciFinder Scholar. American Chemical Society, c 2005. [acesso on line].

TANG, T.H.; TSENG, T.Y. Composition of purple- flowered I –maotsao. I. **Natl. Shangtung Univ. Chem. Lab. Prepts.**, v.3, n.4, p.93-104, 1934. *apud* *Chemical Abstract.*, Columbus, v.29, abstr.n.31152, 1935.

TANG, T.H.; HSÜ, C.W. The chemical constituents of the chinese drug i – mutsao. **J. Chinese Chem. Soc.**, v.7, p.105-10, 1940. *apud* Chemical Abstract., Colombus, v.35, n.49134, 1941.

TANG, Y. Determination of leonurine in Yimucao (*Leonurus heterophyllus*) and its Chinese patent medicines. **Zhong Cao Yao**, v.18, n.2, p.60-2, 1987. *apud* SciFinder Scholar. American Chemical Society, c 2005. [acesso on line].

TANG, Y.; WANG, X.; LU, Y. Determination of stachydrine in four Chinese tradional patent medicines. **Yao Wu Fen Xi Za Zhi**, v.9, n.1, p.22-4, 1989. *apud* SciFinder Scholar. American Chemical Society, c 2005.[acesso on line].

TARIVERDIEVA, S. A phytochemcial study of lion`s ear (*Leonurus cardiaca* L.) occuring in Azerbaijan. **Farmatsiya**, v.9, n.5, p.15-17, 1946. *apud* Chemical Abstract., Columbus, v.41, abstr.n.7677d, 1947.

TIMBERLAKE, C.F.; HENRY, B.S. Plant pigments as natural foods colors. **Endeavour**, 10 31-36, 1986.

TOMAS-BARBERAN, F.A.; KRESTOVSKAYA, T.; GIL, M.I. Flavonoid p-coumaroylglucosides in some *Leonurus*, *Chaituts* e *panzeria* species (Lamiaceae). **Biochem. Syst. Ecol.**, v.21, n.4, p.531-2, 1993. *apud* Chemical Abstract., Columbus, v.119, abstr.n.135651, 1993.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO. Sistema Integrado de Bibliotecas. Serviços oferecidos para normalização técnica de documentos à USP. São Paulo: SIBi/USP, 2004. Disponível em: <http://www.bcq.usp.br>. Acesso em: 26 Jul. 2006.

VARLAKOV, M.N. New kinds of drugs with a blood – vessel dilating action. Panzeria. **Farmatsya**, v.7, n.1, p.30-1, 1944. *apud* Chemical Abstract., Columbus, v.43, abstr.n.5548g, 1949.

WADT, N.S. Y.; OHARA, M. T.; SAKUDA –KANEKO, T. M.; BACCHI, E. M. Ação antimicrobiana de *L. sibiricus* L. **Rev. Bras. Farmacognosia**, São Paulo, v.5, n.2, p. 167 – 174, 1996.

WADT, N.S. Y. **Estudo da avaliação ontogenética de princípios ativos de *Leonurus sibiricus* L. e suas ações farmacológicas**. São Paulo, 2000. 150p. Tese de Doutorado - Faculdade Ciências Farmacêuticas - Universidade de São Paulo.

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

WANG, X. Preliminary study on crystals of calcium oxalate of 57 Chinese medicinal materials. **Zhong Guo Zhong Yao Za Zhi**, v.14, n.3, 1989. *apud* SciFinder Scholar. American Chemical Society, c 2005. [acesso on line].

WANG, J.; YUE, C.; LI, X.; ZHU, H. Isolation and identification of the chemical constituents of *Leonurus japonicus* Houtt. **Zhong Guo Yao Wu Hua Xue Za Zhi**, v.12, n.3, p.146-148, 2002. *apud* SciFinder Scholar. American Chemical Society, c 2005. [acesso on line].

