

**FERNANDA OLIVEIRA DE GASPARI DE GASPI**

**ATIVIDADE ANTIOXIDANTE, CICATRIZANTE E  
ANTIULCEROGÊNICA DOS EXTRATOS E DAS FRAÇÕES  
DAS FOLHAS DE *Oncidium flexuosum* SIMS.  
(ORCHIDACEAE)**

**CAMPINAS**

**2011**

**i**



**FERNANDA OLIVEIRA DE GASPARI DE GASPI**

**ATIVIDADE ANTIOXIDANTE, CICATRIZANTE E  
ANTIULCEROGÊNICA DOS EXTRATOS E DAS FRAÇÕES  
DAS FOLHAS DE *Oncidium flexuosum* SIMS.  
(ORCHIDACEAE)**

Tese de Doutorado apresentada à Pós-Graduação da  
Faculdade de Ciências Médicas da Universidade  
Estadual de Campinas, para obtenção do título de  
Doutor em Clínica Médica na área de Ciências Básicas.

**ORIENTADOR:** PROF. DR. JOÃO ERNESTO DE CARVALHO

**CO-ORIENTADORA:** PROFA. DRA. MARY ANN FOGLIO

**CPQBA/UNICAMP**

**CAMPINAS**

**Unicamp**

**2011**

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA  
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS DA UNICAMP**

Bibliotecária: Rosana Evangelista Poderoso – CRB-8ª / 6652

G214a Gaspi, Fernanda Oliveira de Gaspari de  
Atividade antioxidante, cicatrizante e antiulcerogênica dos extratos e das frações das folhas de *Oncidium flexuosum* Sims / Fernanda Oliveira de Gaspari de Gaspi. -- Campinas, SP : [s.n.], 2011.

Orientadores : João Ernesto de Carvalho ; Mary Ann Foglio.

Tese (Doutorado) - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.

1. *Oncidium flexuosum* Sims. 2. Cicatrização. 3. Úlcera Gástrica. 4. Fitoquímica. 5. Antioxidantes. I. Carvalho, João Ernesto. II. Foglio, Mary Ann. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.

**Título em Inglês: Antioxidant, cicatrizant and antiulcerogenic activities of extracts and fractions of *Oncidium flexuosum* Sims. (Orchidaceae) leaves**

**Keywords:**

- *Oncidium flexuosum* Sims
- Cicatrization
- Gastric ulcer
- Phytochemistry
- Antioxidants

*Titulação: Doutor em Clínica Médica*

**Área de concentração: Ciências básicas**

*Banca examinadora:*

**Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Vera Lúcia Garcia Rehder**

**Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Patrícia Correa Dias**

**Prof<sup>º</sup>. Dr<sup>º</sup>. Armindo Antonio Alves**

**Prof<sup>º</sup>. Dr<sup>º</sup>. Ricardo de Lima Zollner**

**Prof<sup>º</sup>. Dr<sup>º</sup>. João Ernesto de Carvalho**

---

# Banca examinadora da tese de Doutorado

Fernanda Oliveira de Gaspari de Gaspi

---

---

Orientador: Prof. Dr. João Ernesto de Carvalho

---

---

## Membros:

---

1. Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Vera Lúcia Garcia Rehder

*Vera Lucia Garcia Rehder*

---

2. Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Patricia Correa Dias

*Patricia Correa Dias*

---

3. Prof. Dr. Armino Antonio Alves

*Armino Antonio Alves*

---

4. Prof. Dr. Ricardo de Lima Zollner

*Ricardo de Lima Zollner*

---

5. Prof. Dr. João Ernesto de Carvalho

*João Ernesto de Carvalho*

---

Curso de pós-graduação em Clínica Médica da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

---

Data: 11/02/2011

---



## *Dedicatória*

*Aos meus pais, que são presença constante  
em todas as etapas da minha vida.*

*Ao meu marido e aos meus três filhos, que  
alegram e iluminam o meu lar.*



## *Agradecimentos*

A Deus, por ter aberto este caminho e por ter colocado nele as pessoas certas nos momentos difíceis.

Aos meus queridos pais, pelo amor, pela presença constante que me forneceu o apoio para mais esta conquista. Obrigado pelos ensinamentos durante toda a vida, por amarem também a minha família, cuidarem dos meus filhos, tornando possível o que, no início, parecia impossível. Amo muito vocês.

Aos amores da minha vida, meu querido marido Renato, pelo companheirismo, e pela compreensão, permitindo a minha dedicação ao trabalho e ao estudo. E, aos meus filhos Renato, Rafael e Ricardo por existirem, iluminando os meus dias.

A minha avó, pelas preces, pelas tortas e bolos deliciosos, pela presença carinhosa, sempre.

Aos meus irmãos e às minhas cunhadas, tios que brincam, conversam, cuidam dos meus filhos. E, também aos meus sogros. Obrigada por me ajudarem a ter tempo para a realização deste trabalho. É muito bom ter uma grande família.

Ao querido tio João T. Beraldo, por estar sempre por perto nos momentos mais importantes da minha vida, dando o seu precioso apoio.

As minhas ajudantes no lar, Cleusa e Vânia. Obrigada por cuidarem de todas as tarefas da casa, pela comida gostosa, por cuidar e passear com os pequenos para que eu pudesse estudar.

Aos meus queridos orientadores, João Ernesto de Carvalho e Mary Ann Foglio, que me acompanharam desde a minha chegada no CPQBA há vários anos e fazem parte do meu crescimento profissional. Obrigada pelos conselhos, pelos ensinamentos, pela amizade.

A todos que me ajudaram nas Divisões de Fitoquímica e Farmacologia do CPQBA-UNICAMP, especialmente ao Johnny, a Ilza, a Ana Lúcia e a Karin. Obrigada por compartilharem os conhecimentos.

Especial agradecimento ao professor José Antonio Mendes, pelo apoio à minha carreira, por me ouvir nos momentos que precisei, pelos conselhos, pela positividade sempre, me inspirando a seguir em frente.

Ao professor Marcelo A. M. Esquisatto, por me apoiar no desenvolvimento deste trabalho e dos projetos de pesquisa na Uniararas. Obrigada por tudo, pelo suporte profissional, por sempre conseguir um espaço na sua agenda para me receber.

Às professoras Gláucia e Fernanda, por me ajudarem no desenvolvimento deste trabalho, por me apoiarem, pelas conversas e por me dizerem sempre: "Vai dar tudo certo."

À professora Ana Laura, pela amizade, pelos conselhos, pela experiência e por me ajudar com os testes microbiológicos.

Ao professor Cristiano, pela amizade e companheirismo nestes vários anos que trabalhamos juntos nos estudos botânicos. Obrigada pelos estudos histoquímicos.

À professora Grasiela, por um dia me perguntar se havia uma planta para estudarmos, o que acrescentou resultados muito importantes a este trabalho.

Aos amigos Guilherme e Janaína, por me ajudarem a manter o equilíbrio e a calma com as aulas de Yoga e as conversas. Vocês são muito especiais e conquistaram o meu coração em pouco tempo.

Ao amigo Pablo, que me ajudou muito com as aulas práticas na Uniararas, mas principalmente pelas conversas de apoio no final desta tese.

Aos alunos da Uniararas que participaram deste trabalho, aprendendo e ajudando no desenvolvimento de diferentes etapas dos experimentos.



*"Nenhuma atividade no bem é insignificante... As mais altas árvores são oriundas de minúsculas sementes. A repercussão da prática do bem é inimaginável... Para servir a Deus, ninguém necessita sair do seu próprio lugar ou reivindicar condições diferentes daquelas que possui."*

**Francisco Cândido Xavier**

*"Solidários, seremos união. Separados uns dos outros, seremos pontos de vista. Juntos, alcançaremos a realização dos nossos propósitos."*

**Bezerra de Menezes.**



---

## RESUMO

O conhecimento sobre as plantas, a descoberta de suas propriedades curativas têm sempre acompanhado a evolução do homem através dos tempos. A família Orchidaceae é a maior entre as angiospermas, são mais de 25 mil espécies já descritas. Entre elas está a *Oncidium flexuosum* Sims., uma importante espécie brasileira conhecida popularmente como bailarina e que possui grande valor ornamental. Porém, esta é a primeira pesquisa sobre as suas propriedades medicinais. Os objetivos deste trabalho foram avaliar as atividades antioxidante *in vitro* e *in vivo*, cicatrizante e antiulcerogênica dos extratos e das frações obtidas a partir das folhas de *O. flexuosum* e realizar as análises fitoquímicas e histoquímica preliminares. Para isto, foram utilizadas as análises da capacidade sequestradora do radical livre difenilhidrazil (DPPH), da atividade antiulcerogênica induzida por etanol, do reparo tecidual associado ou não a microcorrente, além das reações de caracterização e cromatografia de camada delgada. Também foram realizados testes histopatológicos para avaliar possíveis danos oxidativos. O extrato hidroalcoólico de *O. flexuosum* (EH) possui as atividades antioxidante *in vitro* diante do radical livre DPPH e *in vivo*, cicatrizante associado à microcorrente, estimulante da proliferação de fibroblastos *in vitro* e colágeno *in vivo*, e atividade antiulcerogênica. A fração terpeno (FrT) inibi o processo oxidativo causado pelo substâncias reativas do ácido tiobarbitúrico (TBARS). O extrato bruto enzimático (EBZ) e a FrT estimulam a proliferação de fibroblastos, porém com menor potência do que o EH. As análises fitoquímicas e histoquímica revelaram que as folhas de *O. flexuosum* possuem, entre os seus constituintes, as substâncias fenólicas, tais como flavonoides e taninos, e também cumarinas, triterpenos e esteróides. O EH não induziu danos renais nos animais, mas tem potencial hepatotóxico dose-tempo-dependente, causando inflamação e degeneração tecidual. Conclui-se que o EH possui atividade antioxidante, cicatrizante e antiulcerogênica, provavelmente devido à presença das substâncias fenólicas.

**Palavras-chave:** *Oncidium flexuosum* Sims., cicatrização, úlcera gástrica, antioxidantes, fitoquímica.

---

## ABSTRACT

The knowledge about plants, the discovery of their healing properties has always followed the evolution of man through the ages. The Orchidaceae family is the largest among the angiosperms, they are more than 25,000 described species, among them is the *Oncidium flexuosum* Sims., an important Brazilian species popularly known as dancer and which has great ornamental value. However, this is the first survey of its medicinal properties. The objectives of this work were to investigate the antioxidant activity *in vitro* and *in vivo*, wound healing and antiulcerogenic activities of the extracts and fractions obtained from the leaves of *Oncidium flexuosum* and perform the preliminary phytochemical and histochemistry analysis. For this, analysis of free radical scavenging capacity with difenilhidrazil (DPPH) test, antiulcer activity induced by ethanol, tissue repair associated or not with microcurrent were made, other than the characterization reactions and thin layer chromatography. Histopathological tests were also performed to evaluate possible oxidative damage. The extract of *Oncidium flexuosum* (EH) has *in vitro* antioxidant activity against free radical DPPH and *in vivo*, cicatrizant associated with microcurrent, stimulating fibroblasts proliferation *in vitro* and collagen *in vivo*. The terpene fraction (FrT) inhibit the oxidative process caused by the thiobarbituric acid reactive substances (TBARS). The enzymatic crude extract (EBZ) and FrT stimulate proliferation of fibroblasts, but with less efficiency than the EH. The phytochemical and histochemistry analysis revealed that the leaves of *Oncidium flexuosum* plant species have among its constituents, the phenolic substances such as flavonoids and tannins, and also the coumarins, triterpenes and steroids. The EH was not induce kidney damage in animals, but has hepatotoxic potential dose-time-dependent, causing inflammation and tissue degeneration. It was concluded that the EH has antioxidant, cicatrizant and antiulcerogenic activities probably due to the presence of phenolic substances.

**Keywords:** *Oncidium flexuosum* Sims., cicatrization, gastric ulcer, phytochemistry, antioxidants.

---

## LISTA DE ABREVIATURAS

ALT = Alanina Aminotransferase.  
AST = Aspartato Aminotransferase.  
AT = Azul de Toluidina.  
Cat = catalase.  
CCD = cromatografia de camada delgada.  
CoQ<sub>10</sub> = ubiquinona reduzida.  
CoQH<sub>2</sub> = ubiquinol.  
CuZn-SOD = cobre-zinco-superóxido dismutase.  
DE50 = dose efetiva 50.  
DMEM = Dulbecco's Modified Eagle's Médium.  
DMSO = dimetilsulfóxido.  
DNA = ácido desoxirribonucléico.  
DPPH = 2,2-difenil-1-picrilidrazila.  
DTNB = ácido 5-5'-ditio-bis(2-nitrobenzóico).  
EBZ = Extrato hidroalcoólico com tratamento enzimático.  
ED = Extrato diclorometano.  
EGTA = ethylene glycol tetra-acetic acid.  
EH = Extrato hidroalcoólico.  
ERN = espécies reativas do nitrogênio.  
ERO = espécies reativas do oxigênio.  
Fe-SOD = ferro-superóxido dismutase.  
FrT = Fração terpeno.  
GPx = glutathione peroxidase.  
GR = glutathione reductase.  
GSH = glutathione reduzida.  
GST = glutathione S-transferase.  
HE = Hematoxilina e Eosina.  
HEPES = 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid.

---

ILU = índice de lesões ulcerativas.  
L<sup>•</sup> = radical lipídico.  
LDH = lactato desidrogenase.  
LDL = lipoproteína de baixa densidade.  
LH = ácido graxo poliinsaturado.  
LO<sup>•</sup> = radical alcóxila.  
LOO<sup>•</sup> = radical peróxila.  
LPO = lipoperoxidação.  
MDA = malondialdeído.  
Mn-SOD = manganês-superóxido dismutase.  
MTT = dimethylthiazol-diphenyltetrazolium bromide.  
NAD<sup>+</sup> = nicotinamida adenina dinucleotídeo oxidada.  
NADH = nicotinamida adenina dinucleotídeo.  
OMS = Organização Mundial da Saúde.  
PAS = Periodic Acid Schiff.  
SFB = Soro Fetal Bovino.  
SOD = superóxido dismutase.  
SR = Picrossirius-hematoxilina.  
TBA = ácido tiobarbitúrico.  
TBARS = espécies reativas do ácido tiobarbitúrico.

## LISTA DE FIGURAS

---

	<i>Página</i>
<b>Figura 1:</b> Esquema das principais reações ocorridas durante o processo de peroxidação lipídica .....	43
<b>Figura 2:</b> Detoxificação enzimática realizada por SOD, CAT e GPx .....	45
<b>Figura 3:</b> Núcleo fundamental dos flavonóides .....	48
<b>Figura 4:</b> Exemplar de <i>O. flexuosum</i> Sims. cultivado na Horta de Plantas Medicinais da Uniararas .....	57
<b>Figura 5:</b> Detalhe das folhas e flores do exemplar de <i>O. flexuosum</i> apresentado na figura 4 .....	57
<b>Figura 6:</b> Fluxograma do processo de obtenção do extrato bruto com tratamento enzimático (EBZ) .....	61
<b>Figura 7:</b> Fluxograma de fracionamento ácido-base do extrato hidroalcoólico EH .....	63
<b>Figura 8:</b> Esquema da placa teste utilizada na avaliação do estímulo do crescimento de fibroblastos <i>in vitro</i> .....	76
<b>Figura 9:</b> Anatomia foliar de <i>O. flexuosum</i> . Cortes transversais evidenciando nervura central (A), limbo foliar homogêneo (B), epiderme adaxial (C), estômato (D), cristais de oxalato de cálcio (E), cristal flavoídico (F), presença de tanino ao redor de feixe condutor (coloração marron-esverdeada) (G) .....	90
<b>Figura 10:</b> Cromatoplasmas do extrato hidroalcoólico (EH) e diclorometano (ED) de <i>O. flexuosum</i> . Eluente EH = Clorofórmio:Metanol (98:2 v/v). Eluente ED = Hexano:Acetato de etila (80:20 v/v). Revelador = Anisaldeído .....	92
<b>Figura 11:</b> Cromatoplasmas do extrato hidroalcoólico (EH) e suas frações. Eluente = Clorofórmio:Metanol (98:2 v/v). Revelador = Anisaldeído.....	93
<b>Figura 12:</b> Efeito Antioxidante do extrato hidroalcoólico (EH) de <i>O. flexuosum</i> no ensaio do DPPH. ....	94
<b>Figura 13:</b> Gráfico da porcentagem de inibição do radical DPPH pelo extrato hidroalcoólico das folhas de <i>O. flexuosum</i> (EH) nas concentrações de 0,25; 2,5; 25 e 250µg/mL .....	95

---



<b>Figura 14:</b>	Gráfico da porcentagem de inibição do radical DPPH pelo extrato hidroalcoólico das folhas de <i>O. flexuosum</i> com tratamento enzimático (EBZ) nas concentrações de 0,25; 2,5; 25 e 250µg/mL .....	95
<b>Figura 15:</b>	Gráfico da porcentagem de inibição do radical DPPH pela fração terpeno (FrT) nas concentrações de 0,25; 2,5; 25 e 250 µg/mL .....	96
<b>Figura 16:</b>	Gráfico da porcentagem de inibição do radical DPPH pelas frações obtidas a partir do extrato hidroalcoólico das folhas de <i>O. flexuosum</i> na concentração de 250µg/mL .....	97
<b>Figura 17:</b>	Diferentes concentrações da fração terpeno (FrT) e respectivos resultados obtidos pelo Método de TBARs .....	98
<b>Figura 18:</b>	Dosagem de Uréia realizada nos grupos Controle, Paracetamol e Paracetamol + Extrato bruto (EH) .....	99
<b>Figura 19:</b>	Dosagem de alanina aminotransferase (ALT) realizada nos grupos Controle, Paracetamol e Paracetamol + Extrato bruto (EH) .....	100
<b>Figura 20:</b>	Dosagem de aspartato aminotransferase (AST) realizada nos grupos Controle, Paracetamol e Paracetamol + Extrato bruto (EH) .....	101
<b>Figura 21:</b>	Dosagem de fosfatase alcalina realizada nos grupos Controle, Paracetamol e Paracetamol + Extrato bruto (EH) .....	102
<b>Figura 22:</b>	Dosagem de grupamento sulfidril no homogenato de fígado realizada nos grupos Controle, Paracetamol e Paracetamol + Extrato bruto (EH) .....	103
<b>Figura 23:</b>	Dosagem de Tbars no homogenato de fígado realizada nos grupos Controle, Paracetamol e Paracetamol + Extrato bruto (EH) .....	104
<b>Figura 24:</b>	Curva concentração-resposta da atividade antiproliferativa da doxorubicina sobre as linhagens de células neoplásicas humanas .....	105
<b>Figura 25:</b>	Curva concentração-resposta da atividade antiproliferativa do extrato bruto (EH) de <i>O. flexuosum</i> sobre as linhagens de células neoplásicas humanas .....	105
<b>Figura 26:</b>	Curva concentração-resposta da atividade antiproliferativa da doxorubicina sobre as linhagens de células neoplásicas humanas .....	106



<b>Figura 27:</b>	Curva concentração-resposta da atividade antiproliferativa da fração terpeno (FrT) de <i>O. flexuosum</i> sobre as linhagens de células neoplásicas humanas .....	106
<b>Figura 28:</b>	Curva concentração-resposta da atividade antiproliferativa da doxorubicina sobre as linhagens de células neoplásicas humanas .....	107
<b>Figura 29:</b>	Curva concentração-resposta da atividade antiproliferativa do extrato bruto com tratamento enzimático (EBZ) de <i>O. flexuosum</i> sobre as linhagens de células neoplásicas humanas .....	107
<b>Figura 30:</b>	Curva concentração-resposta da atividade antiproliferativa da doxorubicina sobre as linhagens de células neoplásicas humanas .....	106
<b>Figura 31:</b>	Curva concentração-resposta da atividade antiproliferativa da fração acetato de <i>O. flexuosum</i> sobre as linhagens de células neoplásicas humanas .....	109
<b>Figura 32:</b>	Curva concentração-resposta da atividade antiproliferativa da fração acetato básica de <i>O. flexuosum</i> sobre as linhagens de células neoplásicas humanas .....	109
<b>Figura 33:</b>	Curva concentração-resposta da atividade antiproliferativa da fração acetato ácida de <i>O. flexuosum</i> sobre as linhagens de células neoplásicas humanas .....	110
<b>Figura 34:</b>	Curva concentração-resposta da atividade antiproliferativa da fração diclorometano (ED) de <i>O. flexuosum</i> sobre as linhagens de células neoplásicas humanas .....	110
<b>Figura 35:</b>	Efeito estimulante dos extratos (EH e EBZ), da fração terpeno (FrT) de <i>O. flexuosum</i> e da alantoina em fibroblastos humanos .....	111
<b>Figura 36:</b>	Fotomicrografias dos cortes transversais da pele do dorso de ratos Wistar no 10º dia após lesão experimental. Cortes tratados com <i>Azul de Toluidina</i> .....	113
<b>Figura 37:</b>	Fotomicrografias dos cortes transversais da pele do dorso de ratos Wistar no 10º dia após lesão experimental. Cortes tratados com Picrossirius- Hematoxilina .....	113
<b>Figura 38:</b>	Medidas da área de reparo tecidual (x103 µm <sup>2</sup> ) na região da lesão experimental. As avaliações foram feitas em amostras coletadas após o 2º (2d), 6º (6d) e 10º (10d) dias após a lesão .....	114



<b>Figura 39:</b>	Número total de células ( $n/10^3 \mu\text{m}^2$ ) na região da lesão experimental. As avaliações foram feitas em amostras coletadas após o 2º (2d), 6º (6d) e 10º (10d) dias do experimento .....	115
<b>Figura 40:</b>	Número total de vasos neoformados ( $n/10^3 \mu\text{m}^2$ ) na região da lesão experimental. As avaliações foram feitas em amostras coletadas após o 2º (2d), 6º (6d) e 10º (10d) dias do experimento .....	116
<b>Figura 41:</b>	Espessura do epitélio ( $\mu\text{m}$ ) na região da lesão experimental. As avaliações foram feitas em amostras coletadas após o 2º (2d), 6º (6d) e 10º (10d) dias do experimento .....	117
<b>Figura 42:</b>	Efeito gastroprotetor do extrato hidroalcoólico de <i>O. flexuosum</i> (EH) em úlcera induzida por etanol .....	118
<b>Figura 43:</b>	Foto dos halos de sensibilidade e resistência da <i>C. albicans</i> frente ao extrato hidroalcoólico de <i>O. flexuosum</i> (EH). (1) 50mg/mL, (2) 10mg/mL, (3) fração terpeno (FrT) (10mg/mL) e (4) controle positivo de fluconazol (30mg/mL). Diluições em DMSO .....	119
<b>Figura 44:</b>	Foto dos halos de sensibilidade e resistência da <i>C. tropicalis</i> frente ao extrato hidroalcoólico de <i>O. flexuosum</i> (EH). (1) 50mg/mL, (2) 10mg/mL, (3) fração terpeno (FrT) (10mg/mL) e (4) controle positivo de fluconazol (30mg/mL). Diluições em DMSO .....	120
<b>Figura 45:</b>	Foto dos halos de sensibilidade e resistência da <i>C. krusei</i> frente ao extrato hidroalcoólico de <i>O. flexuosum</i> (EH). (1) 50mg/mL, (2) 10mg/mL, (3) fração terpeno (FrT) (10mg/mL) e (4) controle positivo de fluconazol (30mg/mL). Diluições em DMSO .....	120
<b>Figura 46:</b>	Atividade da enzima ALT nos grupos controle (G1) e tratados com as três diferentes concentrações (G2 - 100mg/Kg, G3 - 250mg/Kg e G4 - 500mg/Kg) do extrato de <i>O. flexuosum</i> Sims. ....	121
<b>Figura 47:</b>	Quantificação de grupos sulfidril (P-SH) nos grupos controle (G1) e tratados com as três diferentes concentrações (G2 - 100mg/Kg, G3 - 250mg/Kg e G4 - 500mg/Kg) do extrato de <i>O. flexuosum</i> Sims. ....	122
<b>Figura 48:</b>	Níveis de malondealdeído nos grupos controle (G1) e tratados com as três diferentes concentrações (G2 - 100mg/Kg, G3 - 250mg/Kg e G4 - 500mg/Kg) do extrato de <i>O. flexuosum</i> Sims. ....	122



<b>Figura 49:</b>	Avaliação da atividade da catalase nos grupos controle (G1) e tratados com as três diferentes concentrações (G2 - 100mg/Kg, G3 - 250mg/Kg e G4 - 500mg/Kg) do extrato de <i>O. flexuosum</i> Sims. ....	123
<b>Figura 50:</b>	Avaliação do inchamento mitocondrial nos grupos controle (G1) e tratados com as três diferentes concentrações (G2 - 100mg/Kg, G3 - 250mg/Kg e G4 - 500mg/Kg) do extrato de <i>O. flexuosum</i> Sims. ....	123
<b>Figura 51:</b>	Secções dos fígados dos animais dos grupos controle (G1) e tratados por 15 dias com as três concentrações do extrato (G2 - 100mg/Kg, G3 - 250mg/Kg e G4 - 500mg/Kg) de <i>O. flexuosum</i> Sims.. Cortes tratados com Hematoxilina/Eosina. ....	125
<b>Figura 52:</b>	Secções dos fígados dos animais dos grupos controle (G1) e tratados por 30 dias com as três concentrações do extrato (G2 - 100mg/Kg, G3 - 250mg/Kg e G4 - 500mg/Kg) de <i>O. flexuosum</i> Sims.. Cortes tratados com Hematoxilina/Eosina. ....	126
<b>Figura 53:</b>	Secções dos fígados dos animais dos grupos controle (G1) e tratados por 15 dias com as três concentrações do extrato (G2 - 100mg/Kg, G3 - 250mg/Kg e G4 - 500mg/Kg) de <i>O. flexuosum</i> Sims. submetidas à citoquímica com Periodic Acid Shiff (PAS). ....	127
<b>Figura 54:</b>	Secções dos fígados dos animais dos grupos controle (G1) e tratados por 30 dias com as três concentrações do extrato (G2 - 100mg/Kg, G3 - 250mg/Kg e G4 - 500mg/Kg) de <i>O. flexuosum</i> Sims. submetidas à citoquímica com Periodic Acid Shiff. ....	128
<b>Figura 55:</b>	Secções dos fígados dos animais dos grupos controle (G1) e tratados por 15 dias com as três concentrações do extrato (G2 - 100mg/Kg, G3 - 250mg/Kg e G4 - 500mg/Kg) de <i>O. flexuosum</i> Sims. submetidas à citoquímica com azul de bromofenol. ....	129
<b>Figura 56:</b>	Secções dos fígados dos animais dos grupos controle (G1) e tratados por 30 dias com as três concentrações do extrato (G2 - 100mg/Kg, G3 - 250mg/Kg e G4 - 500mg/Kg) de <i>O. flexuosum</i> Sims. submetidas à citoquímica com azul de bromofenol. ....	130
<b>Figura 57:</b>	Secções dos fígados dos animais dos grupos controle (G1) e tratados por 15 e 30 dias com as três concentrações do extrato (G2 - 100mg/Kg, G3 - 250mg/Kg e G4 - 500mg/Kg) de <i>O. flexuosum</i> Sims. submetidas à citoquímica com Tricrômico de Mallory (400X). ....	131



<b>Figura 58:</b>	Secções histológicas de rim dos ratos <i>Wistar</i> dos grupos controle (G1) e tratados por 15 dias com as três concentrações do extrato (G2 - 100mg/Kg, G3 - 250mg/Kg e G4 - 500mg/Kg) de <i>O. flexuosum</i> Sims., coradas com Hematoxilina/Eosina. (tp-túbulo contorcido proximal, cr-corpúsculo renal, g-glomérulo, cB-cápsula de Bowman). .....	133
<b>Figura 59:</b>	Secções histológicas de rim dos ratos <i>Wistar</i> dos grupos controle (G1) e tratados por 30 dias com as três concentrações do extrato (G2 - 100mg/Kg, G3 - 250mg/Kg e G4 - 500mg/Kg) de <i>O. flexuosum</i> Sims.), coradas com Hematoxilina/Eosina. ....	134
<b>Figura 60:</b>	Secções histológicas de rim dos ratos <i>Wistar</i> dos grupos controle (G1) e tratados por 15 dias com as três concentrações do extrato (G2 - 100mg/Kg, G3 - 250mg/Kg e G4 - 500mg/Kg) de <i>O. flexuosum</i> Sims., submetidas à citoquímica de PAS. ....	135
<b>Figura 61:</b>	Secções histológicas de rim de ratos <i>Wistar</i> dos grupos controle (G1) e tratados por 30 dias com extrato hidroalcoólico de <i>O. flexuosum</i> (EH) nas concentrações de 100mg/kg/dia (G2), 250mg/kg/dia (G3) e 500mg/kg/dia (G4), submetidas à citoquímica de PAS (seta-borda em escova). ....	136
<b>Figura 62:</b>	Secções histológicas de rim dos ratos <i>Wistar</i> dos grupos controle (G1) e tratados por 15 e 30 dias com extrato (G2 - 100mg/Kg, G3 - 250mg/Kg e G4 - 500mg/Kg) de <i>O. flexuosum</i> Sims., submetidas à citoquímica com Tricrômico de Gomori (1000X). ....	137



## LISTA DE TABELAS

---

	<i>Página</i>
<b>Tabela 1:</b> Reveladores específicos utilizados na cromatografia de camada delgada .....	67
<b>Tabela 2:</b> Linhagens celulares utilizadas nos ensaios antiproliferativos. ....	73
<b>Tabela 3:</b> Avaliação das lesões ulcerativas em estômago. ....	79
<b>Tabela 4:</b> Rendimentos dos extratos das folhas de <i>O. flexuosum</i> Sims. e das frações. ....	88
<b>Tabela 5:</b> Triagem fitoquímica preliminar: principais classes de substâncias do extrato hidroalcoólico das folhas de <i>O. flexuosum</i> Sims. ....	91
<b>Tabela 6:</b> Perfil cromatográfico do extrato hidroalcoólico de <i>O. flexuosum</i> (EH) revelado com solução de anisaldeído (Figura 9) LF=10cm. ....	93
<b>Tabela 7:</b> Diferentes concentrações da fração terpeno (FrT) e respectivos resultados obtidos pelo Método de TBARs.....	97
<b>Tabela 8:</b> Halos de inibição (mm) do extrato hidroalcoólico de <i>Oncidium flexuosum</i> (EH), da fração terpeno (FrT) e do controle positivo fluconazol frente as leveduras .....	121



## SUMÁRIO

---

	<i>Página</i>
RESUMO .....	xiii
ABSTRACT .....	xiv
INTRODUÇÃO .....	39
OBJETIVOS .....	54
Objetivos Gerais e específicos .....	55
MATERIAL E MÉTODOS .....	56
1- Estudo fitoquímico das folhas de <i>Oncidium flexuosum</i> .....	57
A- Obtenção do material vegetal .....	57
B- Preparação dos extratos vegetais .....	59
2- Histoquímica das folhas de <i>Oncidium flexuosum</i> .....	64
3- Estudo farmacognóstico .....	64
A – Triagem fitoquímica preliminar das principais classes de substâncias .....	64
B – Cromatografia de camada delgada (CCD) .....	66
C- Determinação do teor polifenóis totais .....	67
D – Determinação do teor de flavonóides .....	68
4- Avaliação da atividade antioxidante <i>in vitro</i> .....	68
A – Método do DPPH .....	68
B- Método de TBARs .....	69
5- Avaliação da atividade antioxidante <i>in vivo</i> .....	69
A- Animais .....	69



B- Coleta do Plasma .....	70
C- Coleta do Fígado .....	70
D- Parâmetros de avaliação da função hepática no plasma .....	70
E- Parâmetros de avaliação em homogenato de fígado .....	72
F- Análise estatística .....	72
6- Avaliação da atividade antiproliferativa .....	73
A- Células .....	73
B- Descongelamento e congelamento celular .....	73
C- Ensaio para a determinação da atividade antiproliferativa das amostras .....	74
7- Estímulo do crescimento de fibroblastos <i>in vitro</i> .....	75
8- Análise estrutural e morfométrica do reparo tecidual .....	76
A- Procedimento cirúrgico e tratamento .....	76
B- Estudos histopatológicos .....	77
9- Atividade antiulcerogênica: úlcera induzida por etanol .....	78
A- Determinação da dose efetiva 50 (DE50) .....	79
B- Análise estatística .....	79
10- Atividade antimicrobiana .....	80
A- Banco de microrganismos .....	80
B- Padronização dos inóculos bacterianos .....	80
C- Padronização dos inóculos de leveduras .....	81
D- Determinação da atividade antibacteriana e antifúngica do EH e da FrT .....	81



11- Análises dos danos oxidativos e histopatológicas .....	82
A- Avaliação da Função Hepática .....	82
B- Avaliação dos Danos Oxidativos no Tecido Hepático .....	83
C- Avaliação dos Danos Causados às Mitocôndrias Hepáticas .....	84
D- Avaliação histopatológica .....	84
E- Análise estatística .....	86
RESULTADOS .....	87
1- Estudo fitoquímico das folhas de <i>Oncidium flexuosum</i> : Preparação dos extratos e das frações .....	88
2- Histoquímica das folhas de <i>O. flexuosum</i> .....	89
3- Estudo farmacognóstico .....	91
A – Triagem fitoquímica preliminar .....	91
B – Cromatografia de camada delgada (CCD) .....	91
C- Determinação do teor de polifenóis totais .....	94
D- Determinação do teor de flavonóides .....	94
4- Avaliação da atividade antioxidante <i>in vitro</i> .....	94
5- Avaliação da atividade antioxidante <i>in vivo</i> .....	98
A - Parâmetros de avaliação da função hepática no plasma .....	98
B - Parâmetros de avaliação em homogenato do fígado .....	102
6- Avaliação da atividade antiproliferativa .....	104
7- Estimulo do crescimento de fibroblasto <i>in vitro</i> .....	111
8- Análise estrutural e morfométrica do reparo tecidual .....	112



9- Atividade antiulcerogênica: Úlcera induzida por etanol .....	118
10- Atividade antimicrobiana .....	119
11- Análises dos danos oxidativos e histopatológica .....	121
DISCUSSÃO .....	139
CONCLUSÕES .....	155
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	159
APÊNDICE .....	175





# *Introdução*

---

## INTRODUÇÃO

O conhecimento sobre as plantas tem sempre acompanhado a evolução do homem, através dos tempos. Desde os primórdios, o homem busca no reino vegetal recurso para a sua sobrevivência, seja para a sua alimentação ou para fins medicinais. A descoberta das propriedades curativas das plantas foi, no início, meramente intuitiva ou dada pela observação dos animais que buscavam nas ervas a cura para as suas doenças. Os primeiros relatos feitos pelos homens sobre as propriedades curativas das plantas remontam às sagradas escrituras e ao papiro de Ebers (1550 a.C.), reconhecido como o primeiro e mais importante documento médico do Antigo Egito, o qual enumera aproximadamente 100 doenças e descreve um grande número de drogas de natureza animal e vegetal utilizadas com potencial farmacológico (1-4).

Esta prática milenar de uso das plantas medicinais ultrapassou todas as barreiras e obstáculos durante o processo evolutivo e chegou até os dias atuais, sendo amplamente utilizada por grande parte da população mundial como fonte de recurso terapêutico eficaz, passando a fazer parte do cotidiano das pessoas no tratamento de enfermidades. A Organização Mundial da Saúde (OMS) afirma que 80% da população dos países em desenvolvimento utilizam as práticas tradicionais nos cuidados básicos a saúde. Destes, 85% usam plantas ou preparados derivados das mesmas. Utilizadas inicialmente de forma empírica, fruto do conhecimento repassado entre as gerações, as plantas medicinais tornaram-se alvo de interesse para as pesquisas científicas, aliando, assim, diferentes percepções sobre esse instrumento terapêutico (5-8).

O Brasil é considerado um dos países com maior biodiversidade vegetal, abrigando 55 mil espécies catalogadas de um total estimado entre 350.000 e 550.000. Mais da metade dessas espécies se encontra nas florestas tropicais, cuja área corresponde a 7% da superfície da Terra. Estima-se que quatro mil destas espécies vegetais brasileiras sejam usadas para fins medicinais, como resultado da observação e manejo da flora pela população, gerando a sabedoria popular que é transmitida de geração a geração (9-11).

Este tipo de cultura medicinal desperta o interesse de pesquisadores para estudos, envolvendo diferentes áreas, como por exemplo, botânica, farmacologia e fitoquímica, que juntas enriquecem os conhecimentos sobre a inesgotável fonte medicinal natural. As universidades realizam diversas pesquisas com fitoterápicos, nestas diversas especialidades envolvidas. A pesquisa etnodirigida coloca a informação popular como um ponto referencial para os experimentos (10,12,13).

Mas, a maioria destas espécies é desconhecida sob o ponto de vista científico. Somente cerca de 5% foram estudadas em relação aos aspectos fitoquímicos e uma

---

porcentagem menor avaliada sobre as propriedades biológicas. Portanto, há muito a ser pesquisado sobre o potencial terapêutico das plantas medicinais e de seus constituintes, tais como flavonoides, taninos, alcaloides e terpenos. Muitas destas plantas e seus derivados têm grandes possibilidades de, futuramente, virem a ser aproveitadas como agentes medicinais (14).

Os resultados das pesquisas têm influenciado diretamente as sociedades em vários níveis, possibilitando o uso racional dos fitoterápicos, a descoberta de novos medicamentos de origem vegetal, a identificação de fontes de substâncias químicas locais capazes de substituir as importadas, assim como o desenvolvimento das indústrias de fitomedicamentos nacionais. Esta fundamentação científica é indispensável, pois possibilita a transformação segura e eficaz de uma planta em um medicamento fitoterápico de qualidade (13,15).

Há um grande interesse no estudo dos antioxidantes devido, principalmente, às descobertas sobre o efeito dos radicais livres no organismo. As crescentes evidências mostram o envolvimento de radicais livres no desenvolvimento de uma série de patologias, incluindo neoplasias, doenças hepáticas, aterosclerose e também no processo de envelhecimento (16-19).

O estudo do efeito antioxidante de compostos naturais presentes em vegetais que fazem parte da nossa dieta ou em plantas medicinais é de grande importância e tem sido realizado por causa dos efeitos tóxicos e/ou mutagênicos apresentados por muitos antioxidantes sintéticos (16).

A oxidação é parte fundamental da vida aeróbica e do nosso metabolismo e, assim, os radicais livres são produzidos naturalmente ou por alguma disfunção biológica. Esses radicais livres, cujo elétron desemparelhado encontra-se centrado nos átomos de oxigênio ou nitrogênio são denominados, respectivamente, espécies reativas do oxigênio (ERO) ou espécies reativas do nitrogênio (ERN). No organismo, encontram-se envolvidos na produção de energia, fagocitose, regulação do crescimento celular, sinalização intracelular e síntese de substâncias biológicas importantes (19,20).

No entanto, seu excesso apresenta efeitos prejudiciais, tais como, a peroxidação dos lipídeos de membrana e agressão às proteínas dos tecidos e das membranas, às enzimas, aos carboidratos e ao DNA. Dessa forma, encontram-se relacionados com várias patologias, tais como, artrite, choque hemorrágico, catarata, disfunções cognitivas, AIDS (17), câncer, doenças hepáticas, aterosclerose e envelhecimento (19-22).

De maneira simples, o termo radical livre refere-se ao átomo ou molécula altamente reativo, que contém número ímpar de elétrons em sua última camada eletrônica (23). É este

---

não emparelhamento de elétrons da última camada que confere elevada reatividade a esses átomos ou moléculas (24). Em geral, estas espécies são instáveis, têm uma meia vida muito curta (podendo variar desde nanossegundos a alguns minutos) e reagem rapidamente com diversos compostos e alvos celulares. Os radicais livres podem ser formados pela perda ou adição de um único elétron a um composto não radicalar (25).

O oxigênio é uma molécula altamente reativa e pode ser parcialmente reduzido para formar um número de agentes quimicamente reativos. O processo de transferência de elétrons, ou a absorção de energia pode levar o oxigênio a gerar espécies reativas de oxigênio (EROs) (25), com uma enorme capacidade para combinar-se com diversas moléculas integrantes da estrutura celular e derivados de cada uma delas (26).

As espécies reativas de oxigênio são geradas no citoplasma, mitocôndrias, retículo endoplasmático, membrana celular e núcleo de todas as células aeróbicas (25). As ERO mais importantes são ânion superóxido, radical hidroxila, peróxido de hidrogênio e o oxigênio singlete. O óxido nítrico e o peroxinitrito constituem as principais ERN (26).

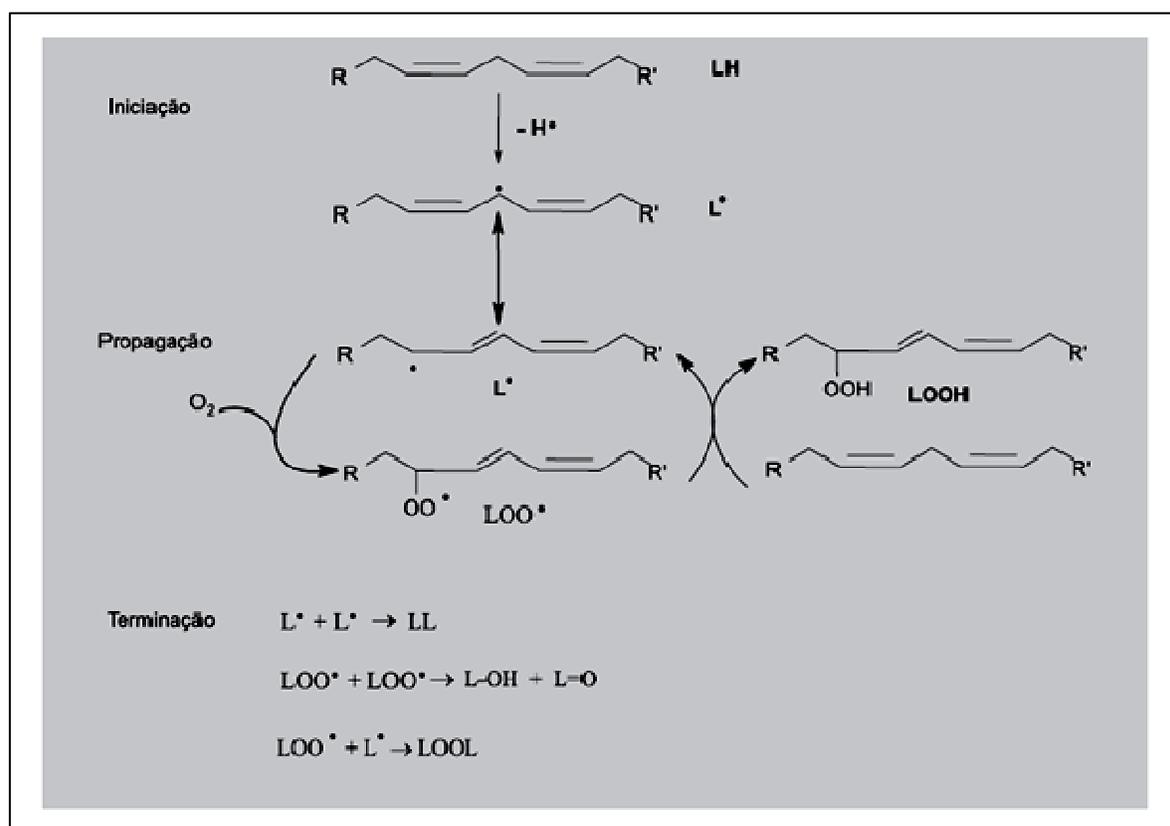
A reatividade dos radicais livres é inversamente proporcional à sua meia vida. Assim, há espécies radicalares de tempo de vida muito curto, como o radical anion superóxido ( $\bullet\text{O}_2^-$ ) e o radical hidroxila ( $\bullet\text{OH}$ ), e de tempo de vida longo, como o oxigênio molecular ( $\text{O}_2$ ) ou os íons ferro ( $\text{Fe}^{2+}$  e  $\text{Fe}^{3+}$ ), que estão normalmente associados a proteínas. Embora o peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) seja considerado um agente oxidante fraco, participa da produção do  $\bullet\text{OH}$ , uma das espécies radicalares mais reativas entre as existentes (27).

O termo estresse oxidativo é utilizado em circunstâncias nas quais o “desafio” por radicais livres resulta em dano tecidual ou na produção de compostos tóxicos ou danosos aos tecidos. Pode-se dizer que um organismo encontra-se sob estresse quando ocorre um desequilíbrio entre os sistemas prooxidantes e antioxidantes, de maneira que os primeiros sejam predominantes (28). Um dos principais mecanismos de lesão é a lipoperoxidação (LPO), ou seja, a oxidação da camada lipídica da membrana celular. Além disso, o estresse oxidativo pode gerar danos a proteínas e ao DNA, provocando diversas alterações na função celular e, portanto, tecidual (29).

A lipoperoxidação pode ser definida como uma cascata de eventos bioquímicos resultante da ação dos radicais livres sobre os lipídeos insaturados das membranas celulares, levando à destruição de sua estrutura, falência dos mecanismos de troca de metabólitos e, numa condição extrema, a morte celular (30). A LPO talvez se constitua no evento citotóxico primário que desencadeia seqüência de lesões na célula. As alterações nas membranas levam a transtornos da permeabilidade, alterando o fluxo iônico e o fluxo de

outras substâncias, o que resulta na perda da seletividade para entrada e/ou saída de nutrientes e substâncias tóxicas à célula, alterações do DNA, oxidação da LDL e comprometimento dos componentes da matriz extracelular (proteoglicanas, colágeno e elastina) (31,32)

O processo de LPO é iniciado pelas ERO, especialmente pelo radical hidroxila, e inclui três eventos principais: iniciação, propagação e término, ilustrados na figura 1 (29,33).



**Figura 1:** Esquema das principais reações ocorridas durante o processo de peroxidação lipídica (29).

A reação inicia-se com o sequestro do hidrogênio do ácido graxo poliinsaturado (LH), contendo, pelo menos, duas ligações duplas metilênicas intercaladas. Tal sequestro pode ser realizado pelo  $\bullet OH$  (radical hidroxila) ou pelo  $LO^{\bullet}$  (radical alcoxila), conseqüentemente formando  $L^{\bullet}$  (radical lipídico), e com o concomitante rearranjo das ligações duplas (conjugação de dienos). Na primeira equação de propagação, o  $L^{\bullet}$  reage

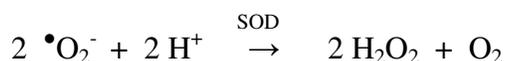
---

rapidamente com o oxigênio, resultando em  $\text{LOO}^\bullet$  (radical peroxila), que, por sua vez, sequestra novo hidrogênio do ácido graxo poliinsaturado, formando novamente o radical lipídico na segunda equação de propagação. O término da LPO ocorre quando os radicais ( $\text{L}^\bullet$  e  $\text{LOO}^\bullet$ ), produzidos nas etapas anteriores, propagam-se até se autodestruírem. (33-37)

O excesso de radicais livres no organismo é combatido por antioxidantes produzidos pelo corpo ou absorvidos na dieta. Antioxidante é qualquer substância que, quando presente em baixa concentração comparada à do substrato oxidável, regenera o substrato ou previne significativamente a oxidação do mesmo (38). Os antioxidantes produzidos pelo corpo agem enzimaticamente, a exemplo da glutathione peroxidase, catalase e superóxido dismutase ou não-enzimaticamente a exemplo de glutathione, peptídeos de histidina, proteínas ligadas (transferrina e ferritina), ácido diidrolipóico e ubiquinol ( $\text{CoQH}_2$ ). Além dos antioxidantes produzidos pelo corpo, o organismo utiliza aqueles provenientes da dieta como  $\alpha$ -tocoferol (vitamina E),  $\beta$ -caroteno (pro-vitamina A), ácido ascórbico (vitamina C), e compostos fenólicos, onde se destacam os flavonoides e poliflavonoides (39).

As defesas antioxidantes enzimáticas incluem a atividade da superóxido dismutase (SOD), catalase (Cat), glutathione peroxidase (GPx), glutathione redutase (GR) e glutathione S-transferase (GST). Para minimizar os efeitos tóxicos dos radicais livres formados, é necessário um adequado equilíbrio das enzimas antioxidantes citadas acima (40,41).

