

UNIVERSIDADE DO EXTREMO SUL CATARINENSE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS AMBIENTAIS

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DE *MIKANIA GLOMERATA*
SPRENGEL E *MIKANIA LAEVIGATA* SCHULTZ BIP. EX
BAKER (ASTERACEAE) NO PROCESSO INFLAMATÓRIO
INDUZIDO PELA EXPOSIÇÃO AGUDA AO CARVÃO MINERAL**

TIAGO PETRUCCI DE FREITAS

Criciúma
2006

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DE *MIKANIA GLOMERATA*
SPRENGEL E *MIKANIA LAEVIGATA* SCHULTZ BIP. EX
BAKER (ASTERACEAE) NO PROCESSO INFLAMATÓRIO
INDUZIDO PELA EXPOSIÇÃO AGUDA AO CARVÃO MINERAL**

Tiago Petrucci de Freitas

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Ambientais da Universidade do Extremo Sul Catarinense como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Ciências Ambientais.

Área de Concentração:
Ecologia e Gestão de Ambientes Alterados

Orientador:
Prof. Dr. Emilio Luiz Streck

Co-Orientadora:
Profa. Dra. Vanessa Moraes de Andrade

Criciúma, SC
2006

*Dedico esta dissertação a minha **esposa Luciana, meu filho Gabriel e ao meu amigo Xuxa**, que durante a realização deste trabalho não mediram esforços e dedicação para que eu conseguisse alcançar os objetivos.*

AGRADECIMENTOS

Aos mestres:

Prof. Dr. Emílio Streck, pelos ensinamentos, pela amizade e dedicação e, principalmente, pela confiança e oportunidade de trabalhar sob sua orientação.

Profa. Dra. Vanessa Moraes de Andrade, pela sábia co-orientação e amizade.

Prof. Dr. Ricardo Pinho, pela amizade e oportunidade em participar de outros trabalhos aumentando o meu conhecimento dentro da ciência.

Prof. Dr. Pedro Roosevelt Torres Romão e Prof. Dr. Felipe Dal Pizzol, pela ajuda e disponibilidade na formatação do trabalho.

Profa. Dra. Vanilde Citadini-Zanette e Prof. Dr. Robson dos Santos, pelo auxílio na formatação do trabalho.

À família:

Luciana, minha esposa, por ter lutado pelos meus sonhos ajudando na formulação deste trabalho.

Gabriel, meu filho, que por muitas vezes não teve a atenção necessária do pai, mas que o pai ama muito!

Aos colegas e amigos:

Paulo, pela amizade, dedicação e paciência.

Luis Gustavo, Bruna, Daiane, Mirele, Renata, pela ajuda e dedicação na formatação do trabalho, que por muitas vezes deixaram a vida acadêmica para me auxiliar.

Aos colegas do **Laboratório de Fisiopatologia Experimental e Laboratório de Fisiologia e Bioquímica do Exercício** pela ajuda nos experimentos e ótima convivência.

RESUMO

Vários estudos já demonstraram importantes efeitos biológicos de *Mikania glomerata* Sprengel e *Mikania laevigata* Schultz Bip. ex Baker (Asteraceae), popularmente conhecidos como guaco e utilizados na medicina popular brasileira para o tratamento de doenças respiratórias. As principais indicações populares são para o tratamento de asma e bronquite, principalmente pelas propriedades broncodilatadoras apresentadas por essas plantas medicinais. A pneumoconiose, doença comum em mineradores de carvão é caracterizada por inflamação pulmonar causada pela exposição ao pó de carvão. Nesse sentido, o papel das espécies reativas de oxigênio na pneumoconiose e em outras doenças respiratórias já foi bem descrito. Nesse trabalho, foi avaliado o efeito do pré-tratamento com extratos de *Mikania glomerata* e *M. laevigata* em parâmetros inflamatórios e de estresse oxidativo em pulmão de ratos submetidos a uma instilação traqueal de pó de carvão. Os resultados mostraram que a contagem de células e a atividade da lactato desidrogenase foram aumentadas pela exposição ao carvão. Ambos MGE e MLE preveniram o aumento na contagem de células, mas somente o MLE preveniu o aumento da lactato desidrogenase. Também foi demonstrado que a atividade da mieloperoxidase e a medida de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico não foram alteradas pela exposição ao carvão. Por outro lado, os níveis de carbonilação de proteínas aumentaram e os níveis de grupos tióis diminuíram, demonstrando aumento na oxidação de proteínas após a exposição ao carvão. Além disso, MGE e MLE não preveniram o aumento da carbonilação de proteínas. No entanto, ambos extratos apresentaram importante efeito protetor sobre a oxidação de grupos tióis. Esses achados mostram que MGE e MLE podem ser mais eficazes para a prevenção de oxidação de grupos tióis do que para a carbonilação de proteínas causadas pela exposição ao carvão. Mais estudos farmacológicos e bioquímicos são necessários para compreender os mecanismos de ação dos extratos. A partir desses resultados, *Mikania glomerata* e *M. laevigata* podem se tornar bons candidatos (candidato no dicionário Houaiss = aquele que aspira um cargo, emprego ou honrarias para a prevenção de dano oxidativo pulmonar causado pela exposição ao carvão).

Palavras-chave: carvão mineral; *Mikania glomerata*; *Mikania laevigata*; estresse oxidativo.

ABSTRACT

Several studies report important biological effects of *Mikania glomerata* Sprengel and *Mikania laevigata* Schultz Bip. ex Baker (Asteraceae) popularly known as “guaco”, used in Brazilian folk medicine for respiratory diseases. The main folk indications are for asthma and bronchitis, especially because these medicinal plants present bronchodilating properties. Pneumoconiosis, a disease of coal miners, is characterized by pulmonary inflammation caused by coal dust exposure. The role of ROS in pneumoconiosis and other pulmonary diseases has already been well described. In this work, we evaluated the effect of pre-treatment with *Mikania glomerata* and *M.laevigata* extracts on inflammatory and oxidative parameters in lung of rats submitted to acute coal dust intratracheal instillation. We first verified that bronchoalveolar lavage total cells count and lactate dehydrogenase activity were increased by coal dust intratracheal instillation. Both MGE and MLE prevented the increase in cells count, but only MLE prevented the increase in lactate dehydrogenase activity. We also showed that myeloperoxidase activity and TBARS levels were not affected by coal dust acute exposure. On the other hand, the levels of protein carbonylation were increased and the protein thiol levels were decreased, showing that sulfhydryl groups were oxidized in coal dust-treated rats. Besides, MGE and MLE did not prevent the increase in protein carbonyl content. However, both extracts presented an important protective effect on the oxidation of thiol groups. These findings show that MGE and MLE may be more effective in the prevention of oxidation of sulfhydryl groups than in the carbonylation of aminoacids residues in proteins caused by coal dust acute exposure. Further pharmacological and biochemical investigations are necessary to elucidate the mechanisms of action of these extracts. *Mikania glomerata* and *M.laevigata* may become good candidates for the prevention of lung oxidative injury caused by coal dust exposure.

Key words: coal dust; *Mikania glomerata*; *Mikania laevigata*; oxidative stress.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Herança do carvão mineral. Fonte: BRASIL MINERAL (2004).	2
Figura 2: Rejeitos do carvão ao redor das áreas mineradas. Fonte: ZILLI (2002). ...	3
Figura 3: Detalhe das folhas de <i>Mikania glomerata</i> Sprengel. Fonte: SILVA JÚNIOR (2006).	7
Figura 4: Detalhe das folhas de <i>Mikania laevigata</i> Schultz Bip. ex Baker. Fonte: SILVA JÚNIOR (2006).	7
Figura 5: Aspecto geral de <i>Mikania glomerata</i> Sprengel. Fonte: SILVA JÚNIOR (2006).	9
Figura 6: Aspecto geral de <i>Mikania laevigata</i> Schultz Bip. ex Baker. Fonte: SILVA JÚNIOR (2006).	10
Figura 7: Esquema de estresse oxidativo (Adaptado de MARKS <i>et al.</i> , 1996).	14

SUMÁRIO

1 LISTA DE FIGURAS	iv
1 INTRODUÇÃO	1
1.1 Carvão Mineral	1
1.1.1 Histórico	1
1.1.2 Carvão e Questões Ambientais	2
1.1.3 Carvão e Doenças Pulmonares	3
1.2 Etnofarmacologia	4
1.2.1 Histórico	4
1.2.2 <i>Mikania glomerata</i> Sprengel e <i>Mikania laevigata</i> Schultz Bip. ex Baker	5
1.3 Espécies reativas de oxigênio	13
1.3.1 Definição	13
1.3.2 Estresse oxidativo	14
1.3.3 Radicais livres e doenças pulmonares	15
2 OBJETIVOS	16
2.1 Objetivo geral	16
2.2 Objetivos específicos	16
3 EFFECTS OF MIKANIA GLOMERATA SPRENGEL AND M. LAEVIGATA SCHULTZ BIP. EX BAKER (ASTERACEAE) EXTRACTS ON PULMONARY INFLAMMATION AND OXIDATIVE STRESS CAUSED BY ACUTE COAL DUST EXPOSURE	17
Abstract	17
1 Introduction	18
2 Materials and Methods	19
3 Results	22
4 Discussion	25
5 References	27
4 DISCUSSÃO	30
4.1 Análise do lavado bronco-alveolar	31
4.2 Análise do tecido pulmonar	32
5 CONCLUSÕES	34
6 PERSPECTIVAS	35
7 REFERÊNCIAS	36

1 INTRODUÇÃO

1.1 Carvão Mineral

1.1.1 Histórico

A descoberta e o início da exploração do carvão mineral no Brasil aconteceu por volta de 1795, na época do governo imperial. No período que antecedeu a Primeira Guerra Mundial, a exploração e a extração do carvão mineral tiveram uma queda e somente após a Segunda Guerra Mundial foi que o Brasil apresentou uma política voltada para a exploração do mineral, em função do desabastecimento mundial do petróleo. A partir daí, o carvão tornou-se o principal impulsor para a geração de energia elétrica, atendendo a indústria em vasta expansão, a navegação e a rede ferroviária (MÜLLER, 1987).

O carvão assumiu uma posição de destaque com a criação da Companhia Siderúrgica Nacional, em Volta Redonda (RJ), no ano de 1945. Depois deste fato, muitas unidades mineiras foram abertas em toda a região carbonífera do estado de Santa Catarina. Por volta de 1960, mais de duas dezenas de empresas exploravam carvão. Durante trinta anos o carvão mineral esteve como segundo produto de maior importância no cenário de combustíveis no Brasil, permanecendo apenas abaixo do petróleo (BELOLLI *et al.*, 2002). Em 1973, com a crise mundial do petróleo, a qual atingia 52% da reserva energética do Brasil, o carvão despontou novamente no país, com a substituição do óleo combustível por carvão a vapor. Esta medida aumentou em seis vezes a produção de carvão em dez anos, que se estendeu como principal produto até meados dos anos oitenta. Em razão do poder calorífico e alto teor de impurezas, esse carvão é geralmente usado para a geração de energia elétrica. Atualmente, o Brasil dispõe de uma das maiores reservas e rejeitos de carvão da América Latina e os grandes depósitos encontram-se no sul do Brasil, principalmente em Criciúma e região (BRASIL, 1985).

A contaminação ambiental tem surgido com o desenvolvimento industrial, que proporcionou ao homem uma qualidade de vida jamais alcançada, porém, trazendo como efeito deletério o aumento do risco de exposição a substâncias nocivas, entre elas, as derivadas do carvão mineral (LEITE; FACCINI, 2001).



Figura 1: Herança do carvão mineral. Fonte: BRASIL MINERAL (2004).

1.1.2 Carvão e Questões Ambientais

A extração do carvão subterrâneo e a céu aberto, teve impacto positivo no desenvolvimento econômico da região sul de Santa Catarina, mas por outro lado, os danos ambientais assumiram proporções gigantescas, com a contaminação dos lençóis freáticos, extinção das nascentes dos rios, erosão do solo, o que causou a destruição de grande parte da vegetação nativa e a contaminação química da água (CAROLA, 2002).