WANG, Z.; ZHANG, P.L.; YONG, J. Effect of leonurine on the activity of creatine kinase. **Journal of Asian Natural Products Research**, v.6, n.4, p.281-287, 2004. *apud* SciFinder Scholar. American Chemical Society, c 2005. [acesso on line].

WATANABE, S. Oral composition containing an oil ext. of mastic and an

anti-inflammatory agent. **Jpn. Kokai Tokkyo Koho**. U.S. Pat. Appl. Publ. US 2004037790 A1. 2004. 11 pp. *apud* SciFinder Scholar. American Chemical Society, c 2005. [acesso on line].

WATANABE, S. Dentifrice compositions containing antioxidant herb extracts or prophylactic or therapeutic treatment of periodontitis, and method and kits for the treatment. **Jpn. Kokai Tokkyo Koho**, 2004. *apud* SciFinder Scholar. American Chemical Society, c 2005. [acesso on line].

WASICKY, R.; AKISSUE, G. Um aparelho aperfeiçoado para extração de óleos essenciais. **Revista da Faculdade de Farmácia e Bioquímica da Universidade de São Paulo**, v.7, n.2, p.399-405, 1969.

WOLF, B.; CHRISTA, M.; MANFRED, S. Flavonoids antioxidants: rate constants for reactions with oxygen radicals. **Methods in Enzymology**, v.234, p.420-429, 1994.

XU, L.; DONG, Y. Quatitative determination of total alkaloids in herba leonuri by colorimetric method with ammonium chromium thiocyanate. **Zhong Cao Yao**, v.16, n.11, p.487-8, 1985. *apud* Chemical Abstract., Colombus, v.104, abstr.n.75133v, 1986.

XU, X.; YE, H.; WANG, W.; CHEN, G. An improved method for the quantitation of flavonoids in herba leonuri by capillary electrophoresis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.53, n.15, p.5853-5857, 2005.

YANG, M. Nanometer 'Yimu Tiaojing' medicinal preparation. **Faming Zhuanli Shenqing Gongkai Shuomingshu**, 2002. *apud* SciFinder Scholar. American Chemical Society, c 2005. [acesso on line].

YANG, M.; FACING ZHUANLI SHENQING GONGKAI SHUOMINGSHU. Zhongfeng Huichun nanometer medicinal preparation. CN Pat.1362200. 2002.

5p.

YAGI, N.; IWASAKI, H.; YANAGIDA, Y.; UCHIDA, K. Hair dyes containing iron salts and plant extracts. **Jpn. Kokai Tokkyo Koho**, 2003. *apud* SciFinder Scholar. American Chemical Society, c 2005. [acesso on line].

YASUDA, Y.; OGAWA, A. Aqueous acne treatment stick compositions. **Jpn. Kokai Tokkyo Koho**, 2004. *apud* SciFinder Scholar. American Chemical Society, c 2005. [acesso on line].

YEN, G.C.; DUH, P.D. Scavenging effect of methanolic extracts of peanut hulls on free radical and active-oxygen species. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.42, p.629-632, 1994.

YOKOZAWA, T.; CHEN, C.P.; DONG, E.; TANAKA, T.; NONAKA, G.I.; NISHIOKA, I. Study on the Inhibitory effect of tannins and flavonoids against the 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl. **Radical Biochemical Pharmacology**, v.56, p.213-222, 1998.

YU, C.F. Studies on the chemical constituents of the Chinese traditional medicine I-Mu-Tsao. II. Structure of "alkaloid A". **Hua Xue Xue Bao**, v.39, n.1, p.94-96, 1981. *apud* SciFinder Scholar. American Chemical Society, c 2005. [acesso on line]

YUE, C.; WANG, J.H.; LI, X. A new flavonoside from *Leonurus heterophyllus*. **Journal of Asian Natural Products Research**, v.7, n.3, p.273-277, 2005. *apud* SciFinder Scholar. American Chemical Society, c 2005. [acesso on line].

ZHAO, C.; GAO, W.; SUN, Y.; SI, S.; XUE, X. Determination of water soluble silicon from herbal drugs. **Zhong Guo Zhong Yao Za zhi**, v.15, n.9, p.555-6, 1990. *apud* SciFinder Scholar. American Chemical Society, c 2005. [acesso on line].

ZHAO, X.; JIANG, D.; XIE, D.; DONG, C. Study on optimized extraction process for compound Puxiang capsules with orthogonal design. **Zhong Guo Yi Yuan Yao Xue Za Zhi**, v.23, n.10, p.609-610, 2003. *apud* SciFinder Scholar. American Chemical Society, c 2005. [acesso on line].

ZHELNOV, I.I.; GRAZHDAN, A.K. The active substances of *Siberian motherwort*. **Alkaloids. Sb. Tr. Posvyashch.** p.128-31, 1962. *apud* SciFinder Scholar. American Chemical Society, c 2005. [acesso on line].

ZHELNOV, I.I.; GRAZHDAN, A.K. Active substances in *Leonurus sibericus*. Tannins. **Sb. Tr. Posvyashch.** p.125-7, 1962. *apud* SciFinder Scholar. American Chemical Society, c 2005. [acesso on line].

ZINCHENKO, G.V. A pharmacognostic study of *Leonurus* from the Ukraine. **Nekotorye Voprosy Farmatsii, Sbornik Nauch. Trudov Vyssh. Farm. Ucheb. Zavedenii Ukr. S.S.R.**, p 280-5, 1956.

9 ANEXOS OBRIGATÓRIOS

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Comissão de Ética em Experimentação Animal

Ofício CEEA nº 58/2005

São Paulo, 08 de novembro de 2005.

Ilmo(a) Sr(a).

Elisângela Severina de Melo

Orientador: Prof. Elfriede Marianne Bacchi

FBF

Prezado(a) Senhor(a),

A Comissão de Ética em Experimentação Animal da FCF/USP, em reunião realizada em 07 de novembro, **APROVOU** o projeto “Estudo da Atividade Antibiótica e Antiúlcera de Leonurus japonicus Houtt.” (Protocolo CEEA nº 90), apresentado por Vossa Senhoria, devendo apenas ser arrumado o item 7º do formulário (clicar NÃO), uma vez o animal já estar morto.

Sendo o que nos cumpre, reiteramos protestos de estima e consideração.

Atenciosamente,

Prof^ª. Dr^ª. Lígia Ferreira Gomes
Presidente da CEEA

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Secretaria de Pós-Graduação

Informações para os Membros de Bancas Julgadoras de Mestrado/Doutorado

1. O candidato fará uma apresentação oral do seu trabalho, com duração máxima de trinta minutos.

2. Os membros da banca farão a arguição oral. Cada examinador disporá, no máximo, de trinta minutos para arguir o candidato, exclusivamente sobre o tema do trabalho apresentado, e o candidato disporá de trinta minutos para sua resposta.

2.1 Com a devida anuência das partes (examinador e candidato), é facultada a arguição na forma de diálogo em até sessenta minutos por examinador.

3. A sessão de defesa será aberta ao público.

4. Terminada a arguição por todos os membros da banca, a mesma se reunirá reservadamente e expressará na ata (relatório de defesa) a aprovação ou reprovação do candidato, baseando-se no trabalho escrito e na arguição.

4.1 Caso algum membro da banca reprove o candidato, a Comissão Julgadora deverá emitir um parecer a ser escrito em campo exclusivamente indicado na ata.

4.2 Será considerado aprovado o aluno que obtiver aprovação por unanimidade ou pela maioria da banca.

5. Dúvidas poderão ser esclarecidas junto à Secretaria de Pós-Graduação: pgfarma@usp.br, (11) 3091 3621.

São Paulo, 18 de março de 2005.

Profa. Dra. Bernadette D. G. M. Franco
Presidente da CPG/FCF/USP