UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JULIO DE MESQUITA FILHO"
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
CÂMPUS DE ARARAQUARA

ESTUDO FITOQUÍMICO E ATIVIDADES BIOLÓGICAS PRELIMINARES DE EXTRATOS DE *POLYGONUM ACRE* H.B.K. (POLYGONACEAE) E *SYNADENIUM CARINATUM* BOISS (EUPHORBIACEAE)

FILIPE TONI SOFIATI

ORIENTADORA: Profa. Dra. Rosemeire Cristina L. R. Pietro

ARARAQUARA - SP
2009

Livros Grátis

http://www.livrosgratis.com.br

Milhares de livros grátis para download.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JULIO DE MESQUITA FILHO"
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
CÂMPUS DE ARARAQUARA

ESTUDO FITOQUÍMICO E ATIVIDADES BIOLÓGICAS PRELIMINARES DE EXTRATOS DE *POLYGONUM ACRE* (POLYGONACEAE) H.B.K. E *SYNADENIUM CARINATUM* (EUPHORBIACEAE) BOISS.

FILIPE TONI SOFIATI

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de Pesquisa e Desenvolvimento de Fármacos e Medicamentos, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP, como parte dos requisitos para obtenção do Título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

ORIENTADORA: Profa. Dra. Rosemeire Cristina L. R. Pietro

ARARAQUARA - SP
2009

O temor do Senhor é o princípio da Ciência

Os loucos desprezam a Sabedoria e a instrução

Bem aventurado o homem que acha sabedoria, e o homem que adquire conhecimento

Porque melhor é a sua mercadoria do que a mercadoria de prata, e a sua renda do que o ouro mais fino

Mais preciosa é do que os rubis; e tudo o que podes desejar não se pode comparar a ela.

Aumento de dias há na sua mão direita: na sua esquerda riquezas e honra

Os seus caminhos são caminhos de delícias, e todas as suas veredas, paz. *Prov 1:7; 3:13*

DEDICATÓRIA

Aos meu pais. Ademir e Célia, pela força, incentivo e confiança na capacidade me emprestada por Deus. Avós Isabel e Nair por servirem de exemplo e fundação na minha personalidade e garra.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora Profa. Dra. Rosemeire Cristina L. R. Pietro por ter me aceito, acreditado e investido sem medo.

À Joyce pelo amor, atenção, carinho e pela eterna disposição em ajudar e apoiar em todos os momentos.

Aos meus colegas de trabalho Tatiana (Tati), Emerson (Verminho), Flavio, Silviane, Elzira, Jean e os novatos Marcelo (Marcelinho) e Ademir (Juninho) que deixavam qualquer trabalho mais leve e mais feliz de ser feito.

Aos técnicos de laboratório Luis Eduardo, Osmar e Fátima pela disposição, carinho e paciência.

Ao meu colega de trabalho José Guedes por compartilhar, mesmo que de longe, de sua amizade e grande sabedoria.

Aos mais que professores, Luis Vitor Sacramento, pelo carinho abrasador, sua disposição atemporal em ajudar e amizade, Hérida Regina Nunes Salgado, pela sua beleza interior incontida, pelo sorriso que nunca deixa faltar em seu rosto, pela amizade e pelo prazer de compartilhar que sempre teve comigo. À Raquel Regina Duarte Moreira, pela confiança, compartilhamento e aceitação de nossas idéias.

Ao meu grande e eterno amigo Vagner por me fazer sorrir nos dias mais difíceis, pelo carinho e apoio que nunca faltaram.

À Cláudia, Laura e Sônia, da seção de Pós-Graduação, pelo apoio contínuo.

À UNESP por ser minha casa e por ter me dado uma oportunidade única, a qual guiará minha vida para sempre.

A CAPES pela bolsa concedida.

