

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
FARMANGUINHOS
COMPLEXO TECNOLÓGICO DE MEDICAMENTOS

ANDRÉ MESQUITA MARQUES

POTENCIAL QUÍMICO E FARMACOLÓGICO DE *ECHINODORUS
GRANDIFLORUS*: UMA ESPÉCIE DE USO POPULAR COM GRANDE
POTENCIAL PARA O DESENVOLVIMENTO DE UM
FITOMEDICAMENTO NO PAÍS.

Rio de Janeiro

2016

ANDRÉ MESQUITA MARQUES

POTENCIAL QUÍMICO E FARMACOLÓGICO DE *ECHINODORUS GRANDIFLORUS*: UMA ESPÉCIE DE USO POPULAR COM GRANDE POTENCIAL PARA O DESENVOLVIMENTO DE UM FITOMEDICAMENTO NO PAÍS.

Monografia apresentada ao Curso de Pós-graduação *Lato Sensu* como requisito para obtenção do título de Especialista em Gestão da Inovação em Medicamentos da Biodiversidade.

Orientadora: Dra. Carmelinda Affonso

Rio de Janeiro

2016

**Ficha catalográfica elaborada pela
Biblioteca de Medicamentos e Fitomedicamentos/ Farmanguinhos / FIOCRUZ - RJ**

M357p

Marques, André Mesquita

Potencial químico e farmacológico de *Echinodorus grandiflorus*: uma espécie de uso popular com grande potencial para o desenvolvimento de um fitomedicamento no país / André Mesquita Marques. – Rio de Janeiro, 2016.

ix , 45f. : il. 30 cm.

Orientadora: Dra. Carmelinda Affonso

Monografia (Especialização) – Instituto de Tecnologia em Fármacos – Farmanguinhos, Pós-graduação em Gestão da Inovação de Medicamentos da Biodiversidade na modalidade EAD, 2016.

Bibliografia: f. 45-56

1. Echinodorus. 2. E. gradiflorus. 3. Anti-hipertensivo. 4. Plantas Medicinais. 5. Chapéu-de-Couro. I. Título.

CDD 581.634

ANDRÉ MESQUITA MARQUES

Monografia apresentada ao Curso de Pós-graduação *Lato Sensu* de Gestão da Inovação em Medicamentos da Biodiversidade FIOCRUZ/ENSP/Farmanguinhos, como requisito final à obtenção do título de Especialista em Gestão da Inovação em Fitomedicamento.

Orientadora: Dra. Carmelinda Affonso

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Carmelinda Affonso – Farmanguinhos/FIOCRUZ
Orientadora

Dr^a. Maria Raquel Figueiredo – Farmanguinhos/FIOCRUZ

Dr^a. Betina M. Ruppelt - Farmanguinhos/FIOCRUZ

**Aos amigos e colaboradores do projeto *Echinodorus grandiflorus* de
Farmanguinhos/FIOCRUZ**

AGRADECIMENTOS

Ao Curso de Pós-Graduação *Lato Sensu* de Gestão da Inovação em Medicamentos da Biodiversidade e ao Núcleo de Gestão em Biodiversidade e Saúde da Fiocruz pela iniciativa de promover e disseminar o conhecimento inerente a inovação e sustentabilidade e a oportunidade de agregar esse conhecimento à minha carreira profissional.

À minha chefe e amiga Dr^a Maria Raquel Figueiredo pelo incentivo, apoio e compreensão com nossa rotina no curso de Gestão da Inovação de Fitomedicamentos.

À minha orientadora Carmelinda Affonso contribuição valiosa aos meus conhecimentos e pelo apoio energético atuante, me estimulando para que eu pudesse continuar no curso em meio as atribulações inesperadas do cotidiano.

À minha Eterna Mentora Prof^a Emérita Maria Auxiliadora Coelho Kaplan por sempre me incentivar na busca pelo conhecimento e fazê-lo da melhor forma possível.

Aos colegas de curso pelo companheirismo e apoio ao longo da trajetória do conhecimento, em especial as amigas Flavia Camillo e Lavínia Brito.

À minha família que sempre me apoiou em todas as etapas de minha vida.

Aos meus amigos e colaboradores do projeto *Echinodorus* de Farmanguinhos por acreditarem sempre no potencial da biodiversidade brasileira e trabalhar unidos em prol da melhoria da saúde no país.

Aos amigos e companheiros de trabalho do Laboratório de Produtos Naturais PN3 em Farmanguinhos/FIOCRUZ.

RESUMO

O Brasil concentra o maior número de angiospermas do planeta e variado conhecimento tradicional associado. Todavia, somente cerca de 1% das espécies da Mata Atlântica já foram estudadas quimicamente. A espécie *Echinodorus grandiflorus* (Cham & Schltdl) Micheli, conhecida popularmente como chapéu de couro é uma espécie nativa do território brasileiro com conhecida utilização medicinal e indicada para o tratamento de diversas enfermidades. Estudos preliminares descritos na literatura, demonstraram que o extrato bruto da espécie *E. grandiflorus* apresenta uma diversidade química estrutural em diterpenos e flavonóides além de significativa atividade anti-hipertensiva em ratos. A hipertensão e doenças cardiovasculares representam um dos maiores problemas de saúde pública em todo mundo. No Brasil, cerca de 30% dos óbitos estão relacionados às doenças cardiovasculares. O objetivo deste trabalho foi sistematizar o conhecimento acumulado da espécie *Echinodorus grandiflorus* a partir da abordagem farmacológica e toxicológica da espécie e seus marcadores químicos descritos na literatura. Os dados farmacológicos descritos na literatura demonstram que o extrato hidroalcolólico apresenta um potencial efeito anti-hipertensivo por via oral sem causar toxidez aparente em ratos, sendo esta atividade corroborada pelos mecanismos de ação dos marcadores químicos isolados na espécie. O método empregado nesse estudo consistiu em revisão bibliográfica não exaustiva de artigos científicos, dissertações e teses relacionados a espécie *Echinodorus grandiflorus* e seus marcadores químicos. Foram utilizadas ferramentas de busca virtuais como o Scifinder, ISI Web of Science, Pubmed e sites de patentes como o site eletrônico do Instituto Nacional de Propriedade Industrial – INPI, do Escritório de Patentes Europeu – EPO e do United States Patent Trade Office – USPTO para a busca de documentos relacionados á inovação envolvendo a espécie estudada. O potencial farmacológico e comercial descrito para o chapéu-de-couro e seus marcadores químicos torna explícito a necessidade de validação da espécie *E. grandiflorus*, assim como sugere maior atenção à mesma no sentido de se investir no processo de P&D a fim de promover a inovação utilizando a biodiversidade nacional.

Palavras-chave: *Echinodorus*; *E. grandiflorus*; anti-hipertensivo, plantas medicinais; chapéu-de-couro.

ABSTRACT

Brazil has the largest number of angiosperms in the planet and great variety of traditional knowledge. However, about only 1% of Atlantic Forest species have been studied chemically. The species *Echinodorus grandiflorus* (Cham & Schltld) Micheli, popularly known as leather hat is a native species of the Brazilian territory with known medicinal use and indicated for the treatment of various diseases. Preliminary studies described in literature proved that the crude extract of the species *E. grandiflorus* has a chemical diversity specially based in diterpenoids and flavonoids, as well as significant anti-hypertensive activity in rats. Hypertension and cardiovascular diseases represent a major public health problem worldwide. In Brazil, about 30% of deaths are related to cardiovascular disease. The aim of this study was to systematize the accumulated knowledge of the species *Echinodorus grandiflorus* from the pharmacological and toxicological approach of the species and its chemical markers in the literature. The pharmacological data reported in the literature shows that the hydroalcoholic extract has a potential antihypertensive effect orally without causing apparent toxicity in rats, and this activity is supported by the mechanisms of action of isolated chemical markers in the species. The method used in this study consisted of non-exhaustive literature review of scientific papers, dissertations and theses related species *Echinodorus grandiflorus* and its chemical markers. Virtual search tools were used such as Scifinder, ISI Web of Science, Pubmed and patent sites like electronic website of the National Institute of Industrial Property - INPI, the European Patent Office - EPO and the United States Patent Trade Office - USPTO were used for searching related documents related to innovation involving this species. Pharmacological and commercial potential described for the species leather hat and its chemical markers becomes explicit the need for validation of the species *E. grandiflorus*, and suggests more attention to it in order to invest in the R & D process in order to promote innovation using national biodiversity.

Keywords: *Echinodorus*; *E. grandiflorus*; antihypertensive; medicinal plants; chapéu-de-couro.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Partes aéreas de <i>Echinodorus grandiflorus</i> Mitch. em seu habitat natural.....	15
Figura 2 – Principais substâncias bioativas isoladas de <i>Echinodorus grandiflorus</i>	27

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Patentes relacionadas à espécie chapéu-de-couro.....	38
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACE – Acetil colinesterase

AMPc – Monofostato cíclico de adenosina

ATP – Adenosina Trifosfato

Ca – Cálcio

Cl - Cloro

CLAE – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

CGEN - Conselho de Gestão do Patrimônio Genético

COX – Ciclooxygenase

CYP 450 – Citocromo P 450

DNA – Ácido desoxirribonucléico

DL – Dose Letal

EPO – European Patent Organization

EtOH – Fração Etanólica

FIOCRUZ – Fundação Oswaldo Cruz

GMPc – Monofostato cíclico de guanosina

K - Potássio

IC50 – Concentração Inibitória para 50% das amostras

INPI – Instituto Nacional de Propriedade Industrial

NO – Óxido Nítrico

MIC – Concentração Mínima Inibitória

MS – Ministério da Saúde

L - NAME – Ester Metílico de Nitro-L-Arginina

OMS – Organização Mundial de Saúde

P&D – Pesquisa e Desenvolvimento

PAF – Fator de Agregação Plaquetária

PGE2 - Prostaglandina

PNPIC – Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares

PNPMF – Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos

PPPM – Programa de Pesquisa de Plantas Medicinais

PUBMED – Buscador de artigos publicados na área médica

RENAME – Relação de Medicamentos Essenciais

RENISUS – Relação Nacional de Plantas Medicinais com Potencial de Utilização no Sistema Único de Saúde

ROS – Espécie reativa de oxigênio

SCIFINDER – Buscador de artigos científicos

SUS – Sistema Único de Saúde

TNF – alfa – Fator de Necrose tumoral alfa

THP-1 – Tipo de célula (monócito)

USPTO – United States Patent Trade Organization

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	09
2. JUSTIFICATIVA	13
3. OBJETIVO	14
3.1. Objetivos específicos	14
4. REFERENCIAL TEÓRICO	15
4.1. Aspectos Bioecológicos da Espécie	15
4.1.1. Panorama Taxonômico da Espécie.	15
4.1.2. Aspectos Botânicos.....	17
4.1.3. Habitat e Distribuição Geográfica	17
4.1.4. Aspectos Agroecológicos.....	18
4.1.5. Aspectos Etnofarmacológicos.....	19
4.2. Aspectos Químico da Espécie.....	21
4.2.1. Perfil Químico da Espécie.....	21
4.3. Atividades farmacológicas relacionadas.....	22
4.4. Aspectos toxicológicos do <i>E.grandiflorus</i>	26
4.5. Potencial farmacológico dos Metabólitos.....	28
4.5.1. Potencial farmacológico dos marcadores químicos da espécie.....	28
4.5.2. Atividades Descritas para os Flavonóides da Espécie.....	29
4.6. Inovação Tecnológica a partir da Espécie.....	41
4.6.1. Pedidos de Patente relacionados a espécie <i>E.grandiflorus</i>	41
5. METODOLOGIA	42
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	43
7. REFERÊNCIAS	44

1. INTRODUÇÃO

A partir do século XIX, o desenvolvimento da química orgânica foi impulsionado pelo estudo de plantas medicinais e isolamentos das substâncias bioativas presentes nessas espécies, os princípios ativos. Nesse período houve o isolamento e a caracterização de importantes substâncias farmacologicamente ativas utilizadas até hoje para fins medicinais, como é o caso do ácido acetilsalicílico, da morfina, da escopolamina, atropina e fisostigmina por exemplo (BARREIRO *et al.*, 2006). Nas últimas décadas, o emprego de substâncias de origem natural na busca de novas moléculas bioativas teve grande importância no cenário farmacêutico, haja visto que cerca de 25% dos fármacos empregados nos países desenvolvidos são produzidos diretamente ou indiretamente de produtos naturais, sendo 70% dos antitumorais e antimicrobianos são de origem natural ou semi-síntese (NEWMAN AND CRAGG, 2007).

O Brasil, embora apresente uma vasta flora contendo um acervo de 55 espécies vegetais, maior número de angiospermas do planeta, e uma rica cultura popular tradicional em plantas medicinais, possui somente cerca de 1% das espécies da Mata Atlântica estudadas (MYERS *et al.*, 2000). O reduzido investimento em estudos fitoquímicos e farmacológicos envolvendo a biodiversidade nacional com criação de bancos de germoplasma e banco de substâncias/extratos no país retarda o avanço da descoberta de novos fármacos de origem natural no país. No passado, muito da biodiversidade nacional foi usurpada por meio de biopirataria, gerando dividendos em países desenvolvidos com a utilização de espécies nativas do Brasil. A carência de uma política direcionada para a pesquisa e valorização do patrimônio natural brasileiro refletiu durante muito tempo na política de saúde pública do país, visto que em alguns casos, parte das doenças modernas e endêmicas do país poderia ser tratada eficientemente com o uso de plantas medicinais ou utilizadas como adjuvantes no tratamento de diversas enfermidades.

A química de produtos naturais visa o imediato esclarecimento e registro dos constituintes químicos presentes no metabolismo secundário das plantas. A importância científica de pesquisas desenvolvidas nessa área vem contribuindo na identificação e aplicação biológicas de diversas substâncias ou mistura de substâncias, possibilitando assim, um controle racional e mais segurança no emprego de plantas como medicamento.

Vários fármacos de origem natural foram descobertos e ainda são utilizados na terapêutica mundial. Como exemplo, podemos citar o metabólito derivado diterpenoídico taxol isolado de *Taxus brevifolia*, assim como a utilização do extrato padronizado os *Ginkgo biloba* contendo flavóides e diterpenos ginkgolidos (24 e 6%) respectivamente, e o esteviosídeo isolado *Stevia rebaudiana* que são de grande importância para a indústria farmacêutica (BARREIRO *et al.*, 2006).

Nesse contexto, as espécies de plantas medicinais são importantes insumos para a fabricação de medicamentos. Todavia, assim como os medicamentos alopáticos, os constituintes naturais são considerados substâncias xenóbias ao organismo humano, podendo trazer riscos para a saúde em casos de toxidez. Muitas espécies são utilizadas sem qualquer validação científica para garantir a segurança e eficácia de uso, sendo muito utilizadas em práticas populares e tradicionais como misturas caseiras e comunitárias no processo conhecido como medicina tradicional. O Brasil, considerado um país de megadiversidade, possui uma rica diversidade cultural e étnica que resultou num acúmulo de conhecimentos tradicionais e tecnológicos passados de geração a geração entre os diferentes povos que compuseram a população brasileira desde a colonização. Dentre estes se destaca o vasto acervo de conhecimentos sobre o manejo e o uso de plantas medicinais. Muitas espécies medicinais brasileiras podem ser encontradas especialmente nas primeiras edições da Farmacopéia Brasileira. Todavia, a maioria das espécies descritas continuam a ser exóticas, principalmente espécies europeias, o que demonstra a necessidade iminente de valorização e estudo aprofundado sobre o potencial químico e utilização das espécies brasileiras (ALVES, 2013).