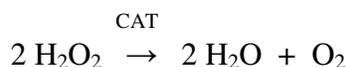
Os radicais superóxido ( $\bullet\text{O}_2^-$ ) se dismutam por ação da atividade da superóxido dismutase, produzindo peróxido de hidrogênio e oxigênio simples ( $\text{O}_2$ ), como mostra a reação:



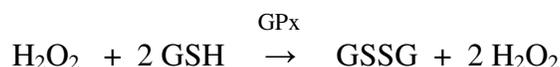
Existem três classes de superóxido dismutase: Fe-SOD, CuZn-SOD e Mn-SOD. A CuZn-SOD e a Mn-SOD encontram-se em eucariotos e a Fe-SOD, apenas em procariotos. A CuZn-SOD encontra-se no citoplasma e nos fluidos extracelulares e a Mn-SOD é uma enzima mitocondrial. A SOD distribui-se em diversos órgãos na seguinte ordem de atividade específica: fígado > cérebro > testículos > rins > coração > estômago > pulmão > pâncreas (25).

A enzima catalase é uma ferrihemoenzima cuja função principal é dismutar peróxido de hidrogênio, formando água e oxigênio molecular (42). A catalase está localizada nos peroxissomos do fígado e rins e em microperoxissomos de outras células (25). Na reação da catalase, que inativa o  $\text{H}_2\text{O}_2$ , uma das duas moléculas de peróxido de

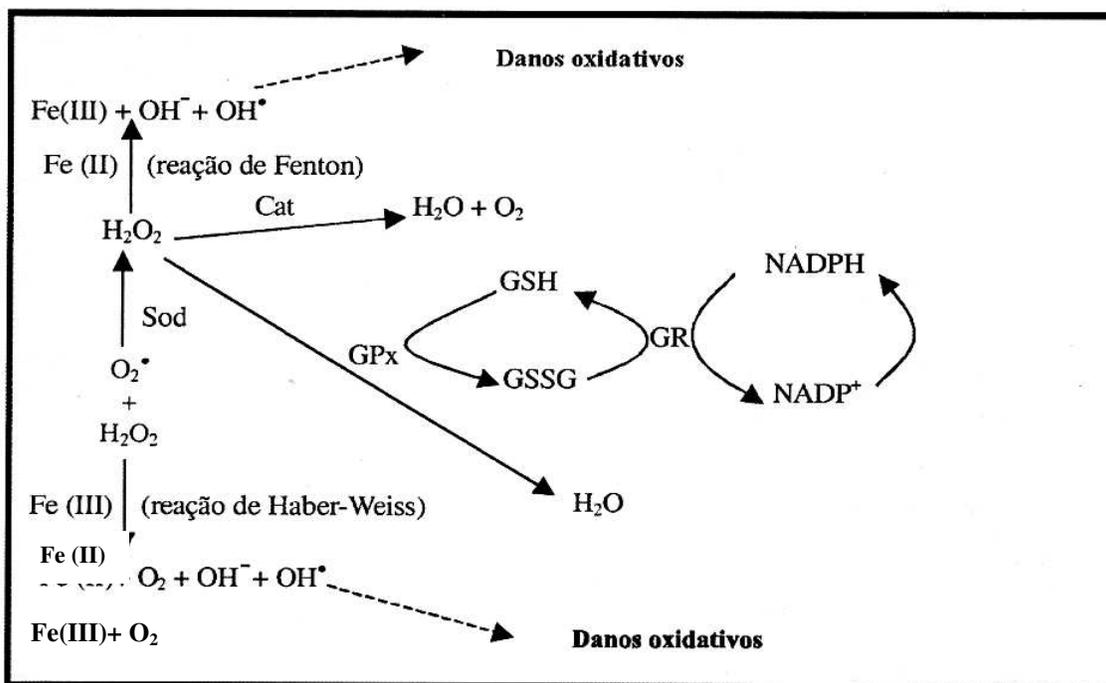
hidrogênio é oxidada a oxigênio-molecular e a segunda é reduzida à água, conforme na seguinte reação:



A glutationa peroxidase, por sua vez, reduz o peróxido de hidrogênio, os peróxidos alifáticos e os aromáticos à água ou ao seu correspondente álcool inerte, em uma reação que precisa da presença de glutationa reduzida (GSH), como fonte de equivalentes redutores (43), como mostra a reação a seguir e a figura 2:



Nas células, cerca de 2/3 de sua atividade encontra-se no citoplasma e 1/3 nas mitocôndrias. Sua atividade varia em diversos órgãos de acordo com a seguinte ordem: fígado > rins > pâncreas > cérebro > coração > pulmão > baço > músculos esqueléticos (25).



**Figura 2:** Detoxificação enzimática realizada por SOD, CAT e GPx (43).

---

A proteção antioxidante por mecanismo não-enzimático é feita por moléculas que protegem alvos biológicos da oxidação, por apresentarem três propriedades: supressão da formação de radical livre (quelação de metais ou inibição de enzimas geradoras de radicais livres); eliminação de radicais livres ou desativação, formando um produto estável e participação em processos de reparo (44).

A glutathiona (GSH) é um tripeptídeo formado por resíduos de glicina, cisteína e glutamato. A GSH é um sequestrador de radical hidroxila e de oxigênio singlete. A GSH atua como cofator de várias enzimas em diferentes vias metabólicas (glutathiona peroxidase, glioxilase, maleilacetoacetato isomerase, prostaglandina endoperóxido isomerase) e participa de diversos processos de detoxificação (conjugação com xenobióticos pela ação da glutathiona-S-transferase e remoção de peróxidos via glutathiona peroxidase) (25).

A glutathiona reduzida (GSH) age como um sequestrador de radical com grupo sulfidrila com ação redox, reagindo com oxidantes para produção de glutathiona oxidada (GSSG). A glutathiona é possivelmente a mais abundante molécula antioxidante nas células (45) e, conseqüentemente esta função é a mais importante na manutenção do estado redox celular. (46,47).

A ubiquinona é o único lipídio endogenamente sintetizado que apresenta função redox, atuando tanto nos sistemas de transporte de elétrons transmembrana, como na cadeia respiratória mitocondrial. Embora de forma diferenciada e bem específica, esta é biossintetizada por todas as células, o que a torna o maior constituinte da membrana mitocondrial interna, membrana do complexo de Golgi e membrana dos lisossomos. Sua forma reduzida ubiquinol-10 (CoQH<sub>2</sub>) é uma hidroquinona, que ocorre predominantemente no coração, rins e fígado e a forma oxidada ubiquinona (CoQ<sub>10</sub>) é abundante no cérebro e intestino (25,39).

Os carotenoides são pigmentos dos tecidos fotossintéticos de vegetais, adquiridos pelo organismo humano pela dieta, principalmente pela ingestão de frutas e legumes. Dentre os carotenoides, o β-caroteno é a mais importante fonte de vitamina A. Eles atuam como supressores de oxigênio singlete e como sequestradores de radicais livres. O β-caroteno reage diretamente com radicais peróxil formados durante a peroxidação lipídica, protegendo as membranas celulares e as lipoproteínas contra modificações lipídicas (25).

O ácido ascórbico ou vitamina C é comumente encontrado em nosso organismo na forma de ascorbato. Por ser muito solúvel em água, está localizado em compartimentos aquosos dos tecidos orgânicos. O ascorbato desempenha papéis metabólicos fundamentais no organismo humano, atuando como agente redutor, reduzindo metais de transição (em particular Fe<sup>3+</sup> e Cu<sup>2+</sup>) e presentes nos sítios ativos das enzimas ou nas formas livres no organismo. O ascorbato possui também propriedades pró-oxidantes, pois os íons Fe<sup>2+</sup> e Cu<sup>+</sup>

---

reagem com peróxido de hidrogênio (reação de Fenton), gerando radical hidroxila. Indiretamente, o ascorbato pode induzir as reações de radicais livres (39).

A vitamina E é constituída principalmente por quatro tocoferóis, e secundariamente por quatro tocotrienóis, sendo o  $\alpha$ -tocoferol o mais ativo. O  $\alpha$ -tocoferol suprime e reage com oxigênio singlete, sequestra os radicais superóxido e hidroxila podendo, portanto, bloquear a iniciação da peroxidação lipídica. Entretanto, sua principal ação antioxidante nas membranas biológicas deve-se ao fato de atuar interrompendo a fase de propagação da lipoperoxidação, doando um átomo de hidrogênio para os radicais peroxil e alcoxil, derivados da oxidação de ácidos graxos e interrompendo a cadeia radicalar da peroxidação lipídica (25,39).

A maioria dos compostos presentes nas plantas faz parte do metabolismo primário. Esses compostos são polissacarídeos, açúcares, proteínas e lipídios, substâncias essenciais à sobrevivência e desenvolvimento das plantas (48). Além desses metabólitos, as plantas produzem uma grande variedade de metabólitos secundários. Esses compostos, não necessariamente essenciais ao organismo produtor, têm um papel importante na sobrevivência da planta em seu ecossistema. (10).

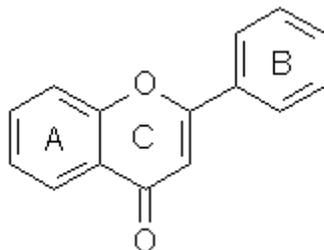
Os metabólitos secundários estão assim envolvidos na resistência contra pragas e doenças, na atração de polinizadores, na interação com micro-organismos simbióticos entre outros (48). Embora os metabólitos secundários encontrem-se presentes em concentrações bem menores nas plantas, a maioria deles tais como alcaloides, terpenoides, antocianinas, esteroides, flavonoides, quinonas e ligninas têm encontrado aplicações comerciais como fármacos, corantes, aromas, inseticidas etc. Esses compostos apresentam uma ampla diversidade em estruturas e tamanhos, sendo encontrados e distribuídos por todo o reino vegetal (49,50).

Os flavonoides, sintetizados a partir da via dos fenilpropanoides, constituem uma importante classe de polifenóis, presentes em relativa abundância entre os metabólitos secundários de vegetais. Uma “substância fenólica ou polifenólica” é aquela que possui um ou mais núcleos aromáticos, contendo substituintes hidroxilados e/ou derivados funcionais (ésteres, éteres, glicosídeos e outros). Entretanto, uma definição levando em conta somente a estrutura química não é apropriada, uma vez que existem compostos contendo hidroxilas fenólicas, que fazem parte de outras classes de metabólitos. Dessa forma, é mais conveniente empregar-se uma definição que leva em conta também a origem bioenergética (48-50).

Os flavonoides representam um dos grupos fenólicos mais importantes e diversificados entre os produtos de origem natural, podendo ser encontrados em diversas formas estruturais. Essa classe de compostos é amplamente distribuída no reino vegetal.

---

Entretanto, a maioria dos representantes dessa classe possui 15 átomos de carbono em seu núcleo fundamental, constituído de duas fenilas ligadas por uma cadeia de três carbonos entre elas (Figura 3) (10).



**Figura 3:** Núcleo fundamental dos flavonoides.

Diversas funções são atribuídas aos flavonoides nas plantas. Dentre elas, pode-se citar: (a) proteção dos vegetais contra a incidência de raios ultravioleta e visível, além de proteção contra insetos, fungos, vírus e bactérias; (b) atração de animais com finalidade de polinização; (c) antioxidantes; (d) controle da ação de hormônios vegetais; (e) agentes alelopáticos; e (f) inibidores de enzima (51,52).

Os polifenóis são efetivos doadores de elétrons, particularmente os flavonoides. Seu potencial antioxidante depende do número e da posição dos grupos hidroxilas e sua conjugação, assim como da presença de doadores de elétrons no anel estrutural, devido à capacidade que o grupo aromático possui de suportar o desemparelhamento de elétrons por deslocamento do sistema de elétrons (estabilização por ressonância). Essa estrutura lhes confere uma significativa atividade antioxidante, capaz de diminuir os efeitos nocivos gerados pelos radicais livres, e conseqüentemente, o surgimento de doenças associadas à ação desses radicais (53,54).

Existe na literatura muita controvérsia sobre o mecanismo de ação dos flavonoides. Eles atuam como antioxidantes na inativação dos radicais livres, em ambos os compartimentos celulares, lipofílico e hidrofílico. Esses compostos têm a capacidade de doar elétrons e, portanto, inibir as reações em cadeia provocadas pelos radicais livres (53).

Os flavonoides e outros derivados fenólicos são conhecidos por atuarem na captura e neutralização de espécies oxidantes como o ânion superóxido ( $O_2^-$ ), radical hidroxila ou radical peróxido, atuando por sinergismo com outros antioxidantes, como as vitaminas C e E. Alguns flavonoides são capazes de complexar íons metálicos, impedindo-os de atuarem como catalisadores na produção de radicais livres. Esta atividade é o resultado de um conjunto de propriedades, tais como atividade quelante de ferro, atividade sequestrante de

---

radicais livres, inibição das enzimas cicloxigenase, lipoxigenase, NADPH-oxidase, xantina-oxidase e fosfolipases, estimulação de enzimas com atividade antioxidante como a catalase e a superóxido-dismutase. Assim, os flavonoides podem interferir nas reações de propagação e formação de radicais livres (53-56).

Os antioxidantes fenólicos formam um radical fenoxil quando reagem com espécies oxidadas, havendo a deslocalização do elétron desemparelhado na molécula de oxigênio fenólico. Estes radicais formados são menos reativos devido à ressonância de sua estrutura química, ou seja, devido à redução da densidade eletrônica do elétron desemparelhado em todas as formas isoméricas dos compostos fenólicos. A estabilização pode ocorrer em decorrência, além da deslocalização eletrônica, da formação de pontes de hidrogênio intramoleculares, ou da oxidação subsequente à reação com outro radical lipídico (55,56).

Os flavonoides representam um grande grupo fitoquímico, que tem apresentado inúmeras funções. Pode ser destacada, particularmente, sua atividade antioxidante, mas, atualmente, estudos relatam que as propriedades farmacológicas dos flavonoides vão além do que se imagina, pois reduzem a carcinogênese em modelos animais. Estas substâncias apresentam funções de inibição da proliferação de diversas linhagens de células cancerígenas e de indução de apoptose (57).

A ação antioxidante mais conhecida dos flavonoides contra as células cancerígenas é a habilidade de desativar moléculas reativas do oxigênio, podendo ainda defender as membranas celulares da peroxidação lipídica, garantindo a integridade e fluidez da membrana, diminuindo a formação de peróxidos imunossupressores e impedindo alterações na sinalização intracelular e função celular (58).

O câncer é um dos mais antigos males da humanidade e, atualmente, os tipos que mais afetam a sociedade são, para o sexo masculino, os de próstata e pulmão; e, para o sexo feminino, os de mama e colo do útero. O câncer é o nome dado a um conjunto de mais de cem doenças que têm em comum o crescimento desordenado de células, apoderando-se dos tecidos, órgãos, entre outras partes do corpo. Dependendo de seu estágio, ou seja, considerando a rapidez da divisão das células cancerígenas, a doença pode ser muito agressiva e incontrolável, e é considerada maligna. Mas, se a sua proliferação for lenta e concentrar-se apenas em uma massa localizada de células, sendo semelhante ao tecido original, o câncer é denominado como benigno e dificilmente gera risco de morte (59).

A formação do tumor é representada em três estágios: iniciação, promoção e progressão. A iniciação é caracterizada pela alteração do material genético, que sofrerá mutação. O estágio de promoção é caracterizado pela conversão da célula iniciada em pré-maligna. Esse processo é longo e reversível, e é nessa fase que os agentes quimiopreventivos agem. A progressão da célula pré-maligna para a célula maligna

---

acontece logo em seguida em consequência do dano adicional ocorrido no cromossomo, e, a partir disso, a divisão das células passa a ser incontrolável (58).

Importante causa de doença e morte no Brasil, desde 2003, as neoplasias malignas constituem a segunda causa de morte na população. Segundo recente relatório da Agência Internacional para Pesquisa em Câncer (IARC)/OMS (World Cancer Report 2008), o impacto global do câncer mais que dobrou em 30 anos. Os cânceres podem ocorrer em qualquer fase da vida, mas, a probabilidade aumenta com o avanço da idade, ou seja, com o envelhecimento. Calcula-se que, em 2050, 57% dos casos de câncer serão detectados em pessoas com mais de 65 anos (60,61).

Compreender e controlar as doenças malignas requer conhecimentos científicos e experiências que vão desde o conhecimento dos complexos mecanismos de regulação molecular intracelular às escolhas individuais do estilo de vida. A prevenção e o controle do câncer estão entre os mais importantes desafios, científicos e de saúde pública, da nossa época (60).

Para o surgimento do câncer não existe origem determinada, e, sim, fatores internos ou externos ao organismo, que podem contribuir para o aparecimento da doença. Um exemplo simples é o próprio hábito alimentar (62,63).

As terapias utilizadas para o tratamento do câncer são a radioterapia, quimioterapia, imunoterapia e hormonioterapia. Essas bases terapêuticas consistem em aproximadamente 300 fármacos, que atuam ao nível celular para impedir o crescimento do tumor. Entretanto, não tem a função de selecionar somente as células mutantes, e acabam sendo tóxicas aos demais tecidos sadios e com rápida proliferação (64).

Existem dois tipos de agentes terapêuticos conhecidos atualmente, denominados agentes bloqueadores (quimiopreventivos), que inibem a iniciação do processo carcinogênico; e os agentes supressores, que inibem a proliferação de células malignas durante as fases de promoção e progressão da evolução tumoral (61).

Para um conceito mais adequado, a quimioprevenção pode ser definida como a utilização de produtos químicos naturais ou sintéticos, com a função de intervir, extinguir ou impedir o processo de evolução do câncer, ou seja, evitam que o dano atinja o DNA (63).

---

Já, os agentes supressores têm sua atividade inibitória atribuída à influência sobre a proliferação e diferenciação celular e/ou apoptose, isto é, transformação de células pré-neoplásicas em tumores malignos capazes de invadir tecidos e formar metástases. Alguns agentes terapêuticos podem agir tanto como agentes bloqueadores, quanto como supressores (62,63).

Dentro desse contexto, além da falta de novos medicamentos para o tratamento dessas patologias, há também necessidade de obter outro foco do desenvolvimento desses fármacos, visando, particularmente, a nossa maior riqueza, que é a imensa biodiversidade brasileira de plantas. Neste sentido, a investigação farmacológica e fitoquímica das plantas presentes nos biomas brasileiros pode ser uma alternativa, uma vez que este território possui cerca de 55000 angiospermas, sendo o primeiro no *ranking* dos países mais ricos em número de espécies dessas plantas. Além disso, sabe-se que as angiospermas são as mais promissoras, quando se trata de desenvolvimento de novos fármacos a partir do reino vegetal (65).

A cicatrização é um processo complexo que envolve a atividade local e sistêmica que vem sendo o alvo, ao longo das últimas décadas, da atenção dos pesquisadores, principalmente, quanto aos fatores que a retardam ou a dificultam. Este processo consiste na substituição de células mortas ou lesadas por novas células sadias, originadas dos elementos parenquimatosos ou do estroma do tecido lesado. A proliferação fibroblástica e a formação de cicatriz são as características mais comuns de todo o processo de regeneração.

O processo de cicatrização de feridas consiste em perfeita e coordenada cascata de eventos celulares e moleculares que interagem para que ocorra a repavimentação e reconstrução do tecido. Esse processo tem despertado o interesse de pesquisadores, principalmente no estudo de fatores que comprometem esse mecanismo. Alguns autores consideram que este varia segundo a presença ou ausência de bactérias, o tipo de tecido lesado, a condição orgânica e a idade do indivíduo (66).

Diferentes agentes podem atuar na indução da cicatrização. Segundo Robinson e Snyder-Mackler (67), a cicatrização pode ser estimulada pela eletroterapia, pois reduz a inflamação pelo aumento da irrigação vascular. Diversos estudos têm demonstrado que aplicações de estímulos elétricos modificam o processo de cicatrização, crescimento e regeneração em todos os organismos vivos (68,69).

Aplicações de estímulos elétricos de baixa amperagem modificam o processo de cicatrização, principalmente no que tange a fatores que o retardam ou dificultam (68,70). Observa-se que os efeitos da aplicação da estimulação elétrica com diferentes amplitudes e frequências promovem modificações nas respostas celulares e teciduais em lesões induzidas, podendo ser usada para promover reparo tecidual (71,72). Esta estimulação por

---

correntes elétricas de baixa intensidade afeta diretamente os potenciais elétricos na membrana, associados a mudanças no gradiente de concentração de íons na membrana celular o que ocasiona aumento da síntese de ATP, seguido do aumento da síntese de proteínas (68,70).

A utilização de fitoterápicos é outro fator que também tem se mostrado bastante eficaz na cicatrização de feridas e queimaduras (73,74). E sabe-se que a eficiência destes fitoterápicos no processo de cicatrização está relacionada, principalmente, aos taninos (10,75,76).

Também a utilização de alguns fitoterápicos tem sido benéfica na cura de feridas e pouco se sabe sobre a ação combinada de fitoterápicos com agentes físicos na regeneração de tecidos moles. Estes apresentam várias indicações terapêuticas, sendo que alguns deles pertencem à farmacopeia (77,78).

A família das orquídeas é a maior das angiospermas, com mais de 25 mil espécies já descritas, além das formas híbridas produzidas por cruzamento de forma espontânea e cultivada. Existem orquídeas das mais variadas dimensões, desde pequenas plantas com flores do tamanho da cabeça de um alfinete até plantas que chegam a três metros de altura (79).

*Oncidium flexuosum* é uma epífita de até 1 metro de altura, possuidora de grande número de flores, que formam inflorescências ramificadas de flores médias vistosas. Suas sépalas e pétalas são amarelas, com listras marrom-avermelhadas e o labelo é realçado com pontinhos avermelhados. As folhas do gênero *Oncidium* geralmente apresentam epiderme uniestratificada, superfície hipoestomática, com presença de câmara subestomática, sendo o mesófilo homogêneo preenchido com parênquima clorofiliano; o feixe vascular é colateral com presença de camadas de fibras nos pólos, tanto do xilema como do floema. Também estas apresentam cutículas grossas e células epidérmicas possuidoras de paredes com alto grau de lignificação (80), evitando assim o dessecamento, mas que também, podem vir a dificultar a extração de possíveis princípios ativos existentes nas espécies deste gênero.

Muitos trabalhos de revisão taxonômica do gênero *Oncidium* são encontrados na literatura (80-84). Entretanto, não há informações científicas sobre este gênero, tanto sobre os constituintes químicos e os métodos ideais de extração quanto avaliações de suas atividades biológicas. Recentemente, Musharof (85) reuniu as informações sobre as propriedades medicinais de outros gêneros da família das orquídeas, os seus usos terapêuticos tradicionais com os recentes avanços nas investigações farmacológicas. Espécies desta família têm sido usadas para o tratamento de diversas doenças por milênios, incluindo disfunções estomacais, tumores, feridas, inflamações. As orquídeas possuem uma incrível diversidade de espécies e a pesquisa destas plantas tem grande potencial.

---

Assim, os resultados de pesquisas com plantas medicinais podem ter desdobramentos em vários níveis. Individualmente, a descoberta de novos fármacos ou de fármacos acessíveis, pode determinar a melhoria da qualidade de vida em doenças crônicas ou a própria sobrevivência do paciente afetado. Socialmente, a descoberta de fontes naturais e locais de compostos químicos, usualmente importados e/ou desenvolvimento de fitoterápicos de fabricação nacional, pode ter consequências econômicas significativas, além de possibilitar a autonomia de cada país no gerenciamento de suas políticas de saúde (2,3,5,10).



# *Objetivos*

---

## OBJETIVOS

### 1- Objetivo geral

Realizar pesquisa exploratória das ações farmacológicas das folhas de *Oncidium flexuosum* Sims.

Avaliar as atividades antioxidante, antiulcerogênica e cicatrizante dos extratos obtidos a partir das folhas de *Oncidium flexuosum* Sims. e analisar os principais grupos de substâncias fitoquímicas presentes.

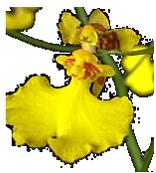
### 2- Objetivos específicos

Obter o extrato hidroalcoólico a partir das folhas de *O. flexuosum* e suas respectivas frações.

Analisar os principais grupos de substâncias presentes neste extrato por análises fitoquímicas, histoquímica, reações de caracterização e cromatografia de camada delgada.

Avaliar as seguintes atividades biológicas do extrato hidroalcoólico e suas frações:

- capacidade antioxidante *in vitro* e *in vivo*.
- atividade cicatrizante associada ou não à microcorrente.
- atividade sobre a proliferação de fibroblastos.
- ação antimicrobiana *in vitro* frente diferentes bactérias e leveduras.
- atividade antiproliferativa e citotóxica *in vitro* em diferentes linhagens.
- análise dos danos oxidativos hepáticos e renais.
- análises histopatológicas.



# *Material e Métodos*

---

## MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados solventes Grau P.A. As análises por cromatografias em camada delgada (CCD) foram efetuadas em cromatofolha de alumínio, sílica gel 60 F<sub>245</sub> (Merck). A detecção dos compostos foi feita com lâmpada UV a 254 e 366nm e, posteriormente, com reagentes específicos. As liofilizações foram realizadas em liofilizador marca Virtis, modelo 8L.

### 1- Estudo fitoquímico das folhas de *Oncidium flexuosum*

#### A- Obtenção do material vegetal

As folhas da espécie *Oncidium flexuosum* Sims. foram coletadas na Horta de Plantas Mediciniais da Uniararas (Projeto de Extensão Universitária Saúde & Harmonia: Bem-estar com as Plantas Mediciniais), localizada no município de Araras, estado de São Paulo. A exsicata foi tombada na coleção do Herbário Rio Clarense (HRCB), do Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista – UNESP de Rio Claro, sob o número 45341, pelo biólogo Cristiano Pedroso de Moraes. Na figura 4, pode ser observado um exemplar da espécie *O. flexuosum* cultivado na Horta de Plantas Mediciniais da Uniararas. Detalhes das folhas e flores estão apresentados na figura 5.



**Figura 4:** Exemplo de *O. flexuosum* Sims. cultivado na Horta de Plantas Medicinais da Uniararas.



**Figura 5:** Detalhe das folhas e flores do exemplar de *O. flexuosum* apresentado na figura 4.

---

## B- Preparação dos extratos vegetais

### Extrato hidroalcoólico (EH)

As folhas frescas (50 g) de *O. flexuosum* foram congeladas e moídas com gelo seco em moinho de facas, marca Stephen, modelo UM 40. Em seguida, foram extraídas por maceração dinâmica, sendo realizados três períodos extrativos com 300 mL de solução hidroalcoólica 70%, à temperatura ambiente, seguido de filtração a vácuo. Os filtrados resultantes dos três períodos extrativos foram reunidos e o solvente foi evaporado sob vácuo a temperatura de 40°C em evaporador rotativo, marca Buchi (modelo R-215). O extrato evaporado foi liofilizado sendo obtido o extrato bruto hidroalcoólico (EH).

### Extrato diclorometano (ED)

Foram adicionados 150 mL de diclorometano em 50 g das folhas e a mistura foi submetida à extração por dispersor, marca IKA (modelo RW20) durante 3 minutos, sendo em seguida, filtrado em funil de placa porosa. Este processo extrativo foi repetido 3 vezes e os sobrenadantes obtidos foram agrupados. Retirou-se o solvente a vácuo, obtendo-se o extrato rico em compostos de baixa e média polaridade (ED).

### Extrato bruto com tratamento enzimático (EBZ)

As folhas moídas de *O. flexuosum* foram submetidas a fermentação através de incubação na presença de xilanases (caldo enzimático bruto) de *Bacillus pumilus* CBMAI 0008 (Coleção Brasileira de Micro-organismos de Ambiente e Indústria) previamente a extração.

Uma porção de 250 mg destas folhas foi misturada a 5,0 mL de solução tampão Tris 0,1 mol/L (pH 8,8) e 66,7 µL do caldo de *B. pumilus* rico em xilanase. Os tubos Falcon foram cobertos por papel alumínio para proteção contra a luz. Em seguida, a mistura foi submetida à agitação oscilatória de 250 rotações por minuto (rpm), a temperatura de 60°C, durante um período de 1h50min. Após o tempo de incubação enzimática, as amostras sofreram um choque térmico em banho de gelo. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 3000 rpm, na temperatura de -5°C, por 30 minutos, em centrífuga

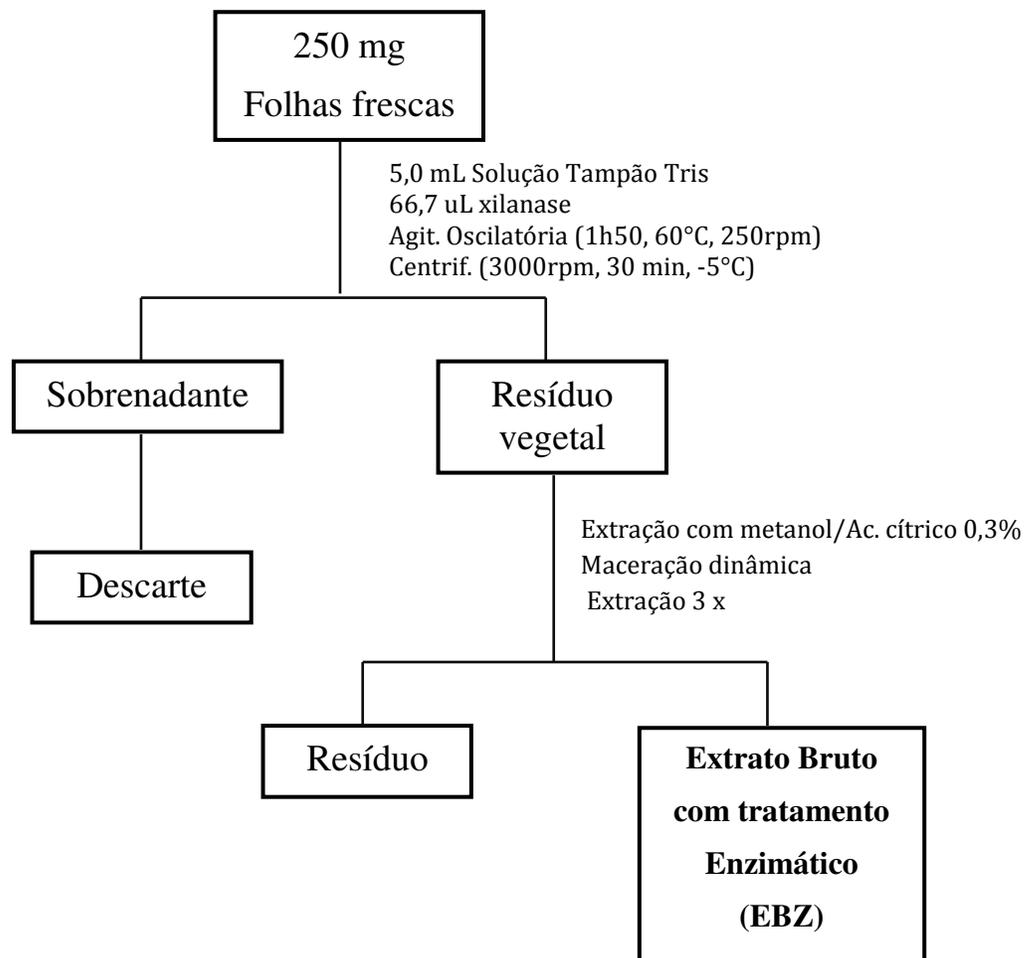
---

refrigerada Centra CL3R. Os sobrenadantes foram descartados e os resíduos vegetais (material vegetal fermentado) foram mantidos nos tubos Falcon e adicionados 5mL de uma mistura metanol/ ácido cítrico 0,3%. Finalmente, o material vegetal fermentado foi extraído por maceração dinâmica da mesma forma descrita para o extrato EH (Figura 6).

#### Fração Terpeno (FrT)

Esta fração foi obtida pela adição de 900 ml de solução saturada de acetato de chumbo 10% e 100 ml de metanol ao EH (1 g). Esta mistura foi homogeneizada e levada à refrigeração por 24 horas.

Decorrido este período, a mistura foi filtrada a vácuo em funil de placa porosa com celite, o filtrado resultante foi evaporado sob vácuo a temperatura de 40°C em evaporador rotativo, sendo obtida a fração aquosa que foi submetida a 3 períodos extrativos com acetato de etila. As frações orgânicas obtidas foram reunidas e evaporadas à vácuo resultando na fração terpeno (FrT).



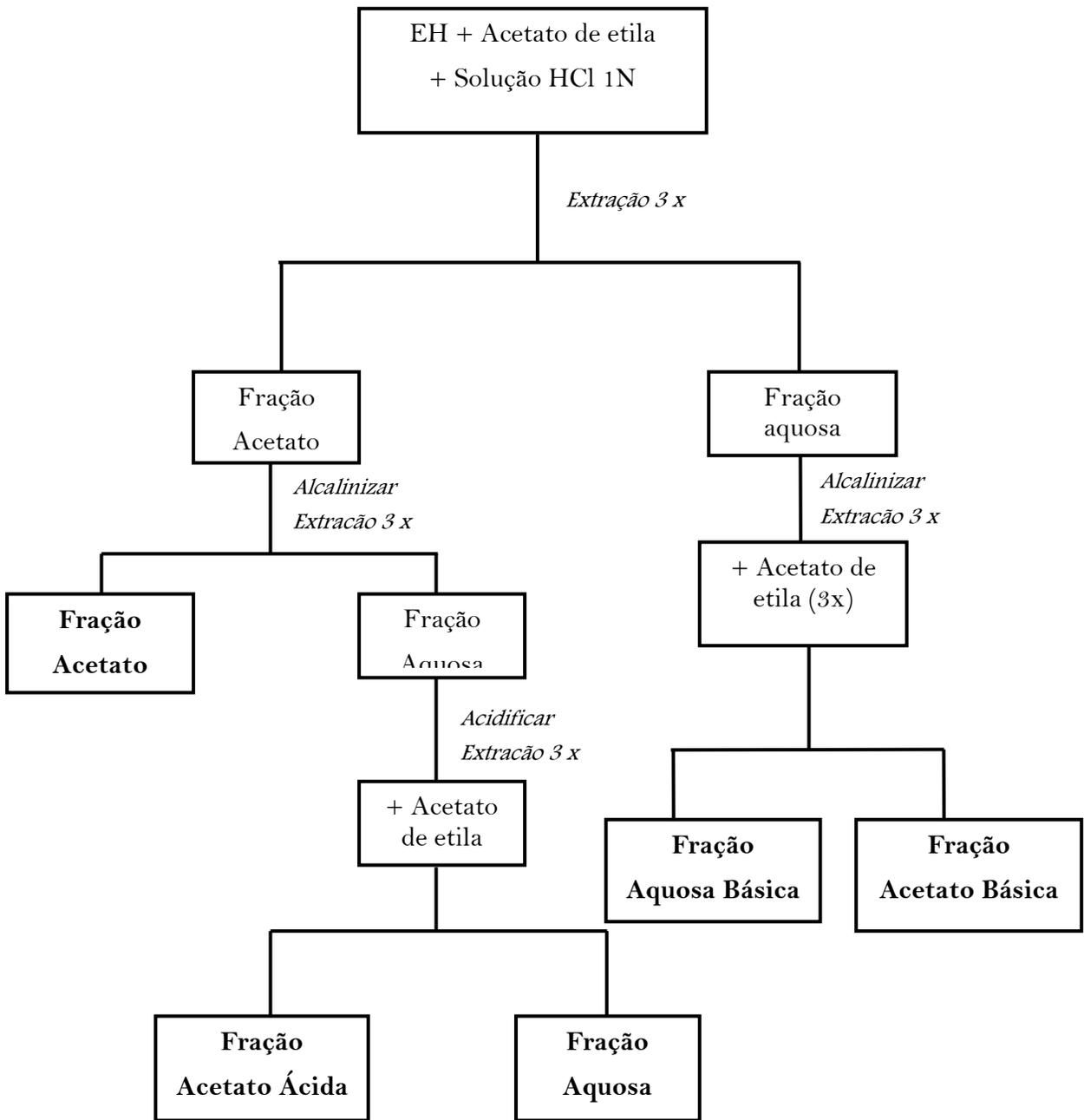
**Figura 6:** Fluxograma do processo de obtenção do extrato bruto com tratamento enzimático (EBZ).

---

### Fracionamento ácido-base do extrato hidroalcoólico EH

Em um funil de separação, foram colocados 100 mL do EH, 100 mL de acetato de etila e solução de ácido clorídrico 1 mol/L até o pH 3,0. Foi realizado o processo extrativo líquido-líquido, agitando vigorosamente o funil. Após um breve período de repouso, as fases foram separadas, a fração aquosa foi reservada e na fração acetato foram adicionados 100mL de solução de hidróxido de sódio 1 mol/L. Esta fração foi submetida a novos 3 períodos extrativos, obtendo-se as frações acetato e aquosa após o período de repouso. A fração aquosa foi acidificada até pH 5, e, posteriormente, extraída três vezes com acetato de etila, resultando nas frações acetato ácida e aquosa.

Na fração aquosa reservada anteriormente foram adicionadas solução de hidróxido de sódio até pH 9 e 100 mL de acetato de etila para novos 3 períodos extrativos com acetato de etila. Após estes períodos, resultaram as frações aquosa básica e acetato básica (Figura 7). As frações aquosas foram liofilizadas e as orgânicas foram evaporadas em evaporador rotativo sob vácuo a 40°C (86).



**Figura 7:** Fluxograma de fracionamento ácido-base do extrato hidroalcoólico EH.

---

## **2- Histoquímica das folhas de *Oncidium flexuosum***

Estes testes foram realizados no Laboratório do Meio Ambiente do Centro Universitário Hermínio Ometto – Uniararas, sob a supervisão do Prof. Ms. Cristiano Pedroso de Moraes.

Para a análise anatômica, cinco folhas de 10 plantas foram fixadas em FAA 50 e preservadas em álcool 70%. Cada uma delas foi seccionada a mão na região mediana, com o auxílio de lâminas de barbear. Os cortes foram corados com Safra-Blau 0,05% (87) e montados em glicerina. Para a identificação dos flavonoides, utilizou-se hidróxido de potássio (88) e para taninos, solução aquosa de cloreto de ferro (III) a 10%, acrescida de algumas gramas de carbonato de sódio (89). Os aspectos mais importantes foram registrados com uma câmara digital, acoplada a um microscópio Olympus (modelo BX51).

## **3- Estudo farmacognóstico**

### A – Triagem fitoquímica preliminar das principais classes de substâncias

Os testes fitoquímicos foram realizados em tubos de ensaio, em triplicata, sendo comparados com um teste branco conforme as metodologias de Harborne (1998) (90) e Matos (1997) (91).

#### Fenóis e Taninos: Cloreto férrico

Foram adicionadas 3 gotas de solução de cloreto férrico 1% ao tubo de ensaio contendo uma amostra do extrato. Após a agitação, coloração variável entre o azul e o vermelho é indicativa da presença de fenóis. A formação de precipitado escuro de tonalidade azul indica a presença de taninos hidrolizáveis e verde, a presença de taninos condensados.

---

#### Flavonoides: Reação de Shinoda

Em 1 mL do extrato foi adicionado um fragmento de limalha de magnésio e 0,5 mL de ácido clorídrico concentrado. Após um repouso de 15 minutos observou-se a coloração. A presença de flavonoides é indicada pela coloração avermelhada.

#### Flavonoides: Reação do cloreto de alumínio

Em um papel de filtro foram aplicadas duas gotas do extrato em duas áreas. Sobre uma das manchas foi colocada uma gota da solução etanólica de cloreto de alumínio 5%. Após a evaporação do solvente, foi observado sob luz UV. A presença de flavonoides é indicada pelo aparecimento de fluorescência.

#### Flavonoides: Reação do ácido sulfúrico

Em um tubo de ensaio foi colocado 1 mL do extrato e adicionadas 3 gotas de ácido sulfúrico. O aparecimento da coloração fortemente amarelada, laranja ou vermelha indica a presença de flavonoides.

#### Taninos: Reação de Stiasny

Em um tubo de ensaio foi colocado 1 mL do extrato e adicionadas 3 gotas de formol e 2 gotas de ácido clorídrico. O aparecimento de precipitado indica a presença de taninos.

#### Taninos: Reação do Acetato Ácido de Chumbo

Em 2 mL do extrato contidos em um tubo de ensaio foram adicionados 4 mL de ácido acético glacial e 2 mL de solução de acetato de chumbo 10%. A presença de precipitado indica taninos.

---

### Alcalóides: Reações de Mayer e Dragendorff

Uma amostra do extrato foi solubilizada em 2 mL de ácido clorídrico 2%. Logo após, a mistura foi dividida em 2 porções iguais em 2 tubos de ensaio, nos quais foram adicionadas 3 gotas dos reagentes de Mayer e de Dragendorff, respectivamente. Após a agitação, o aparecimento de precipitado indica a presença de alcalóides.

### Saponinas: Formação de espuma

O tubo de ensaio contendo o extrato foi vigorosamente agitado por 2-3 minutos. A formação de espuma indica a presença de saponinas.

### Cumarinas: Reação do hidróxido de potássio

Com o auxílio de um capilar, foram aplicadas duas gotas do extrato em duas áreas em um papel de filtro. Sobre uma das manchas foi colocada uma gota da solução alcoólica de hidróxido de potássio 0,5 mol/L. Após a evaporação do solvente, as manchas foram expostas a luz UV 366 nm. A presença de fluorescência azul ou verde indica a presença de cumarinas.

### B – Cromatografia de camada delgada (CCD)

Os extratos e suas frações foram submetidos à análise por CCD, efetuada em cromatoplasmas de alumínio revestidas com sílica gel 60 F254 (Merck 1.05553). A fase móvel adequada para o bom desenvolvimento dos cromatogramas foi analisada conforme a escala de polaridade dos solventes. Em seguida, as placas foram observadas em luz UV (254 e 366 nm) e, posteriormente, reveladas com soluções reagentes específicas, conforme tabela 1.

---

**Tabela 1:** Reveladores específicos utilizados na cromatografia de camada delgada

<b>Solução Reveladora</b>	<b>Classes de substâncias</b>
<i>Ferricianeto de potássio e cloreto férrico</i>	Fenóis, Taninos e Flavonoides
<i>Anidrido acético e ácido sulfúrico</i>	Esteroides e Triterpenos
<i>Hidróxido de sódio em metanol 5%</i>	Cumarinas e Antracenosídeos
<i>Anisaldeído sulfúrico</i>	Terpenos

---

#### C- Determinação do teor de polifenóis totais

A concentração de polifenóis totais foi determinada pelo método colorimétrico descrito por Singleton et al. 1999 (92). Em balão volumétrico, foram adicionados 0,5 mL do extrato, 2,5 mL de reagente de Folin-Ciocalteu diluído (1:10) e 2,0 mL de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 4% (m/v). Após 2 h de incubação no escuro à temperatura ambiente, a absorbância foi medida em espectrofotômetro UV/VIS a 760 nm. O ensaio foi realizado em triplicata.

Os resultados do teor de compostos fenólicos totais foram expressos como equivalentes de catequina (mg de catequina/g), calculados por meio de uma curva construída com concentrações que variaram de 5 a 100 µg/mL.

---

#### D- Determinação do teor de flavonoides

A concentração de flavonoides no extrato foi realizada utilizando uma curva padrão de quercetina. Uma alíquota de 2 ml do extrato foi colocada em tubo de ensaio acrescida de 1 ml de solução de cloreto de alumínio em metanol 2,5%. Após repouso de 30 minutos, fez-se leitura a 425 nm em espectrofotômetro UV/visível para se obter a concentração de flavonoides (mg/mL). A análise foi feita em triplicata.

Os resultados do teor de flavonoides foram expressos como equivalentes de quercetina (mg de quercetina/g), calculados por meio de uma curva construída com concentrações que variaram de 5 a 100 µg/mL (93).

#### 4- Avaliação da atividade antioxidante *in vitro*

##### A – Método do DPPH

O potencial antioxidante dos extratos e das frações foi avaliado, utilizando o método fotocolorimétrico *in vitro* do DPPH (2,2-difenil-1-picrilidrazila), conforme Mensor (2001) (94). O DPPH é um radical livre estável à temperatura ambiente, com coloração roxa intensa. A ação antioxidante de um extrato pode ser visualizada pelo progressivo descoloramento da solução, ao final do qual a mesma torna-se amarelada.

As amostras foram preparadas em etanol nas concentrações de 0,25; 2,5; 25 e 250 µg/mL, com exceção das frações originadas a partir do fracionamento ácido-base que foram preparadas na concentração de 250 µg/mL. Foram adicionados 1mL de solução 0,3 mmol/L de DPPH em etanol a 2,5 mL das respectivas amostras de concentrações diferentes. Nos brancos, adiciona-se apenas 1 mL de etanol aos extratos diluídos nas mesmas concentrações das amostras (2,5 mL). O controle negativo foi preparado apenas com 1 mL da solução de DPPH e 2,5 mL de etanol.

---

Trinta minutos após a adição de DPPH, as absorvâncias foram determinadas em espectrofotômetro a 518 nm em triplicata e, os valores convertidos em atividade antioxidante percentual (AAO%), usando a seguinte fórmula (94):

$$AAO\% = 100 - \{[ABS_A - ABS_B) \times 100] / ABS_C\}, \text{ onde: } ABS_A = \text{absorvância da amostra, } ABS_B = \text{absorvância do branco, } ABS_C = \text{absorvância do controle.}$$

## B- Método de TBARS

A atividade antioxidante *in vitro* da fração terpeno (FrT) foi estimada pela inibição de formação de espécies reativas do ácido tiobarbitúrico (TBARS). As amostras foram preparadas nas concentrações de 1, 5, 10 e 200 µg/mL. Foram adicionados às estas diferentes concentrações das amostras, 2,5 mL de tampão fosfato 20 mmol/L (pH 7,4) com o homogenato de fígado e 100 µL de solução de sulfato ferroso, 100 µL de água oxigenada (0,4 mol/L) para induzir lipo-peroxidação. Os tubos foram levados ao banho – maria a 37°C por 30 minutos.

Após esse período, foram adicionados 1 mL de ácido tiobarbitúrico (TBA – 0,67%), 500 µL de ácido fosfórico (H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>), 10 µL de hidróxido de sódio (NaOH) e levado a aquecimento (100 °C), durante 10 minutos. Após arrefecimento, foram medidas as absorvâncias das amostras em espectrofotômetro (535 nm). Os resultados foram expressos em porcentagem de inibição do processo oxidativo (95).

## 5- Avaliação da atividade antioxidante *in vivo*

### A- Animais

Foram utilizados para os experimentos, 09 ratos *Wistar* machos com dois meses de idade, fornecidos pelo Biotério da UNIARARAS. Esses animais foram divididos em 03 grupos conforme descrito abaixo, mantidos em gaiolas durante todo o experimento, com acesso irrestrito a comida e água durante 14 dias. Os protocolos experimentais utilizados com os animais foram aprovados pelo Comitê de Ética e Pesquisa da Uniararas, sob parecer número 806/2006.

---

O Grupo I (controle) recebeu apenas ração e água durante o experimento; o Grupo II recebeu paracetamol (diluído em soro fisiológico) por 5 dias (50 mg/Kg) por via intraperitoneal e o Grupo III recebeu o extrato hidroalcoólico de *O. flexuosum* (EH), 100 mg/Kg, por gavagem por 7 dias e mais 5 dias, associado ao paracetamol (via intraperitoneal). Os animais foram pesados no início e no fim do experimento e realizou-se o monitoramento da ração e da água diariamente.

#### B- Coleta do Plasma

Os animais foram anestesiados via intraperitoneal com 2 mL de xilasina 2% (0,5 ml/Kg) e ketamina 10% (0,9 ml/Kg). Em seguida, realizou-se uma secção na cavidade torácica para a visualização do coração. Todo o sangue possível (aproximadamente 5 mL) foi coletado do ventrículo esquerdo, e transferido para tubos de ensaio. Logo após, foi centrifugado por 15 minutos a 2000 rpm para separação do plasma das células sanguíneas. O plasma foi retirado dos tubos, acondicionado em tubos ependorff que foram armazenados a -15°C para as análises posteriores.

#### C- Coleta do Fígado

Os fígados dos ratos foram retirados, congelados e armazenados a -15°C para análises posteriores. No momento da análise, o fígado (30 mg de tecido) foi homogeneizado em uma solução de tampão PBS a 4°C (tampão fosfato 0,05 mol/L, pH 7,4 e solução de cloreto de sódio 0,15 mol/L).

#### D- Parâmetros de avaliação da função hepática no plasma

##### Determinação de Uréia

O método utilizado foi o de Crocker modificado. Adicionou-se à amostra o reagente de cor (tiossemicarbazida 0,5% e diacetilmonoxima 2,5%) e o reagente ácido de uso. Levou-se ao banho-maria por 10 minutos e fez-se a leitura a 530 nm (96).

---

### Determinação das Transaminases: Alanina Aminotransferase (ALT) e Aspartato Aminotransferase (AST)

A determinação de transaminases foi realizada segundo o Método de Reitman e Frankel Modificado (96).

Para a transaminase alanina aminotransferase, adicionou-se 1 mL da solução do ácido alfa-cetoglutarico a 9 mL do ácido d-1-aspartico e obteve-se o substrato oxalacético. Pipetou-se 1 mL de substrato obtido anteriormente; transferiu-se para um tubo de ensaio; acrescentou-se 0,2 mL do soro em estudo e misturou-se. Incubou-se em banho-maria a 37°C por 60 minutos, juntou-se 1 mL de 2-4-dinitrofenil-hidrazina. Deixou-se em repouso a temperatura ambiente por 20 minutos e adicionou-se 10 mL de NaOH 0,4 mol/L. Deixou-se os tubos em repouso por 10 minutos à temperatura ambiente em fez-se a leitura em espectrofotômetro com comprimento de onda de 505 nm.

Para a aspartato aminotransferase, pipetou-se 9 mL da solução de d-1-alanina; transferiu-se para um tubo de ensaio; juntou-se 1 mL da solução do ácido alfa-cetoglutarico; obteve-se o substrato piruvico. Pipetou-se 1 mL do substrato obtido; transferiu-se para um tubo de ensaio; acrescentou-se 0,2 mL do soro em estudo e misturou-se. Incubou-se em banho-maria a 37°C por 60 minutos, juntou-se 1 mL de 2-4, dinitrofenil-hidrazina. Deixou-se em repouso à temperatura ambiente por 20 minutos. Adicionou-se 10 mL de NaOH 0,4 mol/L. Deixou-se os tubos em repouso por 10 minutos à temperatura ambiente e fez-se a leitura em espectrofotômetro, com comprimento de onda de 505 nm.

### Determinação de Fosfatase Alcalina

O doseamento da fosfatase alcalina foi realizado segundo Método de Bodansky-Gomori. Adicionou-se em tubo de ensaio 5 mL de substrato de glicerofosfato de sódio e levou-se ao banho-maria a 37°C, deixou-se por 5 minutos. Acrescentou-se 0,5 mL soro em estudo e levou-se ao banho-maria a 37°C por exatamente uma hora. Adicionou-se 4,5 mL da solução de tricloroacético a 10%; misturou-se e filtrou-se. Recolheu-se o filtrado e transferiu-se para tubo de ensaio; adicionou-se 2 mL da solução molibdicó-sulfúrica e 1 mL do reagente redutor. Reservou-se por 30 minutos e fez-se leitura em espectrofotômetro a 650 nm de comprimento de onda (96).

---

## E- Parâmetros de avaliação em homogenato de fígado

### Dosagem de Grupamentos Sulfidrilas Totais

Adicionou-se a 1 mL de meio constituído de Tris 0,25 mol/L e EDTA 20 mmol/L, pH 8,2, uma alíquota do homogenato (50 mL), mediu-se a absorbância a 412 nm (A1). Adicionou-se a essa mistura 20 mL de ácido 5-5'-ditio-bis(2-nitrobenzóico) (DTNB) 10 mM diluído em metanol. Após 15 minutos, fez-se a segunda leitura (A2). Para zerar o aparelho utilizou-se o meio de reação e como branco DTNB diluído no mesmo tampão (B). O procedimento foi realizado à temperatura ambiente. Os valores de grupamentos sulfidrilas totais foram calculados por mg de proteína, dosada pelo método de Bradford (97,98).

### Dosagem de TBARS

Utilizou-se o método de Yagi (1987) (99) modificado. Foram utilizados 100µL de homogenato de fígado diluídos em 4mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (0,04 mol/L), mais 1 mL de H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1%. A essa mistura foi adicionado 1mL da solução reagente de ácido tiobarbitúrico (ácido tiobarbitúrico 0,67% em ácido fosfórico 1%). Incubou-se a mistura final em banho maria (90°C) por 15 min. Após esfriamento em banho de gelo, efetuou-se a extração das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) com 2 mL de butanol, agitando-se vigorosamente e centrifugando-se por mais 15min à 500 x g. Finalmente, a medida da absorbância a 535 nm. Os valores de TBARS foram calculados por mg de proteína, dosada pelo método de Bradford.

## F- Análise estatística

Os resultados estão apresentados em gráficos feitos no programa Origin (1996) e foram analisados usando o método estatístico ANOVA, seguido de teste de Tukey, sendo considerado significante valores de  $p < 0,05$ .

---

## 6- Avaliação da atividade antiproliferativa

### A- Células

As linhagens celulares cedidas pelo National Cancer Institute (NCI), utilizadas na triagem da atividade antiproliferativa (tabela 2), foram cultivadas em 5 mL de meio de cultura RPMI-1640 (Gibco<sup>®</sup>) suplementado com 5% de soro fetal bovino inativado (SFB - Gibco<sup>®</sup>) a 37°C em atmosfera úmida com 5% CO<sub>2</sub>. Quando a monocamada celular atinge cerca de 80% de confluência, as linhagens foram repicadas sob condições estéreis. Rotineiramente dois frascos de cada linhagem celular são sempre mantidos em cultura.

**Tabela 2:** Linhagens celulares utilizadas nos ensaios antiproliferativos.

<b>Tipo celular</b>	<b>Nome</b>	<b>Tipo de cultura</b>
Leucemia	K-562	Suspensão
Pulmão	NCI-H460	Aderida
Mama	MCF-7	Aderida
Mama Resistente	NCI-ADR/ RES	Aderida
Melanoma	UACC-62	Aderida
Cólon	HT-29	Aderida
Próstata	PC-3	Aderida
Ovário	OVCAR-3	Aderida
Renal	786-O	Aderida

### B- Descongelamento e Congelamento celular

O criotubo que contém as células foi descongelado e seu conteúdo transferido para um tubo de centrífuga de 15 mL e seu volume completado para 10 mL com meio de cultura. A seguir é centrifugado a 2000 rpm, 4° C, 4 min formando, assim, um *pellet* de células. O sobrenadante é aspirado e o *pellet* ressuspensionado cuidadosamente, evitando a formação de grumos, com 5 mL de meio. O volume final foi transferido para um frasco de cultura de 25 cm e incubado à 37°C em atmosfera de 95% de CO<sub>2</sub> e 100% de umidade.

---

Para o congelamento, as células foram cultivadas em frascos de 75 cm<sup>2</sup>, para obtenção de uma quantidade elevada, pois o volume final da solução celular a ser congelado deve ser de 1x 10<sup>6</sup> cel/mL. Para células aderidas, após tripsinização, as células são ressuspensas em 10 mL de meio suplementado com 30% de SFB, procedido pela contagem do número de células em câmara de Neubauer. A seguir esse frasco foi centrifugado por 4 min a 4°C e 2000 rpm, o sobrenadante aspirado para adição de meio de cultura com 30% de SFB e 20% de glicerol em volume calculado para obtenção de uma concentração final de 1x 10<sup>6</sup> cel/mL. Em cada criotubo é colocado 1 mL desta solução celular e os criotubos são colocados na fase gasosa do nitrogênio líquido por 24 h, para depois serem imersos no nitrogênio líquido.

Para as células em suspensão, foi realizada a contagem do número de células em câmara de Neubauer, procedida por centrifugação a 2000 rpm, por 4 min a 4°C. O sobrenadante foi aspirado e adicionado meio de cultura com 30% de SFB e 20% de glicerol, para concentração final ser 1X 10<sup>6</sup> cel/mL. Um mililitro desta solução foi transferido para criotubos marcados e inseridos na fase gasosa do nitrogênio líquido por 24 h.

### C- Ensaio para a determinação da atividade antiproliferativa das amostras

Os extratos e as frações, após evaporação do solvente, foram diluídos em dimetilsulfóxido (DMSO) na concentração de 1g/mL. Para a adição na cultura de células, estas soluções foram diluídas pelo menos 400 vezes em RPMI/SFB/gentamicina.

Para o teste de atividade, foram plaqueados 100 µL de células em meio RPMI/SFB/gentamicina, nas suas respectivas densidades de inoculação, em placas de 96 compartimentos que a seguir foram incubadas por 24 horas a 37°C em atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> e ambiente úmido. Depois desse período de adaptação, uma placa controle foi fixada através da adição de ácido tricloroacético para determinação da quantidade de proteínas no momento da adição das drogas. Nas demais placas foram adicionadas os extratos nas concentrações de 0,25; 2,5; 25 e 250 µg/mL e incubadas por 48 horas. Após este período, as placas foram centrifugadas por 3 minutos a 2000 rpm, e fixadas com 50 µL de ácido tricloroacético a 50% (TCA) para as células aderidas e a 80% para as células em suspensão (leucemia). Para completar a fixação celular, as placas foram incubadas por 1 hora a 4°C e submetidas a quatro lavagens consecutivas com água destilada, para a remoção dos resíduos de TCA, meio, SFB e metabólitos secundários. Após a lavagem, as placas foram mantidas em temperatura ambiente até a secagem completa.

---

As placas foram então coradas pela adição de 50 µL do corante proteico sulforrodamina B (SRB) a 0,4 % (peso/volume), dissolvido em ácido acético a 1 %, e incubadas a 4 °C, durante 30 minutos. Após esse período, as placas foram lavadas por 4 vezes consecutivas com uma solução de ácido acético 1%. Após secagem à temperatura ambiente, o corante ligado às proteínas celulares, foi solubilizado com uma solução de Trizma Base na concentração de 10 µmol/L e pH 10,5 por 5 minutos em ultra-som. A leitura espectrofotométrica da absorbância foi realizada em 540 nm em um leitor de microplacas.

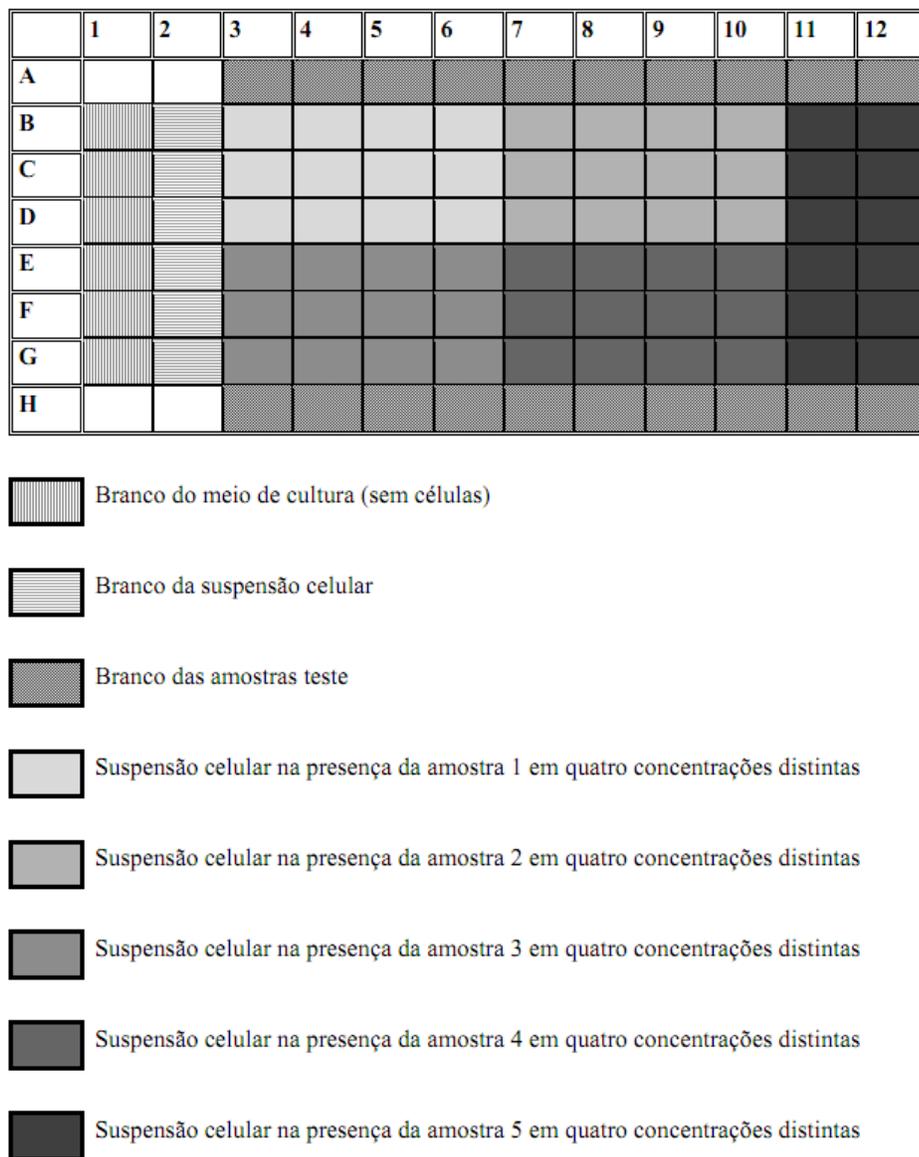
Para análise dos resultados, foram calculadas as médias das absorbâncias descontadas de seus respectivos brancos, e calculada a porcentagem de inibição de crescimento. Com esses valores, foram construídos gráficos relacionando a porcentagem de inibição de crescimento e a concentração do extrato. Como controle positivo, foi utilizado o quimioterápico doxorrubicina.

## **7- Estímulo do crescimento de fibroblastos *in vitro***

Este ensaio foi desenvolvido de acordo com Mensah *et al* (2001) (100) com pequenas modificações. Fibroblastos humanos, doados pela Allergisa Pesquisa Dermato-Cosmética Ltda, foram usados para este experimento. Inoculou-se 100 µL/compartimento de uma suspensão de fibroblastos (densidade de inoculação de  $1 \times 10^3$  cel/mL) em meio Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)/Soro Fetal Bovino (SFB) 10%, em placas de 96 compartimentos.

Foi preparada uma placa T<sub>0</sub> que foi avaliada pela técnica do MTT (Brometo de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazol) para quantificação das células presentes na placa teste no momento da inoculação das amostras. Após 24h de incubação (37°C, atmosfera úmida, 5% de CO<sub>2</sub>), todo o meio foi aspirado, foram adicionados 100 µL/compartimento de meio DMEM suplementado com 0,3% de SFB e as placas foram incubadas por 48h (37°C, atmosfera úmida, 5% de CO<sub>2</sub>). Ao final desse período, foram adicionados 100µL/compartimento das amostras, em quatro concentrações distintas (0,25; 2,5; 25 e 250 µg/mL), seguindo o modelo apresentado na Figura 8. O controle positivo foi alantoína, nas mesmas concentrações das amostras.

As placas foram então incubadas por 72h. Ao final desse período, todo o meio foi aspirado e substituído por meio DMEM/SFB 10%, e as células foram mantidas em estufa por 24h, antes da coloração com MTT (101). Para essa coloração, todo o meio foi aspirado e trocado por meio DMEM/SFB acrescido de MTT (0,5%). As placas foram incubadas por 4h (37°C, atmosfera úmida, 5% de CO<sub>2</sub>) protegidas da luz. Depois desse período, o meio foi trocado por dimetilsulfóxido e a leitura espectrofotométrica foi realizada a 570 nm.



**Figura 8:** Esquema da placa teste utilizada na avaliação do estímulo do crescimento de fibroblastos *in vitro*.

---

## 8- Análise estrutural e morfométrica do reparo tecidual

Estes testes foram realizados nos Laboratórios de Fisiologia e Micromorfologia do Centro Universitário Hermínio Ometto – Uniararas, sob a supervisão das Profa. Dra. Gláucia M. Tesch dos Santos, Profa. Dra. Fernanda Sampaio Mendonça e do Prof. Dr. Marcelo A. Marreto Esquissato.

### A- Procedimento cirúrgico e tratamento

Foram utilizados 36 ratos *Wistar* machos, pesando entre 250-300 g, obtidos no Centro Experimental Animal Prof. Dr. Luiz Edmundo de Magalhães - Uniararas. Estes foram divididos aleatoriamente em quatro grupos de nove animais cada, denominados grupos A (controle-salina 0,9%), B (Aplicação tópica do extrato de *O. flexuosum* – EH, 200 µL), C (Aplicação de Microcorrente (10 µA/2 min), D (Aplicação tópica do extrato de *O. flexuosum* - EH associada a aplicação de Microcorrente). Os animais foram alojados em gaiolas individuais, à temperatura constante ( $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$ ), sob ciclo claro/escuro 12:12 h, com livre acesso a água e alimento. Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa da Uniararas, protocolo número 806/2006 (102,103).

A tricotomia na região dorsal do animal foi realizada 48h antes da intervenção cirúrgica. Após a assepsia do local com diglucoanato de clorexidina a 0,4%, os animais foram submetidos a anestesia com cloridrato de xilazina (20 mg/kg) e hidrocloreto de ketamina (50 mg/Kg). Em seguida, foi realizada incisão longitudinal no dorso do animal com lâmina bisturi na direção crânio-caudal, conforme descrito por Mustoe et al. (104). As incisões dorsais medindo, em média, 1 cm<sup>2</sup> foram feitas em áreas previamente demarcadas com caneta dermatográfica e paquímetro.

Os tratamentos propostos foram iniciados 24 horas após a intervenção cirúrgica e foram continuados diariamente por 10 dias. Para a aplicação de microcorrente, utilizou-se um estimulador elétrico transcutâneo específico, Physiotonus microcurrent – BIOSET na intensidade de 10 µA por 2 minutos.

### B- Estudos histopatológicos

Um animal de cada grupo foi sacrificado no 2º, 6º e 10º dias, para remoção da área lesada e análise histopatológica. Para esta análise, as peças removidas dos animais imediatamente após o sacrifício foram fixadas em 20 volumes da solução-tampão

---

Milloning pH 7,4 contendo 4% de paraformaldeído por 24h a temperatura ambiente. Por fim, o material foi lavado em água destilada e tratado para embebição em Paraplast (Merck). Cortes longitudinais, com 7 µm de espessura, dos espécimes foram corados com hematoxilina e eosina (HE); Picrossirius-hematoxilina (SR) e azul de toluidina (AT) em tampão McIlvane pH 4,0. Os preparados foram documentados em Fotomicroscópio Zeiss-Jena (DHE/UNICAMP).

### **9- Atividade antiulcerogênica: Úlcera induzida por etanol**

Os animais foram adquiridos do Centro de Bioterismo da UNICAMP (CEMIB) e mantidos em câmaras com temperatura controlada ( $20\pm 2^\circ\text{C}$ ) em ciclos claro-escuro de 12 h, com água e ração *ad libitum*. Foram utilizados ratos *Wistar* machos, adultos (150-250 g), aclimatados as condições do laboratório por 7 dias, sendo agrupados ao acaso, em grupos de até 10 animais, submetidos a jejum de 12 horas. Os protocolos estão de acordo com o Princípio Ético Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação animal (COBEA).

Após um período de 12 horas em jejum, com acesso livre a água, os animais foram separados em 8 grupos de 5, onde cada grupo recebeu, por via oral, o tratamento correspondente, ou seja, solução salina 0,9% (10 mL/kg) como controle negativo, carbenoxolona (200 mg/kg), como controle positivo e o extrato hidroalcoólico de *O. flexuosum* (EH), nas doses de 200, 400 e 700 mg/Kg. Após 60 minutos dos tratamentos, foi realizada a administração oral de 1mL de etanol absoluto. Os animais foram sacrificados uma hora depois, por deslocamento cervical. Os estômagos foram retirados, abertos ao longo da maior curvatura e lavados em solução salina 0,9% para posterior contagem e avaliação das lesões ulcerativas. O índice de lesões ulcerativas (ILU) foi calculado, para cada um dos animais, por meio da somatória dos parâmetros, de acordo com o esquema (Tabela 3).

---

**Tabela 3:** Avaliação das lesões ulcerativas em estômago.

Tipo de Lesão	Pontuação	
Perda de pregas da mucosa	um ponto	
Descoloração da mucosa	um ponto	
Edema	um ponto	
Hemorragias	um ponto	
Petéquias	até 10 petéquias mais de 10 petéquias	dois pontos três pontos
Úlceras até um milímetro	*n x dois pontos	
Úlceras maiores que um milímetro	*n x três pontos	
Úlceras perfuradas	*n x quatro pontos	

\*n refere-se ao número de lesões observadas.

Para a determinação da porcentagem de inibição do índice de lesões ulcerativas apresentados pelos grupos tratados em relação ao grupo controle foi utilizada a seguinte fórmula:

$$\frac{\text{ILU médio controle} - \text{ILU médio tratado}}{\text{ILU médio controle}} \times 100$$

#### A- Determinação da dose efetiva 50 (DE50)

A dose efetiva 50 (DE50) do extrato de *O. flexuosum* foi determinada a partir de uma curva dose versus resposta. Esta foi obtida a partir do modelo de úlcera induzida por etanol nas concentrações de 200, 400 e 700 mg/Kg.

#### B- Análise estatística

Todos os resultados foram submetidos a análise de variância de uma única via (ANOVA), considerando-se como nível crítico  $p < 0,05$  para que fosse considerada diferença significativa entre os grupos controle e tratados, seguida do Teste de Duncan, considerando-se o mesmo nível crítico.

---

## 10- Atividade antimicrobiana

Estes testes foram realizados no Laboratório de Microbiologia do Centro Universitário Hermínio Ometto – Uniararas, sob a supervisão da Profa. Dra. Ana Laura Remédio Zeni Beretta.

### A- Banco de micro-organismos

Os micro-organismos para o desenvolvimento deste bioensaio experimental usando testes microbiológicos *in vitro* foram *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Staphylococcus aureus resistente à oxacilina* (ATCC 33591) cedida de lesão de paciente com infecção hospitalar, *Staphylococcus saprophyticus* (ATCC 15305), *Pseudomonas aeruginosas* (ATCC 27853) e leveduras como a *Candida albicans* (ATCC 10231), *Candida tropicalis* (ATCC 13803) e *Candida krusei* (ATCC 14243).

Todos os microrganismos citados foram fornecidos pelo laboratório de Microbiologia do Centro Universitário Hermínio Ometto – UNIARARAS. As cepas utilizadas fazem parte do banco estoque de cepas padronizadas de microrganismos (ATCC). Estas foram reativadas partindo de meios de cultivo conforme orientação do fornecedor.

### B- Padronização dos inóculos bacterianos

Para a padronização da técnica e dimensionamento do inóculo, duas alçadas de cada cepa estudada, foram inoculadas em 5,0 mL do meio de cultura líquido (Brain Heart Infusion - BHI) mantidos em seus respectivos tubos de ensaio e incubados a 37° C por 18 a 24 horas. Todos os tubos foram numerados para a identificação de cada uma das suspensões. Após a incubação, emulsionaram os inóculos em solução salina estéril, sendo a turvação ajustada à escala nº 5 de McFarland ( $15 \times 10^8$  bactérias) expressas em número de bactérias/mL de cultura, (0,5 mL de  $\text{BaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0,048 mol/L – 1,75% p/v em 99,5 mL de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  0,36 mol/L – 1% v/v). As inoculações foram realizadas com auxílio de *swab* estéril. Este procedimento foi realizado no interior da câmara de fluxo laminar.

---

### C- Padronização dos inóculos de leveduras

Para o isolamento e identificação de leveduras, todas as cepas foram semeadas em placas de Petri, contendo o meio Sabouraud Dextrose Agar (SDA) adicionado de 0,1 mg/mL de cloranfenicol e incubadas 35°C por período de 5 dias. Após a incubação, emulsionaram os inóculos em água destilada estéril ou solução salina estéril, sendo a turvação ajustada à escala nº 5 de McFarland ( $15 \times 10^8$  bactérias) expressas em número de bactérias/mL de cultura, (0,5 mL de  $\text{BaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0,048 mol/L – 1,75% p/v em 99,5 mL de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  0,36 mol/L – 1% v/v). Todas as técnicas foram realizadas dentro da câmara de fluxo laminar, para que tenha um menor risco de contaminação.

### D- Determinação da atividade antibacteriana e antifúngica do EH e da FrT

Para a avaliação destas atividades foi utilizado o método de difusão em Agar pelo sistema de disco (método de Kirby e Bauer). O meio de cultura Müller Hinton estéril, preparado de acordo com o fabricante, foi adicionado nas placas de Petri e após solidificação, as bactérias do estudo foram inoculadas.

O extrato EH foi utilizado nas concentrações de 10 e 50 mg/mL e a fração terpeno (FrT) na concentração de 10mg/mL preparados em DMSO.

Pipetou-se 0,1mL da suspensão microbiana, e espalhou-se por toda placa de petri, contendo meio de cultura específico com a alça de Drigalsk. Com o auxílio de uma pinça colocou-se na placa os discos já embebecidos com cada diluição do EH e da FrT e levou-se à estufa bacteriológica a 37°C, por 24 horas.

O controle positivo foi feito a partir da sementeação da suspensão microbiana em placa de petri e colocaram-se os discos de gentamicina e penicilina, para o ensaio antibacteriano ou os discos de Fluconazol (30 mg/mL), para os ensaios antifúngicos. Levou-se à estufa a 37°C por 24 horas. O controle negativo foi realizado em discos com DMSO (105).

---

## 11- Análises dos danos oxidativos e histopatológicas

Estes testes foram realizados no Laboratório de Micromorfologia do Centro Universitário Hermínio Ometto – Uniararas, sob a supervisão da Profa. Dra. Grasiela Severi Dias Aguiar.

Os tratamentos foram realizados por gavagem em 40 ratos machos *Wistar* com peso inicial em torno de 180g, que permaneceram por todo o período experimental no Centro de Experimentação Animal do Centro Universitário Hermínio Ometto - Uniararas, à temperatura de 25° C e umidade do ar a 60%, em ciclo claro e escuro de 12 horas e receberam água e ração purina *ad libitum*.

Os animais foram divididos em quatro grupos de 10 animais cada: G1 (Controle – água), G2 (EH, 100 mg/kg/dia), G3 (EH, 250 mg/kg/dia) e G4 (EH 500 mg/kg/dia).

Todos os animais iniciaram o tratamento no mesmo dia, mas 05 de cada grupo foram sacrificados após 15 dias e os outros cinco, de cada grupo, foram sacrificados após 30 dias. Decorrido o período de tratamento, os animais receberam, por via intraperitoneal, xilasina 2% (0,5 ml/kg) e ketamina 10% (0,9 ml/kg). Foi realizada laparotomia medial, rebatendo-se a arcada dorsal e realizada punção cardíaca. Os fígados foram retirados e seccionados, sendo um fragmento coletado para a avaliação histopatológica e outra parte para a avaliação dos danos oxidativos e dos danos causados às mitocôndrias hepáticas.

### A- Avaliação da Função Hepática

#### Avaliação da atividade da alanina aminotransferase (ALT)

A ALT catalisa a transferência do grupo amina da alanina para o cetogluturato com formação de glutamato e piruvato. O piruvato é reduzido a lactato por ação da lactato desidrogenase (LDH), enquanto que a coenzima NADH é oxidada a NAD<sup>+</sup>. A dosagem da atividade desta enzima foi feita através do uso de um kit enzimático ALT–Synermed. O soro (100 µl) foi adicionado a uma cubeta contendo 1,0 mL do reativo de trabalho. Leu-se a absorbância em espectrofotômetro, minuto a minuto, por 4 minutos. A atividade enzimática da ALT na amostra é calculada com base na redução da absorbância em 340 nm, quando o

---

NADH se transforma em NAD<sup>+</sup> (106).

## B- Avaliação dos Danos Oxidativos no Tecido Hepático

### Estimativa dos níveis de GSH hepática

Os níveis de glutathiona reduzida (GSH) foram medidos utilizando tecido hepático homogeneizado em tampão fosfato 0.1 mol/L, pH 7.4 de acordo com o método descrito por Ellman (1959) (107). Adicionou 1mg de proteína da amostra em um tubo contendo 1 mL de tampão Tris-HCL 25 mM com EDTA 20 mM, pH 8,2. Após 10 minutos de repouso, adicionou-se o reagente de Ellman (20 µL de DTNB 10 mmol/L preparado em tampão fosfato com 1% de citrato de sódio). A absorbância foi medida imediatamente e após 15 minutos de reação, em 412 nm (108).

### Avaliação da Atividade da Catalase

A atividade da catalase foi medida de acordo com o método de Bergneyer (1974) (109). O homogenato (0,1 mg de proteína) foi adicionado a uma cubeta de quartzo, contendo 3mL de tampão fosfato 50 mmol/L, pH 7,0. A reação foi iniciada pela adição de 50 µL de peróxido de hidrogênio 30 mmol/L. A velocidade de decomposição do peróxido de hidrogênio foi medida espectrofotometricamente através da variação da absorbância em 240 nm por 3 minutos. A atividade foi expressa em unidades de absorbância/mg de proteína.

### Determinação da lipoperoxidação

A avaliação de malondialdeído (MDA), uma das principais espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARs), foi feita misturando-se 5,0 mg de proteína em 1,0 mL de água destilada, 1,0 mL de ácido tiobarbitúrico (TBA) 1%, 10 µL de NaOH 10 mol/L e 0,5 mL de ácido fosfórico 20%, adicionados nessa ordem e sempre com agitação. A mistura foi aquecida em banho-maria com água fervente por 20 minutos e resfriada. Em seguida, adicionou-se 3,0 mL de n-butanol e agitou vigorosamente a mistura. A fase orgânica foi separada por centrifugação e a sua absorbância lida em 535 nm (110).

---

## C- Avaliação dos Danos Causados às Mitocôndrias Hepáticas

### Isolamento de mitocôndrias de fígado de rato

Após o sacrifício o fígado que foi separado para a avaliação dos danos causados às mitocôndrias foi lavado em um meio contendo sacarose 250 mmol/L, HEPES 10 mmol/L e EGTA 1 mmol/L pH 7,2-7,3, fragmentado e homogeneizado em um Potter-Elvehjem. O homogenato foi centrifugado a 2500 rpm, por 10 minutos. O sobrenadante foi centrifugado a 8000 rpm por 10 minutos. O precipitado foi ressuspensionado com o meio contendo sacarose 250 mmol/L, HEPES 10 mmol/L e EGTA 0,3 mmol/L, pH 7,2-7,3, e centrifugado novamente a 8000 rpm por 10 minutos. A fração mitocondrial foi ressuspensa com um meio contendo sacarose 125 mmol/L e Hepes-KOH 10 mmol/L, pH 7,2-7,3 Todos os procedimentos foram realizados a 4° C (111, 112).

### Avaliação do inchamento mitocondrial (*Swelling*)

O *pellet* contendo a fração mitocondrial (0,5 mg de proteína) foi adicionada em 3 mL do meio contendo sacarose 125 mmol/L e Hepes 10 mmol/L, pH 7,2-7,3. A absorbância do meio foi monitorada cineticamente por 15 minutos, em 540 nm sendo que após 1 minuto adicionou-se 40 µL de CaCl<sub>2</sub> e 40 µL de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>. O inchamento mitocondrial é proporcional à taxa de queda da absorbância do meio, após a adição do cálcio e do fosfato (111).

## D- Avaliação histopatológica

Após laparotomia medial, os fragmentos separados para a histologia foram banhados na solução fixadora de formol a 10% em tampão Millonig pH 7,4 durante 24h à temperatura ambiente e lavadas em álcool 70%, durante 12h. Em seguida, os fragmentos foram desidratados e diafanizados gradativamente em banhos de álcool, começando com 80% (uma vez de 50 minutos), depois 95% (uma vez de 50 minutos) até chegar ao álcool absoluto 100% (três vezes de 50 minutos cada - álcool absoluto I, álcool absoluto II e álcool absoluto III). Após a série de banhos, os cortes foram tratados com xilol, para que a amostra do tecido se tornasse translúcida (álcool/xilol 1:1 por 50 minutos e depois xilol por mais 50 minutos). Terminado o banho com xilol os fragmentos foram levados para a estufa

---

a 60°C e colocados em parafina líquida, em dois banhos de 50 minutos cada um. O fragmento impregnado com a parafina foi incluído em barquinhos de papel contendo parafina líquida. Após a solidificação, os fragmentos foram colocados em bloquinhos de madeira e identificados. Depois destes procedimentos, os fragmentos foram cortados por microtomia em secções de 5µm de espessura, sendo as fitas obtidas transferidas para o banho-maria a 45°C. Os cortes foram distendidos na superfície da água e depois dispostos em lâminas. As lâminas que continham uma fina camada de albumina (clara de ovo mais cristais de timol) servindo como um adesivo, evitando assim que o material solte durante o processo de coloração, foram levadas pra uma estufa de secagem (40-50°C), onde permaneceram até a hora da coloração (no mínimo 24 horas).

Antes da coloração, os fragmentos foram desparafinizados, sendo colocados em banho de xilol (duas vezes de 10 minutos cada) e hidratados com banho decrescente de álcool, começando com o álcool absoluto 100%, 90% e 70 % e depois lavado por três vezes com água corrente.

#### Coloração com hematoxilina – eosina (H/E)

As lâminas depois de desparafinizadas e hidratadas, foram então coradas com hematoxilina de Mayer por 15 minutos. Após esse tempo, elas foram lavadas 3 vezes com água onde repousaram por 15 minutos para retirar o excesso do corante. Depois foi colocado álcool 80% por 2 minutos. Posteriormente, elas foram contra-coradas com eosina-floxina por 30 segundos. Passou em seguida para a desidratação em três banhos de álcool absoluto, diafanização em xilol e montagem em bálsamo do Canadá.

#### Coloração com Periodic Acid Schiff (PAS)

Após a desparafinização e a hidratação, as lâminas foram colocadas no ácido periódico por 15 minutos e lavadas três vezes em água. Colocou o reativo de Schiff de 5 a 10 minutos, até os fragmentos obterem coloração rósea, e lavou novamente. Adicionou por 5 minutos a hematoxilina de Mayer e depois de três lavagens em água foram desidratadas, diafanizadas e montadas em bálsamo do Canadá.

---

### Coloração com Tricromo Mallory

Depois da desparafinizados e hidratados, os fragmentos foram colocados por 3 minutos em água destilada, após este tempo colocou na solução A (fucsina ácida 0,5%) por 5 minutos, depois passou diretamente para a solução B (azul de anilina, laranja G e ácido fosfotúngstico) por 15 minutos, em seguida passou para a desidratação em 3 banhos de alcoóis absoluto, diafanização e montagem em bálsamo do Canadá.

### Coloração com Azul de Bromofenol 0,1%

Após a desparafinização e a hidratação, os fragmentos foram corados em azul de bromofenol 0,1% por 5 minutos, passados diretamente para álcool etílico 95%, e em seguida desidratados em banhos de álcool absoluto, diafanizados e montados em bálsamo do Canadá.

As lâminas preparadas foram observadas e os achados fotodocumentados no Microscópio Leica DM2000 do Laboratório de Micromorfologia do Centro Universitário Hermínio Ometto. Foram obtidas fotos nas resoluções de 400x e 1000x. Foi padronizado que as imagens seriam obtidas de regiões próximas a veia centro-lobular.

### E - Análise estatística

Todos os resultados obtidos foram analisados estatisticamente com o auxílio do programa PRISM 3.0, tabulados e submetidos ao teste ANOVA com pós-teste Tukey para comparação dos grupos tratados com o controle, e entre si. Foram considerados significantes os resultados com  $p < 0,05$ .



# *Resultados*

---

## RESULTADOS

### 1- Estudo fitoquímico das folhas de *Oncidium flexuosum*: Preparação dos extratos e das frações

O procedimento utilizado para a extração, conforme descrito na seção de Material e Métodos, item 1A, resultou na obtenção do extrato hidroalcoólico (EH) de cor verde-acastanhado.

Através do tratamento enzimático, foi obtido o extrato bruto (EBZ) de cor castanho-avermelhada. A extração com o solvente diclorometano resultou no extrato ED com cor castanho-escura. E a fração terpeno (FrT) apresentou cor amarela.

O fracionamento ácido-base resultou nas frações aquosa, aquosa básica, acetato, acetato ácida e acetato básica cujas colorações foram respectivamente, castanho claro, castanho, verde intenso, verde-acastanhado e verde.

Os rendimentos obtidos estão descritos na tabela 4.

**Tabela 4:** Rendimentos dos extratos das folhas de *O. flexuosum* Sims. e das frações.

<i>Extrato ou Fração</i>	<i>Material vegetal (g)</i>	<i>Rendimentos (g - %)</i>
Extrato hidroalcoólico (EH)	50*	4,2 – 8,4
Extrato bruto enzimático (EBZ)	10*	0,72 – 7,2
Extrato diclorometano (ED)	50*	2,7 – 5,4
Fração terpeno	1*	0,12 – 12
Fração Aquosa	10*	1,86 – 18,6
Fração Aquosa Básica	10*	1,36 – 13,6
Fração Acetato	10*	1,27 – 12,7
Fração Acetato Ácida	10*	0,78 – 7,8
Fração Acetato Básica	10*	0,32 – 3,2

\* Extrato obtido a partir das folhas de *O. flexuosum* Sims.

\* Fração obtida a partir do EH.

---

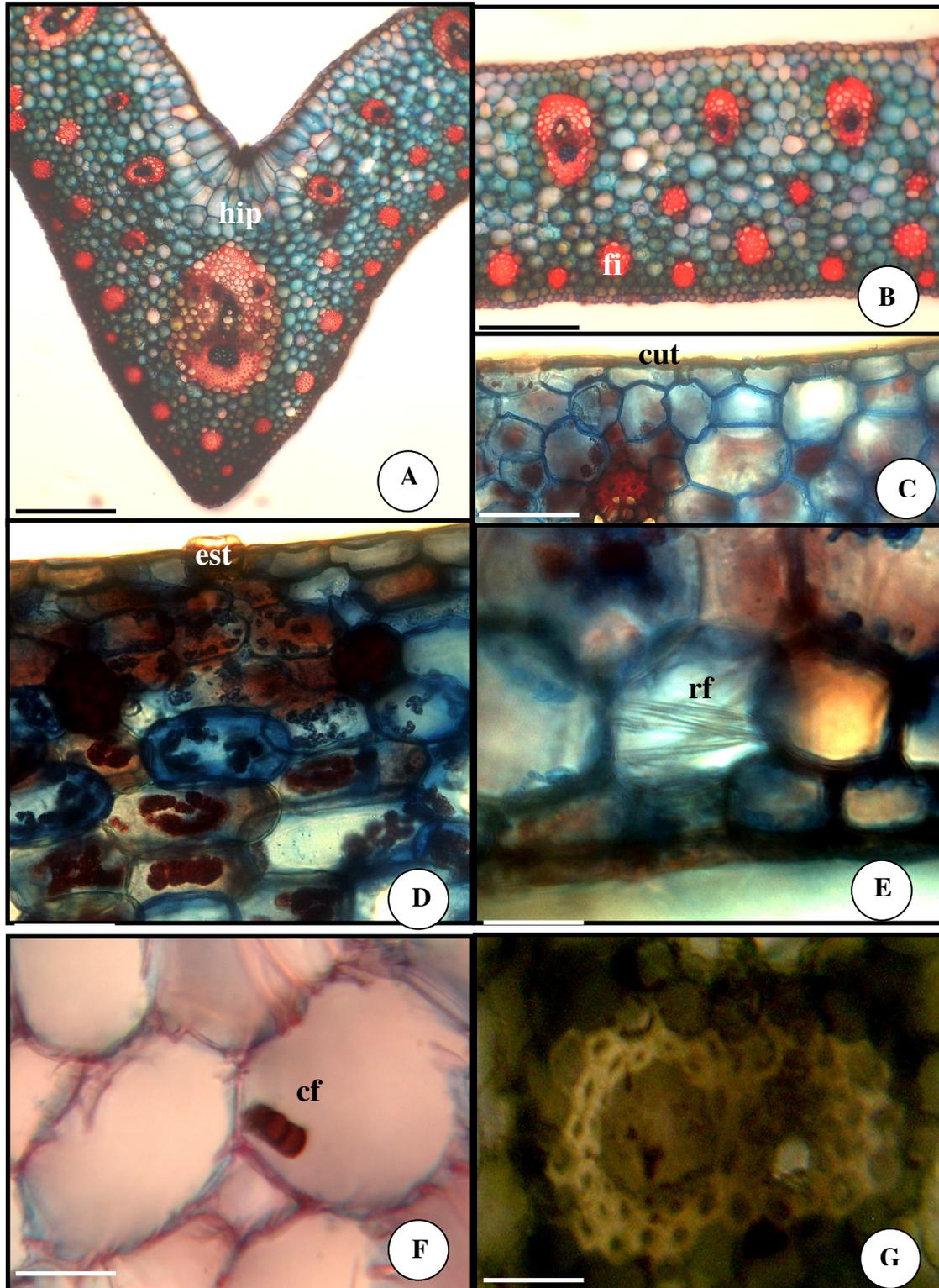
## 2- Histoquímica das folhas de *O. flexuosum*

Na figura 9 observam-se cortes transversais da região mediana de folhas adultas de *O. flexuosum*. Na face adaxial das folhas nota-se, 1-2 camadas subepidérmicas de células aclorofiladas e maiores que as demais do mesofilo, formando uma hipoderme (Figura 9A). O mesofilo apresenta-se homogêneo e estreito apresentando em torno de 10-13 camadas celulares e não se encontra diferenciado em parênquima paliçádico e lacunoso, sendo formado por células arredondadas (Figura 9B). As folhas são recobertas por uma cutícula contínua que se apresenta delgada (3-6  $\mu\text{m}$ ) (Figura 9C).

As células epidérmicas, de tamanho similar em ambas às faces foliares (Figura 9B), apresentam-se arredondadas, retangulares, elípticas ou poligonais, em corte transversal. Os estômatos estão presentes unicamente na superfície abaxial, ocorrendo em nível superior em relação às demais células epidérmicas e apresentam conspícuo espessamento parietal, na região de contato entre as células guardas, conferindo um aspecto triangular ao lúmen (Figura 9D).

Na figura 9B, notam-se feixes vasculares maiores e menores intercalados. Os feixes vasculares são colaterais e possuem calotas de células pericíclicas esclerificadas, adjacentes ao floema e xilema; tantos os de maior calibre quanto os de menor apresentam-se completamente envolvido por células esclerificadas do periciclo (Figuras 9A e B). A nervura central é formada por um único feixe colateral deslocado abaxialmente e circundado por células esclerificadas (Figura 9A).

Grupos de fibras, não associados aos feixes vasculares, aparecem tanto medialmente no mesofilo quanto próximos à superfície abaxial. Também no mesofilo observam-se idioblastos com ráfides e cristais flavonoídicos (Figura 9E e F), também ocorre presença de tanino ao redor dos feixes vasculares (coloração marron-esverdeada) (Figura 9G).



**Figura 9:** Anatomia foliar de *O. flexuosum*. Cortes transversais evidenciando nervura central (A), limbo foliar homogêneo (B), epiderme adaxial (C), estômato (D), cristais de oxalato de cálcio (E), cristal flavoídico (F), presença de tanino ao redor de feixe condutor (coloração marron-esverdeada) (G). cf = cristal flavonoídico; cut = cutícula; est = estômato; fi = fibra esclerenquimática; hip = hipoderme. Bars: A-B = 100 $\mu$ m; C = 50 $\mu$ m; D-G = 10 $\mu$ m.

### Resultados

---

### 3- Estudo farmacognóstico

#### A – Triagem fitoquímica preliminar

As principais classes de substâncias químicas encontradas no EH foram os polifenóis, entre eles os flavonoides, os taninos e as cumarinas. Porém, não foram detectadas a presença de alcaloides e saponinas (Tabela 5).

**Tabela 5:** Triagem fitoquímica preliminar: principais classes de substâncias do extrato hidroalcoólico das folhas de *O. flexuosum* Sims..

<i>Testes</i>	<i>Classes de substâncias</i>	<i>Resultados</i>
Cloreto férrico	Fenólicas e taninos	+
Shinoda	Flavonoides	+
Ácido sulfúrico	Flavonoides	+
Cloreto de alumínio	Flavonoides	+
Stiasny	Taninos condensados	-
Acetato ácido de chumbo	Taninos hidrolisáveis	+
Mayer	Alcaloides	-
Dragendorff	Alcaloides	-
Formação de espuma	Saponinas	-
Hidróxido de potássio	Cumarinas	+

(+) positivo, (-) negativo.

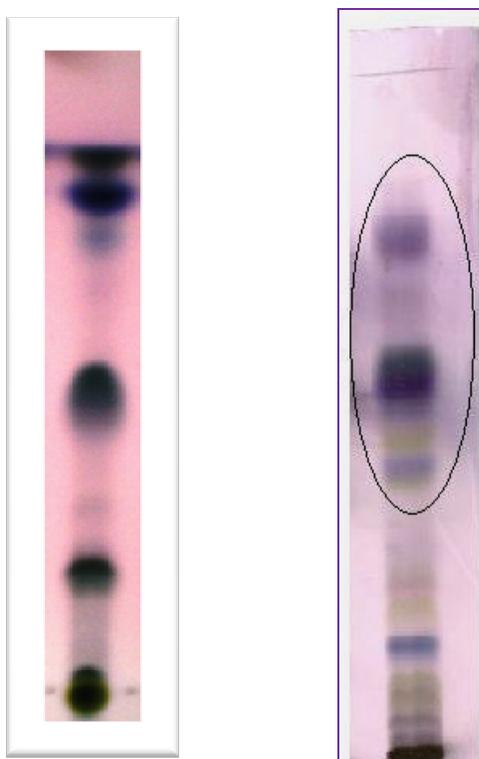
#### B – Cromatografia de camada delgada (CCD)

O melhor sistema solvente para o desenvolvimento cromatográfico do EH e suas frações e também para a FrT foi o clorofórmio:metanol 2% e para o ED foi o hexano:acetato de etila 20% (Figuras 10 e 11).

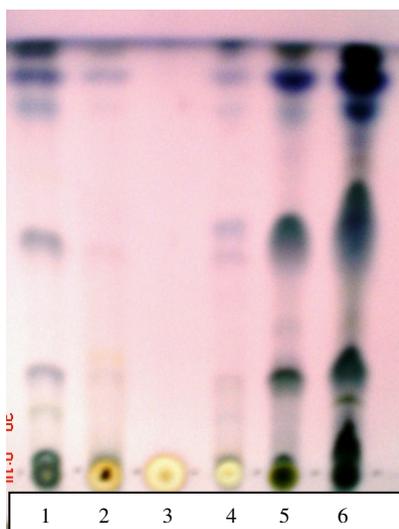
---

A observação dos cromatogramas em luz ultravioleta permitiu a detecção dos flavonoides. Após a revelação das placas cromatográficas com os reagentes específicos foi possível observar as presenças de polifenóis, esteróides e triterpenos.

O perfil cromatográfico do EH foi analisado a partir da placa revelada com a solução de anisaldeído, sendo que foram observados os valores de Rf dos principais componentes visualizados e as suas respectivas colorações (Tabela 6).



**Figura 10:** Cromatoplasas do extrato hidroalcolóico (EH) e diclorometano (ED) de *Oncidium flexuosum*. Eluente EH = Clorofórmio:Metanol (98:2 v/v). Eluente ED = Hexano:Acetato de etila (80:20 v/v). Revelador = Anisaldeído.



**Figura 11:** Cromatoplasas do extrato hidroalcoólico (EH) e suas frações. Eluente = Clorofórmio:Metanol (98:2 v/v). Revelador = Anisaldeído. (1=EH; 2=Fração aquosa básica; 3=Fração aquosa; 4=Fração acetato básica; 5=Fração acetato ácida; 6=Fração acetato).

**Tabela 6:** Perfil cromatográfico do extrato hidroalcoólico de *O. flexuosum* (EH) revelado com solução de anisaldeído (Figura 9) LF=10 cm.

<i>Manchas</i>	<i>Rf</i>	<i>Coloração</i>
A	0,0	Verde-amarelado
B	0,05	Verde escuro
C	0,23	Castanho escuro
D	0,35	Rosa
E	0,55	Lilás
F	0,57	Roxo
G	0,80	Azul
H	0,84	Azul escuro
I	0,89	Verde escuro

LF = Linha de frente.

---

#### C- Determinação do teor de polifenóis totais

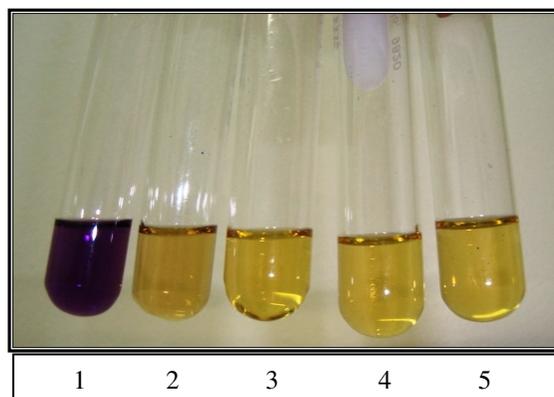
A concentração de polifenóis totais encontrada no EH foi de 12,26  $\mu\text{g/mL}$ .

#### D- Determinação do teor de flavonoides

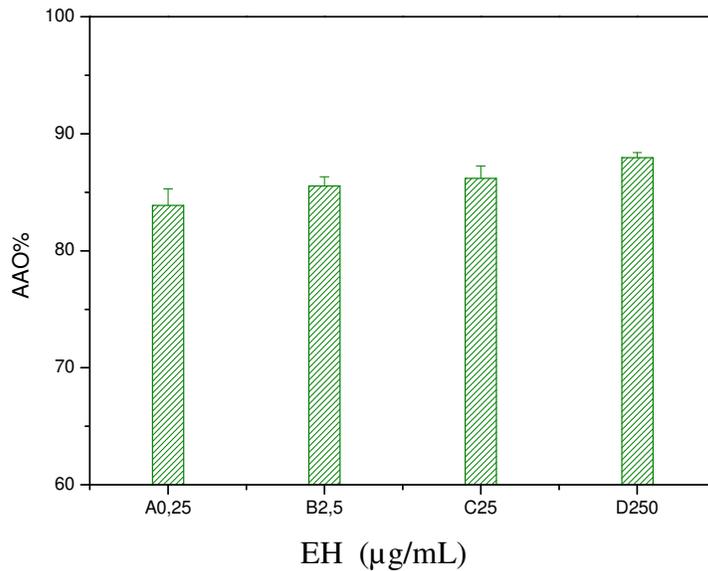
A concentração de flavonoides presentes no EH foi de 10,11  $\mu\text{g/mL}$ .

#### 4- Avaliação da atividade antioxidante *in vitro*

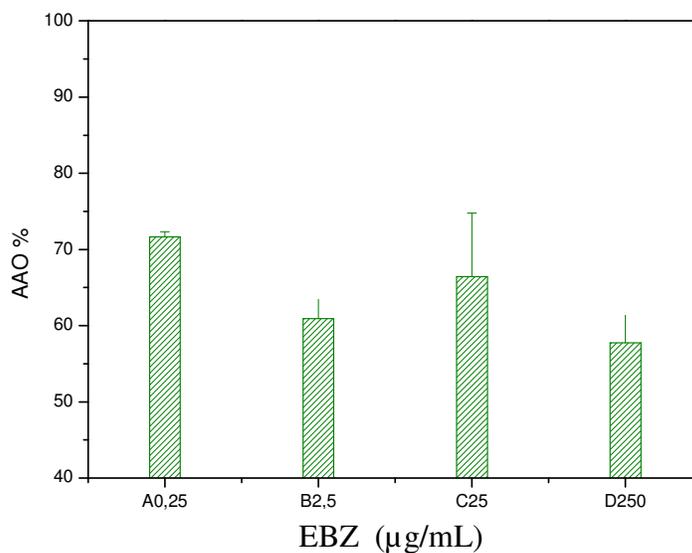
O teste de DPPH demonstrou que o extrato hidroalcoólico de *O. flexuosum* (EH) possui atividade antioxidante (Figuras 12 e 13). O extrato EBZ possui atividade antioxidante menor que o EH e a fração FrT apresentou a menor atividade (Figuras 14 e 15).



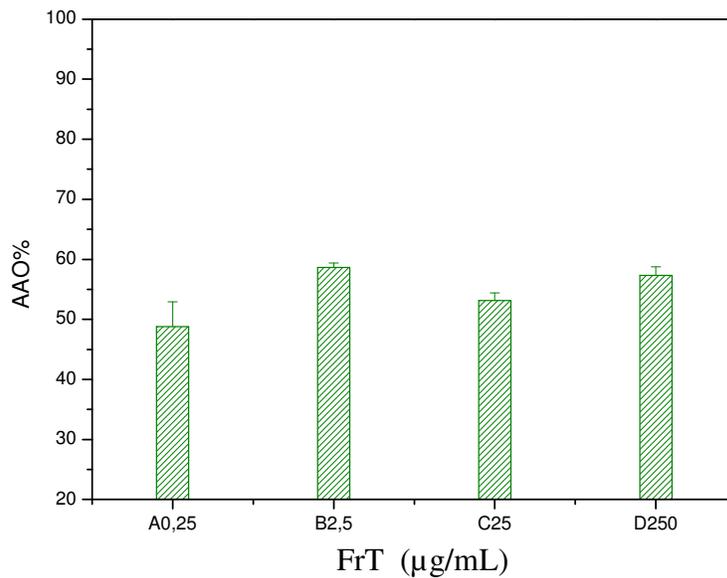
**Figura 12.** Efeito Antioxidante do extrato hidroalcoólico (EH) de *O. flexuosum* no ensaio do DPPH. 1 = Controle DPPH, 2 = EH 0,25  $\mu\text{g/mL}$ ; 3 = 2,5  $\mu\text{g/mL}$ ; 4 = 25  $\mu\text{g/mL}$  e 5 = 250  $\mu\text{g/mL}$ .



**Figura 13:** Gráfico da porcentagem de inibição do radical DPPH pelo extrato hidroalcoólico das folhas de *O. flexuosum* (EH) nas concentrações de 0,25; 2,5; 25 e 250 µg/mL (Média ± Desvio Padrão).

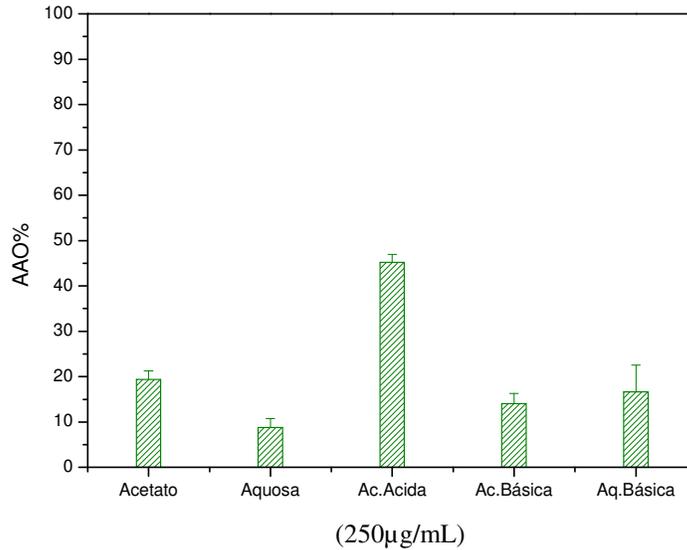


**Figura 14:** Gráfico da porcentagem de inibição do radical DPPH pelo extrato hidroalcoólico das folhas de *O. flexuosum* com tratamento enzimático (EBZ) nas concentrações de 0,25; 2,5; 25 e 250 µg/mL (Média ± Desvio Padrão).



**Figura 15:** Gráfico da porcentagem de inibição do radical DPPH pela fração terpeno (FrT) nas concentrações de 0,25; 2,5; 25 e 250 µg/mL. (Média ± Desvio Padrão).

A partir do potencial antioxidante do EH observado, foi realizado o fracionamento por partição ácido-base descrito no item 1-B de materiais e métodos, sendo observado que todas as frações apresentaram atividade antioxidante menor do que esta atividade apresentada pelo EH. Entre as frações, a fração acetato ácida apresentou o maior potencial antioxidante (Figura 16).



**Figura 16:** Gráfico da porcentagem de inibição do radical DPPH pelas frações obtidas a partir do extrato hidroalcoólico das folhas de *O. flexuosum* na concentração de 250 µg/mL (Média ± Desvio Padrão).

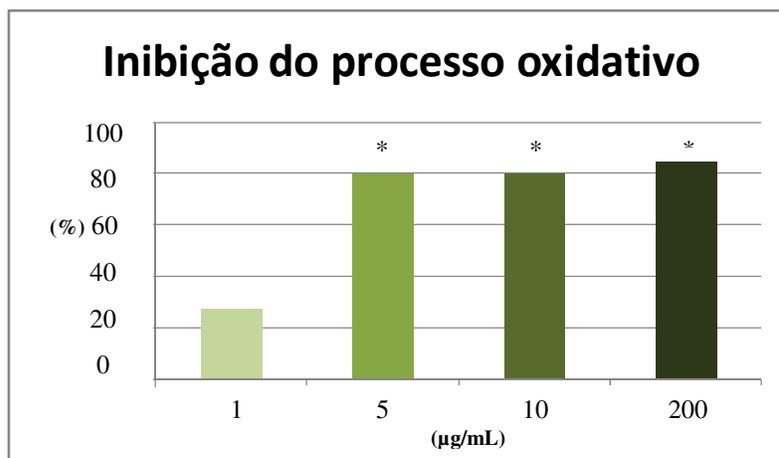
Ao ser testada, através do método de TBARS, a FrT apresentou ação antioxidante significativa. Na tabela 7, observa-se a porcentagem de inibição da oxidação.

**Tabela 7:** Diferentes concentrações da fração terpeno (FrT) e respectivos resultados obtidos pelo Método de TBARS.

<i>Volume</i>	<i>Abs</i>	<i>% MDA formado</i>	<i>% Inibição da oxidação</i>
<b>Controle</b>	<b>1,10</b>	<b>100</b>	<b>0</b>
<b>1 µg/mL</b>	<b>0,80</b>	<b>72,73</b>	<b>27,27</b>
<b>5 µg/mL</b>	<b>0,22</b>	<b>20,00</b>	<b>80,00</b>
<b>10 µg/mL</b>	<b>0,23</b>	<b>20,91</b>	<b>79,09</b>
<b>200 µg/mL</b>	<b>0,17</b>	<b>15,45</b>	<b>84,55</b>

---

Na figura 17, observa-se a inibição causada no processo de oxidação, em relação às diferentes concentrações utilizadas de FrT. Nota-se que na concentração de 5 µg/mL há uma inibição do processo oxidativo de 80%, mantendo-se nessa faixa até a concentração de 200 µg/mL.



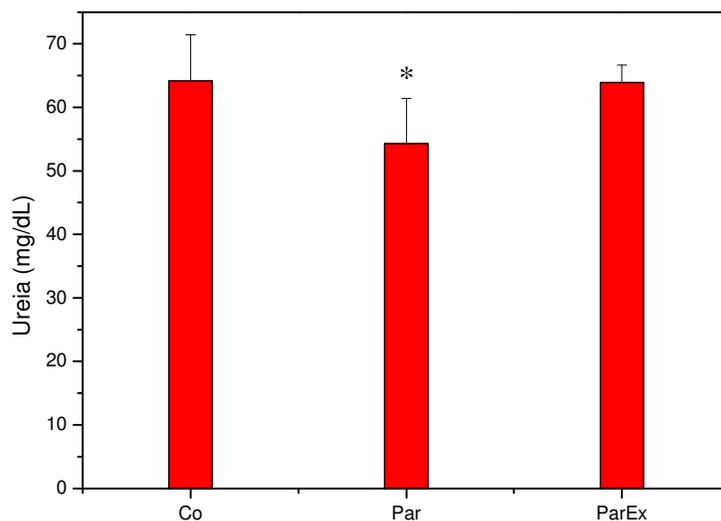
**Figura 17:** Gráfico da inibição do processo oxidativo pela fração terpeno (FrT) pelo Método de TBARs (Média ± DP). \* =  $p < 0,001$ .

## 5- Avaliação da atividade antioxidante *in vivo*

### A - Parâmetros de avaliação da função hepática no plasma

#### Uréia

Observa-se na Figura 18 uma queda na produção de uréia nos animais tratados com paracetamol (Par) e, em contrapartida os animais tratados com o EH (100 mg/Kg) associado ao paracetamol (ParEx) apresentaram uma recuperação da concentração de uréia plasmática, quase atingindo o nível apresentado pelo grupo controle (Co). Estes resultados indicam que o extrato foi capaz de reverter com razoável eficiência o dano hepático induzido pelo paracetamol.



**Figura 18:** Dosagem de Uréia realizada nos grupos Controle, Paracetamol e Paracetamol + Extrato bruto (EH).

Co = controle.

Par = paracetamol.

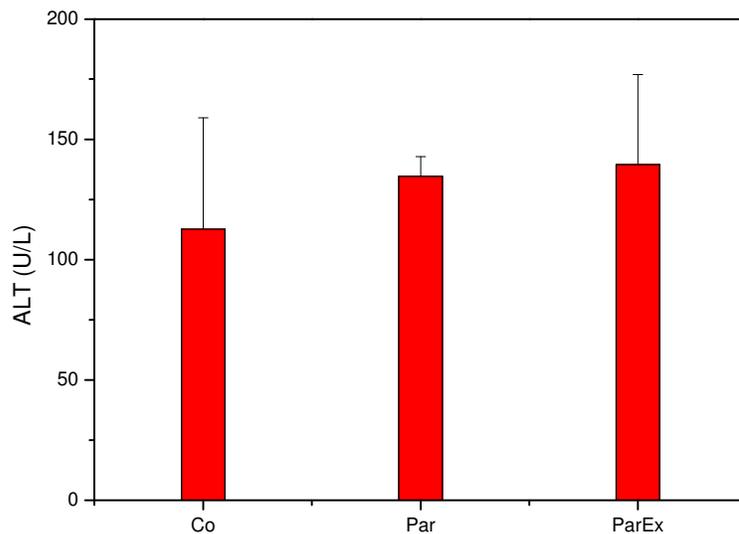
ParEx = paracetamol + extrato bruto (EH) – 100 mg/Kg.

Concentração de uréia expressa em mg/dL.

\* =  $p < 0,05$ .

### Transamisases (ALT e AST)

A Figura 19 mostra o resultado da atividade da ALT e indica que não ocorreu diferença entre a atividade plasmática desta enzima entre os grupos.



**Figura 19:** Dosagem de alanina aminotransferase (ALT) realizada nos grupos Controle, Paracetamol e Paracetamol + Extrato bruto (EH).

Co = controle.

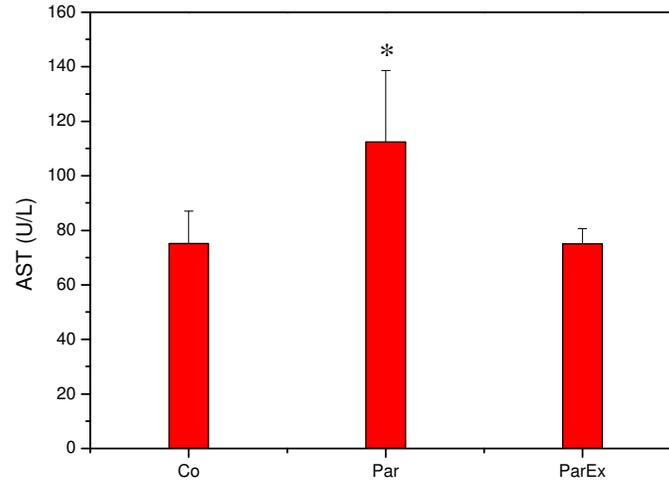
Par = paracetamol.

ParEx = paracetamol + extrato bruto (EH).

Concentração de alanina aminotransferase (ALT) expressa em U/L de plasma.

$p > 0,05$ .

Porém, a Figura 20 mostra uma elevação da atividade plasmática da enzima AST dos animais tratados com paracetamol (Par) e uma tentativa de proteção ao hepatócito nos animais que receberam o extrato bruto (EH) de estudo concomitantemente com o paracetamol (ParEx).



**Figura 20:** Dosagem de aspartato aminotransferase (AST) realizada nos grupos Controle, Paracetamol e Paracetamol + Extrato bruto (EH).

Co = controle.

Par = paracetamol.

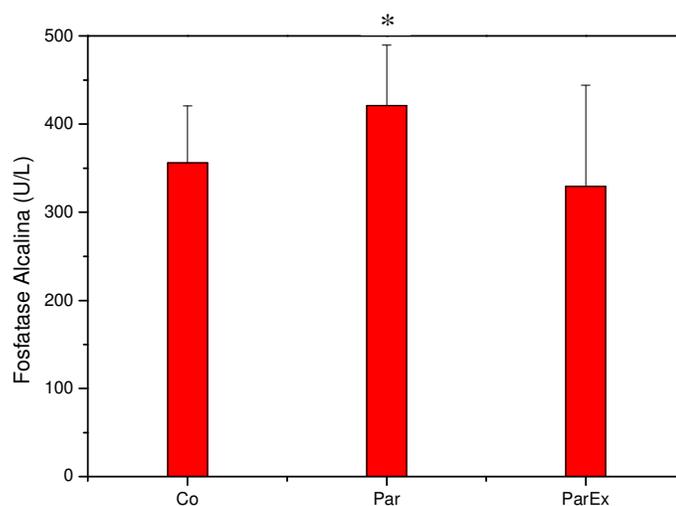
ParEx = paracetamol + extrato bruto (EH).

Concentração de aspartato aminotransferase (AST) expressa em U/L de plasma.

\* =  $p < 0,05$ .

### Fosfatase Alcalina (FAL)

A Figura 21 mostra um aumento discreto na concentração da fosfatase alcalina nos animais tratados com paracetamol (Par). Os animais tratados com paracetamol associado ao extrato bruto (EH) (ParEX) apresentaram uma diminuição dessa concentração, sugerindo uma proteção dos hepatócitos por este extrato.



**Figura 21:** Dosagem de fosfatase alcalina realizada nos grupos Controle, Paracetamol e Paracetamol + Extrato bruto (EH).

Co = controle.

Par = paracetamol.

ParEx = paracetamol + extrato bruto (EH).

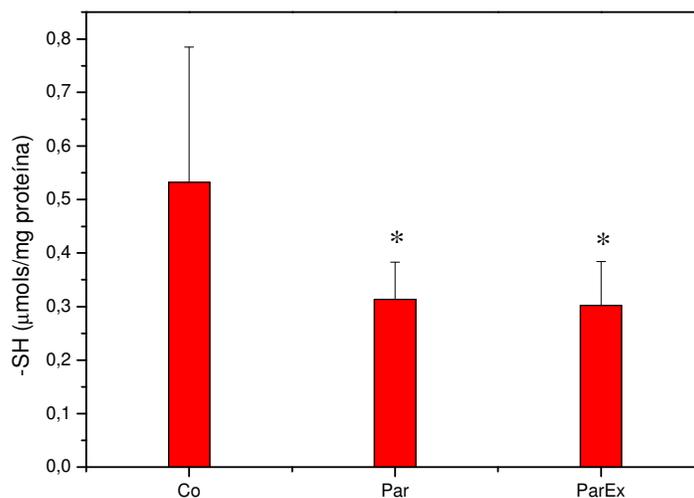
Concentração de fosfatase alcalina expressa em U/L de plasma.

\* =  $p < 0,05$ .

## **B - Parâmetros de avaliação em homogenato do fígado**

### Grupamento Sulfidril

O paracetamol produziu redução dos grupamentos sulfidrilas, mas o tratamento com o EH não conseguiu reverter essa depleção (Figura 22).



**Figura 22:** Dosagem de grupamento sulfidril no homogenato de fígado realizada nos grupos Controle, Paracetamol e Paracetamol + Extrato bruto (EH).

Co = controle.

Par = paracetamol.

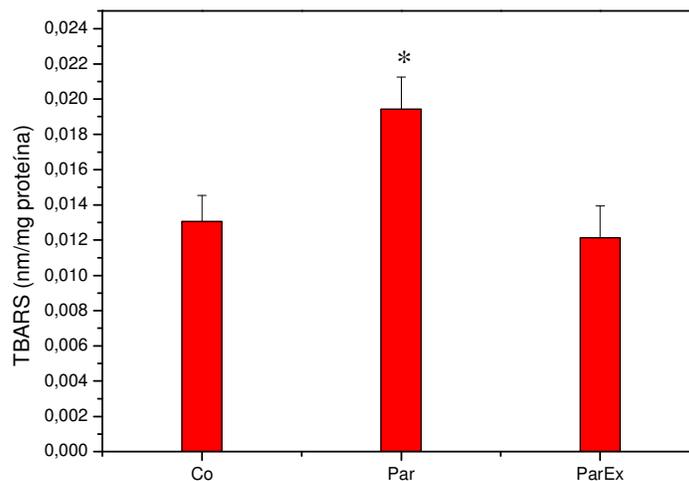
ParEx = paracetamol + extrato bruto (EH).

Concentração de grupamento sulfidril expressa em mmol/mg de proteína.

\* =  $p < 0,05$ .

### TBARS

Como pode ser observado na Figura 23, os animais tratados com paracetamol (Par) apresentaram maiores níveis de TBARS, enquanto os animais que receberam o EH associado ao paracetamol (ParEx) apresentaram menor índice, sugerindo possível proteção das membranas dos hepatócitos pela ação de compostos antioxidantes presentes neste extrato vegetal.



**Figura 23:** Dosagem de Tbars no homogenato de fígado realizada nos grupos Controle, Paracetamol e Paracetamol + Extrato bruto (EH).

Co = controle.

Par = paracetamol.

ParEx = paracetamol + extrato bruto (EH).

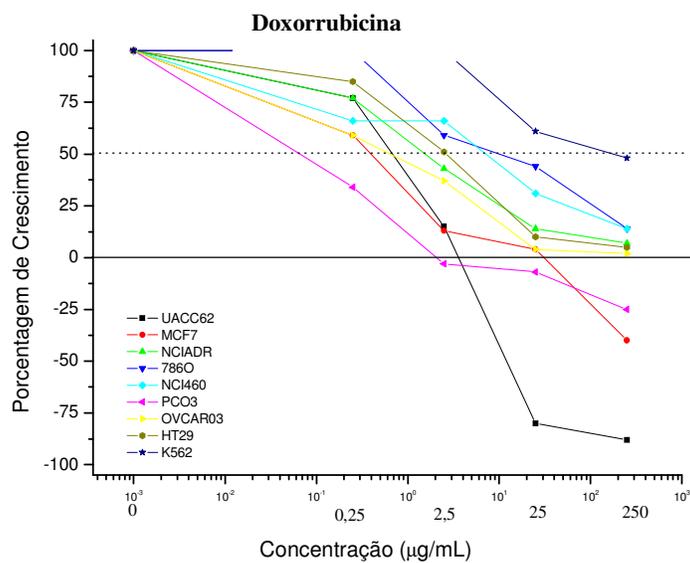
Concentração de TBARS expressa em nm/mg de proteína.

\* =  $p < 0,05$ .

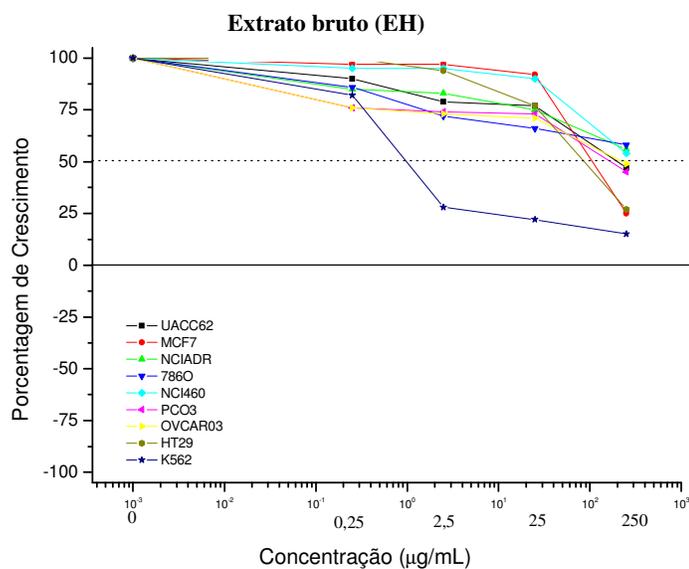
## 6- Avaliação da atividade antiproliferativa

A atividade antiproliferativa da espécie pesquisada foi analisada a partir dos extratos brutos (EH e EBZ) e também da fração terpeno (FrT), utilizando como controle positivo o quimioterápico doxorrubicina (Figura 24). As frações obtidas a partir do fracionamento ácido-base também foram avaliadas.

A figura 25 mostra que o EH foi capaz de inibir o crescimento celular de todas as linhagens de células neoplásicas humanas na concentração aproximada de 250  $\mu\text{g/mL}$ . Apenas na linhagem K562 o EH inibiu o crescimento celular a partir da concentração aproximada de 0,25  $\mu\text{g/mL}$ , indicando ação seletiva por este tipo de célula.

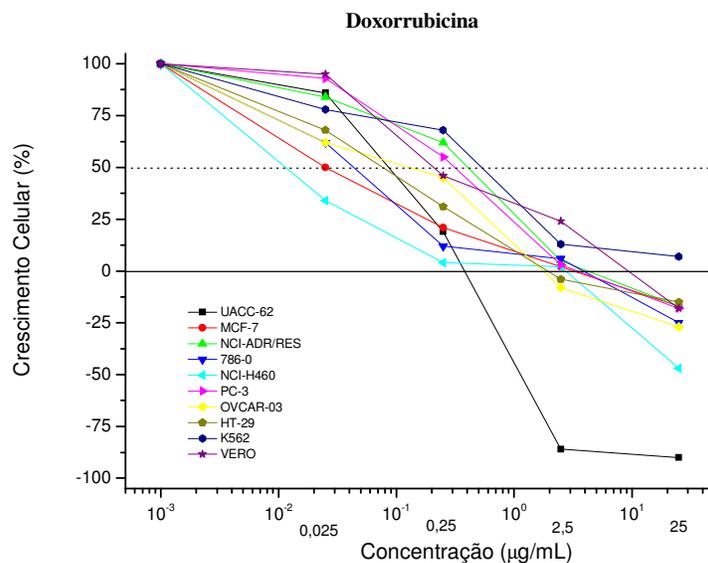


**Figura 24:** Curva concentração-resposta da atividade antiproliferativa da doxorrubicina sobre as linhagens de células neoplásicas humanas.

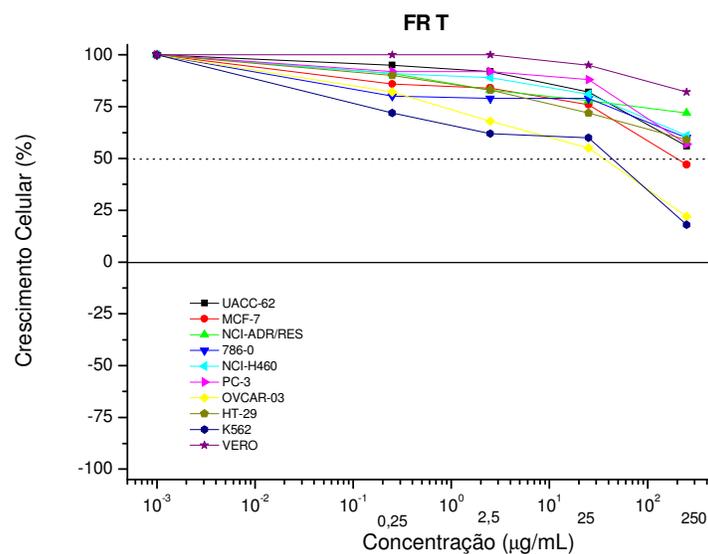


**Figura 25:** Curva concentração-resposta da atividade antiproliferativa do extrato bruto (EH) de *O. flexuosum* sobre as linhagens de células neoplásicas humanas.

A fração terpeno (FrT) não foi capaz de inibir o crescimento celular das linhagens de células neoplásicas humanas testadas (Figura 27). Na figura 26, observa-se o padrão de doxorubicina.

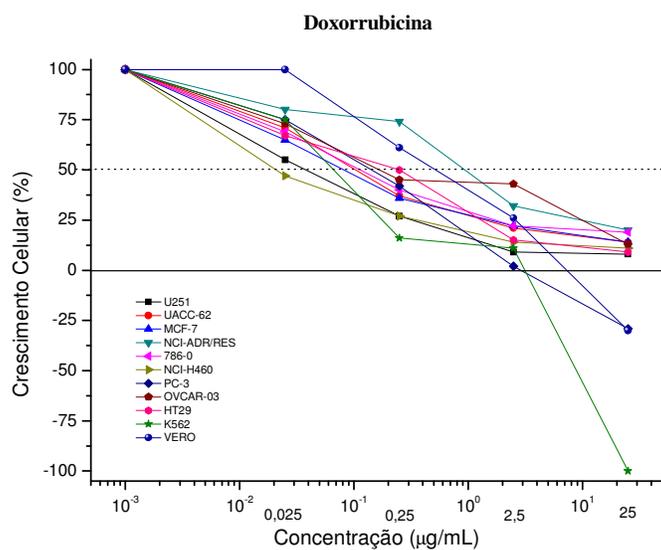


**Figura 26:** Curva concentração-resposta da atividade antiproliferativa da doxorubicina sobre as linhagens de células neoplásicas humanas.

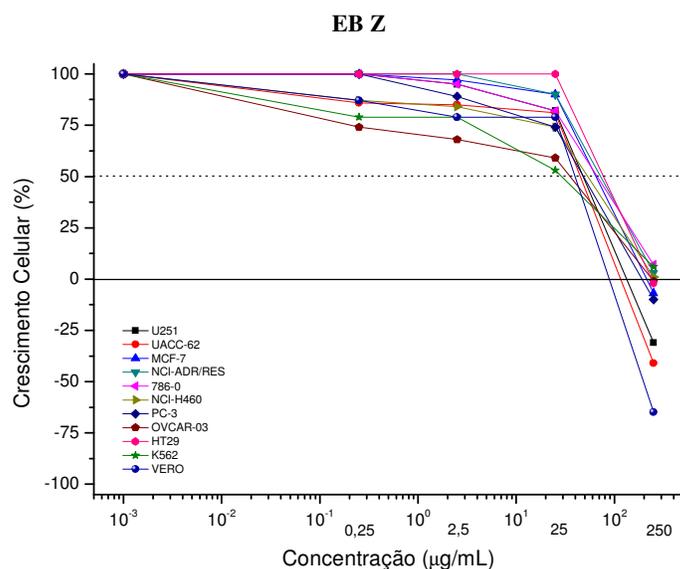


**Figura 27:** Curva concentração-resposta da atividade antiproliferativa da fração terpeno (FrT) de *O. flexuosum* sobre as linhagens de células neoplásicas humanas.

A figura 29 mostra que o EBZ foi capaz de inibir o crescimento celular de todas as linhagens de células neoplásicas humanas na concentração de 250 µg/mL, apresentando um efeito citostático para tais linhagens e provocou a morte destas células na concentração aproximada de 250 µg/mL, mostrando o seu efeito citocida.



**Figura 28:** Curva concentração-resposta da atividade antiproliferativa da doxorrubicina sobre as linhagens de células neoplásicas humanas.

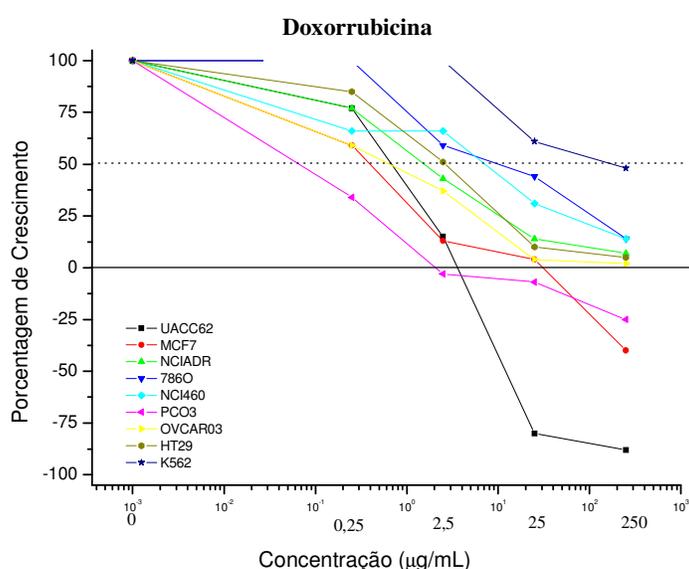


**Figura 29:** Curva concentração-resposta da atividade antiproliferativa do extrato bruto com tratamento enzimático (EBZ) de *O. flexuosum* sobre as linhagens de células neoplásicas humanas.

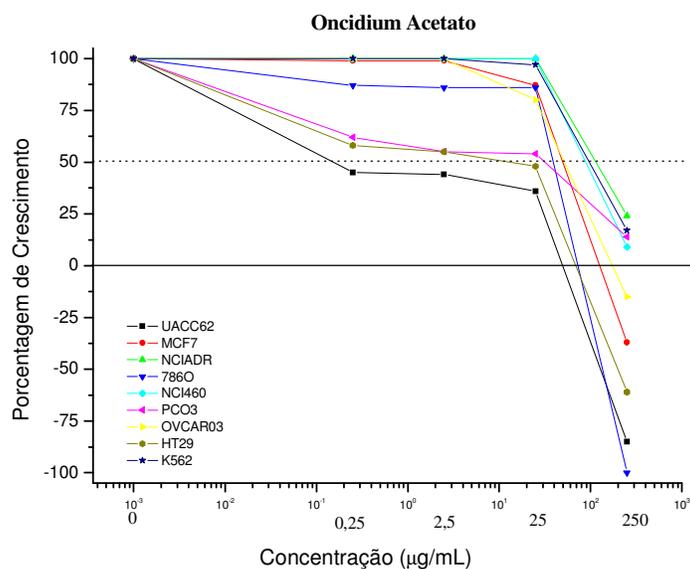
A fração acetato foi capaz de inibir o crescimento celular da linhagem UACC62 das células neoplásicas humanas a partir da concentração de 0,25  $\mu\text{g/mL}$ , apresentando um efeito citostático para tal linhagem. Na concentração aproximada de 250  $\mu\text{g/mL}$ , esta fração demonstrou efeito citostático para as linhagens NCIADR, K562, PCO3, NCI460 e efeito citocida para as outras linhagens (Figura 31).

As frações acetato ácida e básica não foram capazes de inibir o crescimento celular das linhagens de células neoplásicas humanas testadas (Figura 32 e 33).

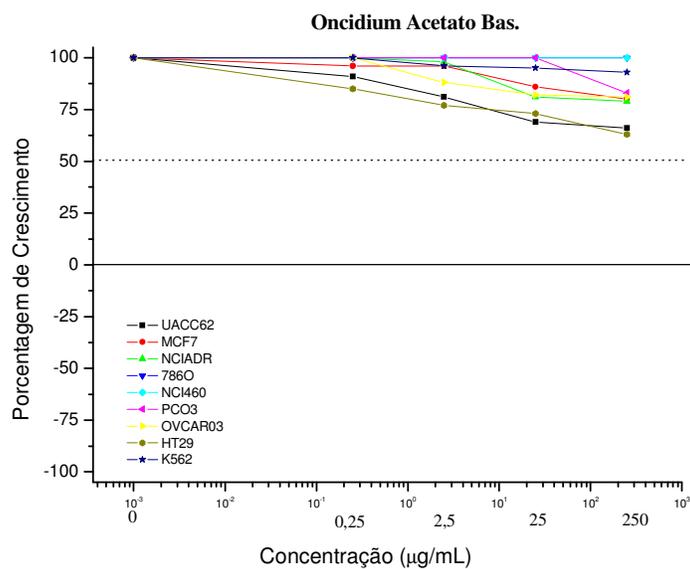
O ED inibiu o crescimento celular da linhagem celular K562 a partir da concentração aproximada de 25  $\mu\text{g/mL}$  apresentando efeito citostático (Figura 34).



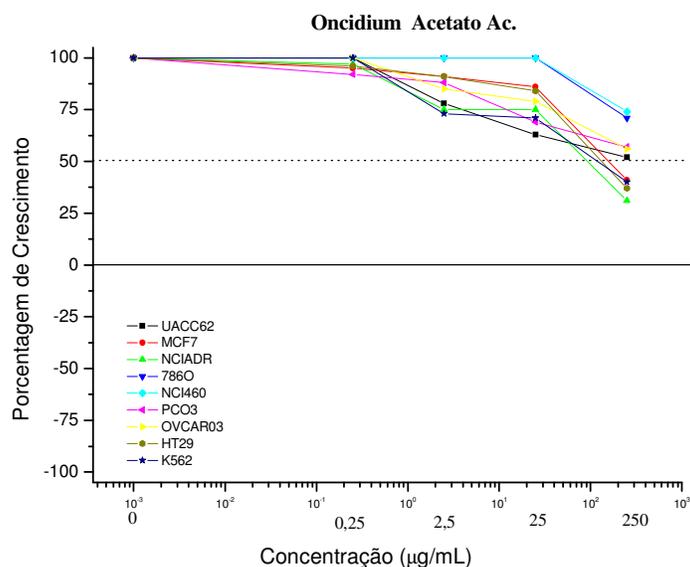
**Figura 30:** Curva concentração-resposta da atividade antiproliferativa da doxorrubicina sobre as linhagens de células neoplásicas humanas.



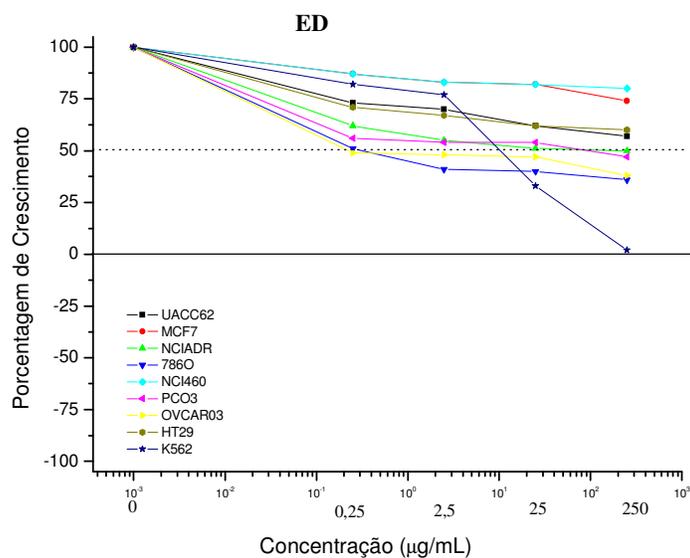
**Figura 31:** Curva concentração-resposta da atividade antiproliferativa da fração acetato de *Oncidium flexuosum* sobre as linhagens de células neoplásicas humanas.



**Figura 32:** Curva concentração-resposta da atividade antiproliferativa da fração acetato básica de *O. flexuosum* sobre as linhagens de células neoplásicas humanas.



**Figura 33:** Curva concentração-resposta da atividade antiproliferativa da fração acetato ácida de *O. flexuosum* sobre as linhagens de células neoplásicas humanas.

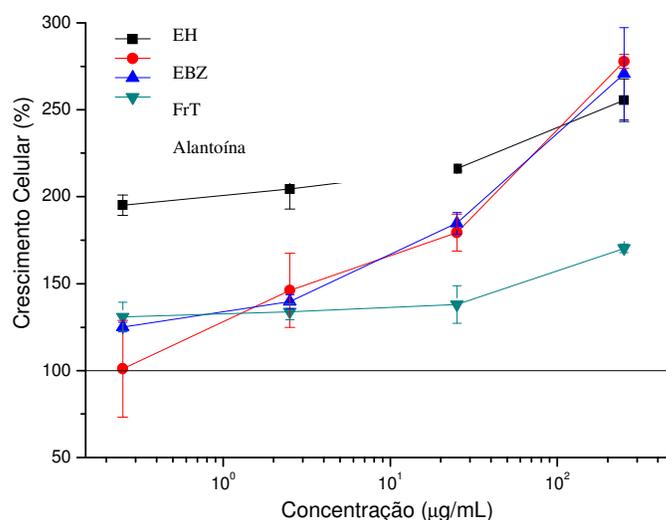


**Figura 34:** Curva concentração-resposta da atividade antiproliferativa da fração diclorometano (ED) de *O. flexuosum* sobre as linhagens de células neoplásicas humanas.

---

## 7- Estímulo do crescimento de fibroblasto *in vitro*

Os extratos brutos de *O. flexuosum*, EH e EBZ, e também a fração terpeno (FrT) estimularam o crescimento de fibroblastos. O EH foi o mais ativo dos três, com  $CE_{50} < 0,25 \mu\text{g/mL}$ , sendo que o tratamento enzimático (EBZ) resultou em uma redução na potência ( $CE_{50} = 3,3 \mu\text{g/mL}$ ). De maneira semelhante, a FrT induziu o crescimento dos fibroblastos, porém com menor potência ( $CE_{50} = 4,4 \mu\text{g/mL}$ ) do que o EH. A alantoína (0,25  $\mu\text{g/mL}$  a 250  $\mu\text{g/mL}$ ) foi utilizada como controle positivo, com  $CE_{50} = 2 \mu\text{g/mL}$ . O valor de  $CE_{50}$  representa a concentração necessária para aumentar em 50% a quantidade de fibroblastos iniciais, sendo que fibroblastos não tratados expostos ao carenciamento de soro foram usados como controle e a sua viabilidade foi considerada como 100% (Figura 35).



**Figura 35:** Efeito estimulante dos extratos (EH e EBZ), da fração terpeno (FrT) de *O. flexuosum* e da alantoína em fibroblastos humanos.

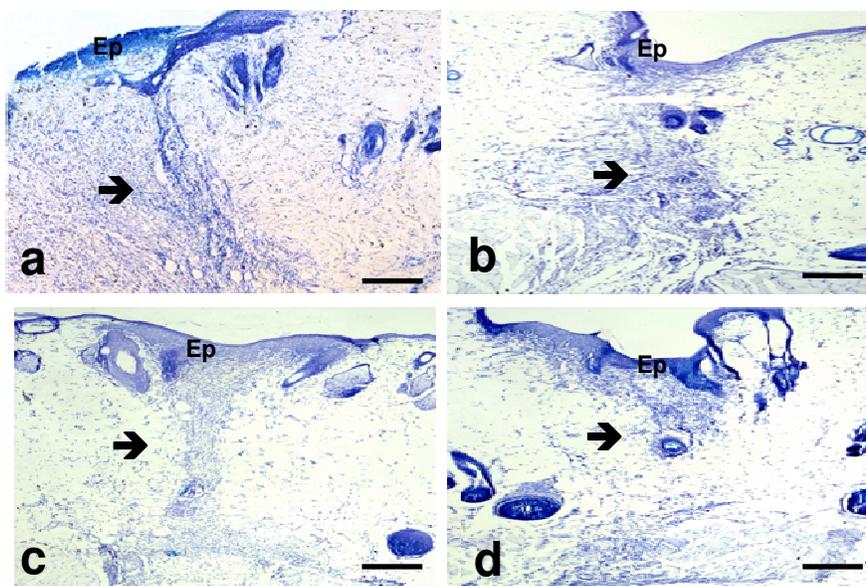
---

## 8- Análise estrutural e morfométrica do reparo tecidual

As análises macroscópica e microscópica das áreas cicatriciais, após dez dias de tratamento, mostram um efeito cicatrizante significativo do extrato bruto de *O. flexuosum* associado a microcorrente quando comparando com os demais grupos.

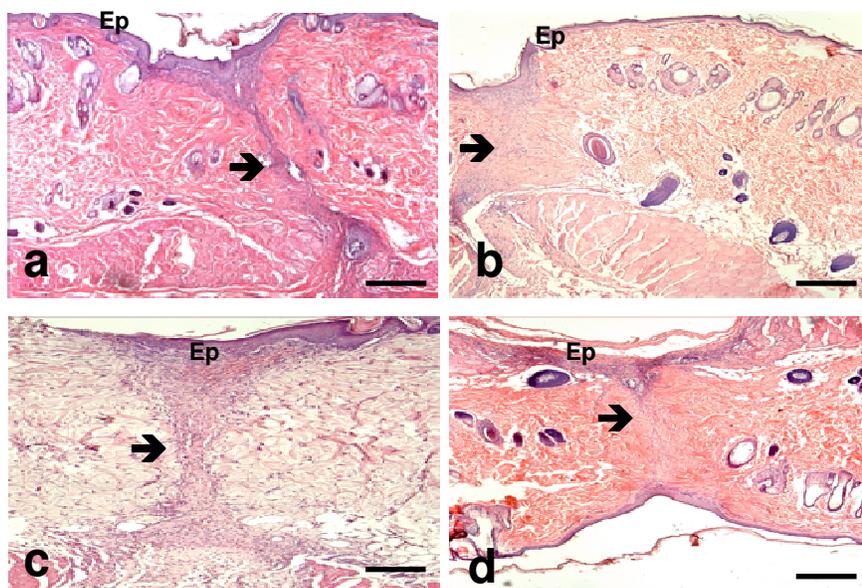
O reparo tecidual nos diferentes grupos foi estudado comparando-se os processos inflamatórios (leucocitose, hemorragia e exsudato), proliferativos (hiperplasia fibroblástica, epitelização e angiogênese) e de reorganização tecidual. Estes processos ocorreram completamente em todos os animais estudados em um período de dez dias. A análise estrutural foi realizada no 2°, 6° e 10° dia. A fase proliferativa iniciou-se precocemente (2° dia) nos animais do grupo tratado com o extrato bruto (EH) combinado com microcorrente (MC) quando comparados com o grupo controle e o grupo tratado com o EH.

As características estruturais da matriz fibrosa entre os diferentes grupos também foram avaliadas. As amostras coletadas no 6° dia após a lesão experimental demonstraram predomínio de fibras colágenas de pequena espessura e pouco compactadas. Contudo, no décimo dia observaram-se fibras compactadas e de média espessura quando comparadas ao tecido íntegro nas bordas da lesão (Figuras 36 e 37).



**Figura 36:** Fotomicrografias dos cortes transversais da pele do dorso de ratos Wistar no 10º dia após lesão experimental. Cortes tratados com *Azul de Toluidina*.

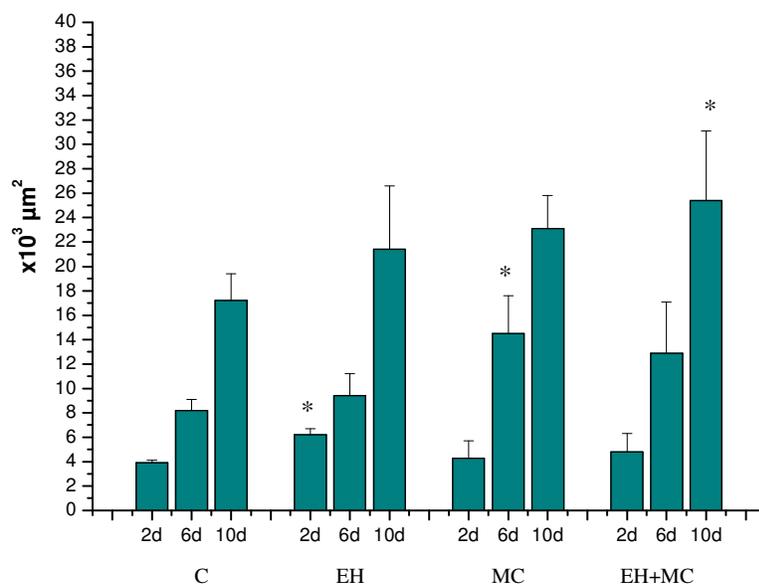
(A) Grupo controle; (B) Grupo tratado topicamente com extrato de *O. flexuosum* (EH); (C) Grupo tratado com microcorrente (10  $\mu$ A/2 min) (MC); (D) Grupo tratado com associação do extrato de *O. flexuosum* e microcorrente (10  $\mu$ A/2 min)(EH+MC). Ep – Epiderme; (➔) – Área de tecido cicatricial. Barra = 50  $\mu$ m.



**Figura 37:** Fotomicrografias dos cortes transversais da pele do dorso de ratos Wistar no 10º dia após lesão experimental. Cortes tratados com *Picrossirius- Hematoxilina*.

(A) Grupo controle; (B) Grupo tratado topicamente com extrato de *O. flexuosum* (EH); (C) Grupo tratado com microcorrente (10  $\mu$ A/2 min) (MC); (D) Grupo tratado com associação do extrato de *O. flexuosum* e microcorrente (10  $\mu$ A/2 min)(EH+MC). Ep – Epiderme; (➔) – Área de tecido cicatricial. Barra = 50  $\mu$ m.

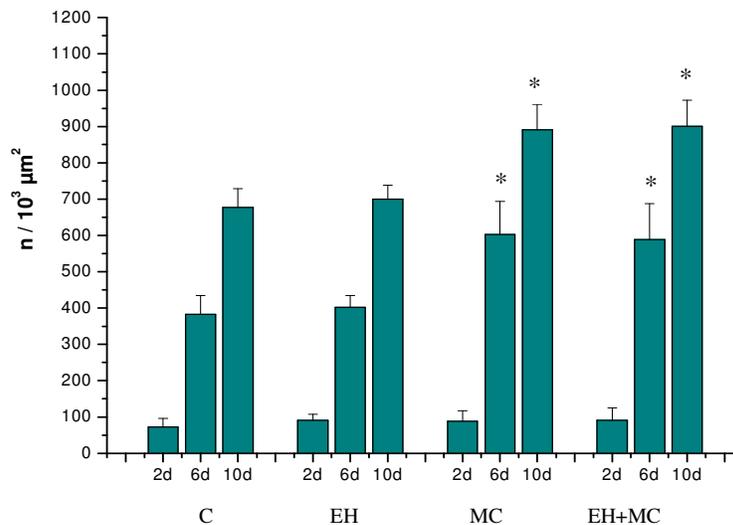
No 2º dia após a lesão experimental a área de tecido de reparo foi significativamente maior para o grupo EH em relação aos demais grupos experimentais. Após o 6º dia, a área de reparo mostrou-se significativamente maior nos grupos MC e EH+MC. No 10º dia após a lesão, a área foi completamente reepitelizada no grupo tratado com o EH+MC, com diferença significativa quando comparado com os demais grupos (Figura 38).



**Figura 38:** Medidas da área de reparo tecidual ( $\times 10^3 \mu\text{m}^2$ ) na região da lesão experimental. As avaliações foram feitas em amostras coletadas após o 2º (2d), 6º (6d) e 10º (10d) dias após a lesão. Os valores foram comparados utilizando ANOVA e pós-teste de Tukey ( $p < 0,05$ ) e representados pela média e desvio-padrão para cada grupo. Os grupos que apresentaram diferenças significativas estão indicados por \*.

(C) Grupo controle, (EH) Grupo tratado topicamente com extrato de *O. flexuosum*, (MC) Grupo tratado com microcorrente (10  $\mu\text{A}/2$  min) e (EH+MC) Grupo tratado com associação do extrato de *O. flexuosum* e microcorrente (10  $\mu\text{A}/2$  min).

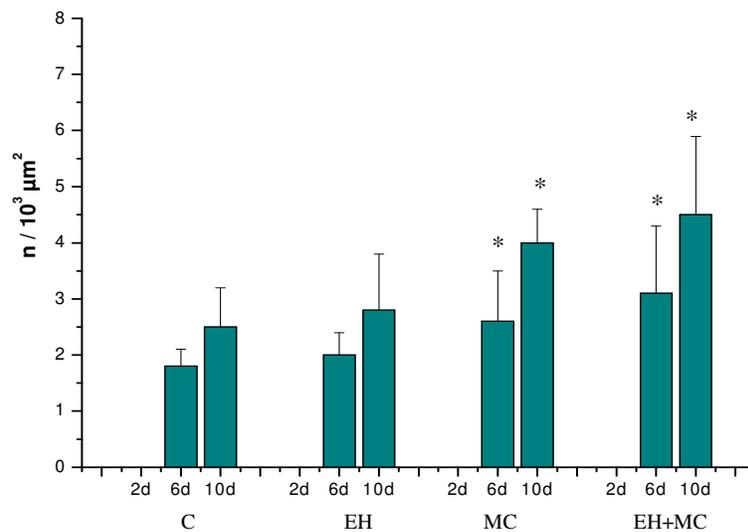
Quanto ao número total de células por  $10^3 \mu\text{m}^2$  na área de reparo no 10º dia após a lesão, os grupos MC e EH+MC apresentaram valores semelhantes e foram significativamente superiores ao controle e EH (Figura 39).



**Figura 39:** Número total de células ( $n/10^3 \mu\text{m}^2$ ) na região da lesão experimental. As avaliações foram feitas em amostras coletadas após o 2º (2d), 6º (6d) e 10º (10d) dias do experimento. Os valores foram comparados utilizando ANOVA e pós-teste de Tukey ( $p < 0,05$ ) e representados pela média e desvio-padrão para cada grupo. Os grupos que apresentaram diferenças significativas estão indicados por \*.

(C) Grupo controle, (EH) Grupo tratado topicamente com extrato de *O. flexuosum*, (MC) Grupo tratado com microcorrente (10  $\mu\text{A}/2$  min) e (EH+MC) Grupo tratado com associação do extrato de *O. flexuosum* e microcorrente (10  $\mu\text{A}/2$  min).

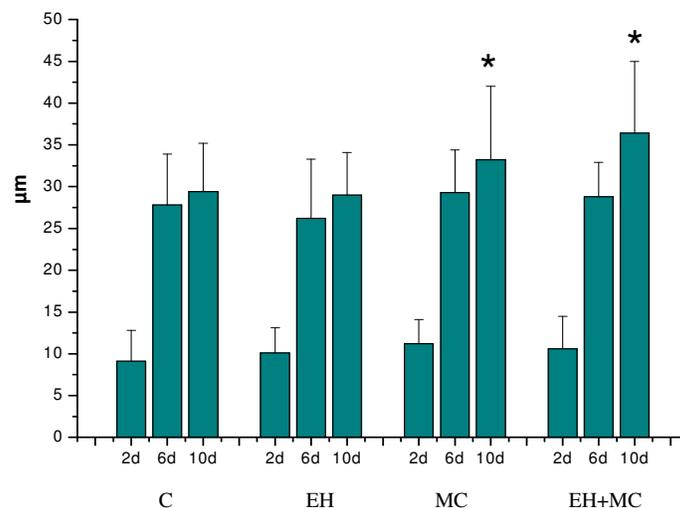
Também foi observado um aumento no número de vasos neoformados no interior da área de tecido de reparo no 6º e 10º dia após a lesão experimental nos grupos tratados com EH+MC, quando comparados com os demais grupos (Figura 40).



(C) Grupo controle, (EH) Grupo tratado topicamente com extrato de *O. flexuosum*, (MC) Grupo tratado com microcorrente (10  $\mu\text{A}/2$  min) e (EH+MC) Grupo tratado com associação do extrato de *O. flexuosum* e microcorrente (10  $\mu\text{A}/2$  min).

**Figura 40:** Número total de vasos neoformados ( $n/10^3 \mu\text{m}^2$ ) na região da lesão experimental. As avaliações foram feitas em amostras coletadas após o 2 (2d), 6 (6d) e 10 (10d) dias do experimento. Os valores foram comparados utilizando ANOVA e pós-teste de Tukey ( $p < 0,05$ ) e representados pela mdia e desvio-padrão para cada grupo. Os grupos que apresentaram diferenças significativas estão indicados por \*.

Adicionalmente, em relação à espessura do eptlio neoformado os grupos MC e EH+MC apresentaram os maiores valores no 10 dia de tratamento (Figura 41). Os resultados foram apoiados pela análise estatística dos dados morfométricos entre os diferentes grupos estudados.



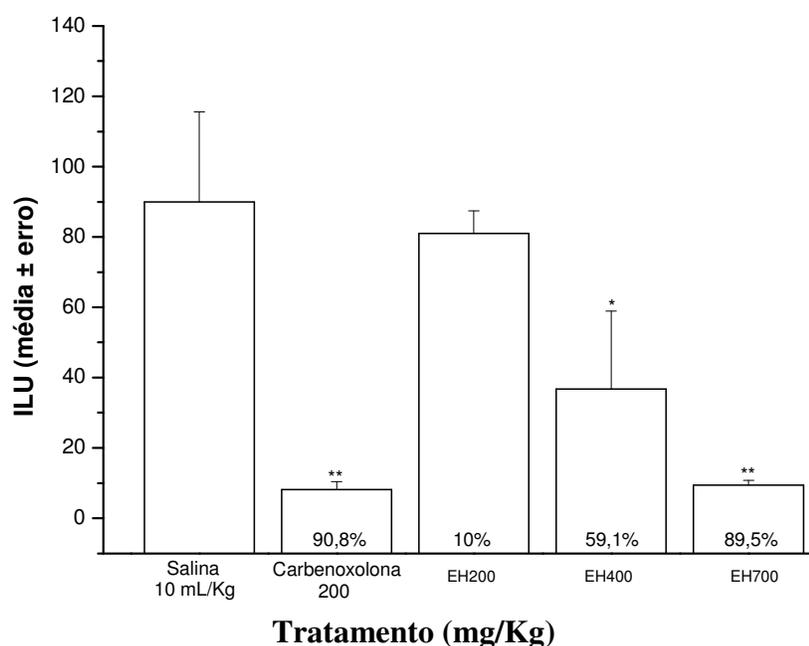
**Figura 41:** Espessura do epitélio ( $\mu\text{m}$ ) na região da lesão experimental. As avaliações foram feitas em amostras coletadas após o 2º (2d), 6º (6d) e 10º (10d) dias do experimento. Os valores foram comparados utilizando ANOVA e pós-teste de Tukey ( $p < 0,05$ ) e representados pela média e desvio-padrão para cada grupo. Os grupos que apresentaram diferenças significativas estão indicados por \*.

(C) Grupo controle, (EH) Grupo tratado topicamente com extrato de *O. flexuosum*, (MC) Grupo tratado com microcorrente (10  $\mu\text{A}/2$  min) e (EH+MC) Grupo tratado com associação do extrato de *O. flexuosum* e microcorrente (10  $\mu\text{A}/2$  min).

---

## 9- Úlcera induzida por etanol

O extrato de *O. flexuosum* (EH), administrado por via oral nas doses de 200, 400 e 700 mg/Kg, apresentou atividade antiulcerogênica, com uma porcentagem de inibição de 10%, 59,1% e 89,5%, respectivamente, enquanto que carbenoxolona, administrada pela mesma via, na dose de 200 mg/kg, utilizada como controle positivo, foi capaz de reduzir o ILU em 90,8%. Os resultados, expressos como média  $\pm$  desvio padrão médio do ILU, estão demonstrados na Figura 42.



**Figura 42:** Efeito gastroprotetor do extrato hidroalcoólico de *O. flexuosum* (EH) em úlcera induzida por etanol.

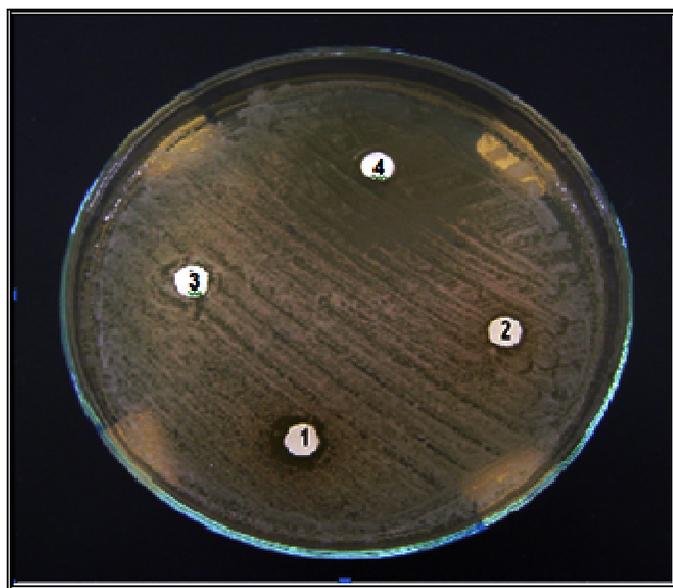
A-Determinação da dose Efetiva 50 (DE50)

A DE50 do extrato de *O. flexuosum* (EH) é de 414,70 mg/Kg.

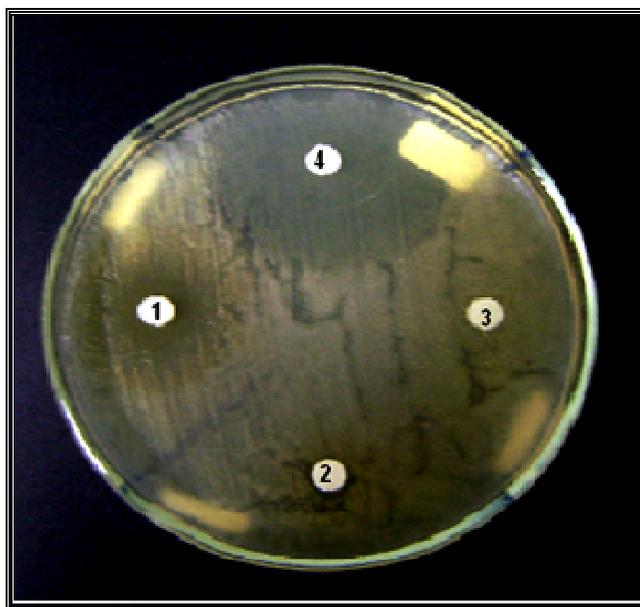
---

## 10- Avaliação da atividade antimicrobiana

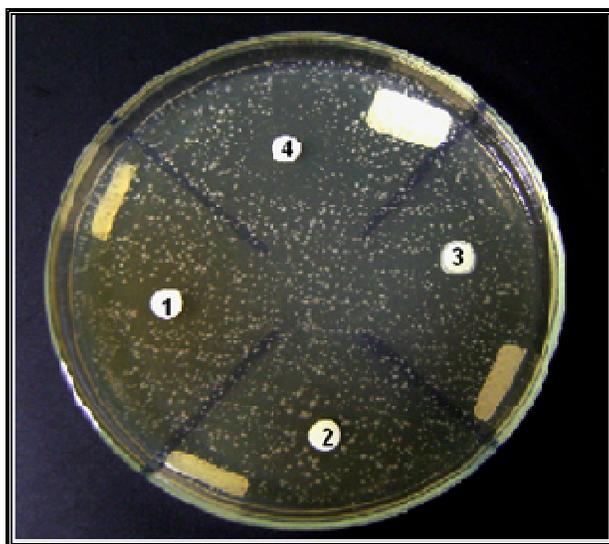
O extrato EH nas concentrações de 10 e 50 mg/mL e a fração terpeno (FrT) na concentração de 10 mg/mL não apresentaram atividade antimicrobiana *in vitro* frente as bactérias *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Staphylococcus aureus resistente à oxacilina* (ATCC 33591) cedida de lesão de paciente com infecção hospitalar, *Staphylococcus saprophyticus* (ATCC 15305) e *Pseudomonas aeruginosas* (ATCC 27853). Porém, frente às leveduras *Candida albicans* (ATCC 10231), e *Candida tropicalis* (ATCC 13803) apresentou atividade antifúngica, mas não diante da levedura *Candida krusei* (ATCC 14243). A frT não apresentou atividade antifúngica diante destas leveduras testadas (Figuras 43-45 e Tabela 8).



**Figura 43:** Foto dos halos de sensibilidade e resistência da *C. albicans* frente ao extrato hidroalcoólico de *O. flexuosum* (EH). (1) 50 mg/mL, (2) 10 mg/mL, (3) fração terpeno (FrT) (10 mg/mL) e (4) controle positivo de fluconazol (30 mg/mL). Diluições em DMSO.



**Figura 44:** Foto dos halos de sensibilidade e resistência da *C. tropicalis* frente ao extrato hidroalcoólico de *O. flexuosum* (EH). (1) 50 mg/mL, (2) 10 mg/mL, (3) fração terpeno (FrT) (10 mg/mL) e (4) controle positivo de fluconazol (30 mg/mL). Diluições em DMSO.



**Figura 45:** Foto dos halos de sensibilidade e resistência da *C. krusei* frente ao extrato hidroalcoólico de *O. flexuosum* (EH). (1) 50 mg/mL, (2) 10 mg/mL, (3) fração terpeno (FrT) (10 mg/mL) e (4) controle positivo de fluconazol (30 mg/mL). Diluições em DMSO.

**Tabela 8:** Halos de inibição (mm) do extrato hidroalcoólico de *O. flexuosum* (EH), da fração terpeno (FrT) e do controle positivo fluconazol frente às leveduras.

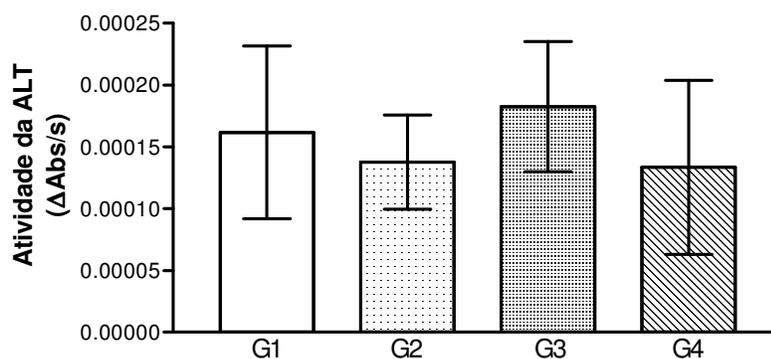
	<i>C. albicans</i>	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. krusei</i>
EH (50 mg/mL)	13	25	-
EH (10 mg/mL)	6	5	-
FrT (10 mg/mL)	-	-	-
Fluconazol (30 mg/mL)	22	40	13

(-) ausência de halo de inibição.

Medidas em milímetros (mm).

## 11- Análises dos danos oxidativos e histopatológica

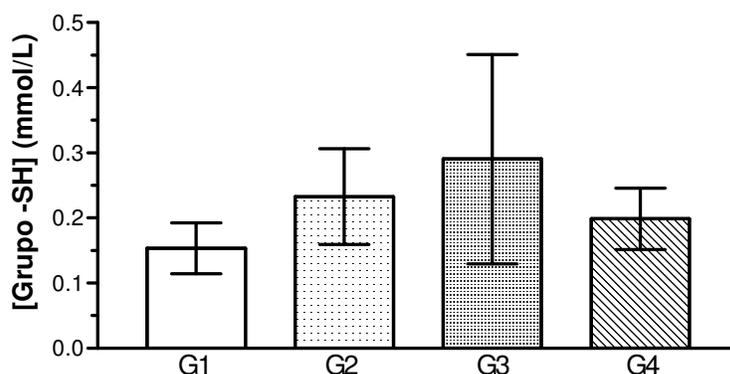
Um dos parâmetros que avaliam a função hepática é a determinação da atividade da enzima alanina aminotransferase (ALT). O aumento da atividade desta enzima normalmente está relacionado com danos hepáticos. Nas três concentrações estudadas, o EH não produziu alterações significativas (figura 46).



**Figura 46:** Atividade da enzima ALT nos grupos controle (G1) e tratados com as três diferentes concentrações (G2 – 100 mg/kg, G3 – 250 mg/kg e G4 – 500 mg/kg) do extrato de *Oncidium flexuosum* Sims. (média e desvio-padrão).

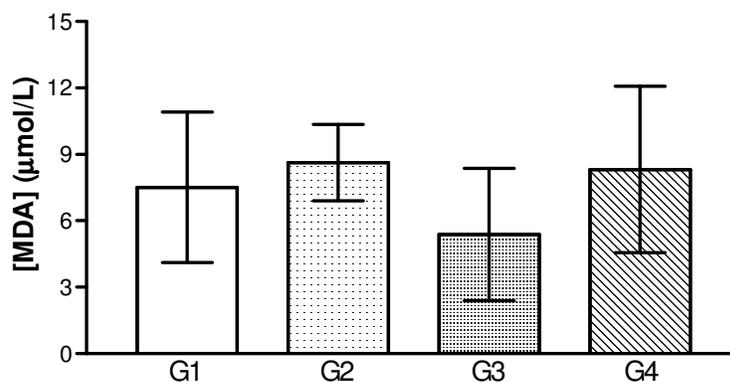
---

A dosagem dos grupamentos sulfidrila no homogenato de fígado dos animais revelou não haver diferença significativa ( $p>0,05$ ) entre os grupos tratados e o grupo controle (Figura 47).



**Figura 47:** Quantificação de grupos sulfidrila (P-SH) nos grupos controle (G1) e tratados com as três diferentes concentrações (G2 – 100 mg/kg, G3 – 250 mg/kg e G4–500 mg/kg) do extrato de *O. flexuosum* Sims. (média e desvio-padrão).

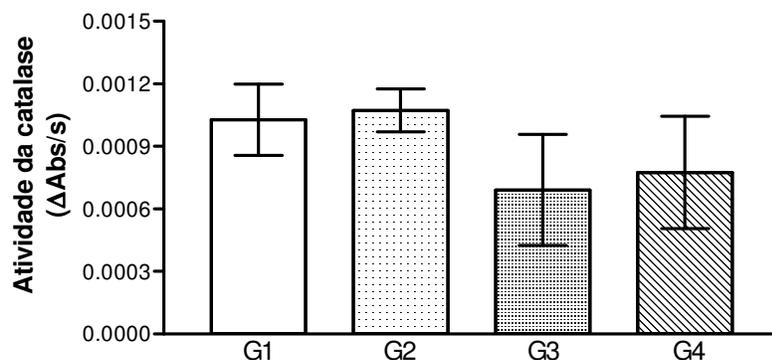
Os níveis de lipoperoxidação, avaliados através da concentração de TBARs, não apresentaram nenhuma diferença significativa ( $p>0,05$ ) entre o grupo controle e os tratados (Figura 48).



**Figura 48:** Níveis de malondealdeído nos grupos controle (G1) e tratados com as três diferentes concentrações (G2 – 100 mg/kg, G3 – 250 mg/kg e G4 – 500 mg/kg) do extrato de *O. flexuosum* Sims. (média e desvio-padrão).

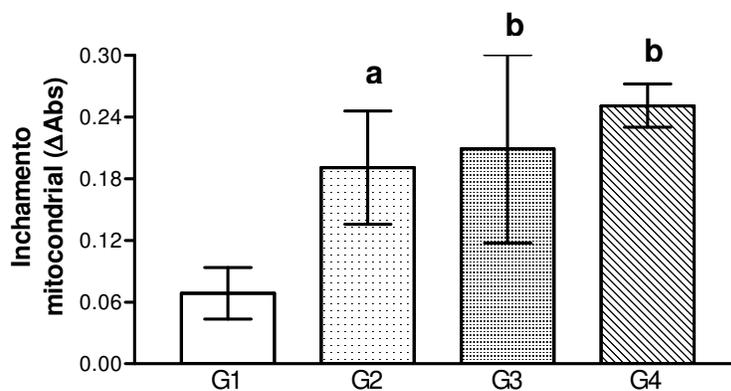
---

A avaliação da atividade da catalase demonstrou não haver diferença significativa ( $p>0,05$ ) entre os grupos analisados (Figura 49).



**Figura 49:** Avaliação da atividade da catalase nos grupos controle (G1) e tratados com as três diferentes concentrações (G2 – 100 mg/kg, G3 – 250 mg/kg e G4 – 500 mg/kg) do extrato de *O. flexuosum* Sims. (média e desvio-padrão).

Na avaliação do inchamento mitocondrial induzido por cálcio e fosfato, foi verificado um aumento significativo na variação de absorvância dos grupos submetidos ao tratamento com o extrato em estudo em comparação com o grupo controle, obtendo-se  $p<0,05$  para o grupo G2 e  $p<0,01$  para os grupos G3 e G4 (Figura 50).



**Figura 50:** Avaliação do inchamento mitocondrial nos grupos controle (G1) e tratados com as três diferentes concentrações (G2 – 100 mg/kg, G3 – 250 mg/kg e G4 – 500 mg/kg) do extrato de *O. flexuosum* Sims. (média e desvio-padrão) (a, b, c representam os valores de p em comparação ao controle, sendo a  $<0,05$  e b  $<0,01$ ).

---

As secções histológicas de fígado dos animais do grupo controle, submetidas a qualquer uma das técnicas citoquímicas utilizadas, revelaram citoarquitetura normal do órgão, cujos lóbulos apresentam centralmente uma veia centrolobular de onde partem cordões de hepatócitos, de núcleos eucromáticos, entremeados por espaços onde são encontrados os capilares sinusóides (Figuras 51-57a, b).

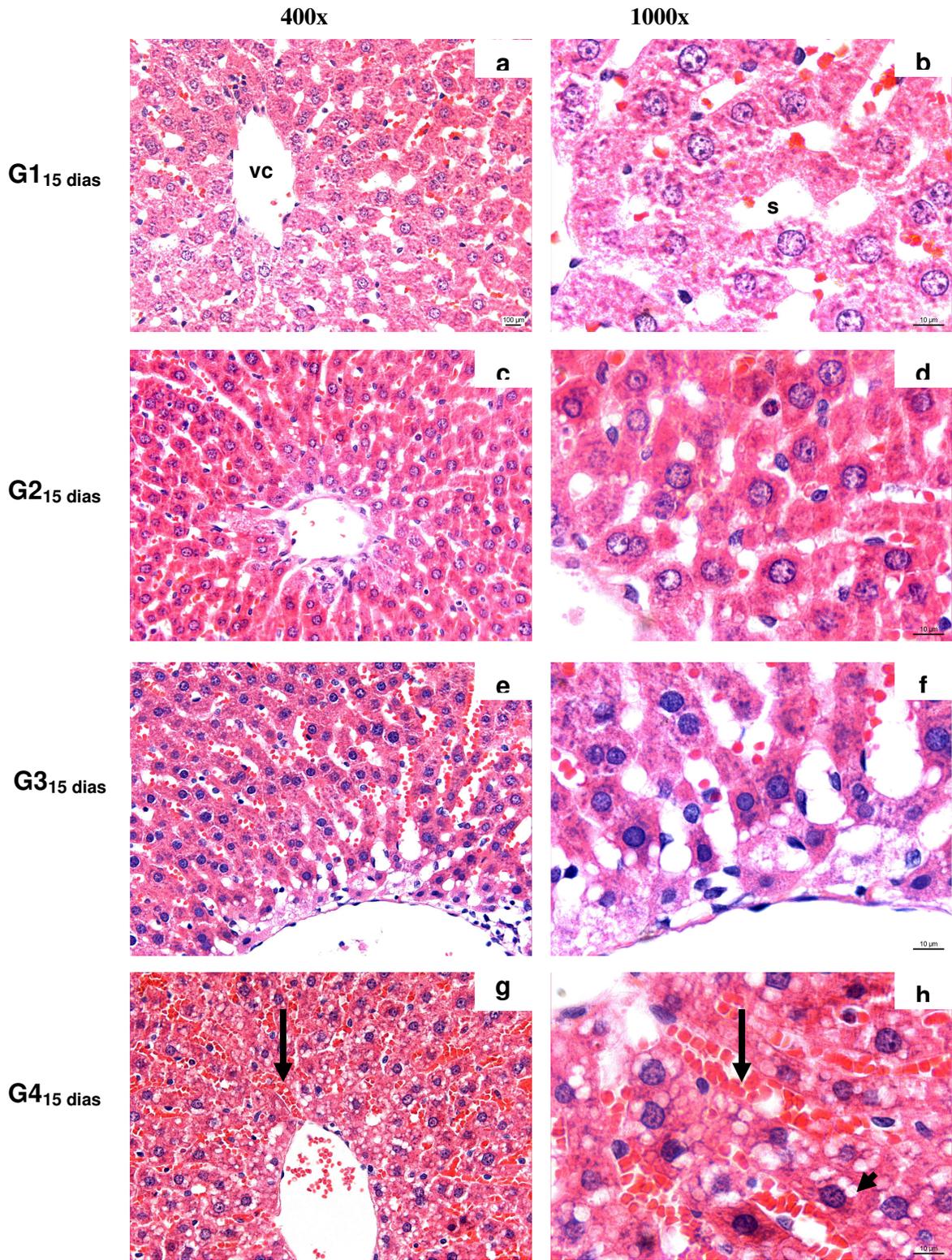
No grupo G3, tratado com 15 dias, já é possível observar discreta hiperemia (Figura 51e) que se tornou bastante evidente no grupo G4 (Figura 51g, h-seta). Além disso, nessa última situação também foi observada vacuolização citoplasmática (Figura 51h-cabeça de seta) e hipertrofia dos hepatócitos.

Nos animais tratados por 30 dias, é possível visualizar vacuolização citoplasmática nos grupos G3 e G4, além de pseudo-eosinofilia com picnose em células desse último grupo (Figura 52h-seta).

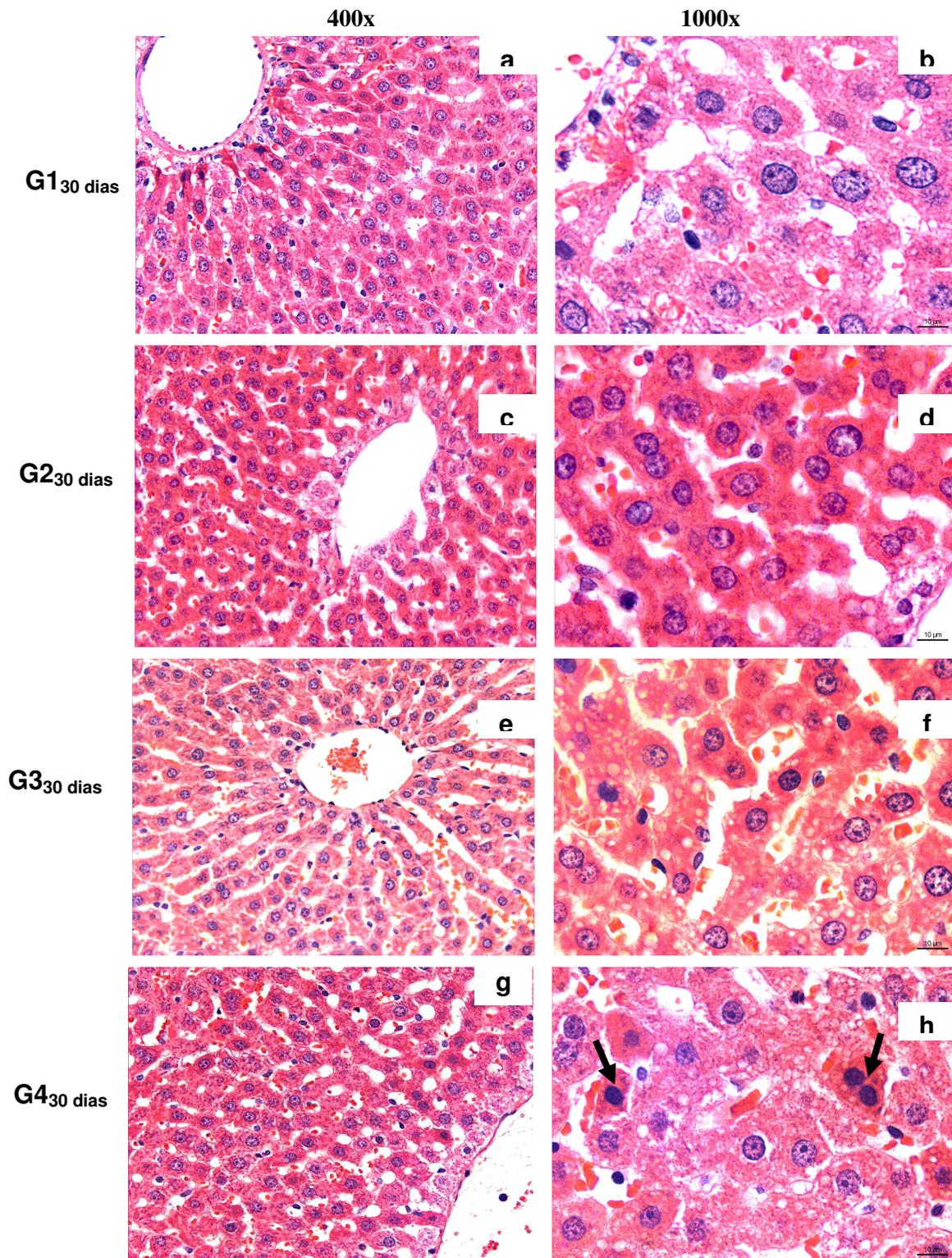
Após a citoquímica de PAS foi possível observar hipertrofia dos hepatócitos no grupo G4 após 15 dias de tratamento, além de aumento no acúmulo de glicogênio próximo a veia centrolobular (Figura 53g,h). Após os 30 dias de tratamento, foi verificada hipertrofia já no grupo G3 (Figura 54e,f) e no grupo G4 também pode ser verificado o acúmulo anteriormente citado (Figura 54g,h).

As secções submetidas à citoquímica com azul de bromofenol evidenciaram aumento na intensidade de marcação no grupo G4 tratado com 15 dias (Figura 55e,f) e nos grupos G3 e G4 tratados com 30 dias (Figura 56e-h).

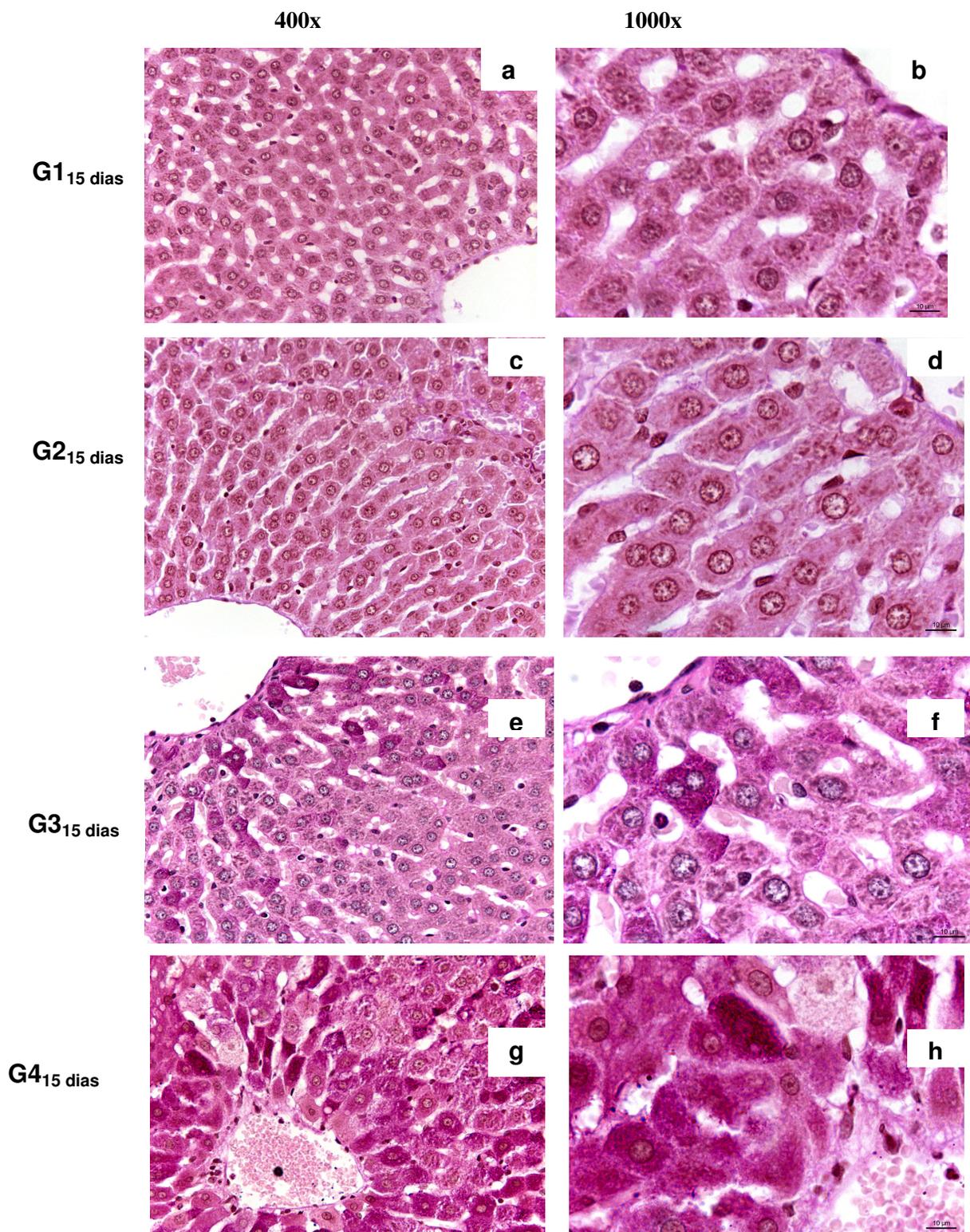
Após citoquímica com Tricômico de Mallory os achados anteriormente citados podem ser reforçados como hipertrofia dos hepatócitos (Figura 57c-h) e vacuolização citoplasmática (Figura 57d-h), porém, parece não ter havido alteração no colágeno do parênquima do órgão.



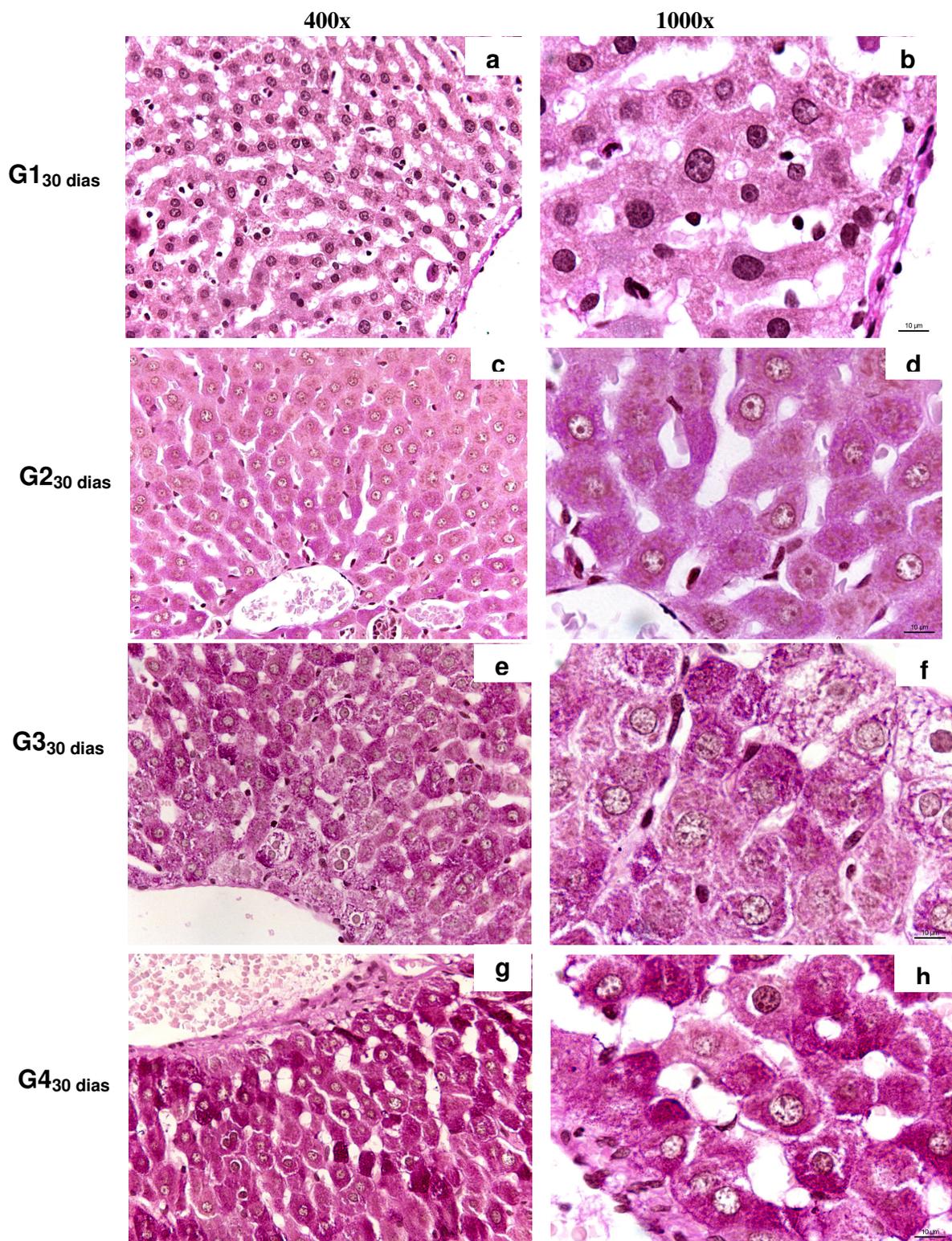
**Figura 51:** Secções dos fígados dos animais dos grupos controle (G1) e tratados por 15 dias com as três concentrações do extrato (G2–100 mg/kg, G3–250 mg/kg e G4–500 mg/kg) de *O. flexuosum* Sims.. Cortes tratados com Hematoxilina/Eosina. (vc-veia centrolobular, s-sinusóides, seta-hiperemia, cabeça de seta-vacuolização citoplasmática).



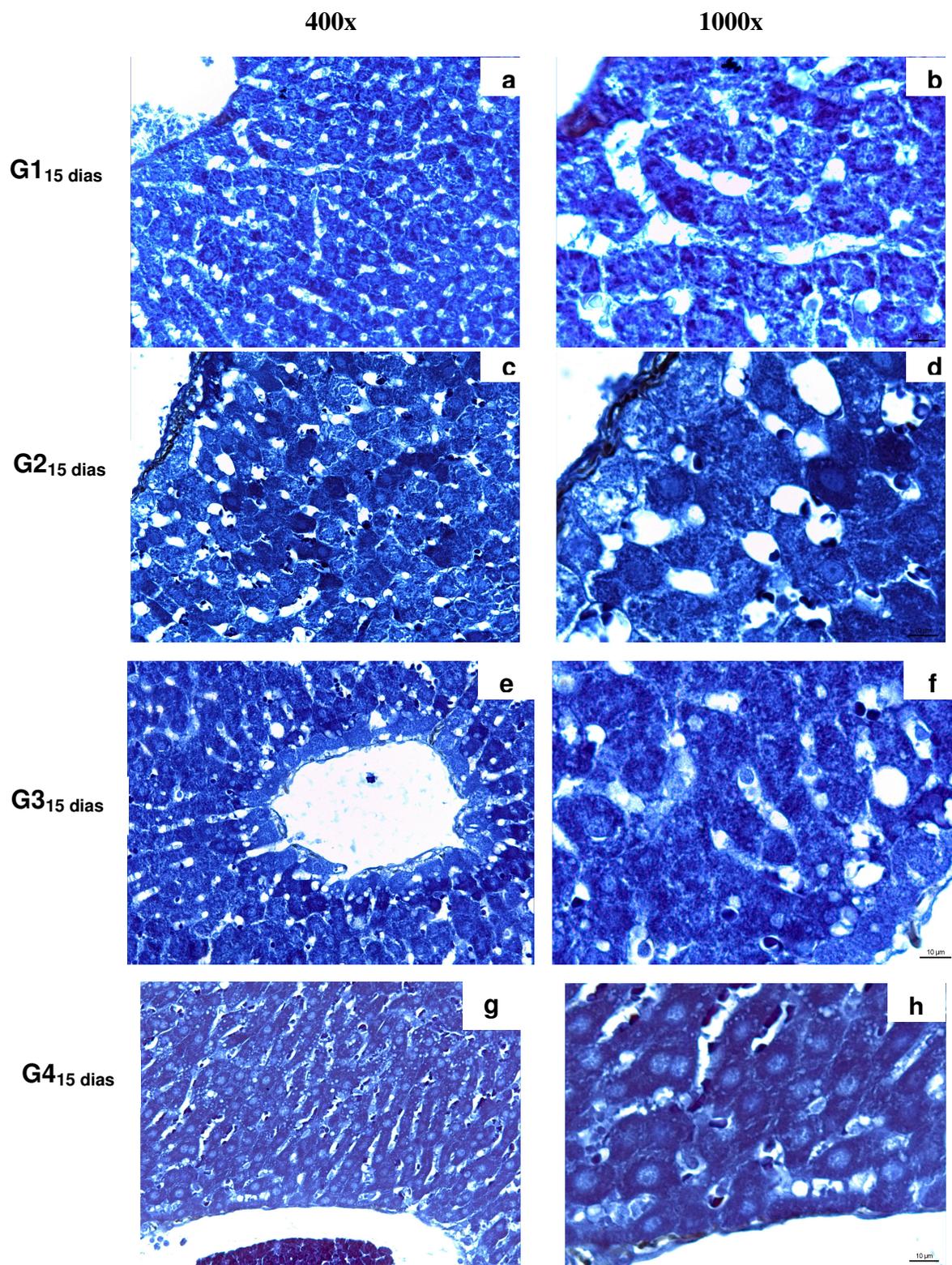
**Figura 52:** Secções dos fígados dos animais dos grupos controle (G1) e tratados por 30 dias com as três concentrações do extrato (G2 – 100 mg/kg, G3 – 250 mg/kg e G4 – 500 mg/kg) de *O. flexuosum* Sims.. Cortes tratados com Hematoxilina/Eosina. (setas – pseudo-eosinofilia com núcleos picnóticos).



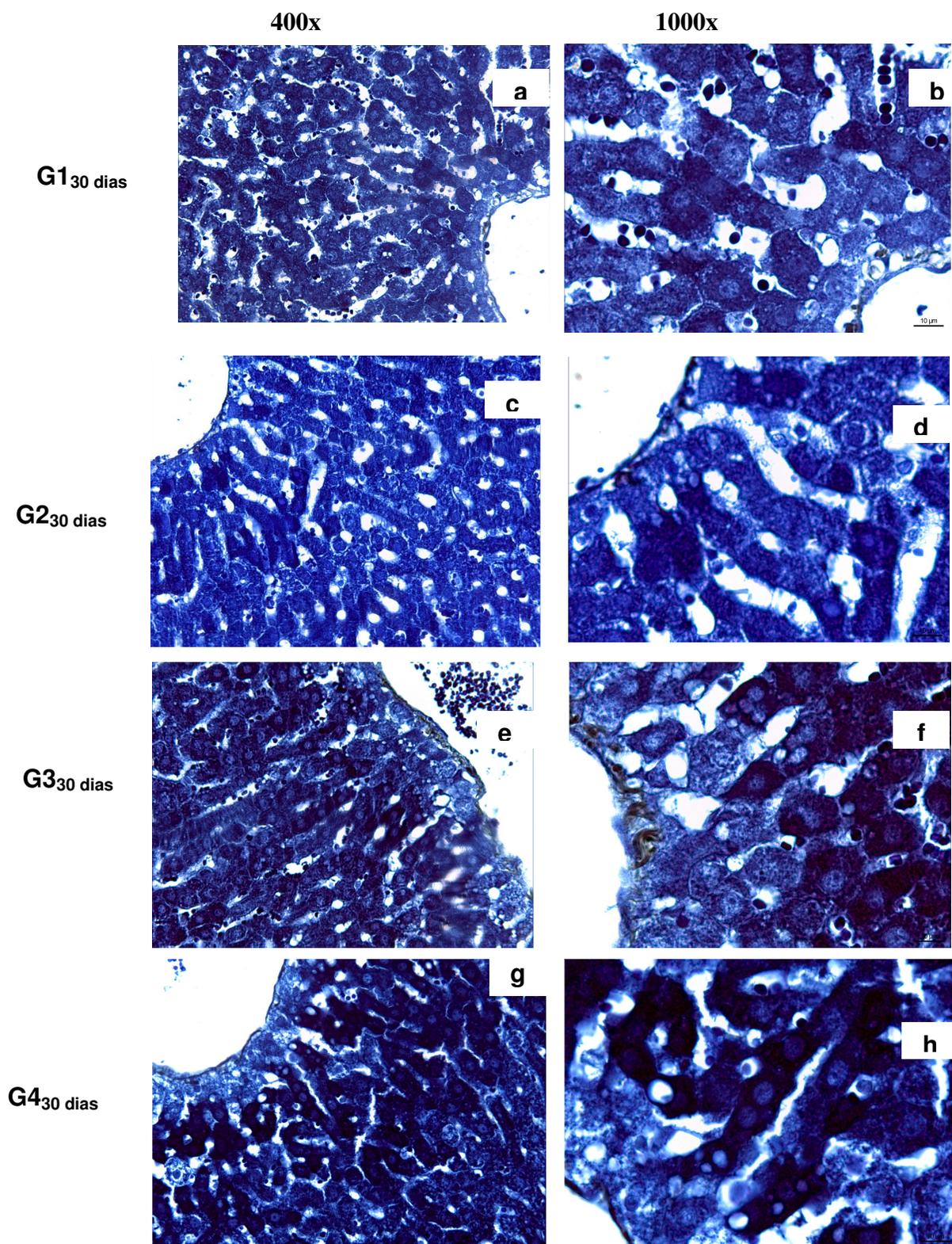
**Figura 53:** Secções dos fígados dos animais dos grupos controle (G1) e tratados por 15 dias com as três concentrações do extrato (G2 – 100 mg/kg, G3 – 250 mg/kg e G4 – 500 mg/kg) de *O. flexuosum* Sims. submetidas à citoquímica com Periodic Acid Schiff (PAS).



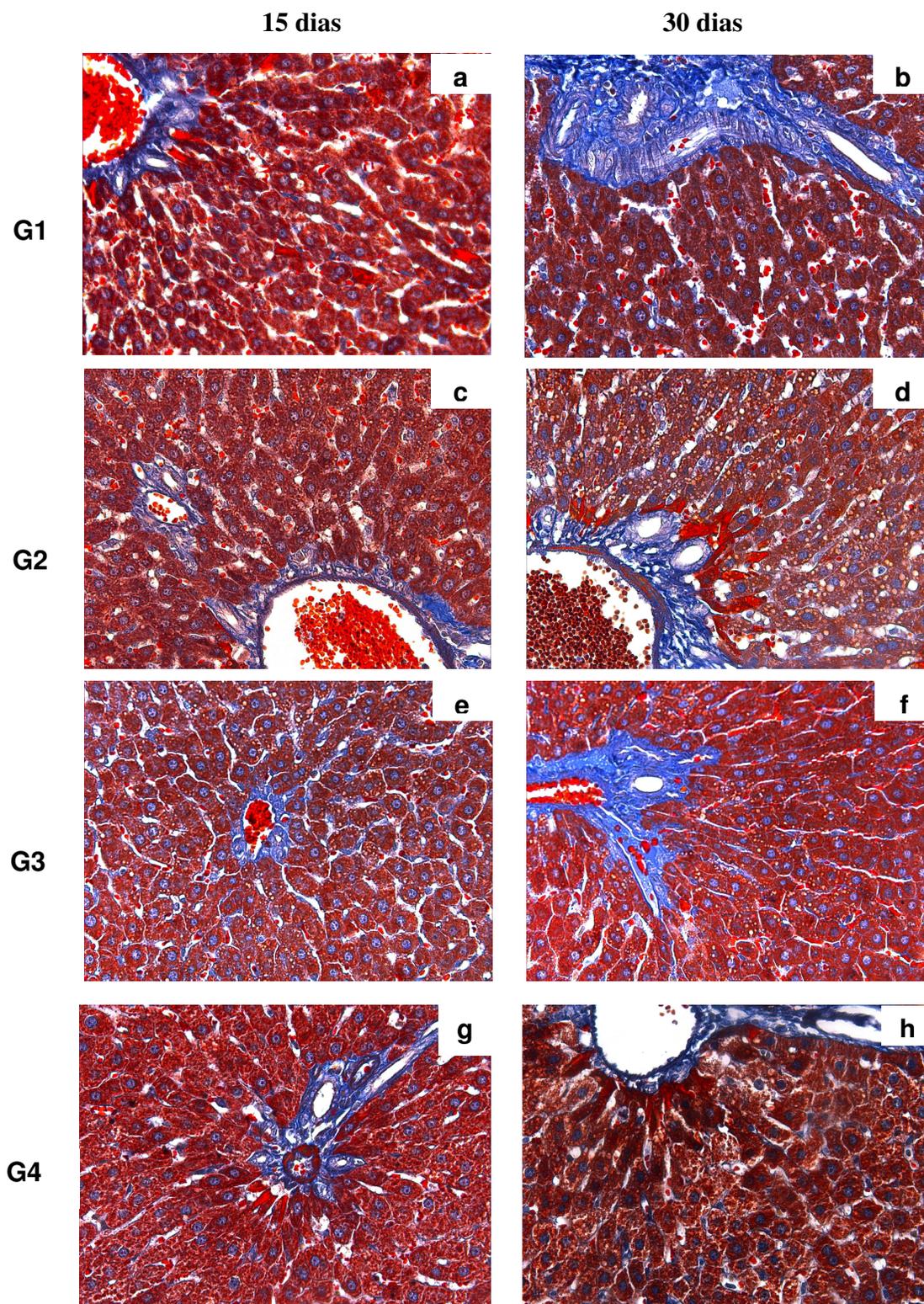
**Figura 54:** Secções dos fígados dos animais dos grupos controle (G1) e tratados por 30 dias com as três concentrações do (G2 – 100 mg/kg, G3 – 250 mg/kg e G4 – 500 mg/kg) de *Oncidium flexuosum* Sims. submetidas à citocuidmica com Periodic Acid Schiff.



**Figura 55:** Secções dos fígados dos animais dos grupos controle (G1) e tratados por 15 dias com as três concentrações do (G2 – 100 mg/kg, G3 – 250 mg/kg e G4 – 500 mg/kg) de *O. flexuosum* Sims. submetidas à citoquímica com azul de bromofenol.



**Figura 56:** Secções dos fígados dos animais dos grupos controle (G1) e tratados por 30 dias com as três concentrações do extrato (G2 – 100 mg/kg, G3 – 250 mg/kg e G4 – 500 mg/kg) de *O. flexuosum* Sims. submetidas à citoquímica com azul de bromofenol.



**Figura 57:** Secções dos fígados dos animais dos grupos controle (G1) e tratados por 15 e 30 dias com as três concentrações do extrato (G2 – 100 mg/kg, G3 – 250 mg/kg e G4 – 500 mg/kg) de *O. flexuosum* Sims. submetidas à citoquímica com Tricrômico de Mallory (400X).

---

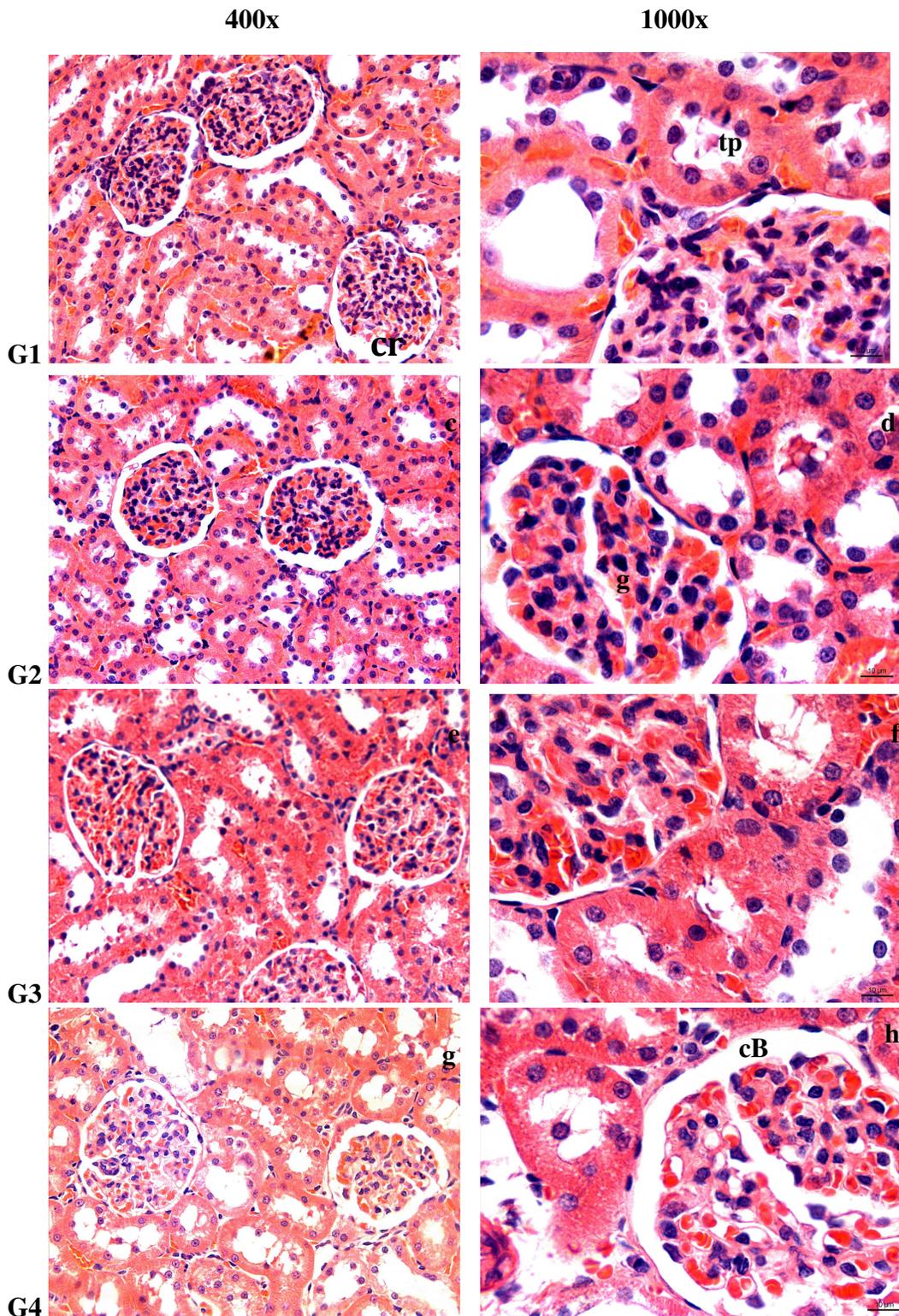
A análise da creatinina na urina dos animais revelou que houve variação nas concentrações, quando se compara os grupos tratados (4,2 a 7 mg/dL) com o controle (4 a 6 mg/dL) e os tempos de tratamento entre si. Em nenhuma situação, porém, a diferença foi significativa ( $p < 0,05$ ).

As figuras 58 e 59 apresentam as secções dos rins dos ratos após coloração com hematoxilina-eosina. As figuras 60 e 61 mostram secções submetidas à citoquímica de P.A.S. e a figura 64 apresenta secções submetidas à citoquímica de Tricrômico de Gomori. Nas colunas, são mostradas secções dos diferentes grupos (G1, G2, G3 e G4 respectivamente) e, nas linhas, as secções em aumento de 400 e 1000X, com exceção da figura 7 onde as secções estão em maior aumento.

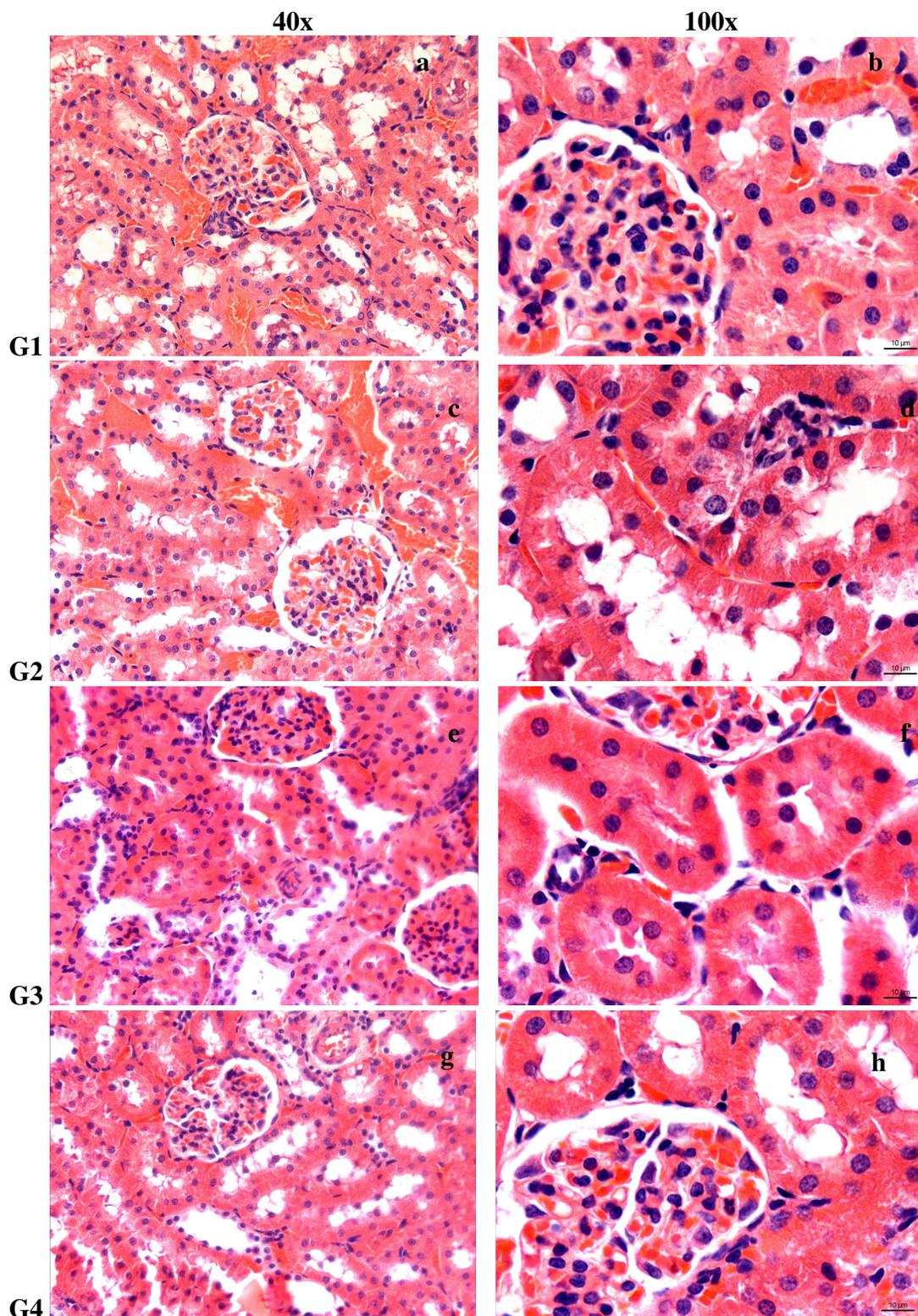
Em a e b (figura 58-62), podem ser observados os rins dos animais do grupo controle, que recebeu apenas água, evidenciando, na região cortical, os corpúsculos renais (cr), constituídos pela cápsula de Bowman (cB), com seus dois folhetos, e pelo glomérulo (g) onde são encontrados os capilares glomerulares envolvidos pelos podócitos e pelas células mesangiais. Podem ser observados, também, os túbulos contorcidos proximais (tp) revestidos internamente por epitélio simples cúbico, cujas células apresentam na superfície apical, proeminente borda em escova, evidenciada pelo PAS (figura 60,61b-seta).

A técnica de tricrômico de Gomori evidencia em azul a lâmina própria dos túbulos coletores (seta maior) e da cápsula de Bowman (seta menor) (figura 62).

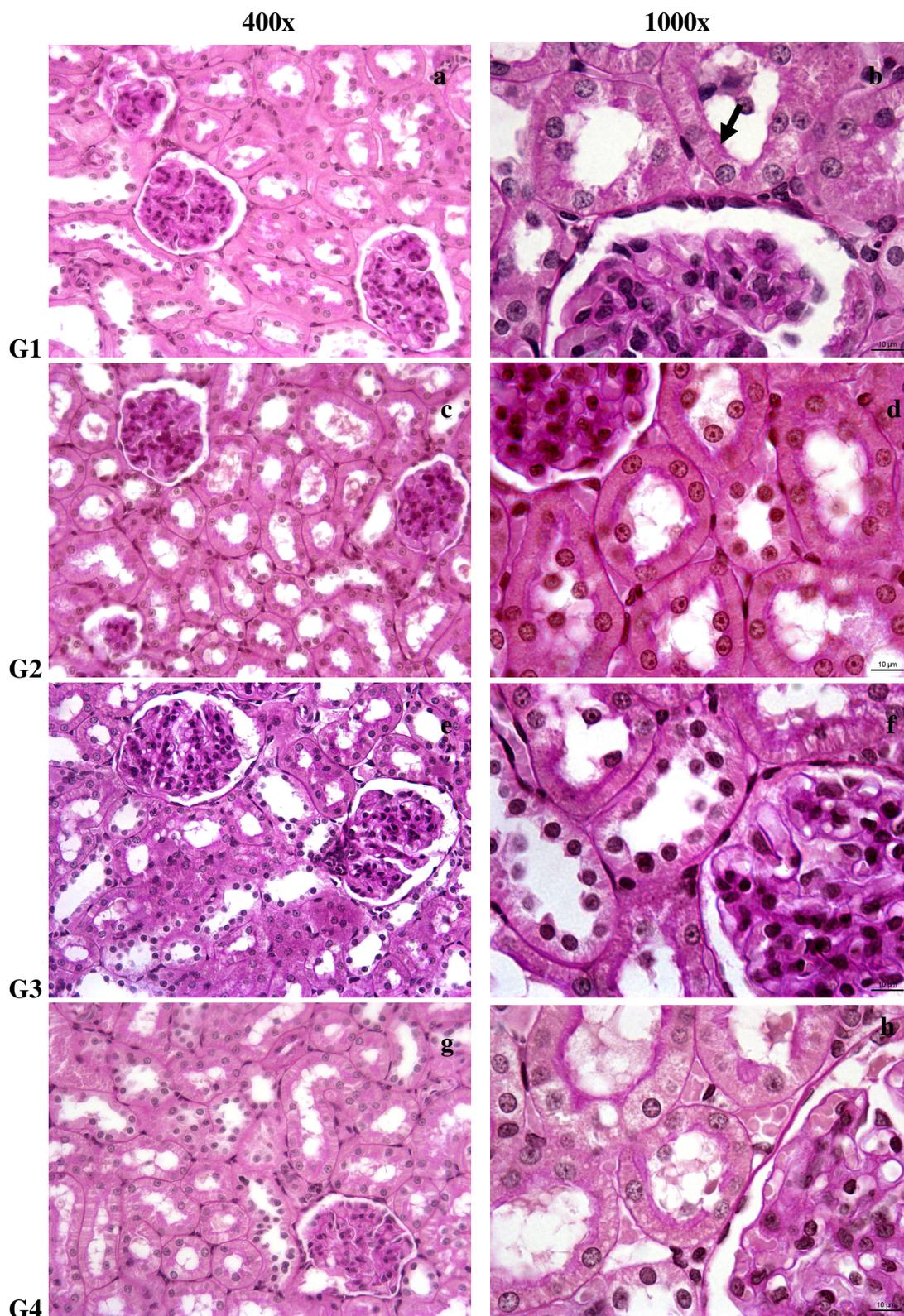
A citoarquitetura da região cortical dos rins dos animais tratados parece não diferir do grupo controle.



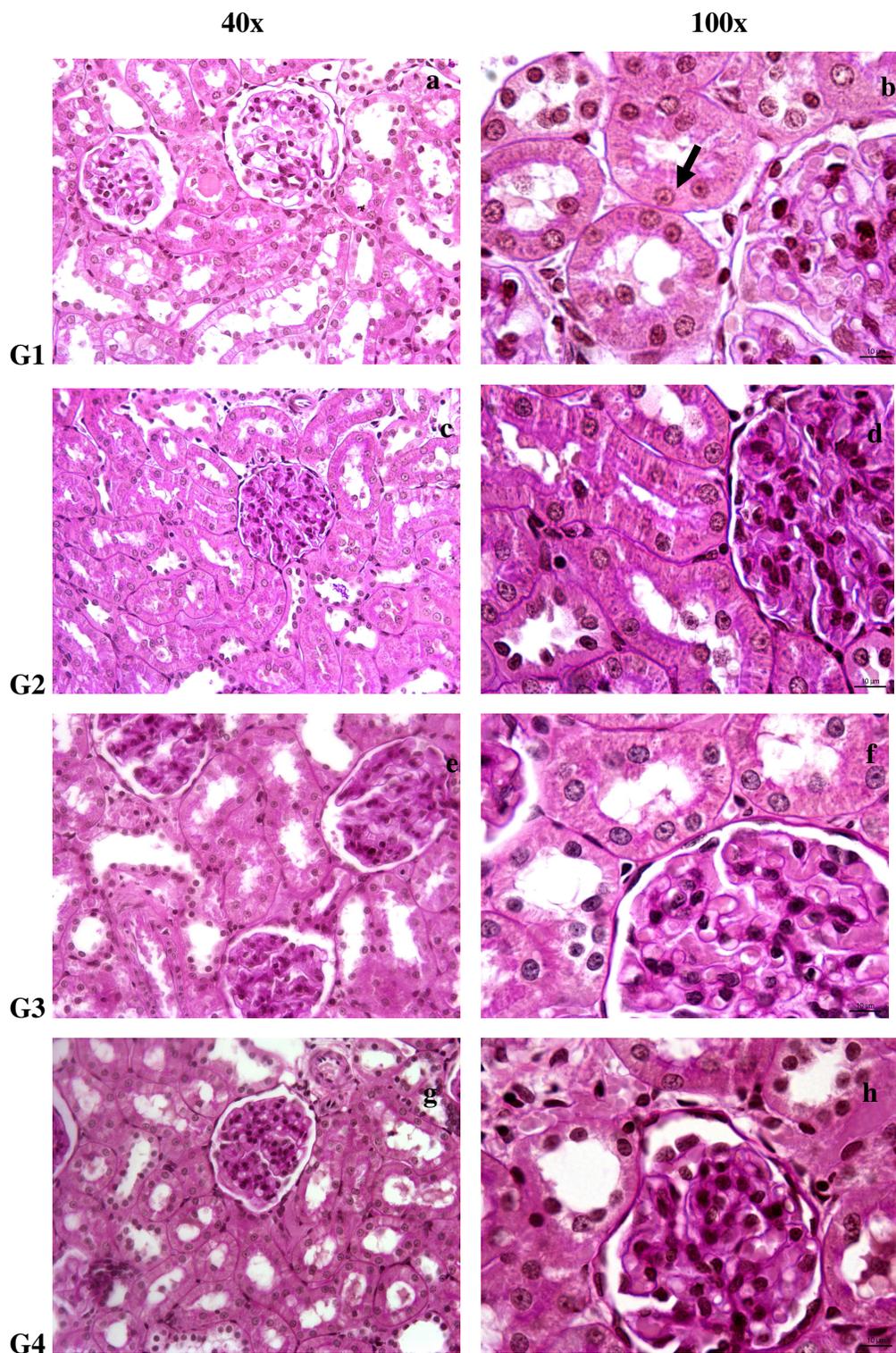
**Figura 58:** Secções histológicas de rim dos ratos *Wistar* dos grupos controle (G1) e tratados por 15 dias com as três concentrações do extrato (G2 – 100 mg/kg, G3 – 250 mg/kg e G4 – 500 mg/kg) de *O. flexuosum* Sims., coradas com Hematoxilina/Eosina. (tp-túbulo contorcido proximal, cr-corpúsculo renal, g-glomérulo, cB-cápsula de Bowman).



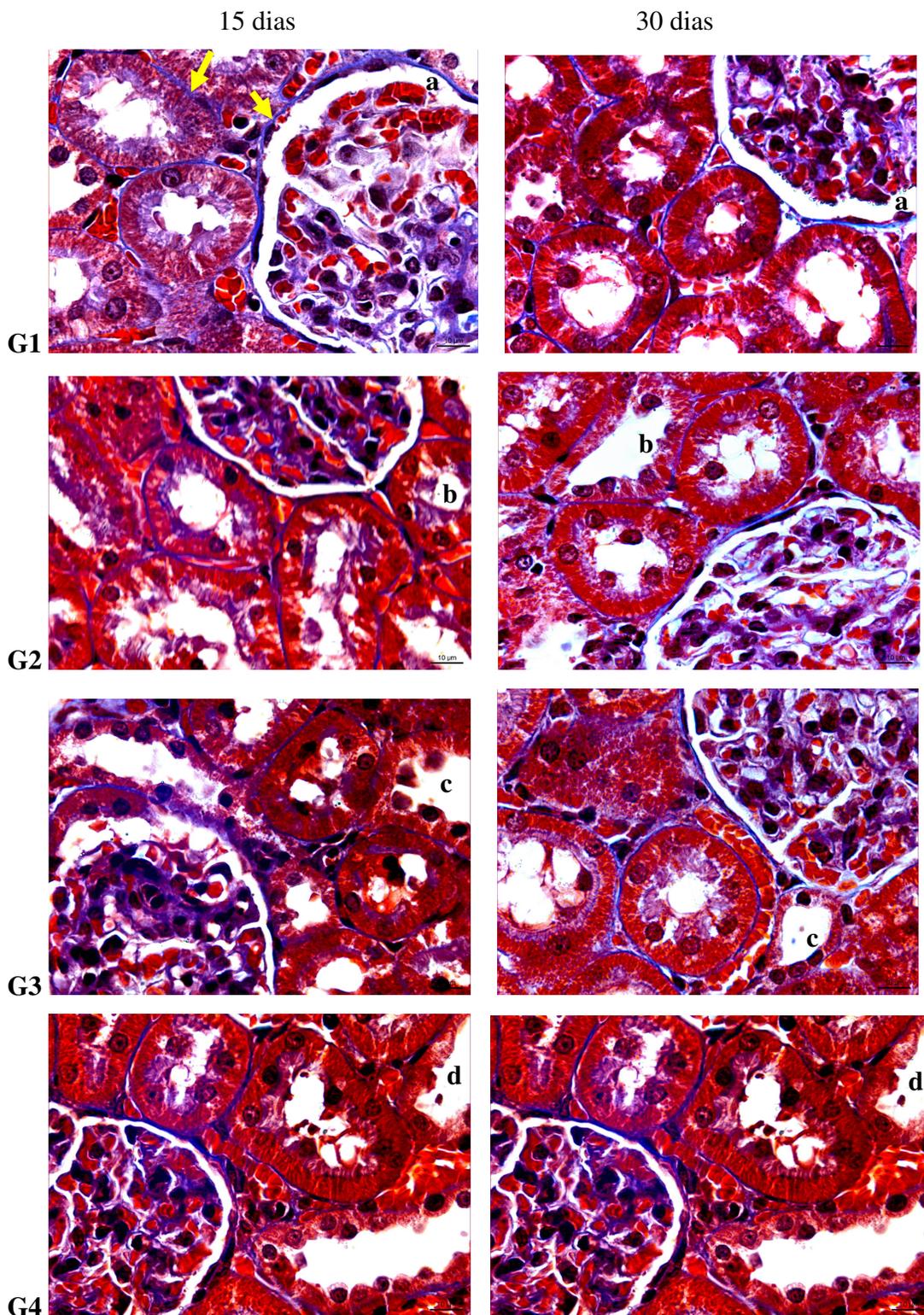
**Figura 59:** Secções histológicas de rim dos ratos *Wistar* dos grupos controle (G1) e tratados por 30 dias com as três concentrações do extrato (G2 – 100 mg/kg, G3 – 250 mg/kg e G4 – 500 mg/kg) de *O. flexuosum* Sims.), coradas com Hematoxilina/Eosina.



**Figura 60:** Secções histológicas de rim dos ratos *Wistar* dos grupos controle (G1) e tratados por 15 dias com as três concentrações do extrato (G2 – 100 mg/kg, G3 – 250 mg/kg e G4 – 500 mg/kg) de *Oncidium flexuosum* Sims., submetidas à citoquímica de PAS (seta-borda em escova).



**Figura 61:** Secções histológicas de rim de ratos *Wistar* dos grupos controle (G1) e tratados por 30 dias com extrato (G2 – 100 mg/kg, G3 – 250 mg/kg e G4 – 500 mg/kg) de *O. flexuosum* (EH), submetidas à citoquímica de PAS (seta-borda em escova).



**Figura 62:** Secções histológicas de rim dos ratos *Wistar* dos grupos controle (G1) e tratados por 15 e 30 dias com extrato (G2 – 100 mg/kg, G3 – 250 mg/kg e G4 – 500 mg/kg) de *O. flexuosum* Sims., submetidas à citoquímica com Tricrômico de Gomori (1000X).

---



## *Discussão*

---

## DISCUSSÃO

Esta pesquisa exploratória sobre as atividades biológicas e os principais constituintes químicos da espécie *O. flexuosum* é inédita. As análises fitoquímica e histoquímica permitiram a identificação de compostos fenólicos nas folhas desta espécie, tais como os flavonóides e os taninos.

A análise histoquímica das folhas da espécie *O. flexuosum* permitiu a identificação das suas principais características morfoanatômicas, e revelou que, como na maioria das orquídeas estudadas por Stern et al. (113), todas as folhas deste vegetal são hipostomáticas e possuem mesofilo homogêneo, formado por poucas camadas celulares, que não se apresenta diferenciado em parênquima paliçádico e lacunoso. As células da epiderme unisseriada são revestidas por cutícula lisa. O grau de espessamento da cutícula foi usado como caráter taxonômico por Rosso (114) que reconheceu na subfamília Cypripedioideae (Orchidaceae) gêneros com folhas plicadas e cutícula estreita e gêneros com folhas conduplicadas e cutícula mais espessa. Entretanto, segundo Withner et al. (115), o padrão de espessamento da cutícula é determinado pela exposição ao sol, sendo que folhas mais expostas tendem a exibir uma cutícula mais espessa nas duas faces.

Os estômatos ocupam nível superior em relação às células epidérmicas e, em geral, suas células-guarda possuem paredes espessadas e apresentam projeções cuticulares formando uma câmara supra-estomática. Segundo Rasmussen (116) e Bonates (117) e câmaras supra-estomáticas, que mantêm um pequeno compartimento de ar úmido, reduzindo a transpiração, são comuns em orquídeas epífitas que enfrentam altas temperaturas e pouca disponibilidade de água.

Nas folhas observa-se, adaxialmente, uma hipoderme formada por células aclorofiladas e maiores que as demais do mesofilo. Hipoderme de células desenvolvidas é freqüente nas Orchidaceae, tendo sido descrita para *Palumbina candida*, *Odontoglossum convallarioides* e *Odontoglossum egertonii* (118), para *Bulbophyllum andersonii* (119), para espécies de *Dresslerella* (120) e *Myoxanthus* (121), para determinadas *Bletiinae* (122) e para algumas *Zygopetalinae* (121,123). Segundo Madison (124), além de armazenar água, a hipoderme exerce um papel importante na economia de calor, especialmente nas epífitas com metabolismo CAM.

---

Os órgãos foliares aqui analisados exibem, em geral, caracteres que podem ser interpretados como adaptações à economia hídrica, elemento escasso no ambiente epifítico onde vive a espécie estudada. Todos eles são hipostomáticos, exibem estômatos com poro protegido por projeções e feixes vasculares envolvidos por fibras pericíclicas. Além disso, a espécie estudada possui pseudobulbos, que são eixos caulinares dilatados e funcionam como estruturas armazenadoras de água e reservas (125).

A planta *O. flexuosum* possui compostos fenólicos, tais como os flavonoides e os taninos, que foram observados pelas análises histoquímica e fitoquímica, o que indica uma possível atividade antioxidante. Para avaliar esta atividade foi inicialmente realizado o teste *in vitro* do DPPH. Este método consiste na utilização do 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH), no qual compostos antioxidantes reagem com o radical livre estável. A capacidade de sequestro do radical livre DPPH pelo extrato de uma planta é determinada pela habilidade de transferência de hidrogênio para este radical livre estável. A redução do DPPH é acompanhada pelo monitoramento do decréscimo da absorvância em comprimento de onda característico durante a reação. Em sua forma radical, o DPPH apresenta absorvância a 517 nm, mas sob redução por um antioxidante a absorvância desaparece (126,127). O extrato bruto (EH) de *O. flexuosum* apresentou um grande potencial para realizar este sequestro, indicado pela coloração da reação e comprovado na leitura da absorvância. Este resultado indica que o extrato possui razoável capacidade antioxidante *in vitro*.

A atividade antioxidante *in vitro* da FrT foi avaliada através dos métodos de DPPH e TBARs. A capacidade desta fração para seqüestrar o radical DPPH é menos eficiente do que a sua capacidade para inibir a peroxidação lipídica. A interação de uma espécie antioxidante com a molécula de DPPH depende, dentre outros fatores, da especificidade pela conformação estrutural do radical livre (128), portanto não se pode afirmar que esta fração possui baixa atividade antioxidante, esta é baixa frente a este radical. Por outro lado, a FrT pode apresentar sinergismo com outro componente do EH e isoladamente não foi tão eficaz.

Estudos recentes relatam que muitos terpenos possuem atividade antioxidante e também as substâncias fenólicas (129,130). Pillai et al. (131) descobriram o efeito protetivo da administração oral dos terpenos totais isolados dos frutos de *Ganoderma lucidum* (Fr) P.Karst contra a nefrotoxicidade causada pela cisplatina em camundongos, indicando atividade antioxidante *in vivo* significativa. No estudo de Kalogeropoulos et al. (132), extratos etanólicos de própolis, que são ricos em terpenos e flavonoides,

---

apresentaram atividades significantes antioxidante, antibacteriana e antifúngica.

O fato da fração FrT não ter apresentado bom potencial antioxidante diante do DPPH não impede que demonstre perfil antioxidante em outros tipos de testes dessa mesma atividade. Por isso, a FrT foi submetida à avaliação da atividade antioxidante perante o TBARs. Ao analisar os resultados obtidos por este método, que quantifica a substância MDA, produto final da oxidação dos ácidos graxos, como uma medida indireta da formação e ação de substâncias altamente reativas e oxidantes, foi observado um potencial antioxidante superior ao demonstrando no teste do DPPH, indicando que esta fração age diminuindo a peroxidação lipídica (133).

Pode-se ressaltar que mesmo em um volume maior do que 2000  $\mu$ L não há uma alteração significativa de inibição oxidativa, portanto volumes de 50  $\mu$ L são suficientes para a inibição do processo oxidativo no método de TBARs, não sendo necessárias concentrações elevadas para se obter o mesmo resultado.

A análise da atividade antioxidante diante do radical DPPH das frações obtidas pelo fracionamento ácido-base do EH mostrou uma diminuição significativa desta atividade em relação ao EH, indicando que possivelmente o extrato possui diferentes componentes exercendo essa atividade e que foram separados no fracionamento.

Diante do resultado positivo do EH no teste do DPPH, foi avaliada a ação antioxidante *in vivo* do EH pela quantificação dos parâmetros de avaliação da função hepática no plasma e no homogenato de fígado após a administração do EH e de dose tóxica de paracetamol.

O paracetamol é um fármaco metabolizado exclusivamente pelo fígado, mas dependendo da dose pode desenvolver lesão hepática, através de seu metabólito intermediário, resultante da biotransformação hepática. Na biotransformação desse fármaco, uma pequena parte da dose após N-hidroxilação mediada pelo citocromo P450, dá origem ao N-acetil-benzoquinonaimina, que é altamente reativo. Normalmente, este metabólito reage com grupo sulfidril da glutatona e é excretado como mercapturato. No entanto, após o uso de doses elevadas de paracetamol, ocorre saturação nas reações de conjugação com o ácido glicurônico e sulfato, fazendo com que este metabólito, ao consumir cerca de 70% de glutatona hepática, possa reagir com as proteínas hepáticas, através de ligação covalente, levando à necrose tecidual (134).

---

A uréia pode ser considerada um dos parâmetros bioquímicos da função hepática, pois é o maior produto do catabolismo protéico e dos aminoácidos (135). A biossíntese da uréia, a partir da amônia, é executada exclusivamente por enzimas hepáticas do ciclo da uréia (136).

Pode-se destacar que os baixos níveis de uréia plasmática são encontrados na presença de hepatopatias. O fígado lesado é incapaz de sintetizar uréia a partir do amônio resultante do metabolismo protéico, resultando na formação de amônia sanguínea (137).

A queda na produção de uréia nos animais tratados com paracetamol (Par) e, em contrapartida o bloqueio dessa queda nos animais tratados com o EH associado ao paracetamol (ParEx), quase atingindo o nível apresentado pelo grupo controle (Co), indica que o EH foi capaz de reverter com razoável eficiência o dano hepático induzido pelo paracetamol, sugerindo que este extrato possui atividade antioxidante *in vivo*.

As transaminases alanina e aspartato são enzimas que possuem um importante papel no metabolismo de proteínas e de carboidratos e amplamente distribuídas nos tecidos animais, predominantemente encontradas no fígado. Nas células hepáticas, 80% da AST (aspartato aminotransferase) localizam-se nas mitocôndrias, enquanto, a ALT (alanina aminotransferase) está predominantemente no citoplasma (90%); por esse motivo, são considerados parâmetros bioquímicos essenciais na avaliação da função hepática (138). As enzimas aminotransferases, quando elevadas, sugerem disfunção hepática, relacionada às lesões de destruição de tecidos ou alteração da permeabilidade celular (139) de maneira que o seu conteúdo intracelular é liberado na circulação local.

Ocorreu uma elevação dos níveis plasmáticos de AST dos animais tratados com paracetamol (Par) e uma tentativa de proteção ao hepatócito nos animais que receberam o EH concomitantemente com o paracetamol (ParEx), indicando a ação antioxidante deste extrato. A atividade da ALT se elevou após a administração do paracetamol, mas o EH não a modificou.

A fosfatase alcalina no fígado é predominantemente encontrada no trato biliar e, por isso, é um marcador para disfunção biliar. A FAL também é encontrada moderadamente elevada na maioria das icterícias decorrentes de lesões hepáticas (138). O aumento discreto na concentração da fosfatase alcalina nos animais tratados com

---

paracetamol (Par) e a diminuição dessa concentração nos animais tratados com paracetamol associado ao EH (ParEX) propõem uma proteção dos hepatócitos por este extrato.

A resposta do fígado a qualquer forma de obstrução biliar é sintetizar mais FAL, ou seja, o efeito é de uma indução enzimática. Os principais locais de síntese de nova enzima são os hepatócitos adjacentes aos canalículos biliares. Parte da enzima recentemente formada adentra na circulação, elevando o nível de enzima no soro (136).

É importante destacar a relação existente entre o citocromo P450 e a concentração de FAL plasmática. Os fármacos metabolizados pelo fígado, por exemplo, Paracetamol, ativam o citocromo P450 e a partir dessa metabolização ocorre a formação de produtos que são excretados pela bile, conseqüentemente acontece a elevação da FAL que é um marcador de função biliar (140).

A maioria das proteínas possui resíduos de cisteína (com grupamentos sulfidríla livres), que podem ser oxidados pela ação de radicais livres, desempenhando, portanto, um papel de proteção ao tecido. Dessa forma, a quantificação da concentração dos grupamentos sulfidríla no tecido fornece uma idéia do nível de ataque oxidativo a proteínas (140).

A liperoxidação é o processo através do qual as ERO agridem os ácidos graxos poliinsaturados dos fosfolípídeos das membranas das células, desintegrando-as e permitindo, desta forma, a entrada dessas espécies nas estruturas intracelulares (141). Um produto da LPO bem conhecido é o malondialdeído (MDA) (142,143), resultado final da degradação não enzimática de ácidos graxos poliinsaturados.

O MDA reage com o ácido tiobarbitúrico formando um complexo colorido que absorve luz a 535 nm. Com isso, quanto maior a concentração de MDA maiores são níveis de TBARS (substâncias que reagem com o ácido barbitúrico) que indicam um aumento da LPO (144).

Os animais tratados com paracetamol (Par) apresentaram maiores níveis de TBARS, enquanto os animais que receberam o EH associado ao paracetamol (ParEx) apresentaram menor índice, sugerindo possível proteção das membranas dos hepatócitos pela ação de

---

substâncias antioxidantes presentes neste extrato vegetal.

A partir dos resultados obtidos nesse trabalho, sugere-se que nas condições experimentais, houve lesão hepática induzida pela ação de radicais livres, causada pela administração do paracetamol em dose elevada. Esta lesão ficou documentada pela diminuição da uréia plasmática, pelo aumento na atividade plasmática das enzimas AST e FAL, pelo aumento de TBARS e pela diminuição de grupamentos sulfidrilas no homogenato de fígado.

Foi possível observar a proteção oferecida ao hepatócito pela ação antioxidante, possivelmente pela presença das substâncias fenólicas no EH da planta *Oncidium flexuosum*. Todos os resultados aqui apresentados indicam isso, porém devem ser destacados os resultados de diminuição da atividade plasmática da AST e a diminuição no TBARS no homogenato de fígado.

Estes efeitos possivelmente acontecem devido à presença de moléculas com capacidade antioxidante no EH, notadamente os flavonoides. Uma vez que estes componentes estão disponíveis no plasma sanguíneo, o seu metabolismo é mediado por enzimas do complexo citocromo P450. Muitos estudos têm sido realizados para se determinar a interação dos flavonoides com estas enzimas, os quais têm se mostrado excelentes inibidores de diferentes isoformas do complexo P450, em particular, CYP1A1 e CYP1A2 (144-147). Em todos os casos, a ação dos flavonoides sobre a atividade das isoformas de P450 leva à oxidação dos flavonoides (47,146,147).

As atividades antioxidante e quelante dos flavonoides são, provavelmente, os fatores mais importantes da sua ação protetora contra a degradação em tecidos e células por radicais livres (148). Além disso, eles atuam na diminuição da peroxidação lipídica, neutralizam os radicais livres nas células em diferentes níveis: na iniciação como seqüestrador de  $\bullet\text{O}_2^-$ , em reações com peroxil ou radicais peroxil lipídicos, e na formação de  $\bullet\text{OH}$ , provavelmente como quelante de ferro e na produção de peroxinitrito (149,150).

Os terpenos também podem estar envolvidos com a ação antioxidante do EH, protegendo contra a peroxidação lipídica. Segundo Pillai et al. (131), os terpenos da planta *Ganoderma* protegeram os rins dos animais tratados com cisplatina contra a peroxidação lipídica, prevenindo contra a nefrotoxicidade.

---

O gráfico concentração-resposta é uma das formas onde melhor se visualiza a atividade antiproliferativa das amostras testadas. Com esse tipo de gráfico, é possível verificar se a substância em questão possui efeito citostático (acima do ponto zero e abaixo de 50%), efeito citocida (abaixo do ponto zero) e/ou perfil concentração-dependente. O ponto zero do eixo das ordenadas representa a placa controle inicial (T0), valor que é comparado com a média da absorbância do controle final (T) que representa 100% de crescimento celular (após 48 horas de incubação e na ausência das amostras testadas) (151).

Por estes gráficos, foi possível observar que o EH e o ED, na concentração aproximada de 0,25 µg/mL, apresentaram atividade antiproliferativa seletiva para a linhagem K562, leucemia, e não provocou ação citocida, o que indica uma possível ação anti-cancerígena com menor toxicidade para as células sadias. Já, as frações FrT, acetato ácido e básica não foram capazes de inibir o crescimento celular das linhagens de células neoplásicas humanas testadas. A K562 é a única linhagem que cresce em solução, o que oferece uma superfície de contato maior. As demais crescem na forma de monocamada.

Classes de compostos fenólicos com propriedades antioxidantes também podem apresentar propriedades antimicrobianas, tais como flavonoides e taninos, o que demonstra que algumas substâncias antioxidantes que atuam sequestrando radicais livres também agem no combate a microorganismos (152). A ação antimicrobiana do extrato EH e da fração FrT foi analisada e não apresentou atividade antimicrobiana *in vitro* frente às bactérias *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus aureus resistente à oxacilina*, *Staphylococcus saprophyticus* e *Pseudomonas aeruginosa*. Porém, frente às leveduras *Candida albicans* e *Candida tropicalis*, a FrT apresentou atividade antifúngica, mas não diante da levedura *Candida krusei*. Segundo Simões et al. (91), a presença de compostos como flavonoides e taninos no EH pode explicar sua ação antifúngica frente a estas leveduras. Estes fatos mostram que a planta pode possuir atividade antimicrobiana seletiva, podendo agir frente a alguns tipos de microrganismos e outros não.

A utilização de extratos de plantas medicinais está se tornando cada vez mais promissora no controle de doenças. A pesquisa de novos agentes antifúngicos com menores efeitos colaterais advém das plantas, usadas na medicina popular, para tratamento de infecções fúngicas, nas quais os óleos e extratos obtidos há muito tempo têm servido de base para diversas aplicações terapêuticas (153,154). Dessa forma, os dados obtidos nesta pesquisa em relação às leveduras podem servir como guia na seleção de plantas com atividades antifúngicas de futuros trabalhos, na perspectiva de uma possível aplicação terapêutica desses produtos.

---

Evidências clínicas mostram que a restauração dos tecidos conectivos, dérmicos e subdérmicos, pode ser acelerada pela aplicação externa de uma corrente elétrica de baixa intensidade. A estimulação elétrica através de microcorrente é denominada bioestimulação, pois é considerada como uma estimulação compatível aos valores das correntes endógenas que agem no organismo em nível celular. Esta estimulação interage no processo de reparo tecidual, acelerando a cicatrização e melhorando a qualidade do tecido cicatricial (155-159).

Nesse estudo, foi observado que a aplicação da microcorrente foi eficaz no processo cicatricial, mostrando efeitos positivos na área de tecido neoformado, número de fibroblastos, número de vasos neoformados e espessura do epitélio. Basset (160), Markov e Colbert (161), Sheffet et al.(162), Kloth (71) observaram que correntes elétricas de baixa intensidade estimulam a cicatrização. Também diferentes autores registraram variações do metabolismo celular, enquanto outros encontraram proliferação de fibroblastos, neovascularização e deposição de colágeno na região do tecido lesado, após a utilização de microcorrente (163-166).

A aplicação do EH promoveu efeito na primeira fase do processo cicatricial. Diferentes estudos têm mostrado a eficiência de fitoterápicos no reparo de lesões teciduais (167-171). Entre os componentes fitoquímicos que têm se mostrado eficazes nesse processo, estão os flavonoides e os taninos, que estão presentes no EH, possuem uma marcante relação com a atividade antiinflamatória e ação no reparo tecidual. Além disso, exercem atividade antioxidante e antibacteriana por interagirem com ampla variedade de sistemas enzimáticos e bioquímicos (76,172-175). A presença destes componentes na família Orchidaceae é bastante conhecida (176). Nayak et al. (177) observaram um potencial de reparo após a aplicação tópica do extrato de uma orquídea epífita *Vanda roxburghii* R.Br. (Orchidaceae) em lesões efetuadas cirurgicamente em ratos *Wistar*.

A ação combinada da aplicação de microcorrente e do extrato EH apresentou vantagem em todos os parâmetros estudados quando comparado com o controle e os demais tratamentos. Também outros autores (167-169) observaram os efeitos da aplicação simultânea de agentes físicos e fitoterápicos em lesões teciduais e demonstraram que esse tipo de tratamento é eficaz tanto na reparação cutânea como na redução do processo inflamatório.

---

Enfim, o EH possui princípios ativos que permitiram a evolução do processo de cicatrização de forma mais eficaz no reparo das lesões, quando aplicado simultaneamente à microcorrente, sugerindo a ação sinérgica entre esses agentes. E, isoladamente, atua principalmente no início do processo cicatrizante.

Os fibroblastos estão envolvidos com a segunda fase do processo cicatricial, na qual é intensificada a migração e a ativação de fibroblastos. Essas células são os principais componentes do tecido de granulação. Após a influência dos fatores de crescimento e demais mediadores, derivados, principalmente, mas, não exclusivamente, dos macrófagos, são ativadas e migram das margens da ferida para o seu centro. Com o aumento do número de fibroblastos ativados para a produção de colágeno no local, a matriz extracelular começa a ser substituída por um tecido conjuntivo mais forte e mais elástico. Este processo é denominado de fibroplasia e para a sua eficiência é necessária a ocorrência em paralelo da formação de novos vasos sanguíneos, ou seja, é necessária a neovascularização da região (178).

Os extratos EH e EBZ e também a FrT estimularam o crescimento de fibroblastos de forma concentração dependente, mas o EH apresentou maior atividade, com CE50 menor que 0,25µg/ml. Esse resultado mostra que este extrato possui alto potencial cicatrizante, melhor do que o resultado obtido com o controle positivo, a alantoína, que apresentou CE50 de 2 µg/ml.

Os testes de atividade antiulcerogênica além de avaliar possíveis agentes para tratamento de gastrite e úlcera gastroduodenal podem também ser utilizados para teste de agentes cicatrizantes (179). A capacidade do EH na cicatrização interna foi avaliada no teste de atividade antiulcerogênica e apresentou resultados promissores, atingindo um índice de inibição da formação de úlceras gástricas de 89,5%, semelhante ao resultado do controle positivo de carbenoxolona que foi de 90,8%. A DE50 foi de 414,70mg/Kg.

Portanto, o extrato EH possui, principalmente, ações antioxidante e cicatrizante, concordando com o relato de Houghton et al. (180), se o composto apresentar potencial antioxidante pode ser um bom agente terapêutico para acelerar o processo cicatricial. Possivelmente, os flavonoides devem estar envolvidos com estas ações, pois eles interferem em alguns processos fisiológicos do organismo, como a absorção de ferro e de vitaminas, e estimulam a cicatrização. Além de agirem como antioxidantes, combatendo os radicais livres, possuem atividade antimicrobiana, antiinflamatória, analgésica, regenerativa de

---

cartilagens, ossos e produzem vasodilatação (181).

Considerando o tratamento dos ratos de 15 dias com o EH, foi verificado, pelas análises de danos oxidativos que a atividade da ALT nos animais tratados não foi estatisticamente diferente ( $p > 0,05$ ) daquela encontrada nos animais não tratados (controle).

A alanina aminotransferase (ALT) é uma enzima presente predominantemente no fígado (182). Assim, qualquer lesão com destruição celular desse tecido, provoca considerável aumento dessa enzima no sangue, o que a torna um excelente marcador de necrose celular (183). Ainda nesse sentido, Kubena et al. (184) relataram que o aumento da atividade da ALT é considerado indicador da alta sensibilidade da disfunção/lesão e inflamação hepática e lesão ou obstrução dos ductos biliares, portanto o EH não provocou esta disfunção.

Os resultados relacionados com a atividade da ALT estão de acordo com os resultados observados nas análises histológicas dos fígados, que indicaram não haver áreas de necrose que justifiquem o extravasamento da enzima para o sangue periférico. Porém, após esse mesmo período de tratamento, foi observado aumento significativo no inchamento das mitocôndrias isoladas dos fígados de ratos tratados com as três concentrações do extrato. Esses resultados sugerem danos na membrana das mitocôndrias hepáticas decorrente do uso deste extrato.

O inchamento mitocondrial é um fenômeno patológico iniciado pela abertura de um poro de transição de permeabilidade de alta condutância na membrana mitocondrial interna. Em condições fisiológicas, a membrana mitocondrial é impermeável a todos os solutos, exceto aqueles que possuem transportadores específicos. Quando o poro de transição de permeabilidade é aberto, todos os solutos com peso molecular abaixo de 1.500Da difundem-se de maneira não seletiva para o interior da mitocôndria. Como consequência da despolarização induzida pela transição de permeabilidade mitocondrial (TPM), ocorre desacoplamento da fosforilação oxidativa, acentuado intumescimento mitocondrial, que posteriormente causa redução do conteúdo de ATP e morte celular (185).

A transição de permeabilidade da membrana mitocondrial pode ser induzida por  $Ca^{2+}$ , fosfato inorgânico, desacopladores da fosforilação oxidativa (através da alteração do potencial de membrana), espécies reativas de oxigênio, através da oxidação de grupamentos

---

sulfidrilas de proteínas da membrana mitocondrial, ácidos biliares hidrofóbicos, algumas drogas, inibidores do carreador ADP/ATP. É cada vez mais evidente que a TPM é um evento importante durante uma variedade de formas tóxicas, hipóxicas e oxidativas de dano celular, bem como a apoptose. Esse evento pró-apoptótico pode causar danos à função mitocondrial, associado ou não ao estresse oxidativo (185).

Em nosso estudo, observamos que o inchamento mitocondrial não foi causado por danos oxidativos, uma vez que a quantificação de grupos sulfidrilas, dos níveis de MDA e da atividade da catalase não apresentou nenhuma alteração significativa em relação ao grupo controle. Contudo, após o tratamento com a concentração de 250 mg/kg/dia, foi possível observar hiperemia, que evidencia processo inflamatório e, na maior concentração, de 500mg/kg/dia, hipertrofia e vacuolização dos hepatócitos, característicos de degeneração tecidual. Alterações hepáticas caracterizadas por aumento citoplasmático (vacuolização) e dilatação dos capilares sinusóides são descritas por Roman et al. (186) como sinalizadoras de lesão tecidual decorrente do tratamento de camundongos com a combinação dos praguicidas ácido 2,4 diclorofenoxiacético e glifosato, o que evidencia a toxicidade desse composto.

Esses achados se repetiram após 30 dias de tratamento nas duas concentrações citadas anteriormente, sendo que na mais alta houve aparecimento de células com pseudo-eosinofilia e picnose, sugerindo hiperqueratinização e posterior morte celular, provavelmente, por apoptose, pois não foi observada nenhuma área de necrose tecidual. Há indicações na literatura de que, na apoptose, o citoplasma dos hepatócitos torna-se condensado e densamente eosinofílico, e o núcleo sofre picnose, cariorréx ou cariólise, chegando até mesmo a desaparecer totalmente. Essa observação corrobora os dados das análises enzimáticas em que não houve alteração significativa na atividade da ALT, normalmente aumentada em casos de necrose, mas que ocorre modificação na permeabilidade da membrana mitocondrial dos hepatócitos, que pode responder pela indução de apoptose (187).

O tratamento com 500 mg/kg/dia por 15 dias induziu aumento na secreção de proteínas como mostrado pela citoquímica com azul de bromofenol e acúmulo aumentado de glicogênio na região centrolobular. Esses mesmos achados foram observados após tratamento por 30 dias nas concentrações de 250 e 500 mg/kg/dia. Essas observações demonstram uma resposta celular, induzida pelo extrato em estudo, sobre a secreção e o acúmulo de biomoléculas.

---

O acúmulo de glicogênio observado nos animais tratados sugere uma diferença na forma que ele está sendo disponibilizado em relação aos animais do grupo controle, ou seja, que pode ter havido um dano celular que impede a liberação de glicose no sangue. Buscando entender os mecanismos que poderiam responder por esse fenômeno, levantamos duas suposições.

O extrato utilizado nesse estudo pode apresentar componentes que sejam capazes de induzir deficiência de glicose-6-fosfatase, uma enzima encontrada no retículo endoplasmático dos hepatócitos, que participa dos processos de gliconeogênese e glicogenólise, causando acúmulo de glicogênio no seu interior e induzindo à apoptose. Situação semelhante foi descrita por Sun et al. (188), no caso da doença genética de Von Gierke, uma disfunção genética caracterizada por intenso acúmulo de glicogênio no fígado, rins e mucosa intestinal, em que essa enzima encontra-se reduzida, os níveis de glicemia são baixos e há comprometimento orgânico pela perda de células por apoptose.

Outra possibilidade é que a apoptose seja induzida por deficiência de ATP. De acordo com Wu et al. (189), um produto natural conhecido por floretina, encontrado em maçãs e peras e reconhecido por prevenir câncer e doenças crônicas, apresenta capacidade de impedir o crescimento de células transformadas por induzi-las à apoptose. O grupo sugere que esse composto impede a entrada de glicose no interior das células hepáticas humanas, através dos transportadores de membrana (GLUTs) e, com isso, ocorre diminuição de ATP (adenosina-trifosfato) no interior das células. Esse evento, ou seja, a redução de ATP constitui um importante mecanismo de apoptose, pois poderá ativar vias extrínsecas, como a ativação da caspase 8, e vias intrínsecas, pela diminuição do potencial de membrana mitocondrial que, via citocromo-c, ativa a caspase 9. Tanto a caspase 8 como a 9 ativarão a caspase 3, que induzirá à morte celular.

Nossos resultados mostraram que as células dos animais tratados por 15 dias com o extrato EH, em todas as concentrações, tiveram inchamento mitocondrial evidenciando dano na membrana dessa organela que pode estar diretamente relacionado com o processo apoptótico.

A redução dos níveis de ATP poderia afetar também a atividade da enzima glicogênio-fosfatase, que atua na disponibilização do glicogênio e que é ativada por fosforilação através de quinases, que são dependentes de ATP (190). Isso porque, na falta ou redução dos níveis de ATP, a glicogênio-fosfatase permanecerá inativa e, com isso, não

---

haverá quebra do glicogênio que será acumulado no interior da célula (191). Um dos componentes encontrados no extrato em estudo, como mencionado anteriormente, são os flavonoides. Na literatura existem algumas referências da ação desses compostos nos transportadores de glicose (GLUTs) e que poderiam explicar nossos resultados.

Cao et al. (192) realizaram um estudo sobre os efeitos do extrato de chá verde, rico em polifenóis e utilizado como anti-inflamatório, antidiabético e antiobesidade, na expressão de genes da família dos GLUTs e das vias de sinalização da insulina, e verificaram que esse extrato, quando utilizado em 1 a 2g/kg/dia, regula a expressão desses genes em ratos alimentados com dieta rica em frutose.

Genisteína e daidizeína são isoflavonas conhecidas por inibir o transporte de glicose mediado por GLUTs, através da membrana plasmática em células de mamíferos. Um estudo realizado em lisossomos de fígados de ratos evidenciou que ambas são inibidoras de transporte de glicose lisossomal e sugerem que esse mecanismo ocorre por interação direta da genisteína com o transportador com maior probabilidade do que por mediação da inativação da tirosina quinase (193).

Os resultados permitem identificar que a resposta do fígado, decorrente da ingestão do EH, é dose-tempo-dependente, pois as alterações histopatológicas surgiram em tempo menor na maior concentração e em tempo maior, a partir da concentração intermediária, salientando o cuidado para o seu uso crônico e em doses não preconizadas.

Difundida pelo mundo, encontra-se a antiga crença de que tudo o que é natural é saudável, não oferecendo riscos a saúde, levando ao consumo de produtos naturais por períodos prolongados e em doses não determinadas, sem o devido cuidado e sem a informação de que a diferença entre o remédio e o veneno pode estar, simplesmente, na dose utilizada (3).

Nos dias atuais, o estudo sobre as plantas para fins medicinais está muito difundido, principalmente nas faculdades de farmácia, pois até hoje o potencial de cura da flora brasileira não foi muito bem explorado (195). Sendo assim, existe um crescente avanço nas pesquisas e, conseqüentemente, nos trabalhos científicos sobre as plantas, sua composição e sua ação terapêutica, bem como a melhor forma galênica de apresentação e de utilização (196).

---

Segundo Bagnis et al. (197), uma vez que as plantas contêm compostos farmacologicamente úteis e ativos, provavelmente também contêm substâncias tóxicas. Vários fatores, tais como, a captação ativa das células tubulares e a alta concentração de moléculas no interstício medular tornam os rins particularmente vulneráveis a substâncias tóxicas. Portanto, a Fitoterapia pode constituir a origem da lesão renal ou, de maneira inversa, um risco para os pacientes renais. Por exemplo, eles podem conter quantidades subestimadas de potássio, interagir com fármacos utilizados para o tratamento de insuficiência renal ou possuir propriedades vasoconstritoras.

Existem muitos relatos na literatura correlacionando a ingestão de extratos de plantas e danos renais. Sokar et al. (198) realizou um estudo histopatológico em animais sobre o efeito da administração oral do extrato alcoólico de *Herniaria cinerea*, utilizada na região de Marrocos no tratamento de cálculo renal, que revelou o aparecimento de lesões muito graves no aparelho urinário como hemorragia, extensas áreas de degeneração tubular no parênquima e necrose de estruturas tubulares. O túbulo proximal é a porção do néfron com grande sensibilidade aos efeitos tóxicos de substâncias químicas. Constitui um sistema transportador de ânions orgânicos, uma importante defesa contra os efeitos tóxicos de substâncias aniônicas, controlando a ação de drogas e tóxicos ambientais.

Segundo Lee e Chen (199), 75% da população do mundo, principalmente nos países em desenvolvimento, usam as plantas para seus cuidados básicos de saúde e, por isso, o conhecimento sobre seus efeitos adversos tornou-se mais importante. Preparados botânicos raramente apresentam descrição da composição, atividade biológica, recomendação de doses e prescrição de uso.

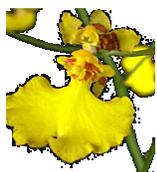
Sendo assim, testes dos mais diversos tipos devem ser realizados com extratos das diferentes plantas de interesse, antes de propagar o seu uso, a fim de assegurar a confiabilidade dos mesmos, garantir os benefícios que podem advir da utilização e minimizar ao máximo os possíveis efeitos adversos.

Em nosso estudo foram realizadas análises histológicas e de quantificação de creatinina na urina de ratos *Wistar* tratados com o EH, em três diferentes concentrações, e por períodos de 15 e 30 dias, ou seja, em uso crônico. Nessas condições, os rins dos animais parecem não ter sofrido dano morfológico e funcional, não apresentando nenhuma das alterações características de injúria tubulointersticial renal, que é o evento pivô na progressão de doença renal crônica. Estas características são acúmulo de matriz

---

extracelular, atrofia tubular e obliteração de capilares peritubulares intersticiais (200).

Como citado anteriormente, na composição do extrato EH foram encontrados flavonoides e taninos. Os primeiros são conhecidos pelo seu potencial antioxidante e, talvez, essa atividade proteja os rins de algum tipo de dano citotóxico. Todavia, deve ser enfatizado que os flavonoides e os taninos não são inofensivos e podem, quando utilizados de forma não controlada, induzir dano renal (199).



*Considerações finais*

---

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

- ☼ As análises fitoquímicas e histoquímica revelam que as folhas da espécie vegetal *Oncidium flexuosum* possuem, entre os seus constituintes, substâncias fenólicas, tais como os flavonóides e os taninos, e também cumarinas, triterpenos e esteróides.
  
- ☼ O EH possui atividade antioxidante *in vitro* diante do radical livre DPPH e o fracionamento deste extrato diminui esta atividade, mostrando que deve haver sinergismo entre as substâncias do extrato.
  
- ☼ A FrT não possui atividade antioxidante *in vitro* diante do radical livre DPPH, mas apresenta tal atividade diante do TBARS.
  
- ☼ O EH possui atividade antioxidante *in vivo*, pois protegeu o fígado dos animais tratados com dose tóxica de paracetamol.
  
- ☼ O EH apresentou atividade antiulcerogênica.
  
- ☼ As análises macroscópica e microscópica das áreas cicatriciais, após dez dias de tratamento da área lesionada do dorso do rato, mostram um efeito cicatrizante significativo do EH associado à microcorrente. Este efeito também é indicado pela ação deste extrato na proliferação de fibroblastos *in vitro* e colágeno *in vivo*.
  
- ☼ A FrT e o EBZ também estimulam a proliferação de fibroblastos, mas com menor potência que o EH.
  
- ☼ Na avaliação da atividade antiproliferativa, o EH e o ED mostraram ação citostática seletiva para a linhagem K562, leucemia, e não houve ação citocida. O EBZ apresentou ação citocida na maior dose testada para todas as linhagens celulares, mas não mostrou ação citostática.

- 
- ⊗ A fração acetato foi capaz de inibir o crescimento celular da linhagem UACC62, melanoma, das células neoplásicas humanas, apresentando um efeito citostático para tal linhagem. Na maior dose testada apresentou efeito citocida.
  
  - ⊗ As frações FrT, acetato ácida e básica não foram capazes de inibir o crescimento celular das linhagens de células neoplásicas humanas testadas.
  
  - ⊗ O extrato EH e a fração FrT não apresentaram atividade antimicrobiana *in vitro* frente as bactérias testadas. Porém, frente às leveduras *Candida albicans* e *Candida tropicalis*, o EH apresentou atividade antifúngica, mas não diante da levedura *Candida krusei*. A FrT não demonstrou possuir atividade antifúngica diante destas leveduras testadas.
  
  - ⊗ O EH não foi capaz de induzir danos oxidativos hepáticos nos animais, mas tem potencial hepatotóxico, causando inflamação e degeneração tecidual dose-tempo-dependente.
  
  - ⊗ A análise histopatológica dos rins e a quantificação dos níveis de creatinina na urina de ratos tratados com o EH revelaram que não houve indução de danos na citoarquitetura e na função renal dos animais.





## *Referências Bibliográficas*

---

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Vilela JD. Mummification and medicine in ancient Egypt. *Rev Paul Med.* 1977 Mai-Jun; 89(5-6):115-24.
2. Pinto AC, Silva DHS, Bolzani VS, Lopes NP, Epifanio RA. Produtos naturais: atualidade, desafios e perspectivas. *Quim Nova.* 2002 Mai; 25(1): 45-61.
3. Ferro D. *Fitoterapia: conceitos clínicos.* São Paulo: Editora Atheneu; 2008.
4. Leite JPV. *Fitoterapia: bases científicas e tecnológicas.* São Paulo: Editora Atheneu; 2009.
5. Di Stasi LC. *Plantas medicinais: arte e ciência. Um guia de estudo interdisciplinar.* São Paulo: Editora Unesp; 1996.
6. Wagner H, Wisenauer M. *Fitoterapia: Fitofármacos e aplicações clínicas.* 2. ed. São Paulo: Pharmabooks; 2006.
7. World Health Organization. *Traditional Medicine* [on-line] 2008 [Acesso em 2 de out de 2010]. Disponível em: URL: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs134/en/>
8. Brasileiro BG, Pizziole VR, Matos DS, Germano AM, Jamal CM. Plantas medicinais utilizadas pela população atendida no “Programa de Saúde da Família”, Governador Valadares, MG, Brasil. *Rev. Bras. Cienc. Farm.* 2008; 44(4): 629-636.
9. Hamburger M, Marston A, Hoostettmann K. Search for new drugs of plant origin. *Advances in Drug Research.* 1991; 20:167-169.
10. Simões CMO et al. *Farmacognosia da Planta ao Medicamento.* 5 ed. Porto Alegre/Florianópolis: Ed. Universidade UFRGS/ Ed. Da UFSC; 2004.
11. Newman DJ, Cragg GM. Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. *J. Nat. Prod.* 2007 Fev; 70(3):461-477.
12. Barbosa WLP, Sole WB. Etnofarmacêutica: uma abordagem de plantas medicinais pela perspectiva das ciências farmacêuticas. *Revista Brasileira de Farmácia.* 1996; 77(3):82-84.
13. Maciel MAM, Pinto AC, Veiga Jr VF, Echevarria NFGA. Plantas medicinais: A necessidade de estudos multidisciplinares. *Quim. Nova.* 2002 Mai; 25(3):429-438.
14. Yunes RA, Calixto JB. *Plantas Medicinais sob a ótica da moderna química medicinal.* Chapecó: Argos Editora Universitária; 2001.
15. Marques LC, Paris CAM. Pesquisa em Fitoterapia: Cenário Atual e Tendências. *Revista Fármacos e Medicamentos.* 2004 Mai/Jun; 28:28-32.

- 
16. Halliwell B, Gutteridge JMC. Free radicals in biology and medicine, Claredon press, oxford; 1991.
17. Barreiros ALBS, David JM, David JP. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. *Química nova*. 2006; 29(1): 113 – 123.
18. Kumar PS, Sucheta S, Deepa VS, Selvamani P, Latha S. Antioxidant activity in some selected Indian medicinal plants. *African Journal of Biotechnology (Short communication)*. 2008; 7 (12):1826-1828.
19. Esterbauer H, Gebicki J, Puhl H, Jürgens G. The role of lipid peroxidation and antioxidants in oxidative modification of LDL. *Free Radical Biol. Méd.* 1992; 13: 341–390.
20. Chirico S, Smith C, Marchant C, Mitchinson MJ, Halliwell B. Lipid peroxidation in hyperlipidemic patients. A study of plasma using a HPLC- based thiobarbituric acid test. *Free Radical Res. Comm.* 1993; 19(1): 51-57.
21. Moriel T, Okawabata FS, Abdalla DSP. Oxidized lipoproteins in blood plasma: possible marker of atherosclerosis progression. *Life*. 1999; 48: 413-417.
22. Chisolm GM, Steinberg D. The oxidative modification hypothesis of atherogenesis: a overview. *Free Radicals Biol. Méd.* 2000; 28(12): 1815 – 1826.
23. Halliwell B, Gutteridge JMC. Role of free radicals and catalytic metal íons in human disease: na overview. *Methods Enzymology*. New York. 1990; 86: 1-85.
24. Ferreira ALA, Matsubara LS. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. *Revista da Associação Médica Brasileira*. 1997; 43(1): 61-68.
25. Abdalla DSP. Radicais Livres e Antioxidantes. In: OGA,S. *Fundamentos de Toxicologia*. São Paulo: Atheneu Editora de São Paulo; 1996.
26. Halliwell B, Gutteridge JC. *Free Radicals in Biology and Medicine*. 3 ed. Oxford, New York; 2000.
27. Gandra PG, Macedo DV, Alves AA. Fontes de espécies reativas de oxigênio na musculatura esquelética durante o exercício. *Revista Brasileira de Ensino de Bioquímica e Biologia Molecular*. Biblioteca Digital de Ciências. 2006 Abr; 3(2). Disponível em: <<http://www.ib.unicamp.br/lte/bdc/visualizarMaterial.php?idMaterial=233>>. Acesso em: 16 nov. 2010.
28. Sies H. Biochemistry of oxidative stress. *Angew Chem. Int. Ed. Engl.* 1986; 25:1058-1071.

- 
29. Halliwell B, Gutteridge JMC. Free Radicals in Biology and Medicine. 3 ed. Oxford:Oxford University Press; 1999.
30. Benzie IF. Lipid peroxidation: a review of causes, consequences, measurements and dietary influences. *Int. J. Food Sci. Nutr.* 1996; 47(3):233- 261.
31. Vaca CE, Wilhelm J, Harms-Ringdahl M. Interaction of lipid peroxidation products with DNA. A review. *Mutat. Res.*1988; 195(2):137-149.
32. Barber AD, Harris SR. Oxygen free radicals and oxidants: a review. *Amer. Pharm.* 1994; 34(9): 26-35.
33. Wagner BA, Buettner GR, Burns CP. Free radical-mediated lipid peroxidation in cells: oxidizability is a function of cell lipid bis-allylic hydrogen content. *Biochemistry.* 1994; 33:4449-4453.
34. Slater TF. Overview of methods used for detection lipid peroxidation. *In: PACKER, L. Methods in enzymology - Oxygen radicals in biological systems.* San Diego: Academic;1984.
35. Shahidi F, Wanasundara P. Phenolic antioxidants. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition.* 1992; 32(1): 67-103.
36. Gutteridge JM. Does redox regulation of cell function explain why antioxidants perform so poorly as therapeutic agents? *Redox Report.* 1999; 4(3):129-131.
37. Sevanian A, Ursini F. Lipid peroxidation in membranes and low-density-lipoproteins: similarities and differences. *Free Radical Biology and Medicine.* 2000, 29 (3/4): 306-311.
38. Halliwell B, Gutteridge JM, Cross C. E. Free radicals, antioxidants, and human disease: where are we now? *J. Lab. Clin. Med.* 1992; 119:598-620.
39. Barreiros ALBS, David JM, David JP. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. *Química Nova.* 2006; 29(1): 113 – 123.
40. Sies H. Strategies of antioxidant defense. *European Journal of Biochemistry.* 1993; 215: 213-219.
41. Bonnefoy M, Drai J, Kostka, T. Antioxidants to slow aging, facts and perspectives. *Presse Medicale.* 2002; 31: 1174-1184.
42. Fridovich I. Oxygen toxicity: a radical explanation. *Journal of Experimental Biology.* 1998; 201:1203-1209.
43. Salvador M, Henriques JAP. Radicais livres e a resposta celular ao estresse oxidativo. Canoas: Editora da ULBRA; 2004.

- 
44. Bourne LC, Rice-Ewans CA. Detecting and measuring bioavailability of phenolics and flavonoids in humans: pharmacokinetics of the urinary excretion of dietary feruic acid. *Methods in Enzymology*. New York; 299 (Part A): 91-151, 1999.
45. Marchler G, Schüller C, Adam G, Ruis H. A *Saccharomyces cerevisiae* UAS element controlled by protein kinase A activates transcription in response to a variety of stress conditions. *The EMBO Journal*. 1993; 12: 1997-2003.
46. Kistler M, Summer KH, Eckardt F. Isolation of glutathione-deficient mutants of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mutation Research*. 1986; 173: 117-120.
47. Ohtake Y, Walle T. Oxidation of the flavonoids galangin and kaempferide by human liver microsomes and CYP1A1, CYP1A2 and CYP2C9. *Drug. Metab. Dispos.* 2001; 30: 103-105.
48. Verpoorte R, Van Der Heijden R, Memelink J. Engeneering the plant cell factory for secondary metabolite production. *Transgenic Res.* 2000; 9: 323-343.
49. Verpoorte R, Collin A, Memelink J. Biotechnology for the production of plant secondary metabolites. *Biochem. Rev.* 2002;1: 13-25.
50. Collin HA. Secondary product formation in plant tissue cultures. *Plant Growth Regul.* 2001; 34:119-134.
51. Harborne JB. *Methods in plant biochemistry. Plant phenolics*. London: Academic. 1989.
52. Harborne JB, Williams CA. Advances in flavonoid research since 1992. *Phytochemistry*. 2000; 52: 481-504.
53. Kuskoski EM, Asuero AG, García-Parilla MC, Troncoso AM, Fett R. Actividad antioxidante de pigmentos antociánicos. *Ciênc. Tecnol. Aliment.* 2004; 24(4): 691-693.
54. Khanavi M, Hajimahmoodi M, Cheraghi-Niroomand M, Kargar Z, Ajani Y, Hadjiakhoondi A, Oveisi MR. Comparison of the antioxidant activity and total phenolic contents in some *Stachys* species. *African Journal of Biotechnology*. 2009; 8 (6): 1143-1147.
55. Trueba GP, Sanchez GM. Los flavoinóides como antioxidantes naturales. *Acta Farm. Bonaerense*. 2001; 20: 297-306.
56. Croft KD. The chemistry and biological effects of flavonoids and phenolic acids. *Annals of the New York Academy of Science*, New York. 1998; 854: 435-442.
57. Yao LH, Jiang YM, Shi J, Tomás-Barberán FA, Datta N, Singanusong R, Chen SS. Flavonoids in Food and Their Health Benefits. *Plant Foods for Human Nutrition*. 2004; 59: 113–122.
-

- 
58. Volp ACP et al. Flavonóides antocianinas: características e propriedades na nutrição e saúde. *Revista Brasileira de Nutrição Clínica*. 2008;23(2): 141-149.
59. Machado H. Atividade dos flavonóides Rutina e Naringina sobre o tumor Ascítico de Ehrlich “in vivo” [Dissertação de mestrado]. Viçosa (MG): Universidade Federal de Viçosa; 2006.
60. Brasil. Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer. Estimativa 2010: incidência de câncer no Brasil / Instituto Nacional de Câncer. – Rio de Janeiro: INCA; 2009.
61. Sacoman JL. Atividade anticâncer e mecanismo de morte celular dos extratos brutos e frações de *Anacardium humile* St. Hil. (Anacardiaceae) e *Pothomorphe umbellata* (L.) Miquel (Piperaceae) [Tese de doutorado]. Campinas (SP): Universidade Estadual de Campinas; 2007.
62. Oliveira EMS. Efeito modulador do café sobre a carcinogênese hepática induzida em ratos. [Dissertação de mestrado]. Belo Horizonte (MG): Faculdade de Farmácia da UFMG; 2007.
63. Oliveira VM, Aldrighi JM, Rinaldi JF. Quimioprevenção do câncer de mama. *Revista da Associação de Medicina Brasileira*. 2006; 52(6): 453-459.
64. Santos HS, Cruz WMS. A terapia nutricional com vitaminas antioxidantes e o tratamento quimioterápico oncológico. *Revista Brasileira de Cancerologia*. 2001; 47(3): 303-308.
65. Rodrigues E, Duarte-Almeida JM, Pires JM. Perfil farmacológico e fitoquímico de plantas indicadas pelos caboclos do Parque Nacional do Jaú (AM) como potenciais analgésicas. Parte I. *Rev. Bras. Farmacogn.* [online]. 2011 jan [cited 2011 jan 13], pp. 0-0. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0102-695X2010005000008&lng=en&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-695X2010005000008&lng=en&nrm=iso)>. Epub July 16, 2010. ISSN 0102-695X. doi: 10.1590/S0102-695X2010005000008.
66. Clark RAF Biology of dermal wound repair dermatological clinics. *J. Invest. Dermatol.* 1993; 11(4): 547-661.
67. Robinson AJ, Snyder-Mackler L. *Eletrofisiologia Clínica*. 2 ed. Porto Alegre: ArtMed; 2001.
68. Cheng N, Van Hoff H, Bocks E. The effect of electric currents on ATP generation, protein synthesis, and membrane transport in rat skin. *Clin Orthop Relat Res*. 1982;171:264-72.
69. Morgareidge KR, Chipman RD. Microcurrent therapy. *Physical Therapy Today*. Spring. 1990; 50-73.

- 
70. Hedge DA, Khosa RL, Chansouria JPN. A study of the effect of *Wedelia calendulacea* Less. On wound healing in Rats. *Phytotherapy Research*. 1994; 8: 439-440.
71. Kloth LC. Electrical Stimulation for wound Healing: A Review of evidence from In Vitro Studies, Animal Experiment, and clinical Trials. *Lower Extremity Wounds*. 2005; 4:23-44.
72. Nayak BS, Suresh R, Rao AV, Pillai GK, Davis EM, Ramkisson V, Marae A. Evaluation of wounds healing activity of *vanda roxburghii* R. Br (Orchidaceae): a preclinical study in a rat model. *Int. J Low Extrem Wounds*. 2005; 4(4): 200-204.
73. Rao SG, Udupa AL, Udupa SL. *Calendula* and *Hypericum*: two homeopathic drugs promoting wound healing in rats. *Fitoterapia*. 1991; 62: 508-510.
74. Schempp CM, Winghofer B, Ludtke R, Simon-Haarhaus B, Shopp E, Simon JC. Topical application of St John's wort (*Hypericum perforatum* L) and of its metabolite hyperforin inhibits the allostimulatory capacity of epidermal cells. 2000; 142: 979-984.
75. Perez-Carreón, Cruz-Jimenez G, Lecea-Vega JA, Poposa EA, Fazenda SF, Villa Trevino S. Genotoxic and-genotoxic properties of *Calendula officinalis* extracts in rats liver cell cultures treated with Diethylnitrosamine. *Toxicology in Vitro*. 2002; 16(3): 253-8.
76. Peruchi CMS, Silva EB, Andrade RA, Franco SL, Ramalho L. Efecto del propoleos en la cicatrizacion de lesions subcutâneas induzidas em el dorso de ratones: estudio histológico. *Fac. Odonto. Univ. Vhile*. 2001, 19(2): 23-24.
77. Hedge DA, Khosa RL, Chansouria JPN. A study of the effect of *Wedelia calendulacea* Less. On wound healing in Rats. *Phytotherapy Research*. 1994; 8: 439-440.
78. Heggors, J. P. Beneficial effects of *Aloe* in wound healing. *Phytotherapy Research*. 1993; 7: 48-52.
79. Rocha C.J. O que é uma orquídea. 2006 Set. [Acesso em 10 de jul de 2010]. Disponível em: URL: <http://www.arraialdocabo.fot.br/orqhistoria.htm>.
80. Arditti J. *Fundamentals of orchid biology*. New York: John Wiley; 1992.
81. Pabst GFJ. Estudos no gênero *Oncidium* Sw. (Orchidaceae) - IV. *Bradea*. 1972; 1(15):137-143.
82. Garay LA e Stacy JE. Synopsis of the genus *Oncidium*. *Bradea*. 1974; 1(40): 393-427.
83. Dressler RL. *The orchids: natural history and classification*. Cambridge: Harvard University Press; 1990.
84. Dressler RL. *Phylogeny and classification of the orchid family*. Portland: Discorides Press; 1993.
-

- 
85. Musharof HM. Therapeutic Orchids: Traditional Uses and Recent Advances – An Overview. *Fitoterapia*. 2010; Article in press. doi:10.1016/j.fitote.2010.09.007.
86. Andrei CC, Ferreira DT, Faccione M, Faria TJ. *Da Química Medicinal à Química Combinatória e Modelagem Molecular: um curso prático*. Barueri (SP): Manole; 2003.
87. Bukatsh F. Benerkemgem zeir doppelfarbeing astrablau-safranina. *Microkosmos*. 1972; 61: 255-256.
88. Costa AF. *Farmacognosia*. Fundação Calouste Gulbenkian, Lisboa; 1982.
89. Johansen DA. *Plant microtechnique*. New York: MacGraw-Hill; 1940.
90. Harborne, JB. *Phytochemical methods : a guide to modern techniques of plant analysis*. 3.ed. London: Chapman e Hall; 1998.
91. Matos FJA. *Introdução à Fitoquímica Experimental*. 2 ed. Fortaleza: Edições UFC; 1997.
92. Singleton VL, Orthofer R, Lamuela-Raventós RM. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods Enzymol* 1999; 299:152-178.
93. Vennat B, Gross D, Pourrat A, Pourrat H. Hamamelis virginiana: identification and assay of proanthocyanidins, phenolic acids and flavonoids in leaf extracts. *Pharmaceutica Acta Helvetiae*. 1992; 67(1):11-14.
94. Mensor LL, Menezes FS, Leitão GG, Reis AS, Santos TC, Coube CS, Leitão SG. Screening of Brazilian Plant Extracts for Antioxidant Activity by the Use of DPPH Free Radical Method. *Phytother. Res*. 2001; 15: 127–130.
95. Ljubuncic P, Dakwar S, Portnaya I, Cogan U, Azaizeh H, Bomzon A. Aqueous Extracts of *Teucrium polium* Possess Remarkable Antioxidant Activity *In Vitro*. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2006; 3(3): 329–338.
96. Lima AO, Soares JB, Greco JB, Galizzi J, Caçado JR. *Métodos de Laboratório Aplicados à Clínica*, 8 ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan; 2001.
97. Bradford, M.M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Dye Binding. *Analytical Biochemistry*. 1976; 72: 248–254.
98. Faure P, Lafond JL. Measurement of plasma sulphhydryl and carbonyl groups as a possible indicator of protein oxidation. In: Favier, AE et al. (Eds.). *Analysis of free radicals in biological systems*. Basel: Birkhäuser Verlag; 1995.
99. Yagi K. Lipid peroxides and human disease. *Chem. Phys. Lipids*. 1987; 45: 337–351.

- 
100. Mensah AY, Sampson J, Houghton PJ, Hylands PJ, Westbrook J, Dunn M, Hughes MA, Cherry GW. Effects of *Buddleja globosa* leaf and its constituents relevant to wound healing *Journal of Ethnopharmacology*. 2001; 77: 219–226.
101. Mosmann, T. A rapid colorimetric assay for cellular proliferation and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*. 1983; 65: 55-63.
102. International Guiding Principles for Biomedical Research Involving Animals-CIOMS; 1985.
103. Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. NIH Publication 1996; 82-23.
104. Mustoe TA, Pierce GF, Thomason A, Gramates P, Sporn MB, Deuel TF. Accelerated healing of incisional wounds in rats induced by transforming growth factor-beta. *Science*. 1987; 237(4820):1333-1336.
105. Somchit MN, Rashid RA, Abdullah A, Zuraini A, Zakaria ZA, Sulaiman MR, Arifah AK, Mutalib AR. *In vitro* antimicrobial activity of leaves of *Acalypha indica* Linn. (Euphorbiaceae). *African Journal of Microbiology Research*. 2010; 4(20): 2133-2136.
106. Silva MF, Ataíde TR, Oliveira SL, Santana AEG, Cabral Júnior CR, Balwani MCLV, Oliveira FGS, Santos MC. Efeito Hepatoprotetor do Consumo Crônico de Dieptanoína e Trieptanoína contra a Esteatose em Ratos. *Arq Bras Endocrinol Metab*. 2008; 52(7): 1145-1155.
107. Ellman GL. Tissue sulphydryl groups. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 1959, 82: 70-77.
108. Allameh A, Vansoun EY, Zarghi A. Role of glutathione conjugation in protection of weanling rat liver against acetaminophen-induced hepatotoxicity. *Mechanisms of Ageing and Development*. 1997; 95(1-2): 71-79.
109. Bergmeyer HV. *Methods in Enzymatic analysis*. New York: Academic press; 1974.
110. Buege JA, Aust SD. Microsomal lipid peroxidation. *Methods and Enzymology*. 1978; 52: 302-310.
111. Santos AC, Uyemura AS, Lopes JLC, Bazon JN, Mingatto FE, Curti C. Effect of naturally occurring flavonoids on lipid peroxidation and membrane permeability transition in mitochondria. *Free radical biology and Medicine*. 1998; 24(9): 1455-1461.
112. Fortes F. Transição de permeabilidade de membrana em mitocôndrias isoladas de batata [Tese de Doutorado]. Campinas (SP): Universidade Estadual de Campinas; 2003.

- 
113. Stern WL, Judd WS e Carlsward BS. Systematic and comparative anatomy of Maxillareae (Orchidaceae), *sans* Oncidiinae. Botanical Journal of the Linnean Society. 2004; 144: 251-274.
114. Rosso SW. The vegetative anatomy of the Cypripedioideae (Orchidaceae). Journal of the Linnean Society (Botany). 1966; 59: 309-341.
115. Withner CL, Nelson PK e Wwjknsora PJ. The anatomy of orchids. In: Withner CL (Ed.). The orchids: scientific studies. New York: John Wiley Co. 1974; p 267-334.
116. Rasmussen H. Orchid stomata-structure, differentiation, function and phylogeny. In: Arditti. (Ed.), Orchid Biology: reviews and perspectives, IV. Ithaca, New York: Cornell University Press; 1987, p105-38.
117. Bonates LCM. Estudos ecofisiológicos de Orchidaceae da Amazônia II. Anatomia ecológica foliar de espécies com metabolismo CAM de uma campina da Amazonia central. Acta Amazonica. 1993; 23:315-348.
118. Ayensu ES e Williams NH. Leaf anatomy of *Palumbina* and *Odontoglossum*, subgenus *Osmoglossum*. American Orchid Society Bulletin. 1972; 41:687-696.
119. Mohana Rao PR e Khasim SM. Anatomy of three species of *Bulbophyllum* (Orchidaceae) with comments on their ecological adaptability and taxonomy. Proc. Indian Acad. Sci. 1987; 97(5):391-397.
120. Pridgeon AM e Williams NH. Anatomical aspects of *Dresslerella* (Orchidaceae). Selbyana. 1979; 5(2): 120-134.
121. Pridgeon AM e Stern WL. Vegetative anatomy of *Myoxanthus* (Orchidaceae). Selbyana. 1982; 7(1): 55-63.
122. Khasim SM e Mohana Rao PR. Anatomy in relation to taxonomy in some members of Epidendroideae (Orchidaceae). Phytomorphology. 1990; 40(3-4): 243-250.
123. Oliveira VC e Sajo MG. Anatomia foliar de espécies epífitas de orquídeas. Revista Brasileira de Botânica. 1999; 22(3): 365-374.
124. Madison M. Vascular epiphytes: their systematic occurrence and salient features. Selbyana. 1977; 2(1): 1-13.
125. Betchel H, Cribb P e Saunert E. The manual of cultivated orchid species. Cambridge (Massachusetts): The MIT Press; 1981.
126. Brand-Williams W, Cuvelier ME, Berset C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. Lebensmittel-Wissenschaft Technologie. 1995; 28:25-30.

- 
127. Leong LP e Shui G. An investigation of antioxidant capacity of fruits in Singapore markets. *Food Chem.* 2002; 76: 69-75.
128. Boscolo OH, Mendonça-Filho RFW, Menezes FS, Senna-Valle. Potencial antioxidante de algumas plantas de restinga citadas como medicinais. *Rev. Bras. Pl. Med.* 2007; 9(1): 8-12.
129. Misharina TA, Terenina MB, Krikunova NI. Antioxidant properties of essential oils. *Appl Biochem Microbiol.* 2009; 45(6): 642-647.
130. Misharina TA, Samusenko AL. Antioxidant properties of essential oils from lemon, grapefruit, coriander, clove, and their mixtures. 2008; 44(4): 438-442.
131. Pillai TG, John M, Thomas GS. Prevention of cisplatin induced nephrotoxicity by terpenes isolated from *Ganoderma lucidum* occurring in Southern Parts of India. *Experimental and Toxicologic Pathology.* 2011; 63(1-2): 157-160.
132. Kalogeropoulos N, Konteles SJ, Troullidou E, Mourtzinis I, Karathanos VT. Chemical composition, antioxidant activity and antimicrobial properties of propolis extracts from Greece and Cyprus. *Food Chemistry.* 2009; 116(2): 452-461.
133. Mohammed MG, Kowti R, Hareesh AR, Harsha R, Satish Kumar BP, Thammanna Gowda SS. *In vitro* Antioxidant Activity of leaves of *Spathodea campanulata* P. Beauv. *Int J Pharm Sci Bio.* 2010; 1(3): 133-137.
134. OGA,S. Fundamentos de Toxicologia. São Paulo: Atheneu Editora de São Paulo; 1996.
135. Lima AO, Soares JB, Greco JB, Galizzi J, Caçado JR. Métodos de Laboratório Aplicados à Clínica. 8 ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan; 2001.
136. Burtis CA, Ashwood ER. Fundamentos de química clínica. 4 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1998.
137. Motta VT. Bioquímica Clínica: Princípios e Interpretações. 3 ed. Porto Alegre: Editora Médica Missau; 2000.
138. Henry JB. Diagnósticos clínicos e tratamento por métodos laboratoriais. 19 ed. São Paulo : Manole; 1999.
139. Hung DY, Siebert GA, Chang P, Whitehouse MW, Fletcher L, Crawford DHG, Roberts MS. Hepatic pharmacokinetics of propranolol in rats with adjuvant-induced systemic inflammation. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Pysiol.* 2006; 290: 343-351.
140. Halliwell B, Gutteridge JMC. Free radicals in Biology and Medicine. Oxford: Clarendon Press; 1989.

- 
141. Alexandrova ML, Bochev PG. Oxidative stress during the chronic phase after stroke. *Free Radical Biology and Medicine*. 2005; 39:297-316.
142. Cherubini A. et al. Potential markers of oxidative stress in stroke. *Free Radical Biology & Medicine*. 2005; 39: 841-852.
143. Kashyap MK et al. Different antioxidant status, total antioxidant power and free radical in essential hypertension. *Molecular and Cellular Biochemistry*. 2005; 277:89-99.
144. Zhai S, Daí R, Wei X, Friedman FK, Vestal R E. Inhibition of methoxyresorufin demethylase activity by flavonoids in human liver microsomes. *Life Sciences*. 1998; 63:119 – 123.
145. Motta VT. *Bioquímica Clínica: Princípios e Interpretações*. 3 ed. Porto Alegre: Editora Médica Missau; 2000.
146. Doostdar H, Burke MD, Mayer RT. Bioflavonoids: selective substrates and inhibitors for cytochrome P450 CYP1A and CYP1B1. *Toxicology*. 200; 144: 31-38.
147. Hu M, Krausz K, Chen J, Ge X, Li J, Gelboin HL, Gonzales FJ. Identification of CYP1A2 as the main isoform for the phase I hydroxylated metabolism of genistein and a pro-drug converting enzyme of methylated isoflavones. *Drug. Metab. Dispos.* 2003; 31: 924 – 931.
148. Korkina LG, Afanas`ev IB. Antioxidant and chelating properties of flavonoids. *Adv. Pharmacol.* 1997; 38: 151-163.
149. Bhatia AL, Jain M. *Cspinacia oleracea* L. Protects against gamma radiations: a study on glutathione and lipid peroxidation in mouse liver. *Phytomed*. 2004; 11: 607-615.
150. Alía M, Horcajo C, Bravo L, Goya L. Effect of grape antioxidant dietary fiber on the total antioxidant capacity and the activity of liver antioxidant enzymes in rats. *Nut. Res.* 2003; 23: 1251-1267.
151. Delsin APM. Estudo químico e avaliação antiproliferativa de diferentes espécies do gênero *Mikania* (Dissertação de Mestrado). Piracicaba (SP): FOP-Unicamp; 2004.
152. Peres MTLP, Simionatto E, Hess SC, Bonani VFL, Candido ACS, Castelli C. et al. Estudos químicos e biológicos de *Microgramma vacciniifolia* (Langsd. & Fisch.) Copel (Polypodiaceae). *Quim. Nova*. 2009; 32(4):897-901.
153. Cowen LE, Anderson JB, Kohn LM. Evaluation of drug resistance in *Candida albicans*. *Annu. Rev. Microbiol.* 2001; 56(139-65).
154. Colombo AL, Guimarães T. Epidemiologia das infecções hematogênicas por *Candida* spp. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 2003 set-out; 36(5):599-607.

- 
155. Santos VNS, Ferreira LM, Horibe EK, Duarte IS. Electric microcurrent in the restoration of the skin undergone a trichloroacetic acid peeling in rats. *Acta Cirurgica Brasileira*. 2004; 19: 466-469.
156. Frick A, McCauley D. Microcurrent electrical therapy. *Journal of Equine Veterinary Science*. 2005; 25: 418-422.
157. Santos MFS, Czezko NG, Nassif PAN, Ribas-Filho JM, Alencar BLF, Malafaia O et al. Evaluation of the use of raw extract of *Jatropha gossypifolia* L. in the healing process of skin wounds in rats. *Acta Cirúrgica Brasileira*. 2006; 21(3):2-7.
158. Lee BY, Wendell K, Al-Waili N, Butler G. Ultra-Low microcurrent therapy: A novel approach for treatment of chronic resistant wounds. *Advances in Therapy*. 2007; 24(6): 1202-1209.
159. Lee BY, Al-Waili N, Stubbs D, Wendell K, Butler G, Al-Waili T, Al-Waili A. Ultra-low microcurrent in the management of diabetes mellitus, hypertension and chronic wounds: Report of twelve cases and discussion of mechanism of action. *Int J Med Sci*. 2010; 7:29-35.
160. Basset CA. Beneficial-effects of electromagnetic-fields. *Journal of Cellular Biochemistry*. 1993; 51: 387-93.
161. Markov MS, Colbert AP. Magnetic and electromagnetic field therapy. *Journal of Back of Musculoskeletal Rehabilitation*. 2000; 15: 17-29.
162. Sheffet A, Cytryn AS, Louria DB. Applying electric and electromagnetic energy as adjuvant treatment for pressure ulcers: a critical review. *Ostomy Wound Manage*. 2000; 46: 28-33.
163. Bach S, Bilgrav K, Gottrup F, Jorgensen TE. The effect of electrical current on healing skin incision. *European Journal of Surgery*. 1991; 157: 171-174.
164. Aaron RK, Ciombor DM. Therapeutic effects of electromagnetic fields in the stimulation of connective tissue repair. *Journal of Cellular Biochemistry*. 1993; 52: 42-6.
165. Chithra P, Sajithlal BG, Chandrakasan G. Influence of *Aloe vera* on the healing of dermal wounds in diabetic rats. *Journal of Ethnopharmacology*. 1998; 59: 195-201.
166. Macedo ACB, Simões ND. Aplicação de estimulação elétrica de baixa intensidade no tratamento de úlceras varicosas. *Fisioterapia em Movimento*. 2007; 20: 25-33.
167. Martins PS, Alves ALG, Hussni CA, Sequeira JL, Nicoletti JLM, Thomassian A. Comparação entre fitoterápicos de uso tópico na cicatrização de pele em equinos. *Archives of Veterinary Science*. 2003; 8: 1-7.

- 
168. Peruchi CMS, Acevedo RA, Franco SL. Efecto del propóleos en la cicatrización de lesiones subcutáneas inducidas en el dorso del ratones, estudo histológico. *Revista de la Facultad de Odontologia*. 2001; 19: 23-36.
169. Bedi MK, Shenefelt PD. Herbal therapy in dermatology. *Archives of Dermatology*. 2002; 138: 232-242.
170. Ardisson L, Godoy J S, Ferreira L A M, Stehmann J R, Brandão MGL. Preparação e caracterização de extratos glicólicos enriquecidos em taninos a partir das cascas de *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville (Barbatimão). *Revista Brasileira de Farmacologia*. 2002; 12: 27-34.
171. Lee WR, Park JH, Kim KH, Kim SJ, Park DH, Chae MH, Suh SH, Jeong SW, Park KK. The biological effects of topical alginate treatment in an animal model of skin wound healing. *Wound Rep Reg*. 2009; 17:505-510.
172. Nayak S, Nalabothu P, Sandiford S, Bhogadi V, Adogwa A. Evaluation of wound healing activity of *Allamanda cathartica* L. and *Laurus nobilis* L. extracts on rats. *BMC Complementary Alternative Medicine*. 2006; 6: 12.
173. d'Acampora AJ, Tramonte R, Bürger D, Bürger PJ. Efeitos da quercetina na cicatrização de ferida cirúrgica contaminada em ratos Wistar / Efeitos da quercetina na cicatrização de ferida cirúrgica contaminada em ratos Wistar. *ACM: Arquivos Catarinenses de Medicina*. 2007; 36 (1): 69-75.
174. Araújo TAS, Alencar NL, Amorim ELC, Albuquerque UP. A new approach to study medicinal plants with tannins and flavonoids contents from the local knowledge. *Journal of Ethnopharmacology*. 2008; 120: 72-80.
175. Ermertcan AT, Inan S, Ozturkcan S, Bilac C, Cilaker S. Comparison of the effects of collagenase and extract of *Centella asiatica* in an experimental model of wound healing: An immunohistochemical and histopathological study. *Wound Repair and Regeneration*. 2008; 16: 674-681.
176. Willams CA, Greenham J, Harborne JB, Kong JM, Goh NK, Chia LS. Acylated anthocyanins and flavonols from purple flowers of *Dendrobium cy`Pompadour'*. *Biochemical Systematics and Ecology*. 2002; 30: 667-675.
177. Nayak BS, Suresh R, Rao AV, Pillai, GK, Davis EM, Ramkisson V, Marae A. Evaluation of wounds healing activity of *Vanda roxburghii* R. Br (Orchidaceae): a preclinical study in a rat model. *Internacional Journal of Lower Extremity Wounds*. 2005; 4: 200-204.
178. Balbino CA, Pereira LM, Curi R. Mecanismos envolvidos na cicatrização: uma revisão. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*. 2005; 41(1):27-51.

- 
179. Jorge, MP. Atividade cicatrizante do extrato bruto de *Arrabidaea chica* (Humb. & Bonpl.) Verlot. (Dissertação de Mestrado). Campinas (SP): Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas – Unicamp; 2008.
180. Houghton PJ, Hylands PJ, Mensah AY, Hensel A, Deters AM. In vitro tests and ethnopharmacological investigations: Wound healing as an example. *J Ethnopharmacol.* 2005; 100:100–107.
181. Vieira AP, Santos NR, Borges JHS, Vincenzi MPA, Schmitz WO. Flavonoid action in second intention healing in surgically-induced clean wounds in Wistar rats. *Semina: Ciências Biológicas e da Saúde.* 2008; 29(1):65-74.
182. Vieira RP. Efeitos do Decanoato de Nandrolona sobre o fígado de ratos. (Dissertação de Mestrado). São José dos Campos (SP): Universidade do Vale do Paraíba; 2003.
183. Silva RA. Avaliação do quadro de estresse metabólico em ratos Wistar exposto à Aflatoxina B<sub>1</sub> (Tese de Doutorado). São Paulo (SP): Coordenadoria de Controle de Doenças da Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo; 2007.
184. Kubena LF et al. Effects of a hydrated sodium calcium luminosilicate (T-Bind™) on mycotoxicosis in young broiler chickens. *Poultry Science.* 1998; 77:1502-09.
185. Parolin MB, Reason IJM. Apoptose como mecanismo de lesão nas doenças hepatobiliares. *Arq. Gastroenterol.* 2001; 38(2):138-144.
186. Roman SS, Scolari S, Bergamin NA, Sachetti CG. Renal and hepatic toxicity of pregnant mice exposed the association of the 2,4 dichlorofenoxyacetic acid and glifosato. *Revista eletrônica de Farmácia.* 2009; 6(2):152-171.
187. Christoff AO. Efeito do veneno e da toxina dermonecrótica recombinante LiRecDT1 de *Loxosceles intermédia* [Dissertação de Mestrado]. Curitiba (PR): Universidade Federal do Paraná; 2008.
188. Sun B, Li S, Yang L, Damodaran T, Desai D, Diehl AM. Activation of glycolysis and apoptosis in glycogen storage disease type Ia. *Molecular Genetics and Metabolism.* 2009; 97: 267-271.
189. Wu CH, Ho YS, Tsai CY, Wang YJ, Tseng H, Wei PL et al. *In vitro* and *in vivo* study of phloretin-induced apoptosis in human liver cancer cells involving inhibition of type II glucose transporter. *Int. J. Cancer.* 2009; 124: 2210-2219.
190. Malheiros SVP. Regulação do metabolismo celular – um resumo. *Revista Brasileira de Ensino de Bioquímica e Biologia Molecular.* 2006; 1: 1-6.
191. Reis CVS, et al. Glicogenose tipo I. *Jornal de Pediatria.* 1999; 75(4): 227-236.

- 
192. Cao H, Wu LY, Juan CC, Ho LT, Hsu YP, Hwang LS et al. Green Tea Polyphenol Extract Regulates the Expression of Genes Involved in Glucose Uptake and Insulin Signaling in Rats Fed a High Fructose Diet. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2007; 55: 6372-6378.
193. Chou HF, Chou HF, Chuang KH, Tsai YS, Chen YJ. Genistein inhibits glucose and sulphate transport in isolated rat liver lysosomes. *British Journal of Nutrition*. 2010; 103: 197-205.
195. Low T, Rodd T, Beresford R. Segredos e virtudes das plantas medicinais. Rio de Janeiro: Reader's Digest Brasil; 1999.
196. Teske M, Trentini AM. Herbarium compêndio de Fitoterapia. Curitiba: Herbarium Laboratório Botânico LTDA; 1994.
197. Bagnis CI, Deray G, Baumelou A, Le Quintrec M, Vanherweghem JL. Herbs and the Kidney. *American Journal of Kidney Diseases*. 2004 jul; 44(1): 1-8.
198. Sokar Z, Gadhi CA, Benharref A, Jana M. Toxic effect of *Herniaria cinerea* DC. on the stomach, intestine, lung, and kidney of rats. *Journal of Ethnopharmacology*. 2003; 88:149-153.
199. Lee J, Chen H. Flavonoid-Induced Acute Nephropathy by *Cupressus funebris* Endl (Mourning Cypress). *Am J Kidney Dis*. 2006; 48: 81-85.
200. Meng L, Qu L, Tang J, Cai SQ, Wang H, Li X. A combination of Chinese herbs, *Astragalus membranaceus* var. *mongholicus* and *Angelica sinensis*, enhanced nitric oxide production in obstructed rat kidney. *Vascular pharmacology*. 2007; 47: 174-183.



## *Apêndice*

---

*Original article*

## **Effects of the Topical Application of Hydroalcoholic Leaf Extract of *Oncidium flexuosum* Sims. (Orchidaceae) and Microcurrent on the Healing of Wounds Surgically Induced in *Wistar* Rats**

**Fernanda Oliveira de G. de Gaspi<sup>1,2,3</sup>; Mary Ann Foglio<sup>2</sup>; João Ernesto de Carvalho<sup>2,3</sup>; Gláucia Maria T. Santos<sup>4</sup>; Milene Testa<sup>1</sup>; José Roberto Passarini Jr<sup>1</sup>; Cristiano Pedroso de Moraes<sup>1</sup>; Marcelo A. Marreto Esquisatto<sup>4</sup>; Josué S. Mendonça<sup>5</sup>; Fernanda A. Sampaio Mendonça<sup>4</sup>**

<sup>1</sup> Núcleo de Ciências da Saúde do Centro Universitário Hermínio Ometto (UNIARARAS), Araras, SP, Brazil.

<sup>2</sup> Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas Biológicas e Agrícolas, CPQBA, UNICAMP, Campinas, SP, Brazil.

<sup>3</sup> Departamento de Clínica Médica, Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas, UNICAMP, Campinas, SP, Brazil.

<sup>4</sup> Programa de Pós Graduação em Ciências Biomédicas, Centro Universitário Hermínio Ometto, UNIARARAS, Araras, SP, Brazil.

<sup>5</sup> Hospital São Lucas, Diadema, São Paulo, SP, Brazil.

Correspondence should be addressed to Fernanda Oliveira de G. de Gaspi, [fernandagaspi@uniararas.br](mailto:fernandagaspi@uniararas.br), [gaspi.fr@uol.com.br](mailto:gaspi.fr@uol.com.br).

---

## Abstract

This study evaluated the wound healing activity of hydroalcoholic leaf extract of *Oncidium flexuosum* Sims. (Orchidaceae), an important native plant of Brazil, combined or not with microcurrent stimulation. *Wistar* rats were randomly divided into four groups of nine animals: control (C), topical application of the extract (OF), treated with a microcurrent (10  $\mu$ A/2 min) (MC), and topical application of the extract plus microcurrent (OF+MC). Tissue samples were obtained 2, 6 and 10 days after injury and submitted to structural and morphometric analysis. The simultaneous application of OF+MC was found to be highly effective in terms of the parameters analyzed ( $p < 0.05$ ), with positive effects on the area of newly formed tissue, number of fibroblasts, number of newly formed blood vessels, and epithelial thickness. Morphometric data confirmed the structural findings. The *O. flexuosum* leaf extract contains active compounds that speed the healing process, especially when applied simultaneously with microcurrent stimulation.

**Keywords:** *Oncidium flexuosum* Sims., Incision, Wound healing, Medicinal plant, Flavonoids.

## 1. Introduction

Medicinal plants have been used since ancient times for the treatment of various skin and dermatological disorders, especially cuts, wounds and burns [1]. Current phytotherapies agents have also been shown to be highly effective in the treatment of these diseases [2-4]. *Oncidium flexuosum* Sims. (Family Orchidaceae), popularly known as the “dancing doll orchid”, is one of the most important species of the *Oncidium* genus in Brazil [5,6]. This plant is an epiphyte that can reach a height of 1 m and possesses a large number of flowers that form branched inflorescences of attractive medium-sized flowers. The sepals and petals are yellow, with brown-reddish transverse stripes, and the lip is highlighted with small red dots [7,8]. The Orchidaceae family is one of the largest

---

angiosperm families and more than 25,000 species have been described so far [9,10], including important species with medicinal potential [11]. In traditional medicine, the species of this family have been used for the treatment of abscesses, inflammation, wounds, external bleeding and chapped skin [12,13].

Wound healing constitutes a complex, dynamic, and well-orchestrated process that is activated whenever disruption of skin tissue occurs. The wound healing process is characterized by a broad spectrum of events, including platelet aggregation and activation of the coagulation cascade, inflammatory infiltration, cell differentiation, and tissue remodeling. Although the cascade of these events seems to be well discriminated and can be divided into three phases, namely inflammation, proliferation, and wound contraction and remodeling, these phases actually overlap and continued or renewed tissue damage may reinitiate the sequence at affected sites within an existing wound. The application of low amperage electrical stimuli modifies the healing process in living organisms, especially factors that delay or impair this process [14-16]. Electrical stimulation of different amplitudes and frequencies has been shown to promote modifications in cell and tissue responses in experimentally induced injuries [17-19] and can be used to promote tissue repair. Stimulation of live cells with low-intensity electrical currents directly affects the membrane potential and is associated with changes in ion gradients across the cell membrane, causing an increase in the synthesis of ATP followed by increased protein synthesis [14,19,20]. Numerous taxonomic reviews of the *Oncidium* genus are available in the literature [7-9], but there are no scientific data regarding the pharmacological activities of *Oncidium flexuosum* Sims. (Orchidaceae). Therefore, the scope of the present study was to evaluate the effects of leaf extract of this important Brazilian plant species combined with microcurrent stimulation or alone on wound healing.

## **2. Materials and Methods**

### *2.1. Plant material*

---

Fresh *Oncidium flexuosum* leaves were collected in the medicinal plant garden of Uniararas (Projeto Saúde & Harmonia), Araras, São Paulo, Brazil, between December 2008 and February 2009, and identified by MSc. Cristiano Pedroso de Moraes. A voucher specimen (45341) was deposited at Herbário Rioclarense (HRCB), Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro/São Paulo, Brazil.

## 2.2. Preparation of the hydroalcoholic leaf extract

Fresh leaves (50 g) were selected, cleaned and macerated dynamically with 300 mL of an aqueous ethanol solution (7:3, v/v) for 4 h at room temperature. This procedure was repeated 3 times with the same powder and the same solvent. After filtration, the solvent was completely evaporated under vacuum at 40°C in a rotary evaporator and the hydroalcoholic *Oncidium flexuosum* leaf extract (OF) was obtained after lyophilization [22]. The yield of the lyophilized extract was 9%.

## 2.3. Phytochemical screening method

The qualitative identification of the chemical constituents was carried out in the same extract as that used in the wound repair tests using chemical methods and thin-layer chromatography according to the methods proposed by Marini-Bettolo et al. [21], Harborne [22] and Matos [23]. The dried extract (100 mg) was used for each test as described below. The presence of polyphenolic compounds was analyzed with 1% ferric chloride solution. Tannins were identified using the dried extract dissolved in water with 2 ml sodium chloride (2%), filtered, and mixed with 5 ml 1% gelatin solution. The presence of flavonoids was determined using 1% aluminum chloride solution in methanol, concentrated hydrochloric acid, magnesium turnings, and potassium hydroxide solution. Dragendorff's reagent was used to evaluate the presence of total alkaloids. Saponins were analyzed based on their capacity to produce foam. For the detection of triterpenes, the extract was mixed with 5 ml chloroform, warmed at 80°C for 30 min and then treated with a small volume of concentrated sulfuric acid. Additionally, the extract (OF) was analyzed by thin-layer

---

chromatography on silica gel using chloroform: methanol (98:2) and hexane:ethyl acetate (80:20) as eluent. Flavonoid components were visualized first under UV light and then by spraying the chromatographic plates separately with a solution of vanillin in sulfuric acid and ammonium vapor, followed by incubation at 100°C for 5 min.

#### 2.4. Experimental groups

Thirty-six male *Wistar* rats (*Rattus norvegicus*), each weighing 250–300 g, obtained from the Experimental Animal Center “Prof. Dr. Luiz Edmundo de Magalhães”, Uniararas, were housed individually in cages at a constant temperature ( $23 \pm 2^\circ\text{C}$ ) under a 12:12-h light/dark cycle, with free access to food and water. No difference in the average weight or behavior of the animals was observed between the beginning and the end of the study. This study was permitted by the Ethics Committee of Uniararas (protocol number 806/2006) and was performed according to international rules considering the animal experiments and biodiversity right [24, 25].

#### 2.5. Preparation of test samples for the bioassay

Each animal’s back was depilated 48 h before surgical intervention. After local asepsis with 0.4% chlorhexidine digluconate, the animals were anesthetized by intraperitoneal injection of xylazine hydrochloride (20 mg/kg body weight) and ketamine hydrochloride (50 mg/kg). After the position was marked with a dermatographic pen and pachymeter, a 2-cm long and 0.2-cm deep surgical incision was made (with sterile surgical blade marked previously) through the full thickness of the skin in the craniocaudal direction, according to methods described by Mustoe et al [26] and Mendonça, et al [27]. The incision was not sutured. In view of the similar genetic background of the animals [28] and following the guidelines of the Ethics Committee of Uniararas, groups of nine animals each were used: control group, C, receiving a topical application of saline solution 0.9%; OF group receiving a topical application of the extract of *Oncidium flexuosum* (60 mg/ml); MC group, treated with

---

microcurrent (10  $\mu\text{A}/2$  min), and OF+MC group, receiving a topical application of the extract of *Oncidium flexuosum* plus microcurrent (10  $\mu\text{A}/2$  min), according to the protocol of Mendonça et al [27]. A transcutaneous electrical stimulator (Physiotonus Microcurrent, Bioset, Rio Claro, São Paulo, Brazil) was used for electrical stimulation of the microgalvanic type. The applications involved the use of two metal electrodes with a spherical tip (10 mm) positioned on the wound. The treatments were started 24 h after surgical intervention and were continued daily for 10 days. From the dose-response curve using doses of 20, 40 and 60 mg/ml of the extract of *Oncidium flexuosum*, 60 mg/ml was selected from the evaluation of the cell count in the reparative tissue.

#### *2.6. Collection and preparation of wound samples for structural analysis*

In 2, 6 and 10 days after the injury, three animals in each group were killed under anesthesia, the total area of the wound was removed and submitted to structural and morphometric analysis. Each sample was removed and fixed in 10% formalin in Millonig buffer, pH 7.4, for 24 h at room temperature. Next, the specimens were washed in buffer and processed for embedding in Paraplast<sup>TM</sup> (Merck). Longitudinal sections (7  $\mu\text{m}$ ) were stained with hematoxylin/eosin for routine histology, with picosirius-hematoxylin for the observation of collagen fibers. The specimens were examined and documented using a Leica DM 2000 photomicroscope at the Laboratory of Micromorphology, Centro Universitário Hermínio Ometto, Uniararas.

#### *2.7. Morphometric analysis*

Cross-sections of the mid-region of the experimental wound were used for the determination of the following morphometric parameters: tissue repair area ( $\times 10^3 \mu\text{m}^2$ ), total number of cells (fibroblastic and inflammatory cells) ( $n/10^3 \mu\text{m}^2$ ), number of newly formed blood vessels ( $n/10^3 \mu\text{m}^2$ ), and thickness of the regenerating epithelium ( $\mu\text{m}$ ). For this purpose, three samples were randomly selected among the sections obtained. All images were captured and digitalized using a Leica DM 2000 photomicroscope. The

---

measurements were made on the digitalized images using the Leica Image Measure™ and Sigma Scan Pro 6.0™ programs.

The results were compared by ANOVA and the Tukey post-test, with the level of significance set at 5%. The results were entered into spreadsheets of the Biostat for Windows XP™ program.

### **3. Results**

#### *3.1. Phytochemical screening*

Preliminary phytochemical analysis of the extract (OF) using chemical methods showed a predominance of phenolic compounds such as flavonoids and tannins, and the presence of triterpenes. However, no total alkaloids or saponins were detected.

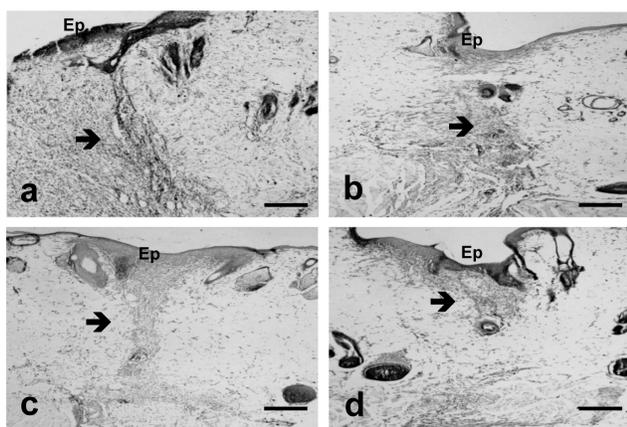
The best separation of the components of the hydroalcoholic extract was achieved using chloroform:methanol (98:2) as the mobile phase. Thin-layer chromatography also revealed the presence of polyphenols, tannins, and triterpenoids.

#### *3.2. Structural and morphometric analysis of wound repair*

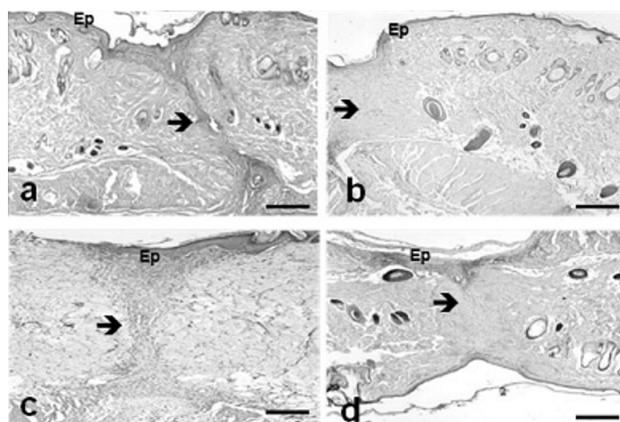
Wound healing was studied in the different groups by comparing inflammatory processes (leukocytosis, hemorrhage and exudate), proliferative processes (fibroblastic hyperplasia, epithelization and angiogenesis), and tissue reorganization. This was completed in all animals within the 10-day observation period. Structural analysis was performed on days 2, 6 and 10.

The proliferative phase was observed early on day 2 after experimental injury in animals of the groups treated with microcurrent (MC) and with the combination of microcurrent and *O. flexuosum* extract (OF+MC) when compared to the control group and group treated with extract OF alone.

The structural characteristics of the fibrous matrix were also evaluated in the different groups. A predominance of thin and poorly compacted collagen fibers was observed in samples collected on day 6 after experimental injury in all groups. However, compact and medium-thick fibers were observed on day 10 when compared to intact tissue at the border of the wound (Figs. 1 and 2). These results were supported by morphometric analysis comparing the different groups (Figs. 3, 4, 5 and 6).

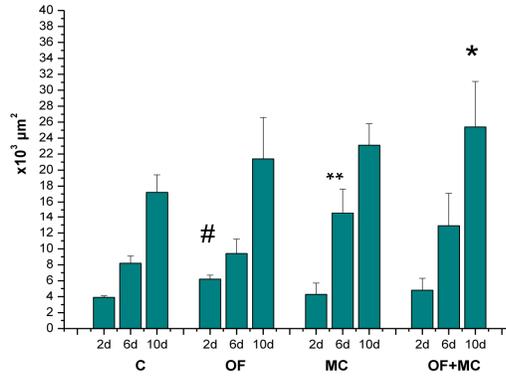


**Figure 1.** Photomicrographs of cross-sections of skin obtained from the back of Wistar rats on day 10 after surgically induced injury. (a): Control group; (b): group topically treated with *Oncidium flexuosum* extract; (c): group treated with microcurrent (10  $\mu$ A/2 min) (MC); (d): group treated with *O. flexuosum* extract plus microcurrent (10  $\mu$ A/2 min) (OF+MC). Ep: epidermis; (➔): tissue repair area. The sections were stained with toluidine blue. Bar = 100  $\mu$ m.



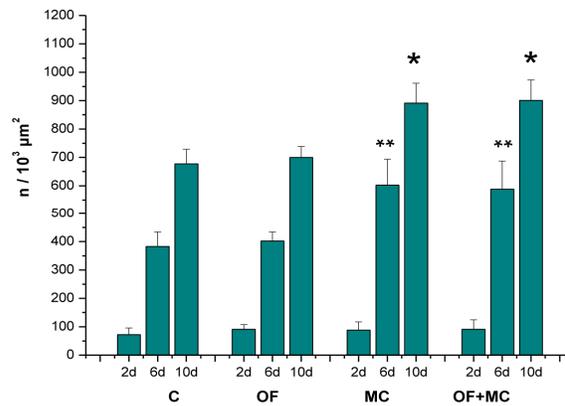
**Figure 2.** Photomicrographs of cross-sections of skin obtained from the back of Wistar rats on day 10 after surgically induced injury. (a): Control group; (b): group topically treated with *Oncidium flexuosum* extract; (c): group treated with microcurrent (10  $\mu$ A/2 min) (MC); (d): group treated with *O. flexuosum* extract plus microcurrent (10  $\mu$ A/2 min) (OF+MC). Ep: epidermis; (➔): tissue repair area. The sections were stained with picosirius-hematoxylin. Bar = 100  $\mu$ m.

Two days after experimental injury, the tissue repair area was significantly greater in the OF group compared to the other experimental groups. This is the inflammatory period of repair process and probably the application of the extract containing *O. flexuosum* exerted an anti-inflammatory action favoring the repair of the lesion. A significantly greater tissue repair area was observed in the MC group as early as on day 6. On day 10 after injury, the wound area was completely reepithelized in the group treated with the combination of *O. flexuosum* extract and microcurrent, with the difference being significant when compared to the other groups (Fig. 3).



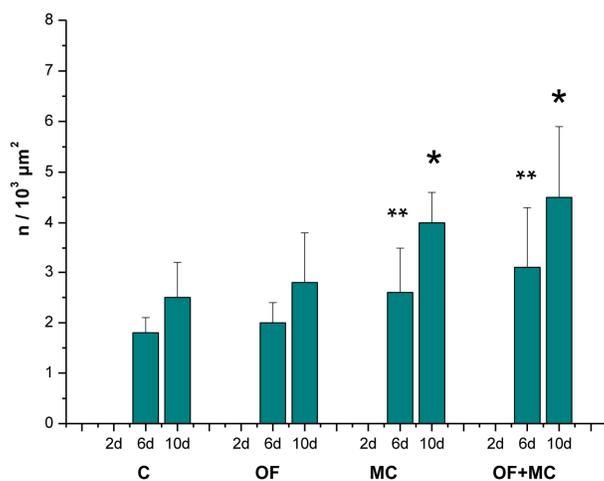
**Figure 3.** Size of the tissue repair area ( $\times 10^3 \mu\text{m}^2$ ) in the region of the experimental wound. C: Control group; OF: group topically treated with *Oncidium flexuosum* extract; MC: group treated with microcurrent ( $10 \mu\text{A}/2 \text{ min}$ ); OF+MC: group treated with *O. flexuosum* extract plus microcurrent ( $10 \mu\text{A}/2 \text{ min}$ ). Samples collected on day 2 (2d), 6 (6d) and 10 (10d) after injury were analyzed. The results are reported as the mean and standard deviation obtained for each group and were compared by ANOVA and the Tukey post-test ( $p < 0.05$ ). Significant differences between control and treated groups in the distinct times of sampling are indicated by #, \*\* and \*.

With respect to the total number of cells on day 6 and 10 after injury, similar numbers were observed in the MC and OF+MC groups, which were significantly higher than those found in the control and OF groups (Fig. 4).



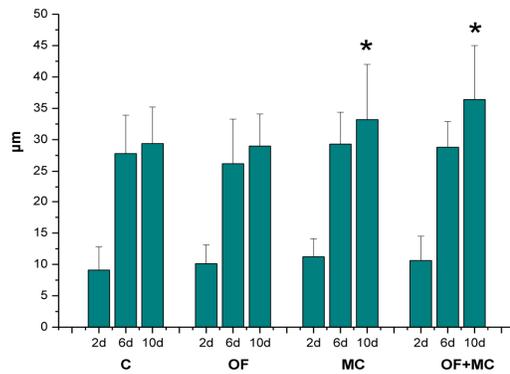
**Figure 4.** Total number of cells ( $n/10^3 \mu\text{m}^2$ ) in the region of the experimental wound. C: Control group; OF: group topically treated with *Oncidium flexuosum* extract; MC: group treated with microcurrent ( $10 \mu\text{A}/2 \text{ min}$ ); OF+MC: group treated with *O. flexuosum* extract plus microcurrent ( $10 \mu\text{A}/2 \text{ min}$ ). Samples collected on day 2 (2d), 6 (6d) and 10 (10d) after injury were analyzed. The results are reported as the mean and standard deviation obtained for each group and were compared by ANOVA and the Tukey post-test ( $p < 0.05$ ). Significant differences between control and treated groups in the distinct times of sampling are indicated by \*\* and \*.

The same pattern was observed for the total number of cells and the number of newly formed vessels. A larger number of newly formed vessels inside the wound area were observed in the OF+MC and MC groups on days 6 and 10 after experimental injury when compared to the other groups (Fig. 5).



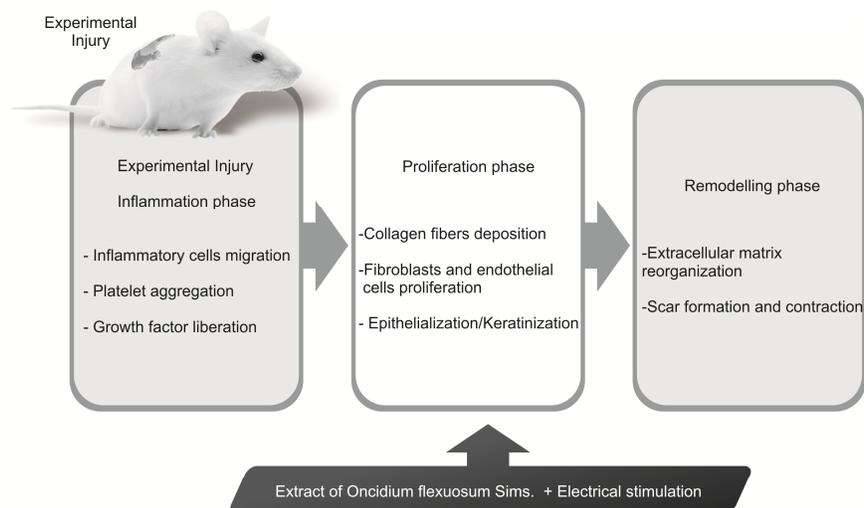
**Figure 5.** Total number of newly formed blood vessels ( $n/10^3 \mu\text{m}^2$ ) in the region of the experimental wound. C: Control group; OF: group topically treated with *Oncidium flexuosum* extract; MC: group treated with microcurrent ( $10 \mu\text{A}/2 \text{ min}$ ); OF+MC: group treated with *O. flexuosum* extract plus microcurrent ( $10 \mu\text{A}/2 \text{ min}$ ). Samples collected on day 2 (2d), 6 (6d) and 10 (10d) after injury were analyzed. The results are reported as the mean and standard deviation obtained for each group and were compared by ANOVA and the Tukey post-test ( $p < 0.05$ ). Significant differences between control and treated groups in the distinct times of sampling are indicated by \*\* and \*.

Additionally, the thickness of newly formed epithelium was higher in the MC and OF+MC groups only on day 10 of treatment (Fig. 6).



**Figure 6.** Epithelial thickness ( $\mu\text{m}$ ) in the region of the experimental wound. C: Control group; OF: group topically treated with *Oncidium flexuosum* extract; MC: group treated with microcurrent ( $10 \mu\text{A}/2 \text{ min}$ ); OF+MC: group treated with *O. flexuosum* extract plus microcurrent ( $10 \mu\text{A}/2 \text{ min}$ ). Samples collected on day 2 (2d), 6 (6d) and 10 (10d) after injury were analyzed. The results are reported as the mean and standard deviation obtained for each group and were compared by ANOVA and the Tukey post-test ( $p < 0.05$ ). Significant differences between control and treated groups in the distinct times of sampling are indicated by \*.

Structural and morphometric analysis suggested that the phytochemical content of the leaf extract of *O. flexuosum* might be responsible for collagen formation at the proliferative state, which is contributed by increased fibroblasts content (Fig. 7).



**Figure 7.** Hypothetical diagram demonstrating the possible effect of *Oncidium flexuosum* leaf extract in wound healing activity.

---

#### 4. Discussion

The understanding of the biological and pathological events that occur during the healing process is of the utmost importance for the treatment of wounds. Clinical evidence shows that the repair of connective, dermal and subdermal tissues can be accelerated by the external application of a low-intensity electrical current [19,29]. Microcurrent electrical stimulation is called biostimulation since this is compatible with that of endogenous currents that act in the organism at the cellular level [14, 17, 18, 30]. This technique is not invasive, presumably has an antioxidant effect, and it showed potential to accelerate wound healing [31].

The combination of the low levels of antioxidants and raised levels of free radical play a major role in delaying wound healing in aged rats and diabetic rats [32]. Microcurrent has been used in the treatment of chronic wounds [33, 34, 35]. Lee [31] using a 100nA current 3 $\mu$ A in the treatment of chronic wounds and ulcers associated with chronic diseases and found that the application of such currents supposedly provide electrons to tissues saturating free radicals and facilitating tissue repair.

In the present study, was evident from the morphometric analysis application that microcurrent alone or combined with OF was significant in promoting an increase in the total number of cells, blood vessels and thickness of the epithelium in the damaged area in all experimental groups subjected to this treatment at 6 and 10 day after the injury. The stimulation of wound healing by low-intensity electrical currents has been reported by various investigators [15, 18, 36, 37]. Biedeback [38] proposed that transmembrane currents open voltage-controlled calcium channels in fibroblasts, causing ATP resynthesis, activation of protein kinase mechanisms to synthesize new cellular protein, and DNA replication necessary for mitotic cell division. Mendonça et al. [27] suggested that microcurrent application to tissue injuries might be used as a coadjuvant to accelerate the healing process. Variations in cell metabolism, as well as fibroblast proliferation, neovascularization and collagen deposition in the wound area have been observed after microcurrent application [39, 40].

---

Topical application of the *O. flexuosum* extract (OF) promoted effects similar to those observed with microcurrent therapy, but to a lesser extent. Various studies have shown the efficacy of phytotherapies agents in wound healing [41-46]. The phytochemical compounds effective in this process and which also present marked anti-inflammatory activity include flavonoids and tannins, also present in the extract OF. Additionally, these compounds exert antioxidant and antibacterial activity by interacting with a wide variety of enzymatic and biochemical systems [42, 47-49]. Moreover, in phytochemical studies of species of the Orchidaceae family have shown the presence of structures which produce and storage substances that are probably responsible for these pharmacological actions, such as flavonoids and terpenes [50, 51]. Fiallo et al. [51], demonstrated that flavonoids were detected in the leaves of the *Oncidium luridum* Lindl.. The presence of these compounds in the Orchidaceae family is widely known [52] and was also present in the extract of *O. flexuosum*.

Flavonoids are used for therapeutic purposes because of their anti-inflammatory, antifungal, antioxidant, and wound healing properties [54]. Moreover, flavonoids and their derivatives are known to decrease lipid peroxidation by improving vascularity and preventing or slowing down the progress of cell necrosis in *Colutea cilicica* Boiss. & Bal. [55]. Flavonoids have also been shown to enhance wound healing processes primarily owing to their antimicrobial and astringent properties, which appear to be responsible for wound contraction and an elevated epithelization rate [56]. Nayak et al. [57] observed a significant wound healing potential after topical application of *Vanda roxburghii* R.Br. extract (Orchidaceae), an epiphytic orchid, to wounds surgically induced in *Wistar* rats.

Tannins also have a role in wound healing processes, according to Bedi and Shenefelt [43] and Jorge Neto et al. [53], these compounds precipitate proteins in damaged tissues, forming a protective lining that favors repair and reduces wound permeability and exudation.

The combination of microcurrent and the extract OF was advantageous in terms of all parameters studied when compared to the control group and to either treatment alone. Soares [58] combined the application of vitamin C and physical agents for the healing of

---

experimental wounds and demonstrated that the combination of antioxidant agents and photodynamnic or low-amperage electrical therapy accelerates wound healing. Maia Filho et al. [59] also investigated the effects of simultaneous application of physical and phytotherapics agents to wounds using ultrasound and *Aloe vera* gel on an experimental model of induction of tendinitis in rats and demonstrated that this type of treatment is effective in terms of both skin repair and reduction of the inflammatory process. Mendonça et al. [27] showed that the simultaneous application of *Aloe vera* and microcurrent was effective in the treatment of open wounds, potentiating wound healing in rats *Wistar*. This seems to indicate a synergistic action between these two applications. Mendonça et al. [60] associated the low-power GaAlAs laser (830nm) with aqueous solution curative of *Stryphnodendron barbatiman* in the treatment of septic wounds of sheep and found complete epithelization at 15 days by daily application of these agents combined. These reports suggest that this methodology where physical agents associated with herbal medicines is effective in the treatment of wounds.

## **5. Conclusion**

The present results show that the extract of *O. flexuosum* was effective in experimental models of wound healing, accelerating this process. However, a better performance was observed when the extract was combined with microcurrent stimulation compared to the other treatments and to the control group, suggesting a synergistic action of these agents. The application of this treatment showed advantages in terms of all parameters studied.

## ***Acknowledgments***

We thank Marta Yabase for donation of the *Oncidium flexuosum* Sims. seedlings used in this study, and Projeto Saúde & Harmonia (Uniararas) for seedling maintenance.

---

## References

1. R. Govindrajan, B. Kumar, M. Vijaykumar, P. Pushpangadan, "Ethnopharmacological approaches to wound healing-exploring medicinal plants of India," *Journal of Ethnopharmacology*, vol. 114, no. 2, pp. 103–113, 2007.
2. S.G. Rao, A.L. Udupa, S.L. Udupa, "Calendula and Hypericum: two homeopathic drugs promoting wound healing in rats," *Fitoterapia*, vol. 62, no. 6, pp. 508-510, 1991.
3. C.M. Schempp, B. Winghofer, R. Ludtke, B. Simon-Haarhaus, E. Shopp, J.C. Simon, "Topical application of St John's wort (*Hypericum perforatum* L) and of its metabolite hyperforin inhibits the allostimulatory capacity of epidermal cells," *British Journal of Dermatology*, vol. 142, no. 5, pp. 979-984, 2000.
4. P.S. Martins, A.L.G. Alves, C.A. Hussni, J.L. Sequeira, J.L.M. Nicoletti, A. Thomassian, "Comparação entre fitoterápicos de uso tópico na cicatrização de pele em eqüinos," *Archives of Veterinary Science*, vol. 8, no. 2, pp. 1-7, 2003.
5. A.B. Joly, "Botânica – Introdução à Taxonomia Vegetal," 11th ed, Companhia Editora Nacional, 1993.
6. P.H. Raven, R.F. Everest, S.E. Eichhorn, "Biologia Vegetal," 6th Ed, Guanabara Koogan, 2001.
7. G.J. Pabst, "Estudos no gênero *Oncidium* Sw. (Orchidaceae)-IV," *Bradea*, vol. 1, no. 15, pp. 137-143, 1972.
8. L.A. Garay, J.E. Stacy, "Synopsis of the genus *Oncidium*," *Bradea*, vol.1, no. 40, pp. 393-427, 1974.
9. R.L. Dressler, "The orchids: natural history and classification," Harvard University Press, 1990.
10. J. Arditti, "Fundamentals of orchid biology," New York: John Wiley, 1992.
11. J.M. Kong, N.K. Goh, L.S. Chia, T.F. Chia, "Recent advances in traditional plant drug and orchids," *Acta Pharmacologica Sinica*, vol.24, no. 1, pp. 7-21, 2003.

- 
12. The Committee on Scholarly Communication with the People's Republic of China, "Herbal Pharmacology in the People's Republic of China," Washington, D.C.: National Academy of Sciences, 1975.
  13. H. Ward, "Herbal Manual: The Medicinal, Toilet, Culinary and other Uses of 130 of the most Commonly Used Herbs," London: LN Fowler & Co Ltd, 1936.
  14. N. Chen, H. Van Hoff, E. Bocks, "The effect of electric currents on ATP generation, protein synthesis, and membrane transport in rat skin," *Clinical Orthopaedics and Related Research*, vol. 171, pp. 264-72, 1982.
  15. P. Houghton, C. Kincaid, M. Lovell, "Effect of electrical stimulation on chronic leg ulcer size and appearance," *Physical Therapy*, vol. 83, no. 1, pp. 17-28, 2003.
  16. L.C. Kloth, J. Feedar, "Acceleration of wound healing with high voltage, monophasic, pulsed current," *Physical Therapy*, vol. 68, no. 4, 503-508, 1988.
  17. L.C. Kloth, "Electrical stimulation for wound healing: a review of evidence from in vitro studies, animal experiment, and clinical trials," *International Journal of Lower Extremity Wounds*, vol. 4, no. 1, pp. 23-44, 2005.
  18. M. Bayat, Z. Asgari-Moghadam, M. Maroufi, F.S. Rezaie, M. Rakhshan, "Experimental wound healing using microamperage electrical stimulation in rabbits," *Journal of Rehabilitation Research & Development*, vol. 43, no.2, pp. 219-226, 2006.
  19. V.N.S. Santos, L.M. Ferreira, E.K. Horibe, I.S. Duarte, "Electric microcurrent in the restoration of the skin undergone a trichloroacetic acid peeling in rats," *Acta Cirurgica Brasileira*, vol. 19, no. 5, pp. 466-470, 2004.
  20. K.K.R. Valle, L.L. Reis, J.J. Bouvent, C.S. Shida, "Efeito da aplicação de microcorrente elétrica na restauração de pele de ratos exposta à ação de radicais livres," *21º CBEB*, pp.247-249, 2008.
  21. G.B. Marini-Bettolo, M. Nicoletti, M. Patamia, "Plant screening by chemical and chromatographic procedures under field conditions," *Journal of Chromatography*, vol. 218, pp. 113-217, 1981.
  22. J.B. Harborne, "Phytochemical Methods. A Guide to Modern Techniques of Plant Analysis," 2nd ed, Chapman and Hall, 1984.

- 
23. F.J.A. Matos, "Introdução à Fitoquímica Experimental," Fortaleza: Edições UFC, 1997.
24. International Guiding Principles for Biomedical Research Involving Animals-CIOMS, 1985.
25. Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, NIH Publication, pp. 82-23, 1996.
26. T.A. Mustoe, G.F. Pierce, A. Thomason, P. Gramates, M.B. Sporn, T.F. Deuel, "Accelerated healing of incisional wounds in rats induced by transforming growth factor-beta," *Science*, vol. 237, no. 4820, pp. 1333-1336, 1987.
27. F.A.S. Mendonça, J.R. Passarini Jr, M.A.M. Esquisatto, J.S. Mendonça, C.C. Franchini, G.M.T. Santos, "Effects of the application of *Aloe vera* (L.) and microcurrent on the healing of wounds surgically induced in Wistar rats (*Rattus norvegicus*)," *Acta Cirurgica Brasileira*, vol. 24, no. 1, pp. 150-155, 2009.
28. T.J. Gill, G.J. Smith, R.W. Wissler, "The rats as an experimental animal," *Science*, vol. 245, no. 4915, pp. 269-276, 1989.
29. A. Frick, D. McCauley, "Microcurrent electrical therapy," *Journal of Equine Veterinary Science*, vol. 25, no.11, pp.418-422, 2005.
30. A. T. Barker, L. F. Jaffee, J. W. Vanable Jr., "The glabrous epidermis of cavies contains a powerful battery," *American Journal of Physiology*, vol. 242, no. 3, pp. 358-366, 1982.
31. B.Y.Lee , N. AL-Waili, D. Stubbs, K. Wendell, G. Butler, T. AL-Waili, A. AL-Waili, "Ultra-low microcurrent in the management of diabetes mellitus, hypertension and chronic wounds: Report of twelve cases and discussion of mechanism of action," *International Journal of Medical Sciences*, vol. 7, pp. 29-35, 2010.
32. M. Anamika, A. S. Rasik, "Antioxidant status in delayed healing type of wounds," *International Journal of Experimental Pathology*, vol. 81, no. 4, pp. 257-263, 2000.
33. P.J. Carley, S. F. Wainapel, "Electrotherapy for acceleration of wound healing: low intensity direct current," *Archives of Physical Medicine and Rehabilitation*, vol. 66, pp. 443-446, 1985.

- 
34. J. P. Nessler, D. P. Mass, "Direct-current electrical stimulation of tendon healing in vitro," *Clinical Orthopaedics and Related Research*, vol. 217, pp. 303-312, 1987.
35. N. AL-Waili, "Electrotherapy for chronic gum and periapical abscesses," *Journal of Pakistan Medical Association*, vol. 39, pp.161-162, 1989.
36. C. A. L. Bassett, "Beneficial effects of electromagnetic-fields," *Journal of Cellular Biochemistry*, vol. 51, pp. 387-393, 1993.
37. A. Sheffet, A. S. Cytryn, D. B. Louria, "Applying electric and electromagnetic energy as adjuvant treatment for pressure ulcers: a critical review," *Ostomy Wound Manage*, vol. 46, pp. 28-33, 2000.
38. M. C. Biedeback, "Accelerated healing of skin ulcers by electrical stimulation and intracellular physiological mechanisms involved," *Acupuncture and Electrotherapy Research*, vol.14, no. 1, pp.43-60, 1989.
39. R. K. Aaron, D. M. Ciombor, "Therapeutic effects of electromagnetic fields in the stimulation of connective tissue repair," *Journal of Cellular Biochemistry*, vol. 52, pp. 42-46, 1993.
40. A. C. B. Macedo, N. D. Simões, "Aplicação de estimulação elétrica de baixa intensidade no tratamento de úlceras varicosas," *Fisioterapia em movimento*, vol. 20, no. 3, pp. 23-33, 2007.
41. C. M S. Peruchi, R. A. Acevedo, S. L. Franco, "Efecto del propóleos en la cicatrización de lesiones subcutáneas inducidas en el dorso del ratones: estudio histológico," *Revista de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile* , vol. 19, no. 2, pp. 23-34, 2001.
42. L. Ardisson, J. S. Godoy, L. A. M. Ferreira, J. R. Stehmann, M. G. L. Brandão, "Preparação e caracterização de extratos glicólicos enriquecidos em taninos a partir das cascas de *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville (Barbatimão)," *Revista Brasileira de Farmacognosia*, vol.12, no. 1, pp. 27-34, 2002.
43. M. K. Bedi, P. D. Shenefelt, "Herbal therapy in dermatology," *Archives of Dermatology* , vol. 138, pp. 232-242, 2002.
44. P. S. Martins, A. L. G. Alves, C. A. Hussni, J. L. Sequeira, J. L. M. Nicoletti, A. Thomassian, "Comparação entre fitoterápicos de uso tópico na cicatrização de pele em eqüinos," *Archives of Veterinary Science*, vol. 8, no. 2, pp. 1-7, 2003.

- 
45. W. R. Lee, J. H. Park, K. H. Kim, S. J. Kim, D. H. Park, M. H. Chae et al, "The biological effects of topical alginate treatment in an animal model of skin wound healing," *Wound Repair and Regeneration*, vol. 17, no. 4, pp. 505-510, 2009.
46. A. J. d'Acampora, R. Tramonte, D. Bürger, P. J. Bürger, "Efeitos da quercetina na cicatrização de ferida cirúrgica contaminada em ratos Wistar ACM: *Arquivos Catarinenses de Medicina* ,vol. 36, no.1, pp. 69-75, 2007.
47. T. A. S. Araújo, N. L. Alencar, E. L. C. Amorim, U. P. Albuquerque, "A new approach to study medicinal plants with tannins and flavonoids contents from the local knowledge," *Journal of Ethnopharmacology*, vol. 120, no. 1, pp.72-80, 2008.
48. A. T. Ermertcan, S. Inan, S. Ozturkcan, C. Bilac, S. Cilaker, "Comparison of the effects of collagenase and extract of *Centella asiatica* in an experimental model of wound healing: An immunohistochemical and histopathological study," *Wound Repair Regeneration*, vol. 16, no. 5, pp. 674-681, 2008.
49. C. Chifa, A. I. A. Ricciardi, "Especies del género *Oncidium* (Orchidaceae) utilizadas como diuréticas por los nativos del Chaco argentino," *Ciencia & Tecnica - Comunicaciones Científicas y Tecnológicas*, 2001.
50. M. F. G. Fernandes, C. S. Oliveira, M. O. Mercadante-Simões, B. C. F. Mota, "Aplicações Terapêuticas de Orquidáceas," III Fórum Gestão, Pesquisa, Ensino e Extensão. Unimontes Universidade Estadual de Montes Claros, 2009.
51. V. R. F. Fiallo, M. M. G. Lorenzo, C. M. L. Hernández, C. A. R. Ferradá, "Estudios Fenológicos en Plantas Medicinales," *Revista Cubana de Plantas Mediciniais*, vol. 3, no. 1, pp. 7-11, 1998.
52. C. A. Williams, J. Greenham, J. B. Harborne, J. M. Kong, N. K. Goh, L. S. Chia, "Acylyated anthocyanins and flavonols from purple flowers of *Dendrobium* cv. 'Pompadour'," *Biochemical Systematics and Ecology*, vol. 30, no. 7, pp. 667-675, 2002.
53. J. Jorge Neto J, J. F. Fracasso, M. C. L. C. Neves, L. E. Santos, V. L. Banuth, "Tratamento de úlcera varicosa e lesões de pele com *Calendula officinalis* elou com *Stryphnodendron barbatiman* (vellozo) *martius*," *Revista de Ciências Farmacêuticas*, vol. 17, pp. 181-186, 1996.

- 
54. S. B. Nayak, S. Sandiford, A. Maxwell, "Evaluation of the wound-healing activity of ethanolic extract of *Morinda citrifolia* L. leaf," *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, vol. 6, no.3, pp. 351-356, 2009.
55. I. S. Süntar, U. Koca, E. K. Akkol, D. Yilmazer and M. Alper, "Assessment of wound healing activity of the aqueous extracts of *Colutea cilicica* Boiss. & Bal. fruits and leaves," *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, volume 2011, Article ID 758191, 7 pages, doi:10.1093/ecam/nep190.
56. I. Pesin, U. Koca, H. Keles, E. Kupeli Akkol, "Wound healing activity of *Rubus sanctus* Schreber (Rosaceae): preclinical study in animal models. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2009; doi:10.1093/ecam/nep137.
57. B. S. Nayak, R. Suresh, A. V. Rao, G. K. Pillai, E. M. Davis, V. Ramkisson, A. Marae, "Evaluation of wound healing activity of *Vanda roxburghii* R. Br (Orchidaceae): a preclinical study in a rat model," *International Journal of Lower Extremity Wounds*, vol. 4, no. 4, pp. 200-204, 2005.
58. F. R. L. Soares, "Reparação de feridas cutâneas tratadas com vitamina C, laser e a associação de vitamina C e laser: estudo histológico em ratos," Master's thesis, Unimar, 2005.
59. A. L. M. Maia Filho, A. G. B. VilaVerda, K. S. Araújo, I. M. S. P. Santos, T. L. Barros, F. Aimbire, R. Albertini, "Análise do efeito do ultra-som terapêutico associado ao *Aloe vera* no tratamento de tendinite experimental," *21º CBEB*, pp. 1359-1362, 2008.
60. G. B. N. Mendonça, J. M. Moraes, J. Ferreira, F. G. Lima, E. R. Bastos, L. K. Soares, J. B. Helou, R. O. Alves, O. C. Silva, "Laser As-Ga-Al de baixa potência associado com solução aquosa de barbatimão (*Stryphnodendron barbatiman* Martius) na reparação tecidual de ferida cutânea séptica de ovino," Universidade Federal de Goiás, 2008.