SUMÁRIO

Páginas

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS

LISTA DE ABREVIATURAS

RESUMO

ABSTRACT

1 INTRODUÇÃO..... 16

2. REVISÃO DA LITERATURA..... 19

3 OBJETIVOS..... 30

4 MATERIAIS E MÉTODOS..... 32

4.1. MATERIAIS E EQUIPAMENTOS..... 33

4.1.1 Solventes, reagentes e meios de cultura..... 33

4.1.2 Equipamentos..... 34

4.2 MÉTODOS..... 36

4.2.1 Material vegetal..... 36

4.2.2 Caracterização da matéria-prima vegetal..... 36

4.2.2.1 Determinação da perda por dessecação em balança com Infravermelho..... 36

4.2.2.2 Perda por dessecação em estufa..... 37

4.2.2.3 Determinação do teor de extrativos..... 37

4.2.2.4 Determinação do pH 37

4.2.2.5 Determinação do teor de cinzas totais..... 38

4.2.2.6 Determinação do teor de cinzas insolúveis em ácido..... 38

4.2.2.7 Análise granulométrica..... 38

4.2.3 Análise fitoquímica preliminar..... 39

4.2.3.1 Pesquisa de alcalóides..... 39

4.2.3.2 Flavonóides..... 39

4.2.3.2.1 Reações de Shinoda..... 40

4.2.3.2.2 Reação de Taubock..... 40

4.2.3.2.3 Reação de Pew..... 40

4.2.3.2.4 Reação do cloreto férrico..... 40

4.2.3.2.5 Reação do cloreto de alumínio..... 40

4.2.3.3 Antraquinonas 41
4.2.3.3.1 Antraquinonas livres..... 41
4.2.3.3.2 Glicosídeos antraquinônicos (reação de Borntrager)..... 41
4.2.3.4 Glicosídeos cardiotônicos..... 41
4.2.3.4.1 Reações de caracterização de glicosídeos..... 41
4.2.3.4.1.1 Reações com o anel lactônico insaturado..... 41
4.2.3.4.1.1.1 Reação de Legal 41
4.2.3.4.1.1.2 Reação de Kedde..... 42
4.2.3.4.1.2 Reações com os desoxi-açúcares..... 42
4.2.3.4.1.2.1 Reação de Pesez..... 42
4.2.3.4.1.2.2 Reação de Keller-Kiliani..... 42
4.2.3.4.1.3 Reação de anel esteroidal..... 42
4.2.3.4.1.3.1 Reação de Liebermann Burchard..... 42
4.2.3.5 Taninos..... 43
4.2.3.5.1 Reação de gelatina..... 43
4.2.3.5.2 Reação de sais de ferro..... 43
4.2.3.5.3 Reação de acetato de chumbo..... 43
4.2.3.6 Saponinas..... 43
4.3 Obtenção dos extratos..... 44
4.4 Cromatografia em camada delgada..... 44
4.4.1 Alcalóides..... 44
4.4.2 Monoterpenóides, sesquiterpenóides e diterpenóides..... 45
4.4.3 Triterpenóides e esteróides..... 45
4.4.4 Iridóides 45
4.4.5 Cumarinas..... 46
4.4.6 Derivados cinâmicos..... 46
4.4.7 Fenilpropanoglicosídeos..... 46
4.4.8 Pesquisa de flavonóides..... 46
4.4.9 Proantocianidinas condensadas e leucoantocianidinas..... 47
4.5 Avaliação da atividade biológica..... 48
4.5.1 Avaliação da atividade antimicrobiana..... 48
4.5.1.1 Preparo dos antimicrobianos..... 48
4.5.1.2 Preparo dos extratos testados..... 48