A biodiversidade, do ponto de vista da preservação e da sustentabilidade, é considerada uma estratégia para a soberania sobre os recursos naturais do Brasil. A partir de 2001 com a criação e regulamentação do Conselho de Gestão do Patrimônio Genético (CGEN), houve início no país a proteção aos recursos naturais nativos (material genético e produtos oriundos de organismos vivos) antes demasiadamente explorada por biopirataria internacional. Nos primeiros quinze anos de existência do CGEN, o lento e dificultoso processo burocrático de pedidos de acesso ao patrimônio genético culminou em muitas multas milionárias aplicadas às empresas e pesquisadores da área de fitos no país, ocasionando um retrocesso na pesquisa fitoquímica e desenvolvimento tecnológico no país.

Com o adjunto da Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos (PNMF) em 2006, a pesquisa, a valorização da biodiversidade e do conhecimento tradicional, assim como a sustentabilidade ganharam importância no cenário político no país. Esses temas estão presentes nas diretrizes nessa Política inovadora nas políticas públicas de saúde por englobar temas como meio ambiente, desenvolvimento econômico e social. Sua implementação propõe ações transversais dentro destes temas com o objetivo de promover melhorias na qualidade de vida da população brasileira (BRASIL, 2006a). Paralelamente, a PNMF, a Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares do SUS de 2006 contribuiu para a democratização da fitoterapia no país, abrindo o mercado para a inserção de fitoterápicos no Brasil e consolidação de práticas terapêuticas alternativas a fim de garantir a melhoria do bem-estar físico e mental dos pacientes do SUS (BRASIL, 2006b). Em 2008, houve a criação da Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS (RENISUS). Foi apresentada uma lista com 71 plantas medicinais que apresentam potencial para gerar produtos de interesse ao SUS. A finalidade da lista é orientar estudos e pesquisas que possam subsidiar a elaboração da relação de fitoterápicos disponíveis para uso da população, com segurança e eficácia para o tratamento de determinada doença (BRASIL, 2008c). A cada ano, é estimulado o preparo de novas monografias e estudos por parte dos centros de pesquisas do país. O acúmulo de informações visa a garantia da segurança e eficácia das plantas medicinais, e servir de suporte para a utilização das mesmas pelo Sistema Único de saúde. O Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos criado em 2008 fortaleceu a implementação e estimulou a utilização e pesquisa de espécies com potencial farmacológico no país como um ato concreto da PNMF (BRASIL, 2008d). Em 2008, a inserção de 12 fitoterápicos na Relação Nacional de Medicamentos Essenciais (RENAME) ampliou o arsenal terapêutico nacional, aumentando a oferta de opções de substituição de medicamentos disponíveis no mercado e estimulando a utilização de plantas medicinais devidamente validadas cientificamente (BRASIL, 2008e). O avanço das pesquisas com plantas medicinais no país é impulsionado pelas políticas públicas de saúde, as quais visam estimular cada vez mais a inserção futura de novas espécies devidamente validadas na lista de medicamentos essenciais e possíveis novas fontes terapêuticas. Nesse intuito, muitas espécies de uso tradicional tem sido pesquisadas e contribuído para a composição de monografias que futuramente farão parte da RENISUS e conseqüentemente da RENAME. Nesse contexto, muitas espécies conhecidas e de uso popular no país ainda aguardam validação científica para configurar no cenário medicinal

do SUS, como é o caso da espécie conhecida como chapéu-de-couro no Brasil, a espécie *Echinodorus grandiflorus*. Apesar dos registros de utilização popular da espécie para algumas enfermidades e a existência de dados referentes ao potencial farmacológico da planta medicinal na literatura, a mesma ainda não consta em nenhuma lista potencial de plantas medicinais no país, sendo necessária uma validação científica para assegurar o potencial terapêutico e eficácia da espécie.

A espécie *Echinodorus grandiflorus* (Cham & Schltldl) Micheli, (Figura 1) conhecida popularmente como chapéu-de-couro apresenta diversas indicações etnofarmacológicas atribuídas frequentemente as propriedades: antiartrítica, anti-inflamatória, antirreumática, diurética e hipotensora (TIBIRIÇA *et al*, 2006; PRANDO *et al.*, 2015; GARCIA *et al.*, 2010). Tal espécie nativa brasileira tem sido comumente utilizada na medicina popular como anti-hipertensivo natural devido principalmente a sua ação diurética apresenta dados científicos que corroboram essa indicação de uso etnofarmacológicos. Estudos preliminares descritos na literatura, demonstraram que o extrato etanólico bruto da espécie *E. grandiflorus* apresenta uma diversidade química estrutural em diterpenos e flavonóides, além de apresentar potencial atividade anti-hipertensiva em ratos. Os dados farmacológicos demonstram que o extrato hidroalcolólico apresenta também efeito anti-hipertensivo por via oral sem causar toxidez aparente.

As doenças cardiovasculares representam um dos maiores problemas de saúde pública não só nos países desenvolvidos, mas também nos países em desenvolvimento. Dados do Ministério da Saúde mostram que no Brasil, cerca de 30% dos óbitos estão relacionados às doenças cardiovasculares (BRASIL, 2011f). O estudo fitoquímico e farmacológico de espécies com propriedades cardiovasculares poderiam auxiliar na terapia tradicional servindo como adjuvantes alternativos às terapias convencionais e/ou facilitar o acesso a medicamentos em locais de difícil acesso por meio da própria utilização das plantas medicinais *in natura* ou de derivados produzidos por farmácias vivas locais.

Visando o desenvolvimento e a inovação com a utilização da biodiversidade do país, os fitoterápicos a partir de espécies nativas do Brasil são essenciais para que a pesquisa nacional inove em saúde pública, criando novas alternativas de tratamento e aumente o acesso universal aos medicamentos essenciais. Desta forma, este trabalho tem como proposta integrar os conhecimentos tradicional, científico, e o patentário

envolvendo o conhecimento e o potencial de inovação tecnológica inerente à espécie chapéu-de-couro a fim de que inovações no âmbito da saúde aconteçam, auxiliando o fortalecimento das bases produtivas e da competitividade industrial nacional.

2. JUSTIFICATIVA

Apesar de ser referência na produção de vacinas e medicamentos no país, a Fiocruz (Fundação Oswaldo Cruz) ainda não possui nenhum fitoterápico na linha de produção. Todavia, possui uma reconhecida estrutura de P&D na área de Produtos Naturais e desde 2006 segue alinhada com a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos aprovada pelo Governo Federal. Atualmente, diversos projetos de pesquisas seguem em andamento, tendo Farmanguinhos um papel de destaque na área de pesquisa em produtos naturais e com grande atuação na interação de cadeias produtivas com o projeto RedesFito. Entretanto, alguns projetos já possuem décadas de estudo e algumas espécies ainda não foram sequer inseridas na lista da RENISUS. Assim, este trabalho visa investigar o acervo literário sobre a química e o potencial tóxico/farmacológico dos metabólitos da espécie *Echinodorus grandiflorus* (espécie estudada por Farmanguinhos), analisando os marcadores químicos e toxicológico já descritos na literatura e correlacionando com o potencial de utilização e inserção de diferentes formas farmacêuticas dessa espécie aplicadas à demanda evidenciada pelo perfil epidemiológico, com a identificação dos diferentes processos de adoecimentos relacionados ao seu uso. A carência de interação entre os possíveis atores da cadeia produtiva (fornecedores de matéria prima e indústrias produtoras de extrato em larga escala para o desenvolvimento do fitoterápico) nos motiva a investigar e analisar o potencial de utilização da espécie no contexto da inovação e sua importância frente às necessidades de alternativas terapêuticas no país, principalmente em áreas de difícil acesso ou carentes. Assim, a partir deste documento fomentar possibilidades de aproveitamento da biodiversidade nacional em estratégias inovadoras viáveis na área de fitomedicamentos.

3. OBJETIVO

3.1. Objetivos Gerais:

- Sistematizar o conhecimento acumulado da espécie *Echinodorus grandiflorus* a partir da abordagem farmacológica, toxicológica e patentária da espécie e seus marcadores químicos descritos na literatura.

3.2. Objetivos Específicos:

- Investigar o potencial farmacológico e toxicologia dos metabólitos descritos para a espécie;
- Investigar o potencial de desenvolvimento de um fitoterápico a partir da espécie *E. grandiflorus* com base nos marcadores químicos e potencial farmacológico dos mesmos;
- Estimular o emprego da espécie para fins medicinais no país e validação de seu potencial farmacológico, assim como inserção da espécie nas listas de plantas medicinais de interesse governamental;

4. REFERENCIAL TEÓRICO

4.1. ASPECTOS BIOECOLÓGICOS DA ESPÉCIE.

4.1.1. Panorama taxonômico da espécie.

O gênero *Echinodorus* pertencem à família Alismataceae e se distribuem por todo continente Americano, sendo composto por 27 espécies, caracterizadas como monocotiledôneas. Dentre as espécies mais conhecidas e utilizadas no país estão a *E. grandiflorus* e *E. macrophyllus*, as quais possuem características botânicas e propriedades medicinais semelhantes e são denominadas de “chapéu-de-couro”. O gênero é constituído por espécies aquáticas que crescem ocasionalmente submersas apresentando folhas grandes e coriáceas características, por isso o nome “chapéu de couro”. Muitas espécies apresentam inflorescências caracterizadas por flores brancas delicadas, sendo muito utilizadas na ornamentação (HAYNES & HOLM-NIELSEN, 1986). Ao todo, 18 espécies pertencentes ao gênero *Echinodorus* podem ser encontradas no Brasil (DUTRA *et al.*, 2006). Várias espécies de *Echinodorus* são utilizadas na medicina popular, entre elas: *E. grandiflorus*, *E. paniculatus* Mich., *E. argentinensis* Rataj. e *E. macrophyllus* (REGO, 1988).

Uma das espécies mais conhecidas e utilizadas popularmente é a espécie *Echinodorus grandiflorus* (Chamisso & Schlechtendal) Michelli. Dependendo da região do país, a espécie *E. grandiflorus* pode receber diferentes denominações conforme as tradições e cultura local. Dentre os principais nomes mais comumente utilizados para a espécie constam: “chapéu-de-couro, aguapé, chá-de-campanha, chá-do-brejo, chá-de-pobre, chá-mineiro, congonha-do-brejo, erva-do-brejo, erva-do-pântano” (LORENZI & MATOS, 2002). A caracterização botânica é imprescindível para garantir o controle de qualidade e a manutenção das características químicas da espécie. Além das semelhanças anatômicas entre algumas variedades de *Echinodorus*, existe na literatura uma série de sinônimas para essa espécie, o que demanda uma pesquisa laboriosa a fim de cobrir toda a gama de citações atribuídas a espécie. Dentre as sinônimas existentes para a espécie *E. grandiflorus* constam: *Alisma grandiflorum* Cham. et Schlecht., *Alisma floribundum* Seub., *Echinodorus argentinensis* Rataj, *Echinodorus sellowianus* Buchenau, *Echinodorus floribundus* (Seub.) Seub., *Echinodorus grandiflorus* var. *aureus* Fassett, *Echinodorus muricatus* Griseb., *Echinodorus grandiflorus* var. *longibracteatus* Rataj,

Echinodorus grandiflorus var. *ovatus* Micheli, *Echinodorus longicapus* Arechav.,
Echinodorus muricatus Griseb., *Echinodorus muricatus* Wood. et Schery (MISSOURI



BOTANICAL GARDEN, 2016).

Figura 1. Partes aéreas de *Echinodorus grandiflorus* Mitch. em seu habitat natural.
Fonte: Foto de André M. Marques.

4.1.2. Aspectos Botânicos

A espécie *Echinodorus grandiflorus* se apresenta como planta herbácea ou subarbusto aquático, perene, acaule, rizomatoso, de comprimento variando entre 0,5 e 0,9m de altura. As folhas são emersas, longo-pecioladas subcordata, lamina foliares ovaladas de 10–40cm × 05–30cm; ductos secretores translúcidos como marcas pontuais,

nervação campilodroma, 11 a 17 nervuras, ápice acuminado, arredondado a levemente retuso; base truncada ou cordada. Escapo triangular não alado. Inflorescência tirso homocladico ou heterocladico, eixo 30–63cm de comprimento, ereto, 12 a 14 zonas de ramificação, uma zona de ramificação com eixos secundários, plântulas se desenvolvem na inflorescência; brácteas ovaladas a lanceoladas. Flores longo-pediceladas, pedicelos 10–22mm de comprimento; sépalas ovaladas, 4,0–6,5mm de comprimento, 4,5–5,0mm de largura, 10–12 nervadas, glabras, persistentes; pétalas ovaladas, 10–12mm de comprimento, 8–12mm de largura, não unguiculadas; 18 a 26 estames, filetes lineares, anteras dorsifixas, ápice obtuso, estruturas secretoras ausentes, carpelos numerosos, superior a vinte. Aquênios oblanceolados, glandulares. Sementes obovaladas, castanhas, superfície ornamentada, reticulada (RATAJ, 1978; REGO, 1988; HAYNE & HOLM-NIELSEN, 1994; MATIAS, 2007).

4.1.3. Habitat e distribuição geográfica

A família Alismataceae possui ampla distribuição geográfica, sendo composta por 12 gêneros e cerca de 80 espécies. No Brasil esta família é representada por dois gêneros (SOUZA & LORENZI, 2005). O gênero *E. grandiflorus* é o representante mais comumente encontrado no Brasil, sendo comum o erro de caracterização com a espécie *E. macrophyllus* (CORREIA JUNIOR, 1994; SILVA JUNIOR *et al.*, 1994). Tal espécie compõe parte característica da flora palustre e lacustre do litoral sul brasileiro (REITZ, 1961; CORDAZZO & SEELIGER, 1995; FALKENBERG, 1999). A distribuição geográfica da espécie é descrita como restrita as Américas, com registro do Norte do México e Região Insular das Antilhas ao Sul da Argentina (LOT *et al.*, 1999; MISSOURI BOTANICAL GARDEN, 2016). A espécie *E. grandiflorus* encontra-se preferencialmente presente em mananciais aquáticos e terrenos alagados, sendo considerada uma planta macrófita aquática, emersas ou flutuantes na superfície da água, presente, preferencialmente, em ambientes de água doce (LOT *et al.*, 1999) como solos úmidos, canais de irrigação, lavouras de arroz inundado, banhados, baixadas, lagos e rios. A espécie chapéu de couro já foi encontrada em ambientes salobros como ocorre na Venezuela (REITZ, 1961; CORDAZZO & SEELIGER, 1995; FALKENBERG, 1999; LORENZI, 2000; GORDON, 1997). É comumente cultivada como ornamental em lagos

decorativos ou para fins farmacêuticos (LORENZI, 2000; CORREA, 2001; MATOS, 2002).

4.1.4. Aspectos Agroecológicos

A espécie *Echinodorus grandiflorus* pode ser encontrada, preferencialmente, em áreas alagadas ou sujeitas a alagamentos. Em solo drenado, as plantas tornam-se raquíticas, podendo haver comprometimento do desenvolvimento da espécie e de sua composição química. Existem poucas descrições sobre sua propagação sexuada na literatura, como: época de colheita, longevidade e dormência das sementes (BEVILAQUA & NEDEL, 2003). Peripolli e colaboradores (2000) analisaram o período de latência de sementes verificando o efeito da época de colheita das sementes em seu poder germinativo e sua longevidade. No que tange ao processo propagativo da espécie *E. grandiflorus*, foi observado que a mesma se reproduz por sementes, podendo permanecer em bancos de sementes por longos períodos em estado de latência (GORDON, 1997). Também foi observado que a espécie propaga-se facilmente assexuadamente por pseudoviviparidade e rizomas (LOT *et al.*, 1999; MISSOURI BOTANICAL GARDEN, 2016). e comumente encontrada nos estados do sul do Brasil (REITZ, 1961; CORDAZZO & SEELIGER, 1995; FALKENBERG, 1999; BEVILAQUA *et al.*, 2001). *E. grandiflorus* é descrita como rara no domínio da Caatinga Brasileira por Matias (2007). Lot e colaboradores (1999) afirmam que, no México, esta espécie é considerada vulnerável. É citado que extrativismo em larga escala dessa espécie tem provocado, em algumas regiões, o aumento do risco de extinção local ou regional da mesma (BEVILAQUA *et al.*, 2001). *E. grandiflorus* possui folhagem forrageira (CORREIA, 1984), e suas sementes podem servir de alimento para aves aquáticas, mas não fazem parte da dieta alimentar regular (CORDAZZO & SEELIGER, 1995). Espécies do gênero *Echinodorus* são comumente descritas na literatura como espécies capazes de absorver metais pesados presentes na água, assim como outros contaminantes de impacto importante para o ecossistema, destacando o potencial descontaminante da espécie no controle de poluentes aquíferos (YING *et al.*, 2014; WAN-RU *et al.*, 2014). O Chapéu-de-couro tem seu desenvolvimento abundante durante a cheia, chegando a dominar campos alagados de solos argilosos férteis, depois desaparecendo na fase de seca do

Pantanal, por exemplo, podendo sobreviver a períodos de seca como rizoma (POTT & POTT, 2000). De acordo com Bevilaqua *et al.* (2001), sementes de *E. grandiflorus* apresentam dormência no inverno, com suscetibilidade variável as baixas temperaturas e geada, afirmando ainda que a planta, de maneira geral, não é muito resistente a insolação e ao solo seco. Em estudo no Sul do Brasil, foram descritos os principais ecotipos de *E. grandiflorus* para cultivo a fim de auxiliar os produtores na seleção de genótipos mais eficientes em termos fitoterápicos.

4.1.5. Aspectos Etnofarmacológicos

O chapéu-de-couro é uma planta com aplicação na medicina popular em diversas regiões do país, sendo utilizadas para ampla variedade de enfermidades, principalmente para fins como: anti-inflamatória, laxativa, adstringente, antirreumática, eliminadora do ácido úrico e ação depuradora (CORREA, 1984 e SILVA-Jr. *et al.*, 1994). Com conhecida propriedade diurética, o chá das folhas de *E. grandiflorus* é, em algumas regiões, uma das alternativas naturais mais popularmente utilizada como diurético e depurativo do organismo. Os farmacógenos considerados medicinais na planta são as partes aéreas, todavia, alguns trabalhos também citam a utilização dos rizomas na medicina tradicional. Dados da literatura mostram que seus rizomas são empregados na forma de cataplasma para hérnias, enquanto as partes aéreas ou somente as folhas são utilizadas principalmente, como diurética e tônica, indicada como depurativa para diversas condições como moléstias do fígado e problemas renais (inflamação da bexiga e cálculos renais) (LORENZI & MATOS, 2002).

O seu chá contendo folhas de chapéu-de-couro é utilizado também para tratar os incômodos do reumatismo, artrite, ou usado como gargarejo ou bochecho para afecções da garganta como amigdalite e faringite, estomatite e gengivite (LORENZI, 2002; CORREA, 1984; ALMEIDA, 1993). Pode ser utilizado segundo Nedel (2003) no combate a inflamações da garganta e na cicatrização de feridas. Nos casos de gota reumática e dores nevralgias, a recomendação é aplicar compressas bem quentes do mesmo tipo de chá, servindo também para ser usado em banhos-de-assento duas a três vezes ao dia, para tratamento da prostatite (MORS *et al.*, 2000; MATOS, 2002).

O modo de preparo comumente utilizado do chá contendo folhas de *Echinodorus* é pelo processo de infusão, juntando-se água fervente sobre uma colher das de sobremesa do pó das folhas secas e moídas em uma xícara, o qual deve ser bebido na dose de uma xícara média, duas vezes ao dia (MATOS, 2002). A espécie é utilizada na fabricação de bebida refrigerante, como componente do produto “Mineirinho®”(PIMENTA, 2002; DE LUCA, 2003; LIMA, 2006; BRUGIOLO, 2010). Juntamente com a erva-mate e o guaraná, o chapéu-de-couro (*E. grandiflorus*) e utilizado pela Industria Mate Couro S/A, desde 1948, como ingrediente de bebidas não alcóolicas (MATE COURO, 2009). Além disso, o gênero *Echinodorus* já serviu no Brasil como base na produção de corantes (TOMOCIK & GARISTO, 1996).

O extrato metanólico, a partir de rizomas, apresentou considerável potencial para uso em terapias da dor e da inflamação (DUTRA *et al.*, 2006). Nesse estudo, Dutra e colaboradores testaram extratos de *E. grandiflorus*, afirmando ser de grande valia para uso em terapias da dor e da inflamação. O estudo indicou que o extrato metanólico dos rizomas da espécie possui propriedades analgésicas sobre o sistema nervoso periférico e central, apresentando componentes ativos com atividades antinociceptiva e anti-inflamatória.

Na medicina popular, a planta como um todo tem sido empregada no intuito de trazer melhoria e cura de diversas enfermidades (LORENZI & MATOS, 2002). Contudo, tanto a utilização da matéria prima na forma de chás caseiros como em preparações da indústria farmacêutica de fitoterápicos, ainda são incipientes os estudos sobre efeitos do seu uso e efeitos toxicológicos a longo prazo (LORENZI & MATOS, 2002).

4.2. ASPECTOS QUÍMICOS DA ESPÉCIE

4.2.1. Perfil químico da espécie

Segundo os dados descritos na literatura, as substâncias isoladas majoritárias da espécie *E. grandiflorus* correspondem principalmente a duas classes químicas, diterpenos e derivados fenólicos, sendo a classe dos flavonóides os componentes majoritários. Os diterpenos encontrados podem ser dos tipos: clerodano, cembrano e labdano, além de alcaloides diterpenoídicos, flavonóides e outros derivados aromáticos. A espécie tem sido muito estudada, descrevendo-se principalmente o isolamento de ácidos graxos, diterpenos, triterpenos e esteroides (TANAKA *et al.*, 2000). Schnitzer e colaboradores

(2007) reportaram o isolamento e a identificação de uma série de metabólitos, principalmente derivadores do ácido cinâmico e com núcleo flavonoídico como: ácido cafeico, β -sitosterol, ácido 2-*O*-caffeoiltartarico, ácido 2-*O*-feruloiltartarico, ácido cichorico, ácido caffeoilferuloil-tartarico, ácido di-feruloil-tartarico, swertisina, isoorientin-7,3'-dimetileter, isoorientina, swertiajaponina e isovitexina e o ácido não fenólico *trans*-aconítico. Pimenta e colaboradores (2006) revelaram na espécie, 17 componentes, sendo o fitol (precursor diterpenoídico) constituinte majoritário em todas as populações estudadas. De acordo com Correa Junior *et al.* (1991), os principais grupos de princípios ativos identificados na planta são alcalóides, glicídios, óleos essenciais, ácidos orgânicos, heterosídeos e taninos.

Alguns derivados clerodânicos diterpenoídicos tem sido isolados da espécie, como o (-) - 16-hydroxycleroda-3,13-dieno-16,15-olide-18-óico, (4aa, 6a, 8aa) 1-carboxi-5 (S) - [2 (2,5-dihidro-5-hydroxy-2-oxo-4-furanyl)ethyl]-5,6,8a-trimethyl-3,4,4a,5,6,8a-trimethyl-3,4,4a,5,6,7,8,8a-octahydronaphthalene, isolado por Costa e colaboradores em 1998 como um componente minoritário das frações apolares das folhas de *E. grandiflorus*. Um derivado cembranoídeo, o ácido echinoíco (1E, 3E, 7Z, 11E)-8-carboxi-1-isopropil-5,18-dimetil-ciclo-tetra decaetraeno foi descrito por Tanaka e colaboradores (1997) como um metabólito presente nas frações menos polares de folhas do chapéu-de-couro. Já o cembrano echinodol foi descrito pela primeira vez na espécie por Manns (1993) extraído de folhas de *E. grandiflorus*.

Segundo Pimenta (2000), o diterpeno ácido echinoíco é o metabólito secundário predominante obtido na extração metanólica das folhas secas da planta. Já em outro estudo realizado por Pimenta (2002), foi mostrado que enquanto o ácido echinoíco era predominante na fração hexânica, enquanto que os flavonóides isoorientina, isovitexina e ácido ferrúlico são predominantes no extrato etanólico da espécie *E. grandiflorus*. Apesar da literatura especializada descrever isolamento e caracterização de uma variada gama de metabólitos secundários da espécie, a droga vegetal é descrita na Farmacopéia pelo teor das folhas secas contendo, no mínimo, 2,8% de derivados do ácido o-hidroxicinâmico, expressos em verbascosídeo. A monografia da espécie *E. grandiflorus* está presente na Farmacopéia Brasileira, vol.2, 5ª Edição de 2010.

4.3. ATIVIDADES FARMACOLÓGICAS RELACIONADAS À ESPÉCIE

Dentre as principais atividades relacionadas constam as seguintes atividades:

- ✓ Atividade analgésica e anti-inflamatória:

Segundo o estudo de Dutra e colaboradores (2006), o extrato metanólico de *E. grandiflorus* possui propriedades analgésicas sobre o sistema nervoso periférico e central. A atividade analgésica periférica foi demonstrada a partir dos efeitos inibitórios das contorções abdominais e dos tempos de lambida da pata. Neste estudo observou-se que o extrato produziu um efeito significativo devido à inibição da biossíntese de mediadores responsáveis pela inflamação, por exemplo, a inibição da ciclooxigenase e conseqüentemente das prostaglandinas. A hipótese foi confirmada a partir do teste da formalina, onde o extrato metanólico de *E. grandiflorus* foi avaliado no modelo do edema da pata induzido por carragenina. Os pesquisadores observaram que a atividade antiedematogênica do extrato testado parece ser dependente da dose. Os resultados sugerem que componentes deste extrato estariam inibindo a biossíntese de prostaglandinas, constituindo assim bioativos potenciais para serem empregados em composições para fins terapêuticos para o alívio da dor.

Garcia e colaboradores (2010) avaliaram a atividade antiedematogênica do extrato aquoso, da fração diclorometano e do extrato hidroetanólico a partir de folhas de *E. grandiflorus* utilizando também o modelo de edema de pata induzido por carragenina em ratos. Também foram testadas frações enriquecidas em diterpenos, flavonóides e ácido tartárico hidroxicinâmico. Foram observadas inibições significativas de edema de pata induzidos pelos extratos hidroalcolícos 50% e 70% (1000 mg / kg, p.o.), bem como pelas frações enriquecidas em diterpenos (70-420 mg / kg, p.o.) e os flavonóides (7,2-36 mg / kg, p.o.). Os flavonóides isovitexina, isoorientina, o ácido trans-aconítico e ácido chicórico foram identificados em todos os extratos analisados por CLAE.

Garcia e colaboradores (2016b), em outro estudo, investigaram a atividade antiartrite do extrato etanólico a 70% de folhas de *E. grandiflorus* e de uma fração enriquecida em flavonóides em artrite induzida por antígeno em camundongos. A análise histológica confirmou que tanto o extrato etanólico quanto a fração rica em flavonóides suprimiram a inflamação das articulações e inibiu a destruição das cartilagens e óssea

quando comparado com o grupo de controle. O trabalho salienta a importância dos flavonóides no processo de resposta da atividade anti-inflamatória.

✓ Atividade diurética:

Estudos envolvendo extratos da espécie *E. grandiflorus* mostraram que a planta possui uma acentuada propriedade diurética, por aumento da taxa de filtração glomerular e aumento do débito urinário, conseqüentemente, estimulando a eliminação de substâncias que são filtradas passivamente como algumas toxinas e o ácido úrico. O trabalho de Ribeiro e colaboradores (1988) descreve que a administração do extrato bruto das folhas de *E. grandiflorus* induz a diurese em ratas, enquanto que o trabalho de Cardoso e colaboradores (2003) confirmou essas observações obtidas com o extrato bruto e verificou-se que a administração por gavagem também aumenta a produção de urina em camundongos.

Recentemente, Prando e colaboradores (2015) avaliaram a possível atividade diurética aguda de extratos etanólicos obtidos a partir de *E. grandiflorus* e a relação entre o fluxo sanguíneo renal cortical e sua atividade antioxidante e hipotensor usando ratos Wistar normotensos. Foi observado que as taxas de excreção de Na⁺ e Cl⁻ foram significativamente aumentadas com a administração oral do extrato etanólico de *E. grandiflorus*. Além disso, a fração etanólica foi capaz de aumentar significativamente o fluxo sanguíneo renal e reduzir a pressão arterial média e o estresse oxidativo em modelos "in vitro" e "in vivo". Os resultados sugerem que os extratos a partir de folhas de *E. grandiflorus* possuem um significativo efeito diurético e atividade hipotensora e sugerem que estes efeitos podem estar relacionados com um efeito vasodilatador renal e sistêmico.

Prando e colaboradores (2015) avaliaram os possíveis mecanismos envolvidos na atividade diurética prolongada a partir do extrato etanólico obtido de folhas de chapéu-de-couro. Os pesquisadores investigaram a relação hipotensora e anti-hipertensiva utilizando ratos normotensos e aqueles com hipertensão renovascular. O estudo constatou que o extrato etanólico provocou um aumento da diurese semelhante à hidroclorotiazida. A administração intraduodenal do extrato induziu a efeitos hipotensores e anti-hipertensivos significativos em ratos. O tratamento de 7 dias com o extrato resultou no aumento dos níveis de nitrito no plasma. Os resultados da pesquisa sugerem que os mecanismos pelos quais o extrato de chapéu-de-couro induz a diurese prolongada e reduz

a pressão arterial em normotensos e ratos hipertensos são principalmente relacionados com a ativação dos receptores muscarínicos e bradicinina com efeitos diretos sobre prostaglandinas e vias de óxido nítrico.

✓ Anti-hipertensiva e vasodilatador:

Segundo dados descritos na literatura, o chá de folhas também poderia ter propriedades úteis no tratamento da hipertensão arterial (Tiribiçá *et al.*, 2007). Na investigação realizada por Tiribiçá e colaboradores (2007), o extrato aquoso de *E. grandiflorus* foi avaliado quanto a sua atividade vasodilatadora, utilizando modelos *in vitro* de aorta isolada de coelhos. Observou-se que o extrato aquoso exibiu efeito vasodilatador, *in vitro*, em anéis isolados de aorta de coelho e em rim isolado de coelho. Os autores sugeriram que a vasodilatação ocorre por três mecanismos diferentes: pela via de produção de óxido nítrico, por estimulação colinérgica muscarínica e por ação em receptores de fator de agregação plaquetária (PAF). Este estudo concluiu que o extrato aquoso de chapéu-de-couro produziu uma vasodilatação dependente de óxido nítrico e receptor PAF.

No estudo de Lessa e colaboradores (2008), o extrato etanólico de *E. grandiflorus* foi injetado intraperitonealmente em doses crescentes em ratos hipertensos. O tratamento utilizando o extrato etanólico apresentou um efeito anti-hipertensivo significativo comparado com as drogas anti-hipertensivas de referência utilizadas no tratamento da hipertensão arterial. Os resultados da pesquisa também sugerem que o extrato exerce seu efeito através da liberação de óxido nítrico e da estimulação de receptores muscarínicos e receptores da PAF. Um dado importante da pesquisa é o fato do extrato ser apropriado no tratamento por via oral da hipertensão arterial. Os estudos realizados por Almeida e colaboradores (2001; 2003) e Araújo e colaboradores (2002) também sugerem as atividades vasodilatadora e anti-hipertensiva dos extratos de *Echinodorus grandiflorus* em ratos.

Em estudo posterior de Barros e colaboradores (1999), avaliando a atividade dos mesmos extratos de *E. grandiflorus* encontraram os mesmos efeitos anti-hipertensivos reversíveis e dose dependentes em ratos com hipertensão induzida por L-NAME.

✓ Atividade antiasma:

Brugiolo e colaboradores (2011) investigaram o efeito do extrato aquoso do chapéu-de-couro em um modelo da alergia pulmonar. O tratamento oral com o extrato reduziu o número total de células e eosinófilos em lavado bronco-alveolar. A atividade da peroxidase de eosinófilos no tecido pulmonar, os níveis de imunocomponentes e fatores inflamatórios também foram menores após tratamento. Estes resultados sugerem que o extrato aquoso de *E. grandiflorus* é capaz de modular o processo de inflamação alérgica pulmonar e pode ser útil como um potencial agente terapêutico para a asma.

✓ Atividade antioxidante:

Lunardi e colaboradores (2014) avaliaram a capacidade antioxidante *in vitro* do chá de *E. grandiflorus* no fígado de rato. Os resultados mostram que diferentes preparações de chá foi detectada a presença de polifenóis como teobromina, catequina e vitexina. Preparações diferentes de chá mostraram impedir danos nos lípidos e proteínas induzidas pelo fator oxidante, bem como auxiliar no restabelecimento da atividade de enzimas como a catalase e a desoxidesmutase. Assim, sugere-se que chá possua potencial atividade antioxidante no soro e no fígado sendo capaz de evitar danos oxidantes gerados por processos oxidativos.

✓ Antitumoral:

Garcia e colaboradores (2016a) avaliaram o efeito de vários extratos e frações obtidos a partir de folhas *E. grandiflorus* em ensaios de liberação do fator de necrose tumoral fator- α por lipopolissacarídeo estimulados por células THP-1. A pesquisa mostrou que todas essas amostras apresentaram alguma atividade anti-necrose tumoral factor- α . Todavia, os extractos preparados a partir de EtOH a 50%, e e as frações de diclorometano e uma fracção de ricas em flavonóides provocaram as respostas mais potentes. Os metabólitos ácido trans-aconítico e o flavonóide isoorientin foram caracterizados como os principais constituintes em algumas preparações. Entretanto, nenhum dos metabólitos testado isoladamente inibiu por completo a liberação do fator de

necrose tumoral. Alguns extratos e frações atingiram esse resultado, sugerindo um efeito sinérgico entre os constituintes presentes no extrato.

4.4. Aspectos toxicológicos do *E. grandiflorus*

Quanto aos possíveis efeitos toxicológicos envolvendo a espécie em estudo existe pouca informação disponível na literatura. Sugere-se que as preparações da planta medicinal não devam ser utilizadas por pessoas com baixa pressão arterial uma vez que a espécie possui propriedades hipotensoras leves e moderadas. Outro fator a ser considerado é o fato da planta em questão ser depuradora de águas contaminadas, logo é necessário ter certeza que a planta coletada não está contaminada.

A toxidez *in vitro* e *in vivo* do extrato aquoso das folhas de *Echinodoros macrophyllus*, frequentemente confundida com *E. grandiflorus*, foi analisada por Lopes e colaboradores (2000), em experimentos realizados com ratos mostrando a ausência de efeito genotóxico desse extrato (LEITE *et al.*, 2007). O extrato aquoso das folhas de *E. macrophyllus* foi avaliado em ensaios *in vitro* de mutagenicidade em culturas de células de hepatomas e células epiteliais renais, o extrato aquoso não apresentou efeito citotóxico. Em ensaio crônico após 6 semanas de ingestão contínua do extrato liofilizado ou extrato bruto, os animais não apresentaram efeitos genotóxicos no fígado, rins e células sanguíneas. Entretanto, análises de DNA de células renais detectaram vários efeitos genotóxicos dos extratos em altas doses. A dose recomendada para uso humano foi 23mg/kg, por não apresentar tais efeitos genotóxicos (LOPES *et al.*; 2000).

Outro ensaio de genotoxicidade foi realizado por meio de ensaio com bactéria lisogênica. Açúcares reduzidos e precursores da reação de Maillard foram encontrados nas preparações realizadas por infusão e poderiam ser um risco para a saúde de pacientes com uso prolongado do extrato na forma de chás. Os flavonoides orientina, isorientina, vitexina e isovitexina foram encontrados no extrato após infusão. Todavia, os flavonoides foram testados separadamente e não apresentaram resultados positivos para toxidez. Apenas os extratos preparados por infusão e esterilizados a vapor demonstraram atividade genotóxica (LIMA *et al.*, 2014).

Brugiolo e colaboradores (2010) avaliaram a possível toxidez do extrato aquoso de chapéu-de-couro em ratos grávidas por gavagem. O tratamento foi realizado durante 15 dias consecutivos. O tratamento com 1000 mg causou anemia, leucocitose, e um

aumento das taxas de colesterol. Houve alterações no fígado e nos rins, todavia, não foi observado alterações nos parâmetros reprodutivos, na morfologia externa feto ou no peso da placenta. O trabalho concluiu que a utilização de altas dose do extrato era capaz de causar toxidez materna, embora não altere o desempenho reprodutivo.

Silva e colaboradores (2010) investigaram os possíveis efeitos citotóxicos e genotóxicos dos extratos chapéu-de-couro, como também sua eficácia no tratamento da obesidade. Observou-se um aumento significativo ($P < 0,05$) independente da dose, na frequência média de eritrócitos micronucleados no sangue periférico em camundongos tratados com extractos chapéu-de-couro, em comparação com o controle negativo. Os resultados deste estudo permitiram inferir que os extratos brutos de chapéu-de-couro não exibem atividades citotóxica ou genotóxicos. No entanto, eles possuem atividade clastogénica fraca (sem significância) sobre células do sangue periférico. Ao contrário do que comumente crenças também foi encontrada neste estudo que os extratos não são eficazes para o tratamento da obesidade.

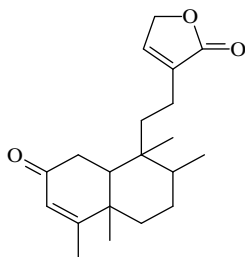
4.5. POTENCIAL FARMACOLÓGICO DOS METABÓLITOS

4.5.1. Potencial farmacológico dos marcadores químicos da espécie

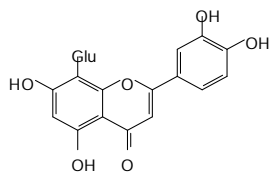
A espécie *E. grandiflorus* é uma planta popularmente utilizada no Brasil para fins medicinais relacionados principalmente a hipertensão e depuração do organismo. Além do moderado efeito diurético relatado frequentemente por usuários da espécie vegetal, diversas outras atividades *in vitro* e *in vivo* já foram descritas na literatura, tais como anti-inflamatória, antinociceptiva, hipocolesterolêmica, e protetora do sistema nervoso e vascular devido aos efeitos anti-oxidativos promovidos pela captação dos radicais livres por parte da fração contendo flavonóides glicosidados e outro fenólicos. Neste trabalho, foi realizada um busca literária através do banco de dados do Scifinder e Pubmed a fim de se obter dados consistentes sobre a toxidez, absorção e metabolização dos principais metabólitos isolados de *E. grandiflorus*. Dentre os metabólitos investigados constam: os flavonoides orientina, isoorientina, vitexina, isovitexina, o diterpeno 3,13-clerodieno-16,15-olideo-2-ona, assim como outros diterpenos da classe dos clerodanos para dar

suporte as possíveis atividades dos diterpenos desta classe química já isolados na espécie, todavia ainda sem estudos farmacológicos.

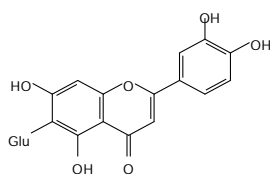
Os dados encontrados visam dar suporte científico às atividades relacionadas à espécie *E. grandiflorus* e sua indicação de uso etnofarmacológico. Através da correlação entre as atividades já comprovadas e os mecanismos de ação dos marcadores químicos presentes na espécie é possível inferir sobre a pronunciada participação da classe dos flavonóides como agentes em potencial para a geração do efeito vasodilatador e anti-inflamatório nos vasos sanguíneos de diversos órgãos do organismo. A ação dos diterpenos também pode ser responsável pela atividade hipotensora descrita para a espécie. Apesar do menor número de trabalhos encontrados para esta classe química relacionado com o efeito vasorrelaxante, alguns estudos com diterpenos clerodanos sugerem ação efetiva na dilatação vascular e somatório de efeitos sinérgicos com flavonóides em extratos brutos, o que também poderia ocorrer com a espécie *E. grandiflorus*, potencializando os efeitos hipotensores da espécie.



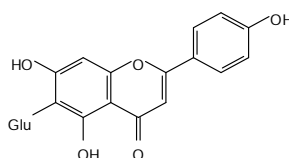
3,13 clerodieno-16,15-olideo-2-ona



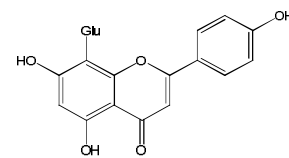
orientina



isoorientina



isovitexina



vitexina

Figura 2: Principais substâncias bioativas isoladas de *Echinodorus grandiflorus*.

4.5.2. ATIVIDADES DESCRITAS PARA OS FLAVONÓIDES DA ESPÉCIE:

Os principais flavonóides isolados da espécie *E. grandiflorus* são glicosídeos pertencentes a classe das flavonas, sendo encontrado principalmente os pares de isômeros orientina e isoorientina, vitexina e isovitexina. Seguem abaixo os principais destaques dado às atividades farmacológicas desses metabólitos especiais.

ORIENTINA: Dados farmacológicos relacionados à ação da orientina em processos biológicos com aplicação medicinal.

- Dano na mitocondrial com IC 50 1889.15 $\mu\text{M/L}$ em células de ovário de Hamster chinês (LIU *et al.*, 2014);
- forte ação inibidora da angiogênese em tumores malignos com baixa toxidez (LIAO *et al.*, 2014);
- inibe o rompimento da barreira induzida por lipopolissacarídeos, reduz a expressão de células de adesão, suprime a migração de leucócitos e hiperpermeabilidade celular, e inibe vários fatores da inflamação como TNF-alfa (LEE *et al.*, 2014);
- neuroproteção devido a efeitos antioxidantes, redução da apoptose frente a peróxido de hidrogênio (LAW *et al.*, 2014);
- ligação com topoisomerase, ação potencial inibindo a divisão celular (WEBB *et al.*, 2006);
- atividade antioxidante com proteção cromossomal contra radiações *in vitro* (VRINDA *et al.*, 2001);
- efeito antioxidante (eliminação de radicais livres) proteção cromossômica contra radiação letal *in vivo* em roedores dose não tóxica até 200mg/kg (DEVI, 1998).
- efeito anti-hipertensivo e diurético com atividade fraca. Estes efeitos podem ser atribuídos devido à inibição da ACE, ação vasodilatadora, efeito beta-bloqueador, e / ou atividades de bloqueio de canais Ca (2+), que foram reportados para os fitoconstituintes, flavonóides, especificamente, como vitexina, isovitexina, orientina e isoorientina (VASANT *et al.*, 2012).
- vitexina, orientina e isoorientina promoveram a redução da hipertensão por tratamento com extratos ricos nesses flavonoides. A ausência de necrose, inflamação cardíaca e significativa redução no colesterol sérico em ratos tratados indicam uma atividade cardioprotetora. A atividade antioxidante da orientina e isoorientina parece reduzir o dano induzido pelo L-NAME (MALI *et al.*, 2012).
- Efeitos antimutagênicos: orientina e isoorientina e seus análogos estruturais exibem propriedades antimutagênicas moderadas (SNIJMAN *et al.*, 2007);
- Orientina e vitexina: Efeito antiespasmódico dominante K (ATP) a fraca ativação do canal de Ca (++) mecanismos antagonistas e, portanto, justifica a sua utilização em distúrbios gastrointestinais hiperativas (GILANI *et al.*, 2006).
- Orientina: Efeito protetor contra irradiação letal em ratos. A dose protetora dos flavonóides foi de 50 $\mu\text{g/kg}$ de peso corporal. Nenhuma toxidez foi observada mesmo a 200 mg/kg de peso corporal. A proteção cromossomal por orientina foi comparável à de 150 mg/kg (DEVI, 1998).
- Orientina pode melhorar os déficits cognitivos na doença de Alzheimer. Os níveis de estresse oxidativo, induzidos por produção de espécies reativas de oxigênio

(ROS), foram significativamente menores após o tratamento orientina em camundongos (YU *et al.*, 2015).

- Orientina e isoorientina inibiram significativamente a aldose redutase em ratos, com valores de IC₅₀ de 1,65 e 1,92, respectivamente μM (LI HONG *et al.*, 2014.);
- efeito cardioprotetor da orientina: protege cardiomitocitos H9c2 contra a apoptose induzida (LU *et al.*, 2011.).
- Estudos sobre a adipogênese e efeito inibidor da acumulação de triglicérides intracelular mostrou que os metabólitos vitexina e orientina tinha a atividade reduzindo os níveis de certas proteínas em células 3T3-L1. Estes metabólitos exibiram uma atividade potente antiadipogenesis e redução dos níveis proteínas em células 3T3-L1, sem citotoxicidade significativa (KIM *et al.*, 2010).
- A apoptose de cardiomiócitos foi reduzida pelo pré-tratamento com orientina (3, 10 e 30 μM). A expressão do citocromo c e da caspase-3 foi também reduzida em cardiomiócitos miocárdio e lesados. Estas observações indicam que a orientina exerce um efeito cardioprotetor potente sobre o miocárdio e cardiomiócitos, e inibe a apoptose através da prevenção da ativação da via apoptótica mitocondrial (citocromo c-caspase-3) (FU *et al.*, 2006).
- O efeito vasorrelaxante de orientina em anéis de aorta torácica com endotélio intacto foi atenuada pelo Inibidor da óxido nítrico sintase (NO), mas não por indometacina (um inibidor de ciclo-oxigenase), cloreto de tetraetilamônio (inibidor canais K⁺) ou propranolol (inibidor do receptor beta). A orientina também reduziu tanto a liberação rápida inicial e as fases sustentadas de contrações induzidas por fenilefrina. Orientina pode estimular a produção de NO a partir de células endoteliais. Também foi constatada que ela aumenta os níveis de (GMPc), sem alterações no (AMPc) na aorta de coelho. Os resultados mostraram que orientina relaxa anéis aórticos torácicos pela via do óxido nítrico-GMPc, e no músculo liso vascular inibe a contração induzida pela ativação de receptores de funcionamento e dependentes da voltagem de canais Ca²⁺. A inibição tanto de liberação de Ca²⁺ intracelular de Ca²⁺ extracelular e afluxo pode ser um dos principais mecanismos de vasorrelaxante orientina (FU *et al.*, 2005);

ISOORIENTINA:

- Isoorientina: ação hepatoprotetora na concentração 16.85 mg/g (LU *et al.*, 2014);
- Efeito anti-hipertensivo e atividade diurética fraca. Estes efeitos podem ser atribuídos devido inibição da ACE, ação vasodilatadora, beta-bloqueador, e / ou atividades de bloqueio de canais Ca²⁺, que foram reportados para os fitoconstituintes, flavonóides, especificamente, como vitexina, isovitexina, orientina e isoorientina (VASANT *et al.*, 2012).
- vitexina, orientina e isoorientina promoveram a redução da hipertensão por tratamento com extratos ricos nesses flavonóides. A ausência de necrose, inflamação cardíaca e significativa redução no colesterol sérico em ratos tratados indicam uma atividade cardioprotetora. A atividade antioxidante da orientina e isoorientina parece reduzir o dano induzido pelo L-NAME (MALI *et al.*, 2012).

- Isoorientina: Efeito protetor nas células do fígado da apoptose estimulada por peróxido. Foi demonstrado que a isoorientina é capaz de proteger as células BRL-3A contra a apoptose induzida por H₂O₂ pela inibição da disfunção mitocondrial, inativando cinases MAPK, ativando a eliminação de ROS e NO (YUAN *et al.*, 2013).
- Isoorientina: resultados demonstraram que a isoorientina induz a apoptose em células hepáticas e indicam que esta apoptose pode ser mediada através de disfunção mitocondrial e não apresenta toxidez para células normais do fígado, sugerindo que a isoorientina pode ter um bom potencial como um agente terapêutico e quimiopreventivo para câncer de fígado (YUAN *et al.*, 2012).
- Orientina, isoorientina e vitexina: Efeitos antiinflamatórios em células hepáticas;
- Isoorientina: registro de patente de medicamento para Infecção Respiratória (LI *et al.*, 2010);
- Isoorientina foi demonstrada que possui atividades anti-nociceptivas e anti-inflamatórias significativas as doses de 15 mg/kg e 30 mg/kg, sem induzir qualquer toxicidade aguda aparente, bem como danos gástricos. No entanto, o metabólito não demonstrou possuir qualquer atividade significativa gastroprotetora na ulcerogenesis induzida por EtOH (KUEPELI *et al.*, 2004).
- Potente ação anti-oxidantes: Isoorientina e isoorientina 2-O-alfa-L-ramnosido mostraram uma potente atividade de eliminação de radicais livres, com valores de IC₅₀ de 9,5 e 34,5 µM, respectivamente, e efeitos citoprotectores significativos (PARK *et al.*, 2007)
- Isoorientina exibiu efeitos hipoglicemiantes e anti-hiperlipidêmicos significativos na dose de 15 mg/kg (SEZIK *et al.*, 2005).
- Efeito anti-hepatotóxico: a isoorientina parece contribuir para a prevenção da dos danos induzidos por CCl₄- ou galactosamina em hepatócitos de rato em cultura primária (HIKINO *et al.*, 1984).
- Orientina e isoorientina inibiram significativamente a aldose redutase em ratos, com valores de IC₅₀ de 1,65 e 1,92, respectivamente µM (LI HONG *et al.*, 2014.);
- Foi demonstrado que a isoorientina poderia melhorar a função do fígado, diminuindo a atividade de diversas moléculas envolvidas em processos inflamatórios, assim a isoorientina em altas e medias doses poderia proteger fibrose hepática induzida pelo álcool (CHEN *et al.*, 2013).
- Isoorientina exerce os seus efeitos anti-diabéticos através da ativação da via de sinalização de insulina, em adipócitos, revertendo a resistência à insulina provocada por estas células em TNF-alfa for estimular a fosforilação correta das proteínas desta via de sinalização, e induzindo assim, a expressão de genes que codificam para estas proteínas (ALONSO *et al.*, 2012).

VITEXINA:

- A vitexina contribui para a proteção contra danos causados pelo estresse oxidativo mediado por H₂O₂ (peróxido) e pode ser usado com segurança para uma ampla faixa de concentração até de 480 µM (WEI *et al.*, 2014).
- Efeito hepatoprotetor foi descrito (LIU *et al.*, 2015);
- O flavonóide isovitexina foi descrito como o inibidor mais potente contra RLAR, Hrar, idade, AChE e BChE enquanto vitexina mostrou a atividade inibidora mais potente PTP1B (CHOI *et al.*, 2014);
- Com relação aos mecanismos antinociceptivos da vitexina, o metabólito impediu a diminuição dos níveis de glutatona reduzida, do potencial de capacidade de ferro de redução, e a capacidade antioxidante frente aos radicais livres. Também inibiu a produção de citocinas hiperalgésicas ligadas ao processo inflamatório tais como TNF-alfa, IL-1beta, IL-6, e IL-33, e regulou positivamente os níveis da citocina anti-hiperalgésico de IL-10. A vitexina exibe um efeito analgésico em uma variedade de modelos inflamatórios de dor por segmentação TRPV1 e o stress oxidativo e através da modulação de citoquinas (BORGHI *et al.*, 2013);
- Vitexina e isovitexina: Efeito inibitório da alfa-glucosidade (hipoglicemia), ambos vitexina e isovitexina não exerceram quaisquer sinais de toxidez com a maior dose de 2 g/kg administrados por via oral em ratos normoglicêmicas e ratos diabéticos induzidos (CHOO *et al.*, 2012);
- Vitexina apresentou quase nenhum efeito citotóxico até 250 µM/L (WAETIEN *et al.*, 2007);
- Efeitos antihipertensivos e diuréticos: Estes efeitos podem ser atribuídos devido ao inibidor ACE, vasodilatadora, beta-bloqueador, e / ou Ca (2+) atividades de bloqueio de canais, que foram reportados para os fitoconstituintes, flavonóides, especificamente, como vitexina, isovitexina, orientina e isoorientina (VASANT *et al.*, 2012);
- Vitexina foi utilizada em composição no tratamento de enfermidades cardiovasculares e cerebrovasculares com bons efeitos curativos relacionados a resistência a isquemia cerebral e miocárdica (SHAO *et al.*, 2013);
- Orientina e vitexina: Efeito antiespasmódico dominante K (ATP) a fraca ativação do canal Ca (++) , mecanismos antagonistas e, portanto, justifica a sua utilização em distúrbios gastrointestinais hiperativas (GILANI *et al.*, 2006);
- Glicosídeos de vitexina demonstraram atividade hepatoprotetora em hepatócitos de rato em cultura primária com a toxidez celular induzida por CCl₄, em comparação com os controles. Isto foi comparável com a de silibinin (69,8%) da espécie *Cardus marianus*, o qual foi utilizado como controle positivo para atividade hepatoprotetora (KIM *et al.*, 2004);
- Vitexina inibiu a migração de células PC12, bem como as suas taxas de invasão, e também inibiu a formação de tubos por células endoteliais da veia umbilical humana. Vitexina inibiu a ativação induzida por hipoxia de

quinase c-Jun N-terminal (JNK), mas não da proteína de sinalização extracelular quinase regulada (ERK), o que implica que atua, em parte, através da via de JNK. Vitexina poderia ser utilizado como um tratamento para doenças tais como o cancer (CHOI *et al.*, 2006);

- Estudos sobre a adipogênese e efeito inibidor da acumulação de triglicérides intracelular mostrou que os metabólitos de vitexina e orientina tinha a atividade potente antiadipogênese e redução do nível de expressão de ptns em células 3T3-L1, sem citotoxicidade significativa (KIM *et al.*, 2010);
- A vitexina (6, 3 e 1,5 mg/kg) foi capaz de aumentar significativamente a atividade da ATPase no miocárdio de ratos. A vitexina (6 e 3 mg/kg) exerce efeitos cardioprotetores significativas contra lesão miocárdica isquêmica aguda em ratos, provável que o metabólito possa aumentar a capacidade anti-oxigênio (antioxidante) e melhorar metabolismo energético nas células do miocárdio (DONG *et al.*, 2011);
- A vitexina promove uma inibição da atividade proliferativa da linha de células de carcinoma de hepatoma HepG2, bloqueando o eixo do sinal de ERK / FOXO3a (ZHENG *et al.*, 2014);
- A vitexina promoveu significativamente a relaxação vascular induzida por forbol, sugerindo como uma possível ação anti-hipertensiva sobre a contração vascular induzida por agonista independentemente da síntese de óxido nítrico endotelial. Por outro lado, ele não houve a inibição da contração induzida por tromboxano A2. Este estudo fornece evidências sobre o mecanismo subjacente ao efeito de relaxamento da vitexina sobre a contração vascular induzida por agonista independentemente da função endotelial (JE *et al.*, 2014);
- A vitexina (3, 10, e 30 mg/kg) impediu a hipertrofia cardíaca induzida pela constrição da aorta transversal. A vitexina tem o potencial para proteger contra a hipertrofia cardíaca através de mediadores de Ca²⁺ + calcineurina-NFATc3 e CaMKII (LU *et al.*, 2013);
- A vitexina inibiu a ativação induzida por hipoxia de quinase c-Jun N-terminal (JNK) (CHOI *et al.*, 2006);

ISOVITEXINA:

- Efeitos antihipertensivos e diuréticos: Estes efeitos podem ser atribuídos devido ao inibidor ACE, vasodilatadora, beta-bloqueador, e / ou Ca (2+) atividades de bloqueio de canais, que foram reportados para os fitoconstituintes, flavonóides, especificamente, como vitexina, isovitexina, orientina, isorientina (VASANT *et al.*, 2012);
- Isoviteína: Efeito inibitório da alfa-glicosidade (hipoglicemia), ambos vitexina e isovitexina não exerceu quaisquer sinais de toxicidade com a

maior dose de 2 g/kg administrados por via oral a ratinhos normoglicêmicas e ratos diabéticos induzidos (CHOO *et al.*, 2012);

- A isovitexina foi caracterizada como um inibidor contra RLAR, Hrar, idade, AChE e BChE enquanto vitexina mostrou a atividade inibidora mais potente PTP1B (CHOI *et al.*, 2014);
- A isovitexina inibe a enzima xantina-oxidase com um valor de IC50 de 15,2 µM. Constatou-se que a isovitexina protegeu o DNA contra danos induzidos pela reação de Fenton de um modo dependente da dose com um valor de IC50 de 9,52 µM. A isovitexina também protegeu as células HL-60 do dano induzido por oxidantes (ROS) pela reação da oxidase de xantina/xantina. Isoviteína exibiu o menor citotoxicidade para as células HL-60 (DL50 > 400 µM) (LIN *et al.*, 2002);

CLERODANOS (exemplos de atividades farmacológicas descritos para a classe de diterpenos encontrados em *E. grandiflorus*).

- A trans-desidrocrotonina principal diterpeno clerodano isolado da casca do caule do *Croton cajucara*, possui efeito gastroprotetor, hipoglicêmico e hipolipidêmico. Em animais normotensos o diterpeno produziu hipotensão e bradicardia de forma dependente da dose. A hipotensão induzida por (10 mg/kg) do diterpeno não foi alterada pelo pré-tratamento com atropina, propranolol e hexametônio, sendo reduzida pelo L-NAME. O diterpeno inibe a frequência de contração espontânea de átrio direito isolado, mas não interfere no aumento dos batimentos atriais induzido pelo isoproterenol. O inotropismo não foi alterado pelo clerodano em átrio esquerdo isolado, sendo este capaz de relaxar contrações submaximais de fenilefrina (1 µM), sendo seu efeito parcialmente inibido pela retirada do endotélio ou pela presença de L-NAME. A trans-desidrocrotonina possui baixa toxicidade para *Artemia* sp, nenhuma neurotoxicidade para células mesencefálicas, hepatotoxicidade e hepatoproteção, dependendo da técnica utilizada, sugerindo uma possível ação inibitória no citocromo P450. A hipotensão induzida pela trans-desidrocrotonina provavelmente se deve a sua ação combinada bradicardizante e vasodilatadora sendo esse efeito parcialmente mediado pela liberação de NO endotelial e parte por efeitos na musculatura lisa vascular (SILVA, 2005).
- O efeito vasorrelaxante de quatro diterpenos neo-clerodânicos, (12R) -12-hidroxicascarillone e 5beta-hidroxi-cis-desidrocrotonina, cis-desidrocrotonina e trans-desidrocrotonina, isolados previamente de *Croton schiedeanus* Schlecht, foi estudada em anéis de aorta isolada contratados pela alta K⁺ (80 mM) ou fenilefrina (1 microM). De acordo com os valores de IC50 para a contração induzida por KCl, a ordem de potência era (12R) -12-hydroxycascarillone > cis-desidrocrotonina > 5beta-hidroxi-cis-desidrocrotonina > trans-desidrocrotonina (0,3, 1,5, 96 e > 100 mM, respectivamente). A possível cooperatividade entre os constituintes diterpenoídicos e o flavonóide majoritário (ayanin) foi

estudado. A atividade vasorrelaxante de cis-desidrocrotonina e ayanin foi aumentada quando ambos os metabólitos foram incorporados simultaneamente para os anéis de aorta pré-contraídos com fenilefrina. Estes resultados sugerem que *Croton schiedeanus* induz os seus efeitos através das ações sinérgicas de várias substâncias vasodilatadoras, entre os quais diterpenóides neo-clerodano desempenham um papel importante (GUERRERO *et al.*, 2004).

- O diterpeno clerodano trans-desidrocrotonina (t-DCTN) isolado a partir da casca de *Croton cajucara* Benth. (Euphorbiaceae) demonstrou possuir uma atividade hipoglicêmica significativa em ratos com diabetes induzida por aloxano, mas não em ratos normais, em doses orais de 25 e 50 mg/kg de peso corporal. A droga também mostrou-se efetiva reduzindo os níveis de açúcar no sangue em ratos normais. O efeito hipoglicemiante de t-DCTN foi quase comparável à produzida por glibenclamida (2 mg/kg), um fármaco clinicamente útil. Os resultados indicam o potencial antihiperlipidêmico de t-DCTN (FARIAS *et al.*, 1997).
- O diterpeno clerodano crispeno foi descrito possuindo uma toxidez significativa contra MDA-MB 231. A linha de células de cancer da mama dependente de STAT3 (MANTAJ *et al.*, 2015);
- Clerodanos Casearinas: Efeito antineoplásico tóxico e anti-proliferativo mediado POR apoptose (FERREIRA *et al.*, 2014);
- Clerodano foi constatado tanto *in vivo* como em resultados *in vitro* um valor potencial como agente anti-osteócito e anti-obesidade, inibem a hipertrofia dos adipócitos e diminuição da esteatose em hepatócitos, uma inibição de adipócitos hipertrofia e diminuição da esteatose em hepatócitos (BEG *et al.*, 2015);
- Disobulbin-D (DBD), um diterpenóide norclerodano furano hepatotóxico: Os resultados sugerem que os efeitos de DBD sobre o crescimento de fígado humano L-02 células normais pode ser devido à indução de apoptose das células, o que pode também explicar a Observação da toxidez nas plantas contendo esse diterpeno clerodano furano (MA *et al.*, 2012);
- Os diterpenos clerodânicos casearinas e casearvestrins, foram considerados como agentes citotóxicos com notável ação antitumoral (FERREIRA *et al.*, 2011);
- Neo-clerodanos (teupolins VI-XII): Todos os metabólitos apresentaram valores de baixa toxidez na mais alta concentração testada (200 µM) (FIORENTINO *et al.*, 2011);
- Trans-desidrocrotonina (DHC), um diterpeno nor-clerodano: DHC causa alterações histopatológicas no fígado, que incluiu uma tumefação turva, degeneração microvacuolar e alterações nucleares. Apesar de a atividade benéfica de antiulcerogênico DHC, os resultados sugerem que o uso a longo prazo do metabólito pode induzir danos no fígado (RODRIGUEZ *et al.*; 2004);
- Clerodano no própolis: Efeito antitumoral por inibição da DNA alfa-polimerase, células normais são pouco afetadas. O clerodanos inibiram a DMA polimerase de mamífero e suprimiu o crescimento das células de hepatoma na concentração de cerca de 10 µg/mL e pararam as células

tumorais em fase S, como revelado por citometria de fluxo. Em concentrações mais elevadas exerceu dano letal sobre eles. O diterpeno mostrou citotoxicidade em várias células tumorais, enquanto que as células diplóides humanas e de rim de coelho primários foram menos afetadas (MATSUNO *et al.*, 1994);

- Os diterpenoides furanos neo-clerodanos são transformados por citocromos P 450 (em particular P 4503A) em metabólitos hepatotóxicos. Os metabólitos (provavelmente epóxidos) são parcialmente inativado pela glutatona e, provavelmente, hidrolase de epóxido (LOEPER *et al.*, 1994);
- Os diterpenos conhecidos montanin C, teucvin, 12-epi-teucvin, teupolin I, 12-epi-teupolin I, e (12S)-teucrin H-2 foram caracterizados como sendo moderadamente tóxicos (LABBE *et al.*, 1989);
- A pré-tratamento com epóxi-clerodânos aumentou consideravelmente os níveis de PGE2, citocinas anti-inflamatórias e fatores pró-angiogênicos. A atividade úlcera-cura do ECD foi inibida por pré-administração da COX-1 inibidor específico (SC560) e inibidor de NOS não específicos (L-NAME), que indica o envolvimento de PGE2 e NOS na atividade de cicatrização de úlcera induzida (ANTONISAMY *et al.*, 2014);
- Neoclerodanos: Efeito antitumoral em células leucêmicas humanas (dois neoclerodanos foram avaliados quanto à atividade citotóxica *in vitro* contra o (leucemia humana HL-60), MCF7 (cancer da mama humano), e LLC (carcinoma de pulmão de Lewis) linhas celulares de câncer. Os metabólitos exibiram fraca atividade citotóxica contra células HL-60, com um valor de IC50 de 41.4µM (LEE *et al.*, 2010);
- Epóxi-clerodanos: resultados sugerem uma reduzida incidência de tumores e reverteu os danos em hepatócitos danificados. Os resultados apresentados confirmam que esses metabólitos exibem efeito preventivo contra hepatotoxicidade quimicamente induzida em ratos, podendo ser uma droga quimiopreventivo potente contra danos hepáticos (DHANASEKARAN *et al.*, 2009);
- Salvileucalin clerodânicos: Esta molécula exerceu uma atividade citotóxica contra células A549 e HT-29 com valores de IC50 de 5,23 e 1,88 µg/ml, respectivamente (AYOAGI *et al.*, 2008);
- Os diterpenóides neo-clerodânicos, barbatins denominados A-C (1-3), e o éster diterpenóide nicotinil neo-clerodânicos, chamado scutebarbatine B mostraram atividade citotóxica contra três linhas humanas de cancer, nomeadamente, aprimorar-1 nasofaringe, KB carcinoma epidermóide oral, e colorrectal HT29 células de carcinoma, com valores de IC50 em µM intervalo 3,5-8,1 (DAI *et al.*, 2006);
- O diterpeno lactônico trans-desidrocrotina (DHC) mostrou induzir a apoptose e a diferenciação terminal em células HL60. O metabólito não apresentou qualquer efeito tóxico em PBMC. Assim, DHC foi capaz de inibir o crescimento celular HL60 *in vitro*, em parte, através da indução de apoptose e diferenciação celular sem causar sérios danos para as células imunitárias (ANAZETTI *et al.*, 2003);

ABSORÇÃO e METABOLIZAÇÃO

FLAVONÓIDES

- A ligação da orientina com a albumina do soro bovino poderia afetar sua concentração plásmatica (TOPRAQ & ARIK, 2014);
- As quatro flavonas C-glicosídeos orientina, homoorientina, vitexina e isovitexina foram mal absorvidas no trato gastrointestinal. Mais de 50% das flavonas C-glicosídeos foram detectadas inalteradas após 12 h, e a maior parte dos quatro flavonoides foram nas fezes após 24h. Estes dados sugerem que o tempo efetivo estes metabólitos permanecem no cólon é suficientemente longo de modo a exercer sua atividade antioxidante e capturar os radicais livres. Além da excreção das formas originais, as porções das flavonas C-glucósídeos foram hidrolisados por desglicosilação e a abertura do anel heterocíclico C. Algumas pequenas moléculas tais como o floroglucinol, ácido hidrocaféico e ácido florético foram detectados e identificados como os metabólitos derivados de flavonas C-glucósídeos (ZHANG *et al.*, 2007).
- A absorção dos metabólitos orientina, vitexina, 2"-O-G-galactopyranosylorientin, e 2"-O-G-galactopiranosil vitexina envolvem um transportador mediado por efluxo somado à difusão passiva. Entre os quatro componentes com 7-OH, aqueles com um grupo hidroxila livre em C-2", tais como orientina e vitexina foram os substratos da P-glicoproteína e que, com um grupo hidroxilo livre em C-2', tais como 2"-O-Lgalactopyranosylorientin foi o substrato da proteína de resistência a múltiplas drogas 2 (MRP2) (LIU LIJIA *et al.*, 2015);
- Os flavonóides orientina e isoorientina são C-glicosídeos, que são pouco absorvidos. Sofrem metabolismo de segunda passagem e degradação intestinal por bactérias são fatores importantes na sua absorção. A modulação de enzimas metabolizadoras de medicamentos pode afetar a janela terapêutica de drogas contendo tais flavonóides (JOUBERT *et al.*, 2009);
- Não foi observado diferenças significativas entre a vitexina e a ramnosilvitexina na absorção intestinal. Não havia uma zona de absorção preferencial no intestino para vitexina e ramnosilvitexina, e ambos na absorção do duodeno, jejuno, íleo e cólon foram consideradas pobres. Diferentes concentrações desses metabólitos não apresentaram influência óbvia para a absorção do intestino (WANG *et al.*, 2014);
- A vitexina foi encontrada inalterada e como um monoglicosídeo reduzido, que foi submetido a glicuronização. A análise da biliar, confirmou que o fígado recebe forma inalterada a vitexina, a qual é devolvida ao intestino pela recirculação entero-hepática para a reabsorção do íleo. A quantidade de apigenina e vitexina remanescente no ceco é de, aproximadamente, 15% e 26%, respectivamente. Estes dados demonstram que o C-glicosídeo

de vitexina na forma inalterada é absorvido e sofre recirculação entero-hepática. A hidrólise para o monoglicosídeo e a conjugação para formar um glicuronido mais polar biodisponível para ser eliminado (ANGELINO *et al.*, 2013);

- Dados mostram que não houve diferenças significativas na absorção de vitexina-2 "- O-ramnosídeo em quatro segmentos do intestino de rato, duodeno, jejuno, íleo e cólon. A difusão passiva mostrou reger o comportamento de transporte de absorção da vitexina-2 "- O-ramnosídeo. A absorção e secreção são mediadas pelo sistema de transporte de efluxo, P-gp. A absorção de vitexina-2 "- O-ramnosídeo pode ser melhorada administrados em conjunto com inibidores da P-gp (XU *et al.*, 2008);
- Os resultados ilustraram que a desglicosilação, a desidroxilação e acetilação foram as principais vias metabólicas de orientina *in vitro* por bactérias intestinais humanas, as quais foram capazes de clivar o C-glicosídeo da orientina para produzir luteolina e gerar outros metabolitos (XU *et al.*, 2014);
- A isoorientina foi incubada com uma mistura de bactérias anaeróbicas do intestino humano intestinal humano. Uma nova clivagem da ligação C-glicosídeo foi descoberta pela primeira vez por meio de bactérias intestinais (HATTORI *et al.*, 1988);
- A biodisponibilidade de vitexina na forma de glicosídeo após a administração intraportal, intestinal, assim como gástrica foi de 45,1%, 8,1% e 9,8%, respectivamente. Acredita-se que a enzima CYP3A participe do metabolismo. O efeito de primeira passagem hepática e intestinal foram considerados os que mais contribuem para a baixa biodisponibilidade de vitexina na forma de glicosídeo em ratos. Além disso, a contribuição de CYP3A para metabolismo e para a ptn mediadora de efluxo tem desempenhado um papel significativo na baixa biodisponibilidade do glicosídeo de vitexina (CHEN *et al.*, 2013);
- As flavonas C-glicosídeo isoorientina e vitexina foram degradadas a ácido 3- (3,4-di-hidroxifenil) propiônico via luteolina e ácido 3- (4-hidroxifenil) propiônico, respectivamente (BRAUNE *et al.*, 2011);
- Os efeitos de primeira passagem hepático, gástrico, e intestinal da vitexina em ratos foram de 5,2%, 31,3%, e 94,1%, respectivamente. O efeito de primeira passagem intestinal de vitexina foi considerável, e efeitos de primeira passagem hepática gástricas e também contribuem para a reduzida biodisponibilidade oral absoluta de vitexina (XUE *et al.*, 2014);

CLERODANOS

- Diterpenóides furânicos neo-clerodano: são transformadas por citocromos P 450 (em particular P 4503A) em metabólitos hepatotóxicos. Os metabolitos (provavelmente epóxidos) são parcialmente inativado pela glutatona e, provavelmente, hidrolase de epóxido (LOEPER *et al.*, 1994);

- Derivados diterpênicos de desidrocroton: A citotoxicidade dos derivados foi maior em hepatócitos isolados recentes (4h de incubação) do que em cultura (24 horas de incubação). Assim, a idade poderia reduzir os efeitos citotóxicos de derivados clerodanos em hepatócitos isolados, sugerindo que a biotransformação mediada pelo citocromo P450 de tais derivados podem levar à formação de metabólitos ainda mais tóxicos (MELO *et al.*, 2002);

Como pode ser observado, as atividades relacionadas aos marcadores químicos e biológicos da espécie estão de acordo com as indicações etnofarmacológicas descritas na literatura. O conjunto de metabólitos flavonoídicos é apontado como sendo valioso para as atividades antioxidantes e protetoras dos vasos sanguíneos no coração, cérebro e fígado. O potencial anti-hipertensivo é frequentemente descrito para os metabólitos isolado ou em mistura, por ação na liberação de óxido nítrico, inibição da PAF e efeito diurético considerável levando a diminuição da pressão arterial. A ausência de toxicidade desses metabólitos é descrita por diversos autores. Infelizmente, não foi descrito nenhuma atividade para os diterpenos isolados de *E. grandiflorus*, entretanto as descrições para outros diterpenos da mesma classe química apontam potencial ação como substâncias como agentes vasorrelaxantes, com potencial efeito sinérgico somado aos flavonóides, além de ação antitumoral e em alguns casos hepatoprotetores para determinadas estruturas. Não foi encontrado estudos envolvendo os diterpenos isolados de *E. grandiflorus*.

A utilização de chás contendo as folhas da espécie e do extrato da mesma em bebida refrigerante sugere que a toxicidade desses extratos estejam em níveis aceitáveis para consumo. Estudos farmacológicos recentes relacionados à toxicidade dos extratos brutos dessa espécie não caracterizaram toxicidade ou genotoxicidade em ensaios *in vitro* e *in vivo* em ratos. A partir da análise das atividades dos principais componentes presentes no extrato da espécie chapéu-de-couro é possível inferir sobre a potencial utilização da mesma no desenvolvimento tecnológico seja na forma de extrato bruto da espécie isolado ou em mistura com outros extratos de plantas medicinais cuja atividade seja sinérgica e benéfica na associação com *Echinodorus*. Também é possível utilizá-la na forma de pó seco do farmacógeno na forma de cápsulas, frações padronizadas ou fitofármacos.

4.6. INOVAÇÃO TECNOLOGIA A PARTIR DA ESPÉCIE

4.6.1 Desenvolvimento tecnológico a partir da espécie *E. grandiflorus*

Tabela 1: Patentes relacionadas à espécie chapéu-de-couro.

Código	Data de depósito	País	Inovação	Atividades
BR102012 027551-1	26/10/2012	Brasil	Composição farmacêutica contendo ácidos aconíticos de folhas de <i>Echinodorus grandiflorus</i> e uso no tratamento de artrite	Os ácidos exibiram atividade em modelos animais de artrite, reduzindo a migração de neutrófilos para a cavidade articular, os níveis de OXCLi, TNF-alfa e/ou IL-1 beta no tecido peri-articular, bem como a hipernocicepção mecânica relacionada à inflamação e o índice de artrite.
JPH10251134	22/09/1998	Japão	Composição para uso externo anticaspa e anti-queda de cabelo	Preparação para uso externo pele eficaz na prevenção e redução caspa e queda de cabelo, e ter ações inibidores excelentes sobre as atividades de tirosinase obtido por formulação de um extracto da espécie Chapéu-de-couro (<i>Echinodorus macrophyllus</i> (Kunth) e <i>Echinodorus ellipticus</i> .
BR200914283	12/03/2012	Brasil	Composição de extratos redutor de colesterol	extractos de plantas utilizados para inibir a lipase pancreática para a redução de peso e colesterol sérico, compreendem extratos metanólicos de chapéu-de-couro, <i>Costus spicatus</i> , <i>Cymbopogon citratus</i> e <i>Baccharis trimera</i>
JP2006257058	28/09/2006	Japão	Composição para prevenção se acne e dermatite	Um inibidor de lipase composto de ingredientes activos de diversas espécies, incluindo <i>Echinodorus grandiflorus</i> para ser usado como agente de tratamento de cabelo e preparação externa da pele (reivindicada), tais como cosméticos, produtos farmacêuticos e medicamentos quasi para o tratamento da acne, caspa, dermatite e melhorar a condição da pele e cabelo.
JP2006257056	28/09/2006	Japão	Composição antienvelhecimento	Ação mimética estrogênica como agente para prevenir o envelhecimento da pele, compreendendo a mistura de extractos de diversas espécies incluindo a <i>E. grandiflorus</i> como ingredientes ativos
JP10251134	22/09/1998	Japão	Agente tópico para prevenção depilatório	O agente previne o desenvolvimento de caspa e promove o crescimento do cabelo e tem um efeito inibidor ativo da tirosinase melhorada. O agente também possui um efeito de clareamento da pele.

5. METODOLOGIA

O método empregado nesse estudo consistiu em revisão bibliográfica de artigos científicos, dissertações e teses relacionados a espécie *Echinodorus grandiflorus* e seus marcadores químicos. Devido ao escasso tempo para o preparo deste manuscrito, somente a sinonímia *Echinodorus grandiflorus* (a mais conhecida e empregada) foi contemplada no estudo em questão. Foram utilizadas ferramentas de busca virtuais como o Scifinder, ISI Web of Science preferencialmente e sites de patentes como o site eletrônico do Instituto Nacional de Propriedade Industrial – INPI (<http://www.inpi.gov.br>), do Escritório de Patentes Europeu - EPO (<http://www.epo.org>) e do United States Patent Trade Office – USPTO (<http://www.uspto.gov>) para a busca de documentos relacionados á inovação envolvendo a espécie estudada. Os resumos foram lidos e descartados os que não corresponderem ao assunto de interesse. Palavras-chave utilizadas: *Echinodorus grandiflorus*; orientin, isorientin, vitexin, isovitexin, labdane diterpenes, clerodane diterpenes. Foi realizado uma análise da utilização popular da espécie na medicina tradicional, assim como uma correção entre as atividades biológicas dos marcadores químicos com os possíveis benefícios e riscos da utilização dessa espécie. Ao todo foram encontrados 186 artigos referentes ao gênero *Echinodorus*. Todos os abstracts foram analisados, todavia somente 20 trabalhos se tratavam exclusivamente da espécie *Echinodorus grandiflorus*. Algumas teses, artigos de jornais, farmacopéia, resumos de congressos também foram utilizados como fonte de informações sobre a espécie. A análise dos principais metabólitos isolados da espécie resultou em 639 trabalhos relacionados ao metabolismo, 329 trabalhos relacionados a toxidez e 112 sobre a absorção das substâncias e/ou, no caso dos diterpenos, artigos relacionados a classe química mais comumente descrita para a espécie. A busca por pedidos de patente resultou na descoberta de 6 patentes envolvendo a espécie *E. grandiflorus*. Quando a pesquisa foi relacionada ao gênero *Echinodorus* foi encontrado registros de 2 patentes depositadas no INPI, 8 na USPTO e 12 na EPO. Nenhuma delas relacionada à utilização da espécie para fins anti-hipertensivos.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A pesquisa bibliográfica sobre a espécie chapéu-de-couro (*Echinodorus grandiflorus*) mostrou a indicação da espécie medicinal para diversos tipos de enfermidades. Todavia, duas indicações etnofarmacológicas são predominantemente citadas: o uso da espécie como anti-inflamatório natural e o uso depurador/diurético da planta medicinal. A comprovação científica de muitas dessas indicações foi realizada em modelos *in vitro* e *in vivo* em ratos normo- e hipertensos. O potencial antioxidante das frações contendo flavonóides em inibir enzimas chave do processo inflamatório, impedindo a liberação de moléculas envolvidas com a cascata de inflamação e a estimulação de liberação de óxido nítrico nos vasos sanguíneos sugere ser o principal mecanismo de ação dessa fração bioativas presente no extrato de folhas da espécie. A atividade dos diterpenos de *E. grandiflorus* ainda não está muito clara segundo os trabalhos. Apesar da classe química dos diterpenos da espécie ter características que a conferem um potencial tóxico (o qual pode ser empregado como antitumoral), acredita-se que os diterpenos cembranos de *E. grandiflorus* sejam hepatoprotetores ou com ausência de toxidez uma vez que o extrato da espécie é utilizado até hoje para a fabricação de refrigerantes no país. Alguns autores acreditam em um efeito sinérgico dessas frações, atuando por diterpenos mecanismos de ação de forma aditiva positiva para o efeito farmacológico.

O potencial anti-inflamatório tem sido investigado para diversos tipos de processos fisiológicos envolvendo órgãos como: ossos, pulmão, fígado, rins, vasos do coração e cérebro, por exemplo. No caso da fração flavonoídica, não somente o efeito anti-inflamatório chama a atenção, mas também o potencial vasodilatador de vasos no coração e no cérebro. Muitos ensaios com os flavonóides isolados também apresentaram resultados animadores com atividade hepato e cardioprotetora. Esses resultados denotam o valioso potencial de uma espécie nativa brasileira subaproveitada pela indústria nacional no país. A exemplo do que acontece com diversas espécies europeias, já comumente descritas e validadas cientificamente, a produção de fitomedicamentos contendo o extrato como um todo ou parte do mesmo na forma de fração enriquecida é uma realidade em vários países e uma alternativa a mais para uso como adjuvante no tratamento de diversas enfermidades. Este trabalho não visa estimular a monoterapia a partir de plantas medicinais, especialmente em casos de doenças coronarianas e de neoplasias, todavia, estima-se chamar a atenção para o potencial de mercado para

aplicação da inovação tecnológica a partir da biodiversidade nacional. Segundo informações aqui descritas, extrato bruto e frações enriquecidas dessa espécie tem potencial para gerar inovação no preparo de formulações tópicas ou orais para a aplicação em diversas enfermidades. A busca por pedidos de patente submetidos e aprovados revelou poucas patentes relacionadas ao emprego da espécie *E. grandiflorus*, um fato animador para ser aproveitado pelo Brasil. Dentro os depositantes de pedidos de patente referentes a espécie em estudo, o Japão é o país com maior número de patentes, todavia, a maioria para utilização na área cosmética. Espera-se maior atenção dada à essa espécie nativa brasileira e que ainda não se encontra presente nem na RENISUS. Neste trabalho, tanto as indicações farmacológicas estão coerentes com os ensaios farmacológicos aplicados aos extratos brutos da espécie, como as atividades de seus marcadores químicos correspondem as indicações anteriormente citadas. Assim, o potencial diurético e anti-hipertensivo da espécie, além do seu caráter hepato e cardioprotetor devem ser observados com interesse e analisados com rigor visando maior aproveitamento da espécie como fonte de novos medicamentos naturais conforme preconizam as políticas públicas de saúde no Brasil.

7. REFERÊNCIAS

ALESSA, S.S. Reproductive toxicity of *Echinodorus grandiflorus* in pregnant rats. *Journal of Toxicological Sciences*. v. 35, n. 6, p. 911-922, 2010.

ALONSO-CASTRO, A.J. et al. Isoorientin reverts TNF-induced insulin resistance in adipocytes activating the insulin signaling pathway. *Endocrinology*, v. 153, n. 11, p. 5222-5230, 2012.

ALVES, L.F. Produção de Fitoterápicos no Brasil: História, Problemas e Perspectivas. *Revista Virtual de Química*, v.5, n. 3, p. 450-513, 2013.

ANAZETTI, M.C. et al. Comparative cytotoxicity of dimethylamide-crotonin in the promyelocytic leukemia cell line (HL60) and human peripheral blood mononuclear cells. *Toxicology*, v. 188, n. 2-3, p. 261-274, 2003.

ANTONISAMY, P. et al. Gastroprotective effect of epoxy clerodane diterpene isolated from *Tinospora cordifolia* Miers (Guduchi) on indomethacin-induced gastric ulcer in rats. *International journal of phytotherapy and phytopharmacology*, v. 21, n. 7, p. 966-969, 2014.

AOYAGI, Y. et al. Salvileucalin B, a novel diterpenoid with an unprecedented rearranged neoclerodane skeleton from *Salvia leucantha* Cav. *Organic letters*, v. 10, n. 20, p. 4429-4432, 2008.

BARREIRO, E.J., BOLSANI, V.S., VIEGAS, C. Os produtos naturais e a química medicinal moderna. *Química Nova*, v. 29, p. 362-337, 2006.

BEG, M. et al. A clerodane diterpene inhibit adipogenesis by cell cycle arrest and ameliorate obesity in C57BL/6 mice. *Molecular and Cellular Endocrinology*, v. 399, p. 373-385, 2015.

BEVILAQUA, G. A. P. et al. Distribuição geográfica e composição química do chapéu-de-couro (*Echinodorus spp.*) no Rio grande do Sul. *Ciência Rural*, v. 32, n. 2, p. 213-218, 2001.

BEVILAQUA, G.P., NEDEL, J. Caracterização morfofisiológica e padrões protéicos de genótipos de chapéu-de-couro. *Revista Brasileira de Agrociência*, v. 9, n. 3, p. 215-220, 2003.

BORGHI, S. M. et al. Vitexin Inhibits Inflammatory Pain in Mice by Targeting TRPV1, Oxidative Stress, and Cytokines. *Journal of Natural Products*, v. 76, n. 6, p. 1141-1149, 2013.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos (PNPMF). Junho de 2006 a. Disponível em: <http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/politica_nacional_fitoterapicos.pdf>. Acesso em: 04 mar. 2016.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares do SUS (PNPIC). Maio de 2006 b. Disponível em: <<http://189.28.128.100/dab/docs/publicacoes/geral/pnpic.pdf>>. Acesso em: 04 mar. 2016.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS (RENISUS). 2008 c. Disponível em: <<http://www.brasil.gov.br/saude/2012/11/sus-tem-fitoterapicos-para-doencas-simples>>. Acesso em: 04 mar. 2016.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos. 2008 d. Disponível em: <<http://portalsaude.saude.gov.br/images/pdf/2014/julho/14/programa-nacional-plantas-medicinais-fitoterapicos-sem-marca.pdf>>. Acesso em: 04 mar. 2016.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Relação Nacional de Medicamentos Essenciais. 2014 e. Disponível em: <<http://u.saude.gov.br/images/pdf/2014/janeiro/29/RENAME-FINAL-VERSAO--14-10-2013.pdf>>. Acesso em: 4 mar. 2016.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. 2011 f. Disponível em: <<http://www.brasil.gov.br/saude/2011/09/doencas-cardiovasculares-causam-quase-30-das-mortes-no-pais>>. Acesso em: 15 mar. 2016.

- BRAUNE, A., BLAUT, M. Deglycosylation of puerarin and other aromatic C-glucosides by a newly isolated human intestinal bacterium. *Environmental Microbiology*, v. 13, n. 2, p. 482-494, 2011.
- BRUGIOLO, A.S.S. Effects of aqueous extract of *Echinodorus grandiflorus* on the immune response in ovalbumin-induced pulmonary allergy. *Annals of Allergy, Asthma, & Immunology*. v. 106, n. 6, p. 481-488, 2011.
- BRUGIOLO, S.S.S. Avaliação da toxicidade do extrato aquoso liofilizado de chapéu-de-couro (*Echinodorus grandiflorus*) em ratas prenhes. 2010. 86f. Tese (Doutorado em Saúde) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, 2010.
- CHEN, Y. X et al. Protective effect of isoorientin on alcohol-induced hepatic fibrosis in rats. *China Journal of Chinese Materia Medica*, v. 38, n. 21, p. 3726-3730, 2013.
- CHEN, Y. et al. Hepatic and gastrointestinal first-pass effects of vitexin-4"-O-glucoside in rats. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, v. 65, n. 10, p. 1500-1507, 2013.
- CHOI, H.J. Vitexin, an HIF-1 alpha inhibitor, has anti-metastatic potential in PC12 cells. *Molecules and cells*, v. 22, n. 3, p. 291-299, 2006.
- CHOI, J.S. Effects of C-glycosylation on anti-diabetic, anti-Alzheimer's disease and anti-inflammatory potential of apigenin. *Food and Chemical Toxicology*, v. 64, p. 27-33, 2014.
- CHOO, C.Y. Vitexin and isovitexin from the Leaves of *Ficus deltoidea* with in-vivo alfa-glucosidase inhibition. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 142, n. 3, p. 776-781, 2012.
- CORDAZZO, C.V., SEELIGER, U. Guia ilustrado da vegetação costeira no extremo sul do Brasil. 2. ed. Rio Grande: FURG, 1995.
- CORREIA JUNIOR, C., MING, L.C., SCHEFFE R, M.C. *Plantas medicinais*. 2 ed. Jaboticabal: FUNEP, 1994.
- CORREA, M.P. *Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas*. Rio de Janeiro: IBDF 1984.
- COSTA, M. Isolation and synthesis of a new clerodane from *Echinodorus grandiflorus*. *Phytochemistry*. v. 50, n. 1, p. 117-122, 1998.
- DAI SHENG, J. Neo-Clerodane diterpenoids from *Scutellaria barbata* with cytotoxic activities. *Phytochemistry*, v. 67, n. 13, p. 1326-1330, 2006.
- DEVI, P.U. Nontoxic protectors from the Indian holy basil, *Ocimum sanctum*. *Trends in Radiation and Cancer Biology*, p. 67-74, 1998.
- DHANASEKARAN, M. Chemopreventive potential of Epoxy clerodane diterpene from *Tinospora cordifolia* against diethylnitrosamine induced hepatocellular carcinoma. *Investigational New Drugs*, v. 27, n. 4, p. 347-355, 2009.
- DONG, L. Effect of vitexin on energy metabolism of experimental rats with myocardial ischemia and protective mechanism. *Zhongcaoyao*, v. 42, n. 7, p. 1378-1383, 2011.

- DUTRA, RC et al. Investigação das atividades analgésica e anti-inflamatória do extrato metanólico dos rizomas de *Echinodorus grandiflorus*. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 16, n. 4, p. 469-474, 2006.
- FALKENBERG, D. B. Aspectos da flora e da vegeta o secundaria da restinga de Santa Catarina, Sul do Brasil. * nsula, Florianopolis*, n. 28, p. 01-29, 1999.
- FARIAS, R.A et al. Hypoglycemic effect of trans-dehydrocrotonin, a nor-clerodane diterpene from *Croton cajucara*. *Planta Medica*, v. 63, n. 6, p. 558-560.
- FARMACOPEIA BRASILEIRA, volume 5 / Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brasília: Anvisa, Brasil. 808p., 2v/il. 2010.
- FERREIRA, P.M.P. Folk uses and pharmacological properties of *Casearia sylvestris*: a medicinal review. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, v. 83, n. 4, p. 1373-1384, 2011.
- FERREIRA, P.M.P. Morphological and biochemical alterations activated by antitumor clerodane diterpenos. *Chemico-Biological Interactions*, v. 222, p. 112-125, 2014.
- FIorentino, A. Structure elucidation and hepatotoxicity evaluation against HepG2 human cells of neo-clerodane diterpenes from *Teucrium polium* L. *Phytochemistry*, v. 72, n. 16, p. 2037-2044, 2011.
- FU, X.C. Anti-apoptotic effect and the mechanism of orientin on ischaemic/reperfused myocardium. *Journal of Asian Natural Products Research*, v. 8, n. 3, p. 265-272, 2006.
- FU, X.C. Vasodilatation produced by orientin and its mechanism study. *Biological & pharmaceutical bulletin*, v. 28, n. 1, p. 37-41, 2005.
- GARCIA, E.F. Antiedematogenic activity and phytochemical composition of preparations from *Echinodorus grandiflorus* leaves. *Phytomedicine*. v. 18, n. 1, p. 80-86, 2010.
- GARCIA, E.F et al. Effect of the Hydroethanolic Extract from *Echinodorus grandiflorus* Leaves and a Fraction Enriched in Flavone-C-Glycosides on Antigen-Induced Arthritis in Mice. *Planta Medica* 2016 [Epub ahead of print].
- GARCIA, E.F et al. In Vitro TNF- α Inhibition Elicited by Extracts from *Echinodorus grandiflorus* Leaves and Correlation with Their Phytochemical Composition. *Planta Medica*. 82(4):337-43, 2016.
- GILANI A.H. Antispasmodic effects of Rooibos tea (*Aspalathus linearis*) is mediated predominantly through K⁺ -channel activation. *Basic & clinical pharmacology & toxicology*, v. 99, n. 5, p. 365-373, 2006.
- GORDON, E. Notas sobre la ecologia de *Echinodorus grandiflorus* (Cham. Et Schl.) Micheli. *Ecotropicos*, v. 10, n. 1, p. 33-39, 1997.

- GUERRERO, M.F. et al. Vasorelaxant effect of new neo-clerodane diterpenoids isolated from *Croton schiedeanus*. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 94, n. 1, 185-189, 2004.
- HIKINO, H. Antihepatotoxic principles of *Swertia japonica* herbs. *Shoyakugaku Zasshi*, v. 38, n. 4, p. 359-360, 1984.
- HAYNES, R.R., HOLM-NIELSEN, L. B. Alismataceae. In: BERRY, P. E.; HOLS T, B. K.; YATSKIEVYCK, K. (Org.). *Flora of the Venezuelan Guayana*, vol. 2. St . Louis: Missouri Botanical Garden Press, 1995.
- JE HYUN, G. The inhibitory effect of vitexin on the agonist-induced regulation of vascular contractility. *Die Pharmazie*, v. 69, n. 3, p. 224-228, 2014.
- JOUBERT, E., GELDERBLOM, W.C.A., DE BEER, D. Phenolic contribution of South African herbal teas to a healthy diet. *Natural Product Communications*, v. 4, n.5, p. 701-718, 2009.
- KIM, J. Vitexin, orientin and other flavonoids from *Spirodela polyrhiza* inhibit adipogenesis in 3T3-L1 cells. *Phytotherapy Research*, v. 24, n.10, p. 1543-1548, 2010.
- KIM, I. Norisoprenoids and hepatoprotective flavone glycosides from the aerial parts of *Beta vulgaris* var. cicla. *Archives of Pharmacal Research*, v. 27, n. 6, p. 600-603, 2004.
- KUEPELI, E. Evaluation of in vivo biological activity profile of isoorientina. *Zeitschrift fuer Naturforschung, C: Journal of Biosciences*, v. 59, n. 11/12, p. 787-790, 2004.
- LABBE, C., POLANCO, M.I., CASTILLO, M. 12-epi-Teuscordonin and other neoclerodanes from *Teucrium bicolor*. *Journal of Natural Products*, v. 52, n. 4, p. 871-874, 1989.
- LAW, B.N.T. Neuroprotective effects of orientin on hydrogen peroxide-induced apoptosis in SH-SY5Y cells. *Molecular Medicine Reports*, v. 9, n. 3, p. 947-954, 2014.
- LEE, W., KU, S.K., BAE, J.S. Vascular barrier protective effects of orientin and isoorientin in LPS-induced inflammation in vitro and in vivo. *Vascular Pharmacology*, v. 62, n. 1, p. 3-14, 2014.
- LESSA, M.A. Antihypertensive effects of crude extracts from leaves of *Echinodorus grandiflorus*. *Fundamental & Clinical Pharmacology*. v. 22, n. 2, p. 161-168, 2008.
- LI, Y. 2010. Medical application of isoorientin for treating infection of respiratory syncytia virus. Faming Zhuanli Shenqing (2010), CN 101843612 A 20100929.
- LIAO, Z. 2014. Application of orientin to manufacture angiogenesis inhibitor. Faming Zhuanli Shenqing (2014), CN 104000812 A 20140827
- LIMA-DELLAMORA, E.C. Genotoxic Maillard byproducts in current phytopharmaceutical preparations of *Echinodorus grandiflorus*. *Anais da Academia Brasileira de Ciencias*, v. 86, n. 3, p. 1385-1394, 2014.
- LIN CHUN, M. 2002. Prevention of cellular ROS damage by isovitexin and related flavonoids. *Planta Medica*, v. 68, n. 4, p. 365-367, 2002.

- LIU, T. Comparison of early damage of CHO cells in the presence of different flavonoid monomers. *Shipin Kexue*, v. 35, n. 11, p. 223-228, 2014.
- LIU, T. Hepatoprotective Effect of Active Constituents Isolated from Mung Beans (*Phaseolus radiatus* L.) in an Alcohol-Induced Liver Injury Mouse Model. *Journal of Food Biochemistry*, v. 38, n. 5, p. 453-459, 2014.
- LOEPER, J. Hepatotoxicity of germander in mice. *Gastroenterology*, v. 106, n. 2, p. 464-472, 1994.
- LORENZI, H., MATOS, F.J.A. *Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas cultivadas*. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2002.
- LORENZI, H. *Plantas daninhas do Brasil: terrestres, aquáticas e tóxicas*. Nova Odessa: Instituto Plantarum de Estudos da Flora Ltda. 2000.
- LU CUI, C. Vitexin protects against cardiac hypertrophy via inhibiting calcineurin and CaMKII signaling pathways. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, v. 386, n. 8, p. 747-755, 2013.
- LU, N., SUN Y., ZHENG, X. Orientin-induced cardioprotection against reperfusion is associated with attenuation of mitochondrial permeability transition. *Planta Medica*, v. 77, n. 10, p. 984-91, 2011.
- LUNARDI, R.F. In vitro antioxidant capacity of tea of *Echinodorus grandiflorus*, "leather hat," in Wistar rat liver. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, v. 86, n. 3, p. 1451-1462, 2014.
- LV, P. The medicinal characteristics of alcohol-extraction water-precipitation fraction from *Swertia mussotii* Franch. *Journal of Medicinal Plants Research*, v. 8, n. 3, p. 158-161, 2014.
- MA, M. The furano norclerodane diterpenoid disobulbin-D induces apoptosis in normal human liver L-02 cells. *Experimental and Toxicologic Pathology*, v. 64, n. 6, p. 611-618, 2012.
- MALI, V. R., MOHAN, V., BODHANKAR, S.L. Antihypertensive and cardioprotective effects of the *Lagenaria siceraria* fruit in NG-nitro-L-arginine methyl ester (LNAME) induced hypertensive rats. *Pharmaceutical Biology*, v. 50, n. 11, p. 1428-1435, 2012.
- MANN, D., HARTMANN, R. Echinodol: a new cembrene derivative from *Echinodorus grandiflorus*. *Planta Medica*, v. 59, n. 5, p. 465-466, 1993.
- MANTAJ, J. Crispene E, a cis-clerodane diterpene inhibits STAT3 dimerization in breast cancer cells. *Organic & Biomolecular Chemistry*, v. 13, n. 13, p. 3882-3886, 2015.
- MATE COURO. Institucional. Disponível em: <<http://www.imgstudio.com.br/clientes/matecouro/site.html>>. Acesso em: 15 mar. 2009.
- MATIAS, L. Q. O gênero *Echinodorus* Rich. ex Engelm. (Alismataceae Vent.) do domínio da caatinga brasileira. *Rodriguesia*, v. 58, p. 473-774, 2007.

- MATSUNO, T., SHIODA, M., KANO, K. *Tumoricidal activity of a new clerodane diterpenoid isolated from propolis*. Edited By: Rao, R. S. Proceedings of the International Cancer Congress, Free Papers and Posters, 16th, New Delhi, Oct. 30-Nov. 5, 1994, 1, 691-694, 1994.
- MELO, P.S., DURAN, N., HAUN, M. Derivatives of dehydrocrotonin, a diterpene lactone isolated from *Croton cajucara*: cytotoxicity in rat cultured hepatocytes and in V79 cells. *Human & Experimental Toxicology*, v. 21, n. 5, p. 281-288, 2002.
- MISSOURI BOTANICAL GARDEN. *Echinodorus grandiflorus* (Cham. & Schldtl.) Micheli. Disponível em: <<http://www.tropicos.org/Name/900024>>. Acesso em: 18 mar. 2016.
- MYERS, N. et al. Biodiversity Hotspots for Conservation Priorities. *Nature*, v. 403, p. 853-858, 2000.
- NEWMAN, D.J., CRAGG, G.M. Natural Products as Sources of New Drugs Over the Last 25 years. *Journal of Natural Products*, v. 70, p. 461-467, 2007.
- PARK, H.S. Antioxidant flavone glycosides from the leaves of *Sasa borealis*. *Archives of pharmaceutical research*, v.30, n. 2, p. 161-166, 2007.
- PERIPOLLI, G.A., BEVILAQUA, E.A., NEDEL, L. Dormência e longevidade de sementes de chapéu-de-couro (*Echinodorus grandiflorus* mich.) – Alismataceae. *Revista Brasileira de Sementes*. v. 22, n. 1, p. 225-231, 2000.
- PIMENTA, D.S. Contribuição a ecologia, cultivo e validação do uso de *Echinodorus grandiflorus* (Cham. & Schultdl.) Micheli (Chapéu de Couro) /Contribution the ecology, culture and validation of the use of *Echinodorus grandiflorus* (Cham. & Schultdl.) Micheli (Chapéu de Couro). Tese: Apresentada a Instituto Oswaldo Cruz para obtenção do grau de Doutor. Rio de Janeiro; s.n; 179 p, 2002.
- PIMENTA et al. Essential oil from two populations of *Echinodorus grandiflorus* (Cham. & Schldtl.) Micheli (Chapéu de couro). *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, v. 78, p. 623-628, 2006.
- POTT, V. J., POTT, A. *Plantas aquáticas do Pantanal*. Brasília: EMBRAPA. 2000.
- PRANDO, T. Ethnopharmacological investigation of the diuretic and hemodynamic properties of native species of the Brazilian biodiversity. *Journal of Ethnopharmacology*. v. 174, p. 369-378, 2015.
- PRANDO, T.B et al. Involvement of bradykinin B2 and muscarinic receptors in the prolonged diuretic and antihypertensive properties of *Echinodorus grandiflorus* (Cham. & Schldtl.) Micheli. *Phytomedicine* 2015 [Epub ahead of print].
- RATAJ, K. Alismataceae of Brazil. *Acta Amazônica*, v. 8, n. 1, p. 1-53, 1978.
- REGO, S.C.A. *Alismataceae no Rio Grande do Sul*, Porto Alegre, 128 p. Dissertação de Mestrado - Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 1988.
- REITZ, P. R. Vegetação da zona marítima de Santa Catarina. *Sellowia*, v. 13, p. 17-115, 1961.

- RODRIGUEZ, J.A. Antiulcer activity and subacute toxicity of trans-dehydrocrotonin from *Croton cajucara*. *Human & Experimental Toxicology*, v. 23, n. 9, p. 455-461, 2004.
- SCHNITZLER, M., PETEREIT, F., NAHRSTEDT, A. *Trans*-Aconitic acid, glucosylflavones and hydroxycinnamoyltartaric acids from the leaves of *Echinodorus grandiflorus* ssp. *aureus*, a Brazilian medicinal plant. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 17, n. 2, p. 149-154, 2007.
- SEZIK, E. Hypoglycaemic activity of *Gentiana olivieri* and isolation of the active constituent through bioassay-directed fractionation techniques. *Life sciences*, v. 76, n. 11, p. 1223-1238, 2005.
- SHAO, X. 2013. Composition for treating cardiovascular and cerebrovascular diseases and preparation and test method thereof. Faming Zhuanli Shenqing (2013), CN 103054849 A 20130424.
- SILVA C.J., BASTOS, J.K., TAKAHASHI, C.S. Evaluation of the genotoxic and cytotoxic effects of crude extracts of *Cordia ecalyculata* and *Echinodorus grandiflorus*. *Journal of Ethnopharmacology*. v. 127, n. 2, p. 445-450, 2010.
- SILVA, R.M. *Estudo dos efeitos cardiovasculares e hepáticos da Trans-desidrocrotonina (T-dctn), um diterpeno clerodano obtido do Croton cajucara Benth. (Sacaca)*. Tese de Doutorado. Universidade Federal do Ceará, 2005.
- SILVA JUNIOR, A.A. *Plantas medicinais, caracterização e cultivo*. Florianópolis: EPAGRI, 1994.
- SNIJMAN, P.W. The antimutagenic activity of the major flavonoids of rooibos (*Aspalathus linearis*): some dose-response effects on mutagen activation-flavonoid interactions. *Mutation Research*, v. 631, n. 2, p. 111-123, 2007.
- SOUZA, V.C., LORENZI, H. *Botânica sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de angiospermas da flora brasileira, baseado em APG II*. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2005.
- TANAKA, C.M.A. A cembrane from *Echinodorus grandiflorus*. *Phytochemistry*. v. 44, n. 8, p. 1547-1549, 1997.
- TANAKA, C.M.A. Abietatrienes diterpenoids from *Sagittaria montevidensis* SSP *Montevidensis*. *Química Nova*, v.33, n.1, p. 30-32. 2010.
- TANDOGAN, B. In Vitro Effects of Isoorientin, Forsythoside B, and Verbascoside on Bovine Kidney Cortex Glutathione Reductase. *International Journal of Chemical Kinetics*, v. 45, n. 9, p. 574-579, 2013.
- TIBIRICA, E et al. 2007. Pharmacological mechanisms involved in the vasodilator effects of extracts from *Echinodorus grandiflorus*. *Journal of Ethnopharmacology*. v. 111, n. 1, p. 50-55, 2007.
- TOPRAK, M., ARIK, M. The investigation of the interaction between orientin and bovine serum albumin by spectroscopic analysis. *Luminescence*, v. 29, n. 7, p. 805-809, 2014.

- VASANT, O. Antihypertensive and Diuretic Effects of the Aqueous Extract of *Colocasia esculenta* Linn. Leaves in Experimental Paradigms. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*, v. 11, n. 2, p. 621-634, 2012.
- VRINDA, B., UMA DEVI, P. Radiation protection of human lymphocyte chromosomes in vitro by orientin and vicenin. *Mutation Research, Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, v. 498, n. 1-2, p. 39-46, 2001.
- WAETJEN, W. P. Prenylation enhances cytotoxicity of apigenin and liquiritigenin in rat H4IIE hepatoma and C6 glioma cells. *Food and Chemical Toxicology*, v. 45, n. 1, p. 119-124, 2007.
- WANG, Y.N. Comparative study on absorption of vitexin and rhamnosylvitexin in intestine of rat. *Anhui Yiyao*, v. 17, n. 10, p. 1660-1663, 2013.
- WAN-RU, L. Effect of organic acids amendment on cadmium uptake and translocation by *Echinodorus Osiris*. *Turang Tongbao*. v. 45, n. 1, p. 205-209, 2014.
- WEBB, M.R., MIN, K., EBELER, S.E. *DNA intercalation, topoisomerase I inhibition and oxidative reactions of polyphenols*. Abstracts of Papers, 232nd ACS National Meeting, San Francisco, CA, United States, Sept. 10-14, 2006, AGFD-024, 2006.
- WEI, W. Effects of vitexin-2"-O-rhamnoside and vitexin-4"-O-glucoside on growth and oxidative stress-induced cell apoptosis of human adipose-derived stem cells. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, v. 66, n. 7, p. 988-997, 2014.
- XU, J. Application of ultra-performance liquid chromatography coupled with quadrupole time-of-flight mass spectrometry to determine the metabolites of orientin produced by human intestinal bacteria. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, v. 944, p. 123-127, 2014.
- XU, Y.A. Assessment of Intestinal Absorption of Vitexin-2"-O-Rhamnoside in Hawthorn Leaves Flavonoids in Rat Using In Situ and In Vitro Absorption Models. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, v. 34, n. 2, p. 164-170, 2008.
- XUE, H.F. Hepatic, gastric, and intestinal first-pass effects of vitexin in rats. *Pharmaceutical Biology*, 52(8), 967-71, 2014.
- YING, L., LEI, L. A comparison of decontaminating effects of hydroponic plants on domestic sewage. *Jiangxi Nongye Daxue Xuebao*. v. 36, n. 4, p. 881-886, 2014.
- YU, L. Orientin alleviates cognitive deficits and oxidative stress in A 1-42-induced mouse model of Alzheimer's disease. *Life sciences*, 121104-9, 2015.
- YUAN, L. Isoorientin protects BRL-3A rat liver cell against hydrogen peroxide-induced apoptosis by inhibiting mitochondrial dysfunction, inactivating MAPKs, activating Akt and scavenging ROS and NO. *Biomedicine & Aging Pathology*, v. 3, n. 3, p. 153-159, 2013.
- YUAN, L. Isoorientin induces apoptosis through mitochondrial dysfunction and inhibition of PI3K/Akt signaling pathway in HepG2 cancer cells. *Toxicology and Applied Pharmacology*, v. 265, n. 1, p. 83-92, 2012.

ZHANG, Y. Metabolism of flavone C-glucosides and p-coumaric acid from antioxidant of bamboo leaves (AOB) in rats. *British Journal of Nutrition*, v. 97, n. 3, p. 484-494, 2007.

ZHENG, X.X. Role of ERK/FoxO3a signal axis in inhibitory effect of vitexin 1 (VB-1) in HepG2 cell proliferation. *China Journal of Chinese Materia Medica*, v. 39, n. 7, p. 1276-1279, 2014.