Os problemas ambientais vêm sendo agravados ainda mais devido ao alto grau de impurezas do carvão catarinense, que na sua composição traz em cada 100 toneladas de matéria prima bruta, uma média de 25% de carvão aproveitável para 75% de rejeito piritoso, que é a parte não aproveitável do carvão mineral e apresenta na sua composição metais pesados. Em passado recente, a maior parte dos rejeitos do carvão era depositada ao redor das áreas mineradas, que na maioria das vezes, encontrava-se perto do perímetro urbano, expostos ao ar livre e sob a ação do clima, podendo-se somar a este fator a utilização do carvão como produto gerador de energia. Com a queima associada aos rejeitos ao ar livre gera-se a contaminação atmosférica, ficando a população exposta às partículas do carvão, dentre elas a sílica, o sulfeto de ferro (FeS_2), arsênico, chumbo, titânio e até mesmo o urânio, que podem estar presentes tanto na pirita como na forma da

marcassita, as quais provocam distúrbios orgânicos, principalmente os respiratórios (PINHO, 2005).

Com a criação do Decreto Federal n. 97.632/89 que faz exigência de um Plano de Recuperação de Áreas Degradadas (PRAD) para obtenção de licença ambiental e devido a maior conscientização dos empresários e da população, atualmente este problema tem diminuído, mas as seqüelas na área de saúde e ambiental ainda persistem.



Figura 2: Rejeitos do carvão ao redor das áreas mineradas. Fonte: ZILLI (2002).

1.1.3 Carvão e Doenças Pulmonares

Os trabalhadores das minas de carvão e a população exposta à poeira têm o seu sistema pulmonar debilitado com a deposição de partículas, que provocam reações inflamatórias e a fibrose pulmonar (REMZI, 2004). Desta forma, as respostas inflamatórias à inalação das partículas podem levar ao desenvolvimento de doenças ocupacionais irreversíveis. Diversos estudos relatam que a exposição à poeira de carvão é a principal responsável pela pneumoconiose, bronquites e câncer de pulmão, além de doenças alérgicas (KUEMPEI *et al.*, 1997).

A pneumoconiose é definida como um estado patológico devido à retenção de carvão no pulmão, sendo os principais tipos a asbestose (pneumoconiose dos mineiros de carvão) e a silicose. A silicose é ocasionada devido à aspiração de sílica livre (SiO_2), caracterizada por mudanças fibróticas e desenvolvimento de uma nodulação evasiva nos pulmões e clinicamente por uma diminuição da capacidade

respiratória e da expansão da caixa torácica, com uma prevalência à tuberculose. A asbestose ocasiona no pulmão uma reação a partículas de sílica livre, levando a uma fibrose pulmonar, que diminui a capacidade das trocas gasosas (MARGOTTI, 1998).

A etiologia da pneumoconiose permanece indefinida, os tipos de lesões dependem do tempo de exposição, tamanho das partículas aspiradas e da qualidade da composição química do carvão (MENDES, 1995). Estes eventos determinam um dano oxidativo e a inflamação pulmonar (CASTRANOVA *et al.*, 2002). O pulmão responde à poeira da mina de carvão provocando uma cascata inflamatória, tendo como resultado a secreção de fatores pró-inflamatórios, síntese da matriz extracelular e proliferação de fibroblastos (SCHINS; BORM, 1999), aumentando a evidência de que a exposição de carvão nos seres humanos está associada com a geração de espécies reativas de oxigênio (ERO) e com a indução de fatores inflamatórios e de peróxidos de lipídio, que implicam diretamente na patogênese da pneumoconiose (VALLYATHAN *et al.*, 2000).

O tratamento realizado para as afecções decorrentes deste desequilíbrio ambiental é a administração de fármacos e internação hospitalar, acarretando em um afastamento por tempo prolongado dos pacientes de suas atividades laborais e, nem sempre, apresentando eficácia comprovada. Para minimizar os efeitos inflamatórios do carvão, algumas alternativas profiláticas estão sendo realizadas, dentre elas a utilização de produtos naturais, retirados da flora brasileira, na forma de extratos, de infusão ou de emplastro. Estas alternativas podem amenizar o custo da recuperação dos pacientes acometidos pela exposição ambiental ao carvão mineral.

1.2 Etnofarmacologia

1.2.1 Histórico

O emprego das espécies vegetais com fins terapêuticos ocorre desde o início da civilização. Esta prática milenar vem ultrapassando todas as barreiras e obstáculos durante o processo evolutivo e chega até os dias atuais, com a utilização plena da população mundial, principalmente a oriental, como fonte de recurso eficaz e com custo financeiro mais acessível (DI STASI, 1996).

O emprego de plantas medicinais na recuperação da saúde tem evoluído ao longo dos tempos. As plantas começam a despertar o interesse dos laboratórios, que utilizam tecnologia sofisticada de fabricação industrial para a utilização do ser humano moderno. O processo laboratorial transforma o extrato medicinal em comprimidos, gotas, pomadas ou cápsulas, conservando o princípio ativo da planta medicinal (DI STASI, 1996). A utilização de produtos de origem vegetal para o tratamento de problemas de saúde é conhecida como fitoterapia. Os medicamentos fitoterápicos são aqueles cuja matéria-prima é originada de plantas medicinais (raízes, caules, folhas, flores e frutos), que se constituem em drogas vegetais ou extratos para a produção dos mesmos (SONAGLIO, 2001).

O comércio de medicamentos está crescendo em larga escala, com taxa anual média de 15%, sendo que cerca de 30% dos medicamentos vendidos hoje são provenientes direta ou indiretamente de produtos naturais, principalmente de plantas medicinais (FARNSWORTH, 1985). Estas plantas possuem uma reserva de substâncias, com papel terapêutico para a cura e prevenção de doenças (WALL; WANI, 1996). O Brasil tem uma riquíssima e vasta floresta e na diversidade biológica da Floresta Amazônica, encontra-se matéria prima para a produção de fitofármacos. Além disso, estima-se que apenas 8% das plantas já foram estudadas. É de suma importância que se busque na flora brasileira alternativas de medicamentos, visando no futuro o descobrimento de novos fármacos mais eficazes e específicos para a cura das doenças (SIMÕES *et al.*, 1988).

O emprego de produtos naturais na fabricação de remédios no Brasil vem despertando também o interesse da comunidade médica, principalmente a fitoterapia, devido ao custo financeiro ser mais acessível para a população em geral e pelo desenvolvimento tecnológico dos laboratórios em transformar a matéria prima em um excelente fármaco (LADEIRA, 2002). Dentre as matérias primas podemos destacar os extratos da *Mikania glomerata* e *M. laevigata*, o popular guaco, utilizado pela população para o tratamento de doenças respiratórias.

1.2.2 *Mikania glomerata* Sprengel e *Mikania laevigata* Schultz Bip. ex Baker

Aspectos gerais

Mikania glomerata Sprengel e *M. laevigata* Schultz Bip. ex Baker, popularmente conhecidas como guaco, são confundidas por apresentarem semelhança morfológica, composição química e usos medicinais muito parecidos

(OLIVEIRA *et al.*, 1994). A principal diferença entre as duas espécies de *Mikania* é a época de floração. No mês de setembro ocorre a floração da *M. laevigata*, diferente da *M. glomerata*, que tem suas flores no mês de janeiro. Como diferenciação morfológica pode-se também visualizar o formato das folhas, onde *M. glomerata* apresenta lobos menos proeminentes do que *M. laevigata* (Figuras 3 e 4) (MORAES, 1997).

Mikania glomerata ocorre no Brasil, desde o sul da Bahia até o Rio Grande do Sul, podendo ser encontrada em pequena escala na Argentina e no Uruguai (BOTSARIS, 1997). *Mikania laevigata* é uma espécie nativa do sul do Brasil, encontrada em São Paulo e se estende até o Rio Grande do Sul, onde é mais cultivada. Além disso, apresenta melhor adaptação a climas úmidos, com pouca luminosidade e a solos ácidos com altos teores de alumínio (ANTONACIO; WINSENIEWSKI, 1998).

Mikania glomerata e a *M. laevigata* são espécies vegetais pertencentes à família Compositae (Asteraceae), denominadas popularmente por guaco, guaco-liso, guaco-de cheiro, erva-de-serpente e cipó-caatinga, cipó-cabeludo, cipó-sucuriçu, guape, erva-de cobra, coração-de-Jesus, erva-cobre, erva-das-serpentes, erva-de-sapo, guaco-selvagem, guaco-trepador, uaco (LUCAS, 1942). As plantas do gênero *Mikania* foram descritas por Willdenow em 1804, recebendo este nome em homenagem ao professor Joseph Gottfried Mikan. Para o gênero *Mikania* são citadas cerca de 430 espécies, distribuídas principalmente na América do Sul, sendo 200 espécies no Brasil, localizadas principalmente nas regiões Sul e Sudeste (SILVA JÚNIOR, 2006). Apesar de apresentar grande número de espécies, o gênero *Mikania* é pouco estudado.



Figura 3: Detalhe das folhas de *Mikania glomerata* Sprengel. Fonte: SILVA JÚNIOR (2006).



Figura 4: Detalhe das folhas de *Mikania laevigata* Schultz Bip. ex Baker. Fonte: SILVA JÚNIOR (2006).

Mikania glomerata é a única espécie oficializada na 1ª edição da Farmacopéia Brasileira e foi identificada por Sprengel em 1826, tendo como sinonímia *Cacalia trilobata* Vell., *Mikania scansoria* DC., *Mikania hederaefolia* DC.; *Willoughbya glomerata* (Sprengel) Ktze. e *Willoughbya moronoa* (Ktze) Ktze. (GILBERT *et al.*, 2005).

Características morfológicas e ecológicas

Mikania glomerata é um subarbusto silvestre, escandente, de folhagem densa e perene, com o seu caule cilíndrico, ramificado, glabro e, quando seco, apresenta fratura fibrosa e aspecto estriado no sentido longitudinal. Quando jovem apresenta coloração verde-claro passando a arroxeadada e a cinzento-escura nas partes suberificadas. Suas folhas são pecioladas, cordiforme-deltóides, oval-lanceoladas, tri ou pentanervadas e agudas no ápice (SIMÕES *et al.*, 1998). Suas flores são esbranquiçadas e carnosas, dispostas em inflorescência panícula tirsóide, que pode alcançar até 30 cm de comprimento, onde os capítulos se encontram reunidos em glomérulos. As bractéolas são lineares e medem aproximadamente 2 mm de comprimento, sendo o aquênio pentangular medindo 3 mm. O *papus*, com 4 a 6 mm de comprimento, possui coloração que varia de amarelo-palha a rosada.

A descrição anatômica das folhas na epiderme superior apresenta células poligonais de parede levemente curvas enquanto na parte inferior é ondeada (GILBERT *et al.*, 2005). Os estômatos são do tipo paraestomatais e se encontram exclusivamente na epiderme inferior. As epidermes possuem pêlos glanulosos unisseriados, pluricelulares, recurvados. O mesófilo é heterogêneo, assimétrico, formado na parte superior por uma ou duas camadas de células paliçádicas e na inferior por parênquima lacunoso, formado por células arredondadas ou elípticas (OLIVEIRA *et al.*, 1984).

Mikania glomerata (Figura 5) tem seu hábitat nas margens dos rios, cresce espontaneamente em matas primárias, capoeiras, capoeirões, orla de matas, terrenos de aluvião, várzeas sujeitas a inundações, e possui boa adaptação ao cultivo doméstico. Na época da floração torna-se uma planta muito procurada pelas abelhas melíferas. Reproduz-se por sementes ou pelo plantio de estacas do caule, de preferência em terrenos arenosos e úmidos (CABRERA; KLEIN, 1989; RITTER *et al.*, 1992;).



Figura 5: Aspecto geral de *Mikania glomerata* Sprengel. Fonte: SILVA JÚNIOR (2006).

Mikania laevigata (Figura 6) é um subarbusto de hábito escandente, volúvel, com o caule lenhoso e cilíndrico, de coloração castanho-acinzentada e verde-claro nas pontas, suas folhas são opostas de contorno oval e oblongo-lanceoladas, de base obtusa e ápice acuminado de até 15 cm de comprimento e 7 cm de largura, com três nervuras bem evidentes, pecioladas, carnosos-coriáceas, verde brilhantes na face superior, mas pálida na interior. As flores são hermafroditas, reunidas em quatro capítulos iguais entre si, agrupadas em glomérulos ou ramos espiciformes congestos, infundibuliformes, com cinco lacínias, com cerca de 5 mm de comprimento e tubo curto com 1mm. As bractéolas são lineares e medem cerca de 5 mm de comprimento. O fruto tipo aquênio é glabro, pentágulo e subcilíndrico mede cerca de 2 a 4 mm e é provido de *papus* com coloração rosada de 4 mm de comprimento (OLIVEIRA *et al.*, 1984).



Figura 6: Aspecto geral de *Mikania laevigata* Schultz Bip. ex Baker. Fonte: SILVA JÚNIOR (2006).

Atividades farmacológicas e biológicas

O gênero *Mikania* já era utilizado na medicina popular para o tratamento de diversas enfermidades, devido as suas propriedades antimicrobianas, antiinflamatórias e analgésicas (FERRO, 1991). As duas espécies de *Mikania* acima descritas apresentam como principal componente químico a cumarina. Sua presença caracteriza o odor fragrante e aromático da planta (EVANS, 1996). Está presente em cerca de 0,5% das folhas secas de *Mikania glomerata* e 2,6% de *M. laevigata* (FERRO, 1991). Lucas (1942) já havia detectado a presença de cumarina e de substâncias resinosas no vegetal, que podem estar relacionadas com a ação expectorante evidenciada.

Os extratos são indicados para o tratamento de doenças do trato respiratório, agindo como coadjuvante no combate à tosse, ocasionando relaxamento da musculatura lisa, fluidificação dos exsudatos traqueobrônquicos de maneira que possam ser mais facilmente expulsos pelo reflexo da tosse. Sabe-se pouco sobre os efeitos biológicos dos extratos de *Mikania glomerata* e de *M. laevigata*. Alguns relatos atribuem ao gênero *Mikania* a ação broncodilatadora,

espasmódica, vasodilatadora, antimicrobiana, analgésica, antiinflamatória, antiulcerogênica, depressora do sistema nervosa central, antiofídica, antiestresse, inseticida, moluscicida e antialérgica (BARRETO; HIRUMA-LIMA, 2002).

Mikania glomerata atua relaxando a musculatura lisa das vias aéreas, principalmente brônquios, e exerce apreciável efeito sudorífico, desejado nos casos febris (OLIVEIRA *et al.*, 1984). Estudos com o extrato de *M. glomerata* em modelo de inflamação demonstraram efeitos espasmódicos, antiedematoso e broncodilatador (LEITE *et al.*, 2003). O extrato aquoso de folhas de *M. glomerata* apresenta atividade biológica sobre linfócitos, inibindo a proliferação celular em edemas, além de diminuir a migração celular (MORAES *et al.*, 1994). Além disso, o extrato de *M. glomerata*, na dose de 100 mg/Kg por via oral, reduz a migração celular na cavidade pleural de ratos (MARTINS *et al.*, 1986). O extrato aquoso e hidroalcolico desta espécie também foram testados em cobaias animais e, também demonstrou efeito antinociceptivo e relaxante da contração uterina de ratas jovens (CUNHA *et al.*, 2003).

Frações deste extrato hidroalcolico inibem o edema em camundongos submetidos à injeção subplantar de veneno de cobra (MOURA *et al.*, 1996). No estudo sobre o extrato de *M. glomerata* realizado por MOURA *et al.* (2002), em humanos, foi verificado que o efeito relaxante sobre a musculatura lisa do trato respiratório pode estar relacionado ao bloqueio dos canais de cálcio. Moura ainda afirma que o tratamento para asma com o guaco ainda não pode ser comprovado apenas pelo relaxamento da musculatura lisa do trato respiratório, tendo em vista que a asma é uma síndrome clínica de etiologia desconhecida, desencadeada com a obstrução rápida das vias aéreas e uma resposta broncodilatadora exagerada a estímulos externos, vinculados à origem alérgica.

Para CRIDDLE *et al.* (1996), *M. glomerata* apresenta forte atividade relaxante sobre a musculatura lisa respiratória de cobaias animais, devido às cumarinas. Paralelamente, apresenta atividade dilatadora sobre a musculatura lisa vascular (LOPES *et al.*, 1997). *M. glomerata* demonstrou também excelente efeito broncodilatador em ratos expostos à fumaça de cigarro, diminuindo a capacidade secretora de muco no pulmão destes animais, exercendo um efeito anti-histamínico, o que minimiza consideravelmente o edema pulmonar (MOURA *et al.*, 2002).

Como resultado de alguns estudos, *Mikania glomerata* não interfere na atividade antiespasmódica (SILVA JUNIOR, 2006). A administração oral de 500 ou 1000 mg/Kg do extrato bruto de *M. glomerata* em camundongos inibiu em 35,9% e 61,1%, respectivamente, contorções abdominais induzidas por ácido acético. Além disso, o extrato não demonstrou sinais de toxicidade na fase aguda (GANDE *et al.*, 2003).

Mikania glomerata demonstrou ainda propriedades antioxidantes, que ajudam na proteção do organismo à presença de espécies reativas de oxigênio e/ou nitrogênio (KIRAKOSYAN, 2003). Muitos autores atribuem esta propriedade do guaco à presença da cumarina, e estudos vêm sendo realizados com o objetivo de verificar esta contribuição. Esta espécie também apresentou efeito antitumoral, o qual apresenta atividade antiproliferativa sobre linhagens de neoplasia de mama resistente, em estágio inicial e neoplasias de pulmão (REHDER *et al.*, 2002).

No artigo publicado por MAMANI *et al.* (2005), também verificou-se efeito antimicrobiano sobre *Leishmania* sp. e *Trypanosoma cruzi*, com uma porcentagem de inibição do crescimento entre 49,5 e 99%. Para BRAGA *et al.* (2002), o extrato das folhas de *M. glomerata* não apresenta atividade antibacteriana sobre *Streptococcus mutans*, bactéria cariogênica Gram-positiva.

Em relação à mutagênese, testes mostraram que o extrato de *M. glomerata* não demonstrou nenhuma atividade mutagênica em animais. No trabalho em questão, foi verificada a taxa de natalidade de ratos. A administração do extrato não demonstrou nenhum impacto na fertilidade e nenhuma diferença significativa nos parâmetros analisados, sugerindo uma ausência do efeito mutagênico em ratos Wistar (FERNANDES; VARGAS, 2003).

Com relação à *Mikania laevigata*, apenas um estudo foi realizado no sentido de avaliar a sua ação antiinflamatória. SUYENAGA *et al.* (2002), demonstraram ação antiinflamatória sobre o edema em patas de ratos, diminuindo significativamente a migração dos leucócitos ao local da lesão. Neste estudo, as doses utilizadas foram de 200 mg/Kg, inibindo 81,56% e 400 mg/Kg com a inibição de 28,26% da migração leucocitária.

Por fim, *Mikania glomerata* e *M. laevigata* possuem efeito tóxico quando do uso abusivo, segundo relatos de MARTINS; SANTOS (1995). O uso destas plantas é desaconselhável para crianças com idade inferior a um ano e mulheres no

período gestacional. Além disso, seu uso prolongado pode provocar acidentes hemorrágicos, pelo antagonismo à vitamina K (FRANCO, 1996).

1.3 Espécies reativas de oxigênio

1.3.1 Definição

Em 1954, Gerham e Gilbert propuseram que alguns efeitos tóxicos do oxigênio poderiam ocorrer pela formação de radicais livres de oxigênio. Os radicais livres são definidos como qualquer espécie química capaz de existir de forma independente e que contenham em sua estrutura elétrons desemparelhados, sendo assim muito reativos, reagindo com moléculas como lipídios, proteínas e ácidos nucleicos, o que por sua vez pode ocasionar a morte celular. Dentre os radicais livres existem dois grupos: as espécies reativas de oxigênio (ERO) e as espécies reativas de nitrogênio (ERN) (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1999).

As espécies reativas de oxigênio (ERO) são produzidas na cadeia mitocondrial, onde 90-95% do oxigênio consumido é reduzido à água. As EROs podem ser geradas nos processos inflamatórios, na metabolização de gordura pela β -oxidação, na degradação da xantina à ácido úrico e na auto-oxidação de catecolaminas (PINHO, 2005).

Durante a respiração celular, na cadeia transportadora de elétrons, o oxigênio é reduzido à água. A molécula de oxigênio pode aceitar um total de quatro elétrons para a sua redução a duas moléculas de água, mas esta redução pode acontecer com apenas um elétron por vez, ocasionando a produção de ERO, e por consequência a produção de radicais livres de oxigênio. Dois a cinco por cento do oxigênio é desviado formando os radicais livres (MATSUO; KANEKO, 2001).

Os radicais livres são produzidos em muitos processos fisiológicos e exercem funções importantes no organismo, participando da fagocitose, processos de sinalização celular e estão envolvidos na síntese e regulação de algumas proteínas, em condições fisiológicas (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1999). O problema constitui-se quando a produção dos níveis totais de ERO forem maiores que a capacidade de defesa, podendo ocasionar danos celulares (PINHO, 2005).

A produção das espécies reativas de oxigênio ocorre em três fases; na primeira fase ocorre a inicialização onde duas moléculas se fundem e formam um

radical, após temos a progressão, fase em que o radical se liga a outra molécula qualquer, gerando um radical livre. (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1999).

Os radicais livres são gerados conforme as fases descritas acima, o ânion superóxido é o primeiro radical livre formado. Na cadeia respiratória mitocondrial, 5% do oxigênio utilizado não é completamente reduzido à água, e ocorre a formação de ânion superóxido (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1999; CADENAS; DAVIES, 2000).

1.3.2 Estresse oxidativo

Os radicais livres são formados no metabolismo celular. As defesas antioxidantes, enzimáticas e não-enzimáticas, atuam contra a toxicidade dessas espécies e são responsáveis pela homeostase entre a eliminação e a produção de radicais livres. Em condições extremas ocorre o aumento da produção dos radicais livres, que são responsáveis por ultrapassar a capacidade antioxidante normal presente no organismo humano ou ocasionar um déficit das defesas antioxidantes no organismo, favorecendo o aumento do estresse oxidativo (BONDY; LE BEL, 1993; CADENAS; DAVIES, 2000) (Figura.7)

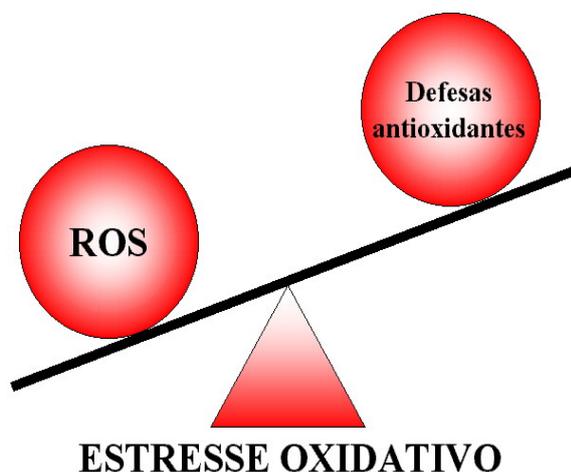


Figura 7: Esquema de estresse oxidativo (Adaptado de MARKS *et al.*, 1996).

O estresse oxidativo pode provocar perda da função celular, por causar alterações no metabolismo das células. No pulmão, com a inalação do carvão mineral, há um aumento da produção das ERO, e este aumento provoca o estresse

oxidativo, e por conseqüência as doenças pulmonares (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1999; CADENAS; DAVIES, 2000; PINHO, 2005).

1.3.3 Radicais livres e doenças pulmonares

O pulmão apresenta algumas características fisiológicas que o torna mais sensível à exposição ao carvão, aumentando o estresse oxidativo, e conseqüentemente a depleção da capacidade de trocas gasosas.

Há evidências de que o pulmão em resposta a poluentes ocupacionais atmosféricos como o carvão, apresenta uma reação inflamatória, tendo como resultado o aumento dos fatores inflamatórios, com uma elevada síntese de matriz extracelular e proliferação de fibroblastos e com um acúmulo de radicais livres (BLACKFORD *et al.*, 1997; VALLYATHAN *et al.*, 2000; SALDIVA *et al.*, 2002; TAO *et al.*, 2003;).

A presença de radicais livres parece estar envolvida na patogênese de várias doenças pulmonares, entre elas a presença de células tumorais, fibrose e a pneumoconiose. Desta maneira diversos autores sugeriram que o uso dos antioxidantes reduz a resposta inflamatória, aumentando a capacidade de defesa pulmonar, diminuindo a quantidade de radicais livres presentes no pulmão (BLACKFORD *et al.*, 1997; VALLYATHAN *et al.*, 2000; SALDIVA *et al.*, 2002; TAO *et al.*, 2003).

Muitos compostos de plantas possuem atividade antioxidante e podem ajudar a proteger o organismo de danos oxidativos causados por radicais livres. As duas espécies de *Mikania* possuem a cumarina e alguns flavonóides como componentes principais, e quando da administração do extrato das folhas de modo periódico, agem como antioxidantes, resultando na defesa do sistema respiratório às doenças inflamatórias relacionadas à exposição da poeira do carvão (LEE *et al.*, 2003).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

- ✓ Estudar o efeito de extrato hidroalcoólico de *Mikania glomerata* Sprengel e *Mikania laevigata* Schultz Bip. ex Baker na prevenção do dano do pulmão de ratos expostos ao carvão mineral.

2.2 Objetivos específicos

- ✓ Verificar o efeito do uso da *Mikania glomerata* e *M. laevigata* sobre o processo inflamatório induzido pela exposição ao carvão mineral em ratos, através da avaliação dos seguintes parâmetros:

No lavado bronco-alveolar: contagem total e diferencial de células; atividade da lactato desidrogenase e dosagem de proteínas;

No tecido pulmonar: lipoperoxidação, através da medida de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS); oxidação de proteínas e oxidação de grupos sulfidrílicos; atividade da enzima mieloperoxidase.

3 EFFECTS OF *MIKANIA GLOMERATA* SPRENGEL AND *M. LAEVIGATA* SCHULTZ BIP. EX BAKER (ASTERACEAE) EXTRACTS ON PULMONARY INFLAMMATION AND OXIDATIVE STRESS CAUSED BY ACUTE COAL DUST EXPOSURE

Tiago P. Freitas¹, Paulo C. Silveira², Luis G. Rocha²,
Vanilde Citadini-Zanette³, Pedro T. Romão⁴, Felipe Dal-Pizzol¹,
Ricardo A. Pinho², Vanessa M. Andrade⁴, Emilio L. Streck¹

¹Laboratório de Fisiopatologia Experimental, ²Laboratório de Fisiologia e Bioquímica do Exercício, ³Herbário Pe. Dr. Raulino Reitz, ⁴Laboratório de Imunologia e Mutagênese, Universidade do Extremo Sul Catarinense, 88806-000 Criciúma, SC, Brazil

ABSTRACT

Several studies report important biological effects of *Mikania glomerata* Sprengel and *Mikania laevigata* Schultz Bip. ex Baker, popularly known as “guaco”, used in Brazilian folk medicine for respiratory diseases. The main folk indications are for asthma and bronchitis, especially because these medicinal plants present bronchodilating properties. Pneumoconiosis, a disease of coal miners, is characterized by pulmonary inflammation caused by coal dust exposure. The role of ROS in pneumoconiosis and other pulmonary diseases has already been well described. In this work, we evaluated the effect of pre-treatment with *Mikania glomerata* (MGE) and *M. laevigata* (MLE) extracts on inflammatory and oxidative parameters in lung of rats submitted to acute coal dust intratracheal instillation. We first verified that bronchoalveolar lavage total cells count and lactate dehydrogenase activity were increased by coal dust intratracheal instillation. Both MGE and MLE prevented the increase in cells count, but only MLE prevented the increase in lactate dehydrogenase activity. We also showed that myeloperoxidase activity and TBARS levels were not affected by coal dust acute exposure. On the other hand, the levels of protein carbonylation were increased and the protein thiol levels were decreased, showing that sulfhydryl groups were oxidized in coal dust-treated rats. Besides, MGE and MLE did not prevent the increase in protein carbonyl content. However, both extracts presented an important protective effect on the oxidation of thiol groups. These findings show that MGE and MLE may be more effective in the prevention of oxidation of sulfhydryl groups than in the carbonylation of aminoacids residues in proteins caused by coal dust acute exposure. Further pharmacological and biochemical investigations are necessary to elucidate the mechanisms of action of these extracts. *Mikania glomerata* and *M. laevigata* may become good candidates for the prevention of lung oxidative injury caused by coal dust exposure.

Key words: coal dust; *Mikania glomerata*; *Mikania laevigata*; oxidative stress.

1 INTRODUCTION

Coal miners are commonly exposed to coal dust that originates within the mine. The coal dust exposure is related to coal workers' pneumoconiosis, a disease of coal miners characterized by the aggregation of macrophages near the respiratory bronchioles. Inflammation is a consistent feature of the pulmonary response to respirable coal dust (Ghanem et al., 2004; Rom et al., 1987). Some studies performed in our laboratory have previously shown that the parameters of oxidative damage to pulmonary function are altered following inhalation of industrial particles, such as coal (Pinho et al., 2004, 2005). Following the inhalation of atmospheric pollutants, the lungs are the first targets affected by the production of oxidants during the combustion of oxygen (Mossman, 2003). As stated above, this response is mediated by the activation of macrophages and the recruitment of polymorphonuclear cells, which increase inflammatory mediators and the formation of reactive oxygen species (ROS) (Tao et al., 2003). In this context, it was demonstrated that antioxidants may play an important protective effect on oxidative damage induced by acute exposure to coal dust (Pinho et al., 2004, 2005).

Mikania glomerata Sprengel and *M. laevigata* Schultz Bip. ex Baker are popularly known as "guaco". Phytochemically, the presence of coumarins, terpenes and organic acids were reported, especially in the leaves (Celeghini et al., 2001; Osório and Martins, 2004). *Mikania glomerata* and *M. laevigata* are medicinal plants used in Brazilian folk medicine for several inflammatory and allergic conditions, particularly of the respiratory system. These plants have been widely used, and their folk indications in asthma and bronchitis are probably due to its bronchodilating properties (Soares de Moura et al., 2002). It has also been reported anti-inflammatory (Suyenaga et al., 2002) and anti-ulcerogenic activities (Bighetti et al., 2005). An interesting work from Fierro and colleagues (1999) reported that a fraction obtained from the ethanolic extract of *M. glomerata* is effective in inhibiting immunologic inflammation but did not affect acute inflammatory response in lung of rats. In this context, Santos and colleagues (2006) have also recently shown that *Mikania* extracts present important effects in a mice allergic pneumonitis model. Finally, other significant biological effect is the antimicrobial activity against bacteria and yeasts (Holetz et al., 2002; Yatsuda et al., 2005; Betoni et al., 2006), and protozoaries, such as *Leishmania amazonensis* and *Trypanosoma cruzi* (Luize et al., 2005).

Considering that coal dust exposure induces an inflammatory response in lungs and that *Mikania glomerata* and *M. laevigata* are plants used in Brazilian folk medicine for several inflammatory of the respiratory system, this study aimed to investigate whether these plants extracts present any effect on inflammatory and oxidative damage indicators in the lungs of rats acutely exposed to coal dust.

2 MATERIALS AND METHODS

2.1 Identification and extraction of plant material:

Aerial parts (leaves) of *Mikania glomerata* and *M. laevigata* were collected in Grão Pará, Santa Catarina, Brazil. Voucher specimen of *Mikania glomerata* and *M. laevigata* were deposited at Herbarium Pe. Dr. Raulino Reitz, Universidade do Extremo Sul Catarinense, Criciúma, Santa Catarina, Brazil, under numbers CRI 7380 and CRI 7379, respectively. The leaves were allowed to dry under air circulation (40°C) for three days and powdered. The resulting powder (400 g) was submitted to dynamic maceration with 2 liters of ethanol:water (70:30, v/v) solution during 3 h. The extracts were filtered and this procedure was repeated twice. The solvent was evaporated in a rotavapor and the residue was dissolved in distilled water (Duarte et al., 2005; Yatsuda et al., 2005).

2.2 Coal dust preparation

One kilogram of gross coal was collected from Carboniferous Cooperminas, located in the municipal district of Criciúma, Santa Catarina, Brazil. Samples of 300 g were triturated in a mill of spheres for 3 h, at a frequency of 25 Hz. The coal was analyzed by the Laboratory of Analyses of Soil and Fertilizers of the Soil and Fertilizer Analysis Laboratory at the Universidade do Extremo Sul Catarinense, Criciúma, Santa Catarina, Brazil, presenting the following mineralogical characteristics: copper (0.003%), iron (2.480%), zinc (0.003%), and silica (27.3%). The coal dust used in the experiments were of diameter less than 15 mm.

2.3 Animals and study design

Male Wistar rats obtained from the Central Animal House of Universidade do Extremo Sul Catarinense were caged in groups of five and provided with commercial rat chow and water ad libitum and maintained on a 12-h light:12-h dark

cycle. The animals were divided into six groups: (1) intratracheal instillation of saline and pre-treatment with subcutaneous administration of saline (SS); (2) intratracheal instillation of coal dust and pre-treatment with subcutaneous administration of saline (CS); (3) intratracheal instillation of saline and pre-treatment with subcutaneous administration of *Mikania glomerata* extract (MGE) (SG); (4) intratracheal instillation of coal dust and pre-treatment with subcutaneous administration of MGE (CG); (5) intratracheal instillation of saline and pre-treatment with subcutaneous administration of *Mikania laevigata* extract (MLE) (SL); (6) intratracheal instillation of coal dust and pre-treatment with subcutaneous administration of MLE (CL). All studies were performed in accordance with National Institutes of Health guidelines and with the approval of Ethics Committee from Universidade do Extremo Sul Catarinense.

2.4 Pre-treatment with *Mikania glomerata* and *M. laevigata* and coal dust instillation

Rats were pre-treated for two weeks with saline solution (groups 1 and 2), MGE (100 mg/kg of body weight) (groups 3 and 4) and MLE (100 mg/kg of body weight) (groups 5 and 6) (Fierro et al., 1999). On the 15th day, the animals were anesthetized with ketamine (80 mg/kg of body weight, i.p.) and xylazine (20 mg/kg body weight, i.p.). Gross mineral coal dust (3 mg/0.3 mL saline) (groups 2, 4 and 6) or saline solution (0.3 mL) (groups 1, 3 and 5) were administered directly in the lung, according to our previous protocol (Pinho et al., 2004).

2.5 Bronchoalveolar lavage

Fifteen days after coal dust instillation, the animals were anesthetized with a ketamine/xylazine overdose. Bronchoalveolar lavage (BAL) was conducted as published previously (Dörger et al., 2002). Briefly, after cannulation of the trachea, the thorax was opened, and the lungs of rats were lavaged with phosphate-buffered saline (PBS) pH 7.4. Pooled samples were centrifuged at $300 \times g$ for 10 min, and the cell pellets were washed twice and resuspended. After BAL obtaining, the animals were killed by decapitation and lungs were quickly removed, and stored at -70°C for biochemical analysis.

2.6 Total cells count

A total cell number presence in BAL was obtained with a hemacytometer chamber immediately after the obtaining of the sample. BAL cells were adjusted to a concentration of 5×10^5 cells/mL in PBS.

2.7 Lactate dehydrogenase activity

Lactate dehydrogenase (LDH) was determined in BAL with the aid of a specific kit obtained by Labtest Diagnóstica SA, Brazil. The reading was made starting from an enzymatic system with a kinetic method, according to the technical orientations observed in the bulletin of the referred kit.

2.8 Myeloperoxidase activity

The activity of myeloperoxidase was assessed by the method of Trush and colleagues (1994), by using 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine as a substrate and measured spectrophotometrically at 650 nm. Tissue myeloperoxidase activity is used as an indicator of neutrophil infiltration. Data are presented as U/mg tissue. All samples were assayed in duplicate.

2.9 Thiobarbituric acid-reactive substances levels

The formation of thiobarbituric acid-reactive substances (TBARS) during an acid-heating reaction is widely adopted as a sensitive method for measurement of lipid peroxidation, as previously described by Draper and Hadley (1990). Briefly, the samples were mixed with 1mL of 10% trichloroacetic acid and 1mL of 0.67% thiobarbituric acid. Subsequently, they were heated in a boiling water bath for 30 min. Malondialdehyde equivalents were determined by the absorbance at 532 nm using 1,1,3,3-tetramethoxypropane as an external standard. Results were expressed as malondialdehyde equivalents (nmol/mg protein). All samples were assayed in duplicate.

2.10 Protein carbonyl content

The oxidative damage to proteins was assessed by the determination of carbonyl groups content, based on the reaction with dinitrophenylhydrazine (DNPH), as previously described by Levine and colleagues (1990). Briefly, proteins were precipitated by the addition of 20% trichloroacetic acid and redissolved in DNPH,

and the absorbance was monitored at 370 nm. All samples were assayed in duplicate.

2.11 Protein sulfhydryl content

The assay is based on the reduction of 5,5'-dithio-bis (2-nitrobenzoic acid) (DTNB) by thiols, which in turn become oxidized (disulfide), generating a yellow derivative whose absorption is measured spectrophotometrically at 412 nm (Aksenov and Markesbery, 2001). Briefly, 50 μ L of homogenate were added to 1 mL of PBS buffer pH 7.4 containing 1 mM EDTA. Then, 30 μ L of 10 mM DTNB, prepared in a 0.2 M potassium phosphate solution pH 8.0, were added. Subsequently, 30 min incubation at room temperature in a dark room was performed. Absorption was measured at 412 nm. The sulfhydryl content is inversely correlated to oxidative damage to proteins. Results were reported as nmol TNB/mg protein. All samples were assayed in duplicate.

2.12 Protein determination

Protein content was determined by the method described by Lowry and colleagues (1951) using bovine serum albumin as standard.

2.13. Statistical analysis

Data were analyzed by one-way analysis of variance (ANOVA) followed by the Tukey test when F values were significant. All analyses were performed using the Statistical Package for the Social Science (SPSS) software.

3 RESULTS

In this work we evaluated total protein levels, lactate dehydrogenase activity and total cells count in BAL of rats, submitted to acute coal dust exposure and pre-treated with MGE and MLE. As seen on Table 1, total protein levels were not altered by coal dust. Lactate dehydrogenase activity was increased by coal dust intratracheal instillation, suggesting that coal dust exposure induces cellular injury. Besides, MLE pre-treatment prevented this effect, but MGE not. Finally, we verified that total cells count was increased in coal dust-exposed rats. Both MGE and MLE prevented the increase in cells count. We also measured myeloperoxidase activity, another parameter of inflammation, in lung of rats. Figure 1 shows that this enzyme

was not affected by coal dust intratracheal instillation. Besides, pre-treatment with MGE or MLE did not affect myeloperoxidase.

Table 1. Cellular and biochemical parameters in the BAL of rats after coal dust exposure

Group	Total protein ($\mu\text{g/mL}$)	LDH activity (U/mL)	Total cells count (cells/ μL)
Saline + Saline	598.6 \pm 81.3	14.8 \pm 3.8	11.5 \pm 3.7
Saline + Coal dust	549.5 \pm 47.5	56.6 \pm 9.2*	27.6 \pm 6.1*
MGE + Saline	617.5 \pm 36.2	15.2 \pm 4.9	17.3 \pm 2.5
MGE + Coal dust	593.4 \pm 28.8	43.6 \pm 9.9**	14.7 \pm 4.7
MLE + Saline	577.2 \pm 26.9	23.0 \pm 6.1	11.6 \pm 2.0
MLE + Coal dust	560.6 \pm 71.7	23.4 \pm 9.1	9.5 \pm 4.0

Data presented as mean \pm S.D. (n=5)

Different from control (Saline + Saline) *p<0.01; ** p<0.05

MGE: *Mikania glomerata* extract; MLE: *Mikania laevigata* extract

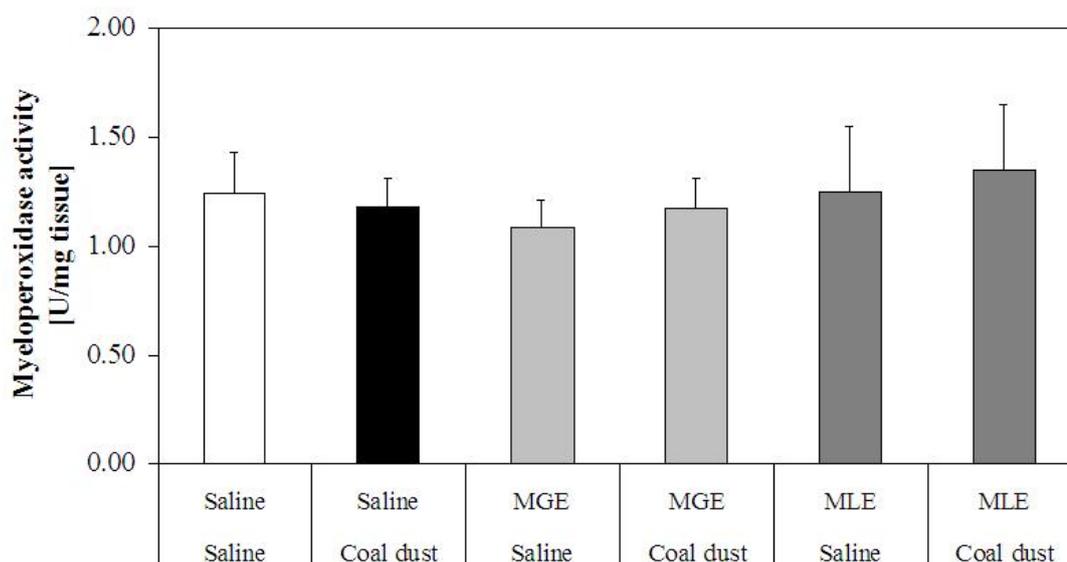


Figure 1. Myeloperoxidase activity in lung after coal dust instillation. Rats were submitted to intratracheal administration of coal dust or saline. Animals were assigned to receive MGE or MLE as described under 'Materials and Methods'. The lung was removed to determine myeloperoxidase activity as described under 'Materials and Methods'. Data are expressed as mean \pm S.D., for six animals. MGE: *Mikania glomerata* extract; MLE: *Mikania laevigata* extract.

In the present work we also measured oxidative stress parameters in lung of rats, named TBARS and protein carbonyl and sulfhydryl contents. As seen on

Figure 2, TBARS levels were not altered by coal dust exposure, indicating that lipid peroxidation is not present in lung of rats 15 days after intratracheal instillation of coal dust. Besides, we verified that rats submitted to coal dust acute exposure presented higher levels of protein carbonyl content, and MGE and MLE pre-treatment did not prevent such effect (Figure 3A). Finally, Figure 3B shows that coal dust induces the oxidation of sulfhydryl groups, since protein thiol content was significantly decreased in these animals. Besides, MGE and MLE prevented this effect, leading to speculate that these extracts may present a protective role in oxidation of thiol groups.

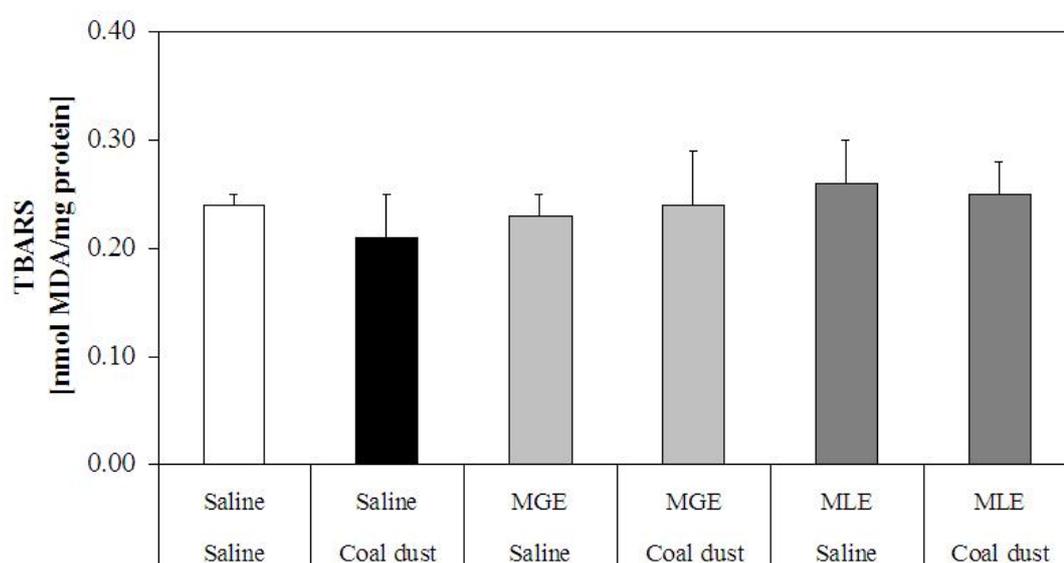


Figure 2. Thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) in lung after coal dust instillation. Rats were submitted to intratracheal administration of coal dust or saline. Animals were assigned to receive MGE or MLE as described under 'Materials and Methods'. The lung was removed to determine TBARS as described under 'Materials and Methods'. Data are expressed as mean \pm S.D., for six animals. MGE: Mikania glomerata extract; MLE: Mikania laevigata extract.

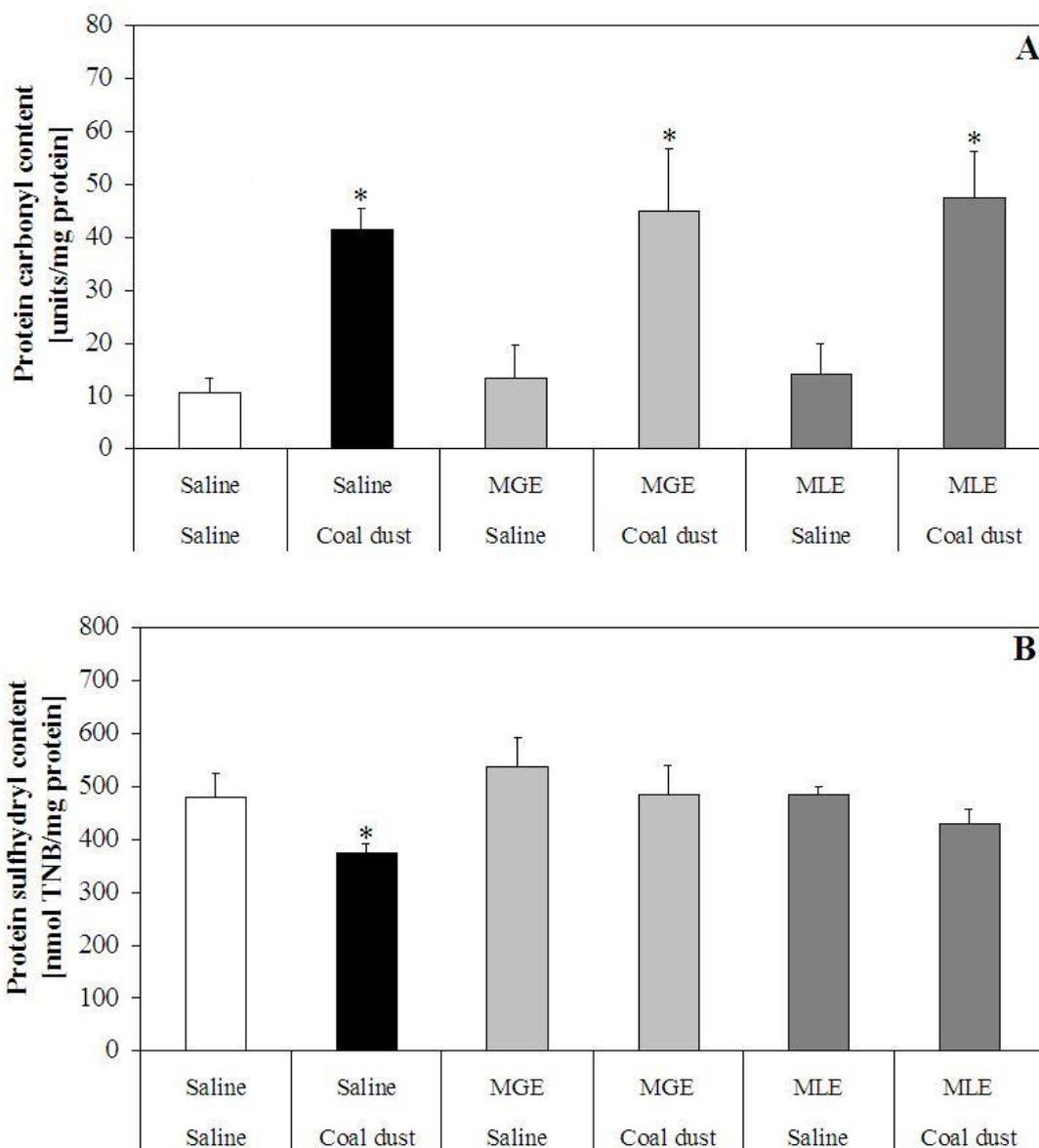


Figure 3. Protein carbonyl (A) and sulfhydryl (B) content in lung after coal dust instillation. Rats were submitted to intratracheal administration of coal dust or saline. Animals were assigned to receive MGE or MLE as described under ‘Materials and Methods’. The lung was removed to determine protein carbonyl (A) and sulfhydryl (B) contents as described under ‘Materials and Methods’. Data are expressed as mean \pm S.D., for six animals. MGE: Mikania glomerata extract; MLE: Mikania laevigata extract. Different from control (Saline + Saline) * $p < 0.01$ (Tukey’s test).

4 DISCUSSION

Several studies report important biological effects of Mikania glomerata and *M. laevigata*, popularly known as “guaco”. The extracts of these plants are characterized by the presence of coumarins, terpenes and organic acids, mainly in

the leaves (Celeghini et al., 2001; Osório and Martins, 2004). *Mikania glomerata* and *M. laevigata* are used in Brazilian folk medicine for respiratory diseases. The main folk indications are for asthma and bronchitis, especially because these medicinal plants present bronchodilating properties (Lopes, 1997; Soares de Moura et al., 2002). Other studies report anti-inflammatory (Suyenaga et al., 2002) and antimicrobial activity (Heletz et al., 2002; Luize et al., 2005; Yatsuda et al., 2005; Betoni et al., 2006).

Pneumoconiosis, a disease of coal miners, is characterized by pulmonary inflammation caused by coal dust exposure (Ghanem et al. 2004; Rom et al. 1987). The lung is a primary target of inhaled oxidants such as coal dust. The role of ROS in pneumoconiosis has also been reported. The main source of these species is lung inflammation, a process that occurs after exposure to many of these agents and infections (Tao et al., 2003).

In this work, we evaluated the effect of pre-treatment with MGE and MLE on inflammatory and oxidative parameters in lung of rats submitted to acute coal dust intratracheal instillation. We first verified that BAL total cells count and lactate dehydrogenase activity were increased by coal dust intratracheal instillation. Both MGE and MLE prevented the increase in cells count, but only MLE prevented the increase in lactate dehydrogenase activity. These results evidenciate that coal dust increases inflammation and cellular death in lung of rats, and that especially *Mikania laevigata* presented a protective effect in the same parameters. It is tempting to speculate that *M. laevigata* is more effective in the prevention of lung injury because this species present a higher amount of coumarins (Ferro, 1991). It is believed that coumarins are responsible for the main biological effects of these plants.

We also showed that myeloperoxidase activity and TBARS levels were not affected by coal dust acute exposure. On the other hand, protein carbonyl and sulfhydryl contents were affected by coal dust intratracheal instillation. The levels of protein carbonylation were increased and the protein thiol levels were decreased, showing that sulfhydryl groups were oxidized in coal dust-treated rats. Besides, MGE and MLE did not prevent the increase in protein carbonyl content. However, both extracts presented an important protective effect on the oxidation of thiol groups. These findings show that MGE and MLE may be more effective in the prevention of oxidation of sulfhydryl groups than in the carbonylation of aminoacids residues in proteins caused by coal dust acute exposure.

Regarding to TBARS and protein carbonyl content results, it is important to state that our findings are in accordance to previous reports from our laboratory (Pinho et al, 2004). These findings are also in accordance to other studies showing that *Mikania glomerata* presents an anti-inflammatory effect (Suyenaga et al., 2002). Besides, there is a lack of information about *Mikania laevigata* properties. This study indicate that *M. glomerata* and *M. laevigata* may become good candidates for the prevention of lung oxidative injury caused by coal dust exposure. Further pharmacological and biochemical investigations are being carried out in our laboratory in order to elucidate the mechanisms of action of these extracts.

ACKNOWLEDGEMENTS

The present work was supported by grants from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and Programa de Pós-Graduação em Ciências Ambientais - Universidade do Extremo Sul Catarinense (PPGCA-UNESC).

6 REFERENCES

- Aksenov, M.Y., Markesbery, W.R., 2001. Change in thiol content and expression of glutathione redox system gene in the hippocampus and cerebellum in Alzheimer's disease. *Neuroscience Letters* 302, 141–145.
- Betoni, J.E.C., Mantovani, R.P., Barbosa, L.N., Di Stasi, L.C., Fernandes Jr, A., 2006. Synergism between plant extract and antimicrobial drugs used on *Staphylococcus aureus* diseases. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 101, 387–390.
- Bighetti, A.E., Antonio, M.A., Kohn, L.K., Rehder, V.L., Foglio, M.A., Possenti, A., Vilela, L., Carvalho, J.E., 2005. Antiulcerogenic activity of a crude hydroalcoholic extract and coumarin isolated from *Mikania laevigata* Schultz Bip. *Phytomedicine* 12, 72–77.
- Celeghini, R.M.S., Vilegas, J.H.Y., Lanças, F.M., 2001. Extraction and Quantitative HPLC Analysis of Coumarin in Hydroalcoholic Extracts of *Mikania glomerata* Spreng. ("guaco") Leaves. *Journal of Brazilian Chemical Society* 12, 706–709.
- Dörger, M., Allmeling, A.M., Kiefmann, R., Münzing, S., Mesmer, K., Krombach, F., 2002. Early inflammatory response to asbestos exposure in rat and hamster lung: role of inducible nitric oxide synthase. *Toxicology and Applied Pharmacology* 181, 93–105.
- Draper, H.H., Hadley, M., 1990. Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation. *Methods in Enzymology* 186, 421–431.

- Duarte, M.C.T., Figueira, G.M., Sartoratto, A., Rehder, V.L.G., Delarmelina, C., 2005. Anti-Candida activity of Brazilian medicinal plants. *Journal of Ethnopharmacology* 97, 305–311.
- Ferro, V.O., 1991. Aspectos Farmacognósticos de *Mikania smilacina* DC. Curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da USP, Tese de Doutorado, 1991.
- Fierro, I.M., Silva, A.C.B., Lopes, C.S., Soares de Moura, R., Barja-Fidalgo, C., 1999. Studies on the anti-allergic activity of *Mikania glomerata*. *Journal of Ethnopharmacology* 66, 19–24.
- Ghanem, M.M., Battelli, L.A., Mercer, R.R., Scabilloni, J.F., Kashon, M.L., Ma, J.Y.C., Nath, J., Hubbs, A.F., 2006. Apoptosis and Bax Expression are Increased by Coal Dust in the Polycyclic Aromatic Hydrocarbon–Exposed Lung. *Environmental Health Perspectives* 114, 1367–1373.
- Holetz, F.B., Pessini, G.L., Sanches, N.R., Cortez, D.A.G., Nakamura, C.V., Dias-Filho, B.P., 2002. Screening of Some Plants Used in the Brazilian Folk Medicine for the Treatment of Infectious Diseases. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 97, 1027–1031.
- Levine, R.L., Garland, D., Oliver, C.N., Amici, A., Climent, I., Lenz, A.G., Ahn, B.W., Stadtman, E.R., 1990. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Methods in Enzymology* 186, 464–478.
- Lowry, O.H., Rosebough, N.G., Farr, A.L., Randall, R.J., 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry* 193, 265–275.
- Luize, P.S., Tiunan, T.S., Morello, L.G., Maza, P.K., Ueda-Nakamura, T., Dias-Filho, B.P., Cortez, D.A.G., Mello, J.C.P., Nakamura, C.V., 2005. Effects of medicinal plant extracts on growth of *Leishmania (L.) amazonensis* and *Trypanosoma cruzi*. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas* 41, 85–94.
- Mossman, B.T., 2003. Introduction to serial reviews on the role of reactive oxygen and nitrogen species (ROS/RNS) in lung injury and diseases. *Free Radical Biology & Medicine* 34, 1115–1116.
- Osório, A.C., Martins, J.L.S., 2004. Determinação de cumarina em extrato fluido e tintura de guaco por espectrofotometria derivada de primeira ordem. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas* 40, 481–486.
- Pinho, R.A., Bonatto, F., Andrades, M., Frota Jr., M.L.C., Ritter, C., Klamt, F., Dal-Pizzol, F., Uldrich-Kulczynski, J.M., Moreira, J.C.F., 2004. Lung oxidative response after acute coal dust exposure. *Environmental Research* 96, 290–297.
- Pinho, R.A., Silveira, P.C.L., Silva, L.A., Streck, E.L., Dal-Pizzol, F., Moreira, J.C.F., 2005. N-Acetylcysteine and deferoxamine reduce pulmonary oxidative stress and inflammation in rats after coal dust exposure. *Environmental Research* 99, 355–360.
- Rom, W.N., Bitterman, P.B., Rennard, S.I., Cantin, A., Crystal, R.G., 1987. Characterization of the lower respiratory tract inflammation of nonsmoking

individuals with interstitial lung disease associated with chronic inhalation of inorganic dusts. *The American Review of Respiratory Disease* 136, 1429–1434.

Santos, S.C., Krueger, C.L., Steil, A.A., Kreuger, M.R., Biavatti, M.W., Wisniewski Jr, A., 2006. LC characterisation of guaco medicinal extracts, *Mikania laevigata* and *M. glomerata*, and their effects on allergic pneumonitis. *Planta Medica* 72, 679–684.

Soares de Moura, R., Costa, S.S., Jansen, J.M., Silva, C.A., Lopes, C.S., Bernardo-Filho, M., Nascimento da Silva, V., Criddle, D.N., Portela, B.N., Rubenich, L.M., Araujo, R.G., Carvalho, L.C., 2002. Bronchodilator activity of *Mikania glomerata* Sprengel on human bronchi and guinea-pig trachea. *The Journal of Pharmacy and Pharmacology* 54, 249–256.

Suyenaga ES, Reche E, Farias FM, Schapoval EE, Chaves CG, Henriques AT., 2002. Antiinflammatory investigation of some species of *Mikania*. *Phytotherapy Research* 16, 519–523.

Tao, F., Gonzalez-Flecha, B., Kobzik, L., 2003. Reactive oxygen species in pulmonary inflammation by ambient particulates. *Free Radical Biology & Medicine* 35, 327–340.

Trush, M.A., Egnor, P.A., Kensler, T.W., 1994. Myeloperoxidase as a biomarker of skin irritation and inflammation. *Food and Chemical Toxicology* 32, 143–147.

Yatsuda, R., Rosalen, P.L., Cury, J.A., Murata, R.M., Rehder, V.L.G., Melo, L.V., Kooc, H., 2005. Effects of *Mikania* genus plants on growth and cell adherence of mutans streptococci. *Journal of Ethnopharmacology* 97, 183–189.

4 DISCUSSÃO

O sistema pulmonar responde à poeira de carvão provocando uma cascata inflamatória, tendo como resultado a secreção de fatores pró-inflamatórios, síntese da matriz extracelular, e proliferação de fibroblastos. A resposta pulmonar inflamatória à inalação de partículas pode levar ao desenvolvimento de patologias. Diversos estudos estabeleceram a exposição à poeira de carvão como principal responsável pela pneumoconiose, bronquites e câncer de pulmão, além de doenças alérgicas. Os tipos de lesões dependem do tempo de exposição, tamanho das partículas aspiradas e da qualidade da composição química do carvão. Estes eventos determinam um dano oxidativo e a inflamação pulmonar, aumentando a evidência de que a exposição de carvão nos seres humanos está associada com a geração de espécies reativas de oxigênio, e com a indução de fatores inflamatórios e de peróxidos de lipídio, que implicam diretamente na patogênese da pneumoconiose (MENDES, 1995; KUEMPEL *et al.*, 1997; SCHINS, 1999; CASTRANOVA, *et al.*, 2000; VALLYATHAN *et al.*, 2000).

A utilização e reconhecimento de plantas medicinais na recuperação da saúde da população têm evoluído ao longo dos tempos desde as formas mais simples de tratamento até as formas tecnologicamente sofisticadas de fabricação industrial. Apesar das enormes diferenças entre os dois tipos de medicamentos, ambos possuem em comum o fato de muitos desses produtos serem processados a partir de plantas.

Dentre os extratos estudados destacamos os encontrados em *Mikania glomerata* e em *M. laevigata* (guaco), utilizado na medicina popular, para o tratamento de diversas enfermidades e na prevenção de doenças respiratórias, devido às suas propriedades antimicrobianas, antiinflamatórias e analgésicas (FERRO, 1991). Alguns estudos atribuem ao gênero *Mikania* ação broncodilatadora, espasmódica, vasodilatadora, antimicrobiana, analgésica, antiinflamatória, antiulcerogênica, depressora do sistema nervosa central, antiofídica, antiestresse, inseticida, moluscicida e antialérgica (BARRETO; HIRUMA-LIMA, 2002). As folhas de *M. glomerata*, quando em extrato aquoso, são ativas sobre os linfócitos, inibindo a proliferação celular em edemas, além de diminuírem a migração celular (MORAES *et al.*, 1994). O extrato bruto das folhas de

M. glomerata administrado antes da indução de inflamação, reduziu a migração celular na cavidade pleural de ratos (MARTINS *et al.*, 1986). Para KIRAKOSYAN *et al.* (2003) a *M. glomerata* possui efeito antioxidante, pois o seu extrato é rico em flavonóides e cumarinas, que diminuem a ativação das espécies reativas de oxigênio, produzidas na cadeia mitocondrial. *Mikania laevigata* demonstrou ação antiinflamatória sobre edema, diminuindo significativamente a migração dos leucócitos no local da lesão (SUYENAGA *et al.*, 2002).

O trabalho foi pautado na possível relação entre a administração de *Mikania glomerata* e *M. laevigata* e no tratamento do processo inflamatório e do dano oxidativo induzido pela exposição aguda ao carvão mineral em ratos. Para tanto, o lavado bronco-alveolar e o tecido pulmonar dos ratos foram avaliados.

4.1 Análise do lavado bronco-alveolar

No lavado bronco-alveolar, observou-se que o grupo SC quando comparado ao SS (grupo controle) apresentou aumento na contagem de células. Além disso, demonstrou-se que o pré-tratamento com as duas espécies de guaco preveniu a resposta inflamatória produzida pela instilação traqueal de pó de carvão, evidenciado pela redução na contagem de células no lavado bronco-alveolar nestes grupos. Também verificou-se o predomínio de linfócitos no lavado bronco-alveolar (dados não demonstrados). No presente estudo, sugere-se que as partículas de carvão, quando inaladas, provocam uma resposta inflamatória pulmonar aguda, marcada por uma infiltração linfocitária e recrutamento de neutrófilos.

GROSS e HUNNINGAKE (2001), sugeriram que a presença marcante de linfócitos e macrófagos não permitiria estabelecer a formação de processos fibrinogênicos sobre o parênquima pulmonar. No entanto, os autores demonstraram que na presença do linfócito T auxiliar do tipo 2 há uma possível resposta fibrinogênica. Assim, é possível estabelecermos que a resposta linfocitária possa vir a induzir uma fase crônica subsequente e levar a um processo inicial de resposta fibrótica na presença do carvão mineral. Quanto à resposta à utilização da *Mikania laevigata* e *M. glomerata*, foi demonstrada que a administração das espécies de guaco tiveram efeito preventivo sobre a resposta inflamatória no sistema pulmonar, estando nossos resultados de acordo com os achados de MORAES *et al.* (1994), MARTINS *et al.* (1996) e SUYENAGA *et al.* (2002).

A lactato desidrogenase é a enzima catalisadora na redução de piruvato por NADH, na formação do lactato. Esta é uma etapa importante na obtenção de energia pelas células. Por isso, vários tipos de células no corpo humano contêm esta enzima. Quando ocorre morte celular, a lactato desidrogenase, bem como outras enzimas e proteínas, são liberadas para o meio extracelular. O índice de morte celular pode ser avaliado pela medida da atividade desta enzima em soro ou outros líquidos biológicos (MOTTA, 2003).

No lavado bronco-alveolar, observou-se que o grupo SC também apresentou resultados significativos em relação ao grupo controle (SS). Além disso, foi demonstrado que o pré-tratamento com *M. glomerata* não causou alteração nos níveis desta enzima, enquanto que o pré-tratamento com *M. laevigata* mostrou-se eficaz na redução da atividade da enzima. Isso significa dizer que esta espécie, neste modelo, preveniu a morte celular.

Em relação à dosagem de proteínas totais, nossos dados demonstraram que não houve alteração significativa em qualquer grupo testado quando comparado com o grupo controle.

4.2 Análise do tecido pulmonar

No tecido pulmonar foi medida a atividade da enzima mieloperoxidase, as substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), dosagem de tióis e carbonilação de proteínas.

A mieloperoxidase (MPO) é uma enzima considerada um marcador de neutrófilos ativadas. Como mecanismo de ação da MPO, temos o neutrófilo que sintetiza peróxido de hidrogênio por ação da enzima superóxido dismutase (SOD) a partir de duas moléculas de superóxido. A MPO converte o peróxido de hidrogênio em presença de uma hialida como o cloreto (Cl⁻) em HOCl⁻, que é um poderosíssimo oxidante (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1999; CADENAS; DAVIES, 2000).

O aumento de fagócitos sobre o pulmão provoca uma produção local de O₂^{•-} e formação de H₂O₂. Na presença do ferro, o H₂O₂ é convertido em radical hidroxil pela reação de Fenton (VALLYATHAN *et al.*, 1998). De acordo com PINHO (2005), a presença de ferro em partículas minerais é o principal mediador de toxicidade pulmonar. Adicionalmente o oxigênio livre é um inibidor da alfa-1-antitripsina, uma

glicoproteína que inibe a ação de várias proteases, o que pode causar destruição tecidual e enfisema pulmonar (OLSZWER, 1999). Esse radical apresenta uma grande afinidade por lipídios e proteínas da membrana celular, o que provoca uma reação em cadeia com alto poder de destruição celular que se refletirá num aumento dos níveis de TBARS (VALLYATHAN *et al.*, 1998).

Em relação à atividade da enzima mieloperoxidase e da dosagem de TBARS, os resultados obtidos demonstraram que não houve diferenças significativas entre nenhum dos grupos tratados.

A oxidação mediada pelas espécies reativas de oxigênio de alguns resíduos de aminoácidos como a lisina, arginina e prolina, leva à formação de grupos carbonil. A carbonilação de proteínas é formada em consequência das reações secundárias de cadeias laterais de alguns aminoácidos com produtos de oxidação lipídica, ou açúcares reduzidos ou seus produtos de oxidação. Alguns grupos carbonil contribuem para o acúmulo de formas oxidadas de proteína, pois não só são resistentes à degradação proteolítica por proteasomas, como também inibem sua habilidade de degradar proteínas em sua forma oxidada (DALLE-DONNE *et al.*, 2003).

Na carbonilação de proteínas, o grupo tratado com salina + carvão evidenciou um aumento significativo de dano oxidativo em proteínas quando comparado ao grupo controle (SS). Os extratos de guaco de maneira preventiva, não apresentaram propriedades de defesa antioxidantes. Os resultados do grupo SC demonstraram valores similares ao GC e ao LC.

Os resultados obtidos referentes a carbonilação de proteínas e dosagem de TBARS estão de acordo com resultados prévios obtidos no nosso laboratório (PINHO *et al.*, 2004)

Os grupos sulfidril das proteínas (resíduos de cisteína) são sensíveis à oxidação por ERO/ERNs. Ao serem oxidados podem, modificar a estrutura da proteína da qual eles pertencem. Com essa modificação estrutural a proteína pode perder importantes propriedades biológicas (EATON, 2006).

Na análise do grupo sulfidril, ficou demonstrado que a administração de carvão no grupo SC ocasionou dano ao sistema pulmonar quando comparado ao grupo SS, e que os grupos com a administração preventiva dos extratos de *Mikania* não evidenciaram proteção ao sistema pulmonar contra o dano oxidativo.

5 CONCLUSÕES

A instilação de carvão mineral em ratos provocou alterações significativas na estrutura pulmonar destes animais, as quais foram medidas por parâmetros de estresse oxidativo.

A administração do extrato hidroalcoólico de *Mikania glomerata* não apresentou resultados significativos quanto à propriedade de diminuir os níveis de estresse oxidativo.

A administração do extrato hidroalcoólico de *Mikania laevigata* mostrou-se mais efetiva em relação à prevenção do dano oxidativo pulmonar causado pelo carvão, constituindo uma espécie promissora para estudos futuros.

6 Perspectivas

Investigar o efeito do tratamento crônico com extrato de *Mikania glomerata* e *M. laevigata* sobre a atividade inflamatória, produzida pelo carvão no sistema pulmonar de ratos.

Investigar a utilização destas espécies de guaco no processo inflamatório pulmonar em seres humanos.

Investigar as atividades do complexo I, II, III e IV da cadeia respiratória mitocondrial.

Realizar avaliação fitoquímica de *Mikania glomerata* e de *M. laevigata*.

Investigar a utilização de *Mikania glomerata* e de *M.laevigata*, no tratamento de outras patologias.

Investigar as mutações genéticas através do Teste de micronúcleos e Ensaio cometa em ratos submetidos ao extrato de *Mikania glomerata* e *M.laevigata*.

7 REFERÊNCIAS

ANTONACIO, C.C; WINSNIEWSKI, C. Caracterização ecológica e fitoquímica de *Mikania laevigata* Schultz ex Baker no primeiro planalto paranaense. In: SIMPÓSIO DE PLANTAS MEDICINAIS DO BRASIL, 15, 1998, Águas de Lindóia. **Resumos...** Águas de Lindóia: Quem organizou, 1998, p. 105.

BARRETO, T.E. ; HIRUMA-LIMA, C.A. Potencial farmacológico da família Asteraceae em um fragmento de cerrado Botocatu, SP. In: SIMPÓSIO DE PLANTAS NATURAIS DO BRASIL, 17, 2002, Cuiabá. **Resumos...** Cuiabá:UFMT, 2002. BO. 075.

BELOLLI, M; QUADROS, J; GUIDI, A. **A História do Carvão de Santa Catarina: 1790 – 1950.** Criciúma: Imprensa Oficial do Estado de Santa Catarina, 2002.

BLACKFORD Jr., JONES, W., DEY, R.D., CASTRANOVA, V., Comparasion of inducible nitric oxide synthase gene expression and lung inflammation following intratracheal instillation of silica, coal, carbonyl iron, or titanium dioxide in rats. **J. Toxicol. Environ. Health** 51, p. 203–218, 1997.

BONDY, S.C.; LE BEL, C.P. The relationship between excitotoxicity and oxidative stress in the central nervous system. **Free Rad. Biol. Med.** 14, p. 633-642, 1993.

BOTSARIS, A.S. **Fitoterapia chinesa e plantas medicinais.** São Paulo: Ícone, 1995.

BRAGA, P.T.; PEREIRA, C.V.; BARREIRA, M.E.S.; DIAS, D.R.; ARGENTA, J.A.; AZEVEDO, A. O. Avaliação da atividade dos extratos de guaco (*Mikania glomerata* Spreng) e romã (*Punica granatum*) contra *Streptococcus mutans* In: SIMPÓSIO DE PLANTAS MEDICINAIS DO BRASIL, 17, 2002, Cuiabá. **Resumos...** Cuiabá: UFTM. 2002, p. 241.

BRASIL MINERAL. **Herança do carvão:** Mineração e Meio Ambiente: ed. 228, 2004.

BRASIL. **Principais Depósitos Minerais do BR.** Departamento Nacional de Produção Mineral.p.187, 1985.

CABRERA, A.L.; KLEIN, M. Compostas. **Flora Ilustrada Catarinense.** Itajaí, 1989.

CADENAS, E.; DAVIES, K.J. Mitochondrial free radical generation, oxidative stress, and aging. **Free Rad. Biol. Med.** 29: p. 222-230, 2000.

CAROLA, C. R. **Dos subterrâneos da história:** as trabalhadoras das minas de carvão de Santa Catarina (1937-1964). Florianópolis. Editora da UFSC, 2002.

CASTRANOVA V; PORTER D; MILLECCHIA L; MA J Y C; HUBBS A; FTEASS K. Effect of inhaled crystalline silica in a rat model. **Mol. Cell Biochem.** 234/235, p. 177–184, 2002.

CRIDDLE, D.N.; SOARES-DE-MOURA, R.; LOPES, C.S.; CARVALHO, L.C.R. Efeito do guaco (*Mikania glomerata*) no leito vascular mesentérico (LVM) do rato. In: SIMPÓSIO DE PLANTAS MEDICINAIS DO BRASIL, 14, 1996, Florianópolis. **Resumos...** Florianópolis: UFSC/CEME/FINEP/CNPq, 1996, p.110.

CUNHA, K.M.A.; PAIVA, L.A.; SANTOS, F.A.; GRAMOSA, N.V.; SILVEIRA, E.R.; RAO, V.S.N. Smooth muscle relaxant effect of kaurenoic acid, a diterpene from *Copaifera langsdorffii* on rat uterus in vivo. **Phytoter. Res.**, v. 17, p.320-324, 2003.

DALLE-DONNE, I.; GIUSTARINI, D.; COLOMBO, R.; ROSSI, R. MILZANI, A Protein carbonylation in human diseases. **Mol. Med.** v.9 n.4, 2003.

DI STASI, L. C. **Plantas Medicinai Arte e Ciência: um guia de estudo interdisciplinar.** São Paulo: UNESP, 1996. 232p.

EATON, P. Protein thiol oxidation in health and disease: Techniques for measuring disulfides and related modifications in complex protein mixtures. **Free Rad. Biol. Med.**, 40: p. 1889–1899, 2006.

FARNSWORTH NR. Medicinal plants in therapy. **Bull World Health Organ.** Geneva. v. 63 n.3 p. 965-81, 1985.

FERNADES, J.B.F.; VARGAS, V.M.F. Mutagenic and Antimutagenic Potential of the Medicinal Plants *M. laevigata* and *C. xanthocarpa*. **Phytother. Res.** 17, p. 269–273, 2003.

FERRO VO. **Aspectos Farmacognósticos de Mikania smilacina DC.** Curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, Tese de Doutorado, 1991.

FRANCO, L. L. **As sensacionais plantas medicinais: campeãs de poder curativo,** Curitiba: Santa Mônica, 1996.

GANDE, E.P.; PETERS, D.E.C.; KANIS, L. A.; PETERS, R.R. Avaliação da atividade antinoceptiva e antiedematogênica do extrato bruto de Mikania Glomerata Sprengel. In: JORNADA CATARINENSE DE PLANTAS MEDICINAIS, 4, 2003, Itajaí. **Resumos...** Itajaí: UNIVALI, 2003, p.141.

GILBERT, B.; FERREIRA, JL; ALVES, L F. **Monografia de plantas medicinais brasileiras climatizadas.** Curitiba: ABIFITO, 2005. 250p.

GROSS, T. J.; HUNNINGHAKE, G. W. Idiopathic pulmonary fibrosis. **N. Engl. J. Med.** 345, p. 517-525, 2001.

HALLIWELL B. GUTTERIDGE JMC. Free Radical in Biology Medicine University Press, Oxford, N.Y., 1999.

KIRAKOSYAN, A.; SEYMOUR, E.; KAUFMAN, P.B.; WARBER, S.; BOLLING, S.; CHANG, S.C. Antioxidant Capacity of Polyphenolic Extracts from Leaves of *Crataegus laevigata* and *Crataegusmonogyna* (Hawthorn) Subjected to Drought and Cold Stress. **J. Agric. Food Chem.** 51,p. 3973-3976, 2003.

KIRAKOSYAN, A; Antioxidant Capacity of poliphenolic Extracts from Leaves of *Crataegus laevigata* and *Crataegus monogyna* (Hawthorn) Subjected to Drought and Cold stress. **J. Agric. Food Chem.** 2003.

KUEMPEL E D; SMITH R J; ATTFIELD M D; STAYNER L T. Risks of occupational respiratory diseases among U.S. coalminers. **Appl. Occup. Environ. Hyg.** v.12, p. 823–831, 1997.

LADEIRA, A. M. **Plantas Medicinais com óleos essenciais.** São Paulo: Instituto de Botânica, 2002.

LEE, S E; HWANG HJ; HA J-S; JEONG H-S; KIM JH. Screening of medicinal plant extracts for antioxidant activity. **Life Sci.** 73, p. 167-179, 2003.

LEITE, J.C; FACCINI, L.S. Defeitos congênitos em uma região mineradora de carvão. **Rev. de Saúde Pública,** 2001.

LEITE, M.G.R.; SOUZA, C.L.; SILVA M.A.M., MOREIRA, L.K.A.; MATOS, F.J.A.; VIANA, G.S.B. Estudo farmacológico comparativo de *Mikania glomerata* Sprengel (guaco). **Rev. Bras. Farm.** 74, p. 12-15, 2003.

LOPES, C.S.; CARVALHO, L.C.M.; PINTO, A. C.; JANSSEN, J.M.; MOURA, R.S. Efecto de *Mikania glomerata* (guaco) em la musculatura lisa resprratória. In: WORLD CONGRESS ON MEDICINAL AND AROMATIC PLANTS FOR HUMAN WELFARE, 2 , 1997, Mendoza. **Abstracts...** MENDONZA: ICMAP/ISHS/SAIPA, 1997, p.325.

LUCAS, V. Estudo farmacognóstico do guaco - *Mikania glomerata* Sprengel - Composta. **Revista da Flora Medicinal,** Rio de Janeiro, v. 9, n. 3, p. 101-132, 1942.

MAMANIA, M.C.V.; ALEIXOM, L.M.; ABREU, M.F.; RATHA, S. Simultaneous determination of cadmium and lead in medicinal plants by anodic stripping voltammetry. **J. of Pharm. and Biom. Anal.,** 37, p. 709–713, 2005.

MARGOTTI, F. L. **Monografia de pós-graduação.** Universidade do Extremo Sul Catarinense. A pneumoconiose dos Trabalhadores do Carvão. Criciúma, 1998.

MARKS, D.B.; MARKS, A.D.; SMITH, C.M. **Basic Medical Biochemistry.** Baltimore. Lippincott Williams & Wilkins. 1996.

MARTINS, A. F.; CALIXTO, J.B.; MEDEIROS, Y. Efeito dos extratos brutos de *Cephaelis ipecacuanha* e *Mikania Glomerata* na pleurisia em ratos. In: SIMPÓSIO DE PLANTAS MEDICINAIS DO BRASIL, 14, 1986, Florianópolis. **Resumos...** Florianópolis: UFSC/CEME/FINEP/CNPq, 1986, p.81.

MARTINS, E.R; SANTOS, R.H.S. Plantas medicinais: uma alternativa terapêutica de baixo custo. **Informe Técnico,** Viçosa: UFV, v.16, n.73, 26 p., 1995.

MATSUO W; KANECO T. The chemistry of reactive oxygen species and related free radicals. In Radák Z, editor. **Free Radicals in Exercise and Aging Champaign: Human Kinetics,** 2001.

MENDES, R. **Patologia do Trabalho**. São Paulo: Atheneu, 1995.

MORAES, M.D. A. **Família Asteracea na planície litorânea de Piciguaba**. Tese de Doutorado, Instituto de Biologia. Universidade Estadual de Campinas, São Paulo, 1997.

MORAES, V.L.G.; SANTOS, L.F.M.; CASTRO, S.B.; LOUREIRO, L.H.; LIMA, O.A.; SOUZA, M.L.M.; YEN, M.L.Q.; ROSSI-BERGMANN, B.; COSTA, S.S. Inhibition of lymphocyte activation by extracts and fractions of katanchoe, *Alternanthera*, Pauliniaans *Mikania* species. **Phytomed.** v.1, n.3, p. 199-204, 1994.

MOTTA, V. T. **Bioquímica Clínica para o Laboratório: princípios e interpretações**. 4ª ed. EDUCS: Caxias do Sul, 2003.

MOURA, R.S.; CARVALHO, L.C.; LOPES C.S.; SOUZA, M.A. Efeitos do guaco (*Mikania Glomerata*) sobre o edema podal em camundongos induzido pelo veneno de da *Bothrops jararaca*. In: SIMPÓSIO DE PLANTAS MEDICINAIS DO BRASIL, 14, 1996, Florianópolis, **Resumos...** Florianópolis: UFSC/CEME/FINEP/CNPq, 1996, p. 87. F-025.

MOURA, R.S.; COSTA, S.S.; JANSEN, J.M.; SILVA, C.A.; LOPES C.S.; BERNARDO FILHO, M.; SILVA, V.N., CRIDDLE, D.N., PORTEL, B.N.; RUBENICH, L.M.; ARAUJO, R.G.; CARVALHO, L.C. Bronchodilator activity of *Mikania glomerata* Sprengel on human bronchi and guinea-pig trachea. **J. Pharm. Pharmacol.**, v.54, n.2, p.249-256, 2002.

MÜLLER, A. A. **Perfil Analítico do Carvão**. Porto Alegre: DNPM, 1987.

NELSON, D.L.; COX, M.M. **Lehninger Principles of Biochemistry**. New York, Worth Publishers, 2000.

OLIVEIRA, F; ALVARENGA, M. A; AKISUE, G; AKISUE, M.K. Isolamento e identificação de componentes químicos de *Mikania glomerata* Sprengel e de *Mikania laevigata* Schultz Bip. ex Baker. **Rev. Farm. Bioq USP**, São Paulo, v. 20, n. 2, p. 169-183, 1984.

OLSWER, E. Radicais Livres e patologia pulmonar. In: EDITORES DO LIVRO (Eds.), **Radicais Livres em Medicina**. São Paulo: Fundo Editorial BYK, 1995. p. 136-141.

PINHO, R. **A Efeito da suplementação de N-acetilcisteína e do exercício físico sobre os marcadores de estresse oxidativo pulmonar induzido pela exposição aguda ao carvão mineral**. Tese do programa de Pós Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica. Universidade Federal do Rio Grande do Sul; Porto Alegre, 2005.

PINHO, R; SILVEIRA P.L.; SILVA, L.; STRECK, E.L.; DAL-PIZZOL, F.; MOREIRA, J.C.F.; Lung oxidative response after acute coal dust exposure. **Environ. Res.**, 2004.

REHDER, V.L.G.; RODRIGUES, M.V.N.; MELLO, L.V.; SANTOS, A. S. Desenvolvimento de metodologias analíticas para quantificação de diterpenos

presentes em *Mikania* por LC-DAD. In: SIMPÓSIO DE PLANTAS MEDICINAIS DO BRASIL, 17, 2002, Cuiabá. **Resumos...** Cuiabá: UFMT, 2002. C.Q. 002

REMZI A; FERAH A; LEVENT K; AHMET G; AHMET S; HUSEYIN Z. Antioxidant response at early stages and low grades of simple coal worker's pneumoconiosis diagnosed by high resolution computed tomography. Intern. **J. Hyg. Environ. Health**, 2004.

RITTER MR, BAPTISTA LRM, MATZENBACHER NI. **Boletim do Instituto de Ciências**. 50, p. 11, 1992.

SALDIVA, P.H.N.; CLARKE, R.W.; COULL, B.A., STEARNS, R.C.; LAWRENCE, J.; MURTHY, G.G.K.; DIAZ, E., KOUTRAKIS, P.; SUH, H.; TSUDA, A.; GODLESKI, J.J. Lung inflammation induced by concentrated ambient air particles is related to particle composition. **Am. J. Resp. Crit. Care Med**. 165, p. 1610–1617, 2002.

SCHINS, R P F.; BORM, P J A. Mechanisms of mediators in coal dust induced toxicity: a review. **Ann. Occup. Hyg**. 43, p. 7–33, 1999.

SILVA JÚNIOR, A.A. **Essencia herba – plantas bioativas**. Florianópolis: Epagri, 2006. v. 2, 634p.

SIMÕES, C.M. O.; SCHENKEL, E.P.; BAUER, L. LANGELOH, A. Pharmacological investigations on *Achyrocline satueoide*. **J. Pharm.** v.22, n.3, p.281-293, 1988.

SONAGLIO, D. **J. Ethnopharm**. 82, p. 207-215, 2001.

SUYENAGA, E. S.; RECHE, E.; FARIAS, F.M.; SCHAPOVAL, E.E.S.; CHAVES, C. G; HENRIQUES, M.A.T. Antiinflammatory Investigation of Some Species of *Mikania*. **Phytother. Res**. 16, p. 519–523, 2002.

TAO, F.; GONZALEZ-FLECHA, B.; KOBZIK, L.; Reactive oxygen species in pulmonary Inflammation by ambient particulates. **Free Rad. Biol. Med**. 35, p. 327–340, 2003.

VALLYATHAN V; GOINS M; N L LEROY ; PACK D; LEONARD S; X SHI X; CASTRANOVA V; Am Changes in Bronchoalveolar Lavage Indices. **J. Respir. Crit. Care Med**. v. 162, p. 958–965, 2000.

WALL, M. E.; WANI, M. C. Camptotecin and taxol: from discovery to clinic. **J. Ethnopharm.**, v. 51, p. 239-254, 1996.

WALLACE, D.C. Mitochondrial diseases in man and mouse. **Science** 283, p.1482-1487, 1999.

ZILLI, C. B. **Considerações sobre o aproveitamento dos rejeitos de produção do carvão catarinense**. Dissertação apresentada à Escola Politécnica da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2002.