4.5.1.3 Preparo das suspensões de bactérias..... 48
4.5.1.4 Teste de difusão em ágar por “templates”..... 48
4.5.1.5 Determinação da concentração inibitória mínima..... 49
4.5.1.5.1 Método de difusão em ágar por discos..... 49
4.5.1.5.2 Método de diluição em tubos..... 50
4.5.1.5.3 Método de diluição em microplaca..... 50
4.6 Testes pré-clínicos..... 52
4.6.1 Teste de toxicidade em dose única..... 52
4.7 Controle de qualidade microbiológico das preparações..... 53
4.7.1 Contagem do número total de microrganismos..... 54
4.7.2 Pesquisa de *Salmonella* sp. e *Escherichia coli*..... 54
4.7.3 Pesquisa de *Staphylococcus aureus* e *Pseudômonas aeruginosa*..... 55
4.8 Avaliação de citotoxicidade..... 55
4.9 Determinação da capacidade de sequestro de radicais livres..... 56
4.10 Análise estatística..... 57
5 RESULTADOS..... **58**
5.1 Material vegetal..... 59
5.1.1 Caracterização da matéria-prima vegetal..... 59
5.1.1.1 Determinação da perda por dessecação em balança com infravermelho (INFRATEST) 59
5.1.1.2 Perda por dessecação em estufa..... 59
5.1.1.3 Determinação do teor de extrativos..... 59
5.1.1.4 Determinação do pH das soluções vegetais..... 60
5.1.1.5 Determinação do teor de cinzas totais..... 60
5.1.1.6 Determinação do teor de cinzas insolúveis em ácido..... 60
5.1.1.7 Análise granulométrica..... 61
5.1.2 Perfil fitoquímico: análises preliminares e utilizando CCD..... 62
5.2 Avaliação da atividade biológica..... 64
5.2.1 Avaliação da atividade antimicrobiana..... 64
5.2.1.1 Teste de difusão em ágar..... 64
5.2.1.2 Determinação da Concentração Inibitória Mínima/ Concentração Bactericida Mínima (CIM/CBM) 65

5.2.1.2.1 Teste de difusão em ágar utilizando discos..... 65
5.2.1.2.2 Teste de diluição em tubos..... 65
5.2.1.2.3 Método de diluição em microplaca..... 66
5.3 Testes pré-clínicos preliminares..... 67
5.3.1 Teste de toxicidade 67
5.4 Avaliação da citotoxicidade..... 71
5.5 Controle de qualidade microbiológico das preparações..... 72
5.6 Determinação da capacidade de seqüestro de radicais livres..... 72
6 DISCUSSÃO..... 74
7 CONCLUSÃO..... 85
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... 87
9 ANEXOS..... 99

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1	Partes aéreas e estrutura floral da espécie *P. acre*.....	21
2	Estrutura química de Poligodial.....	24
3	Partes aéreas e estrutura floral da espécie *S. carinatum.*	28
4	Esquema da microplaca utilizada para determinação da concentração inibitória mínima para bactérias.....	52
5	Distribuição granulométrica do pó obtido a partir de *P. acre*.....	61
6	Distribuição granulométrica do pó obtido a partir de *S. carinatum*.....	62
7	Índice de células sobreviventes no teste de citotoxicidade.	71
8	Atividade anti-radicalar percentual das substâncias padrão e dos extratos estudados na concentração de 250 µg/mL.....	73

LISTA DE TABELAS

Tabela		Página
1	Metabólitos, sistemas de eluição, reveladores e referências bibliográficas utilizadas para a abordagem fitoquímica de *P. acre* e *S. carinatum*.....	47
2	Teor de umidade das drogas vegetais *P. acre* e *S. carinatum*.....	59
3	Perda por dessecação de *Polygonum acre* e *S. carinatum* em estufa.....	59
4	Determinação do teor de extrativos de *Polygonum acre* e *S. carinatum*.....	60
5	pH das drogas vegetais *P. acre* e *S. carinatum* apresentado em média e desvio padrão.....	60
6	Teor de cinzas da espécie *P. acre* e *S. carinatum*.....	60
7	Teor de cinzas insolúveis em ácido das espécies vegetais *P. acre* e *S. carinatum*.....	61
8	Freqüências percentuais, freqüências cumulativas e tamanho médio das partículas na análise granulométrica de *P. acre*.....	61
9	Freqüências percentuais, freqüências cumulativas e tamanho médio das partículas na análise granulométrica de *S. carinatum*.....	62
10	Análise fitoquímica preliminar e utilizando reações químicas de caracterização e cromatografia em camada delgada.....	63
11	Percentual de inibição dos halos formados com relação à ampicilina no teste de atividade antibacteriana de *P. acre* e *S. carinatum* extrato etanólico 70% e *S. carinatum* látex, em concentrações, microrganismos e solventes diversos, analisados em triplicata.....	64
12	Halos de inibição e desvio padrão do crescimento bacteriano (mm) para o extrato etanólico 70% de *P. acre* e látex de *S. carinatum* no teste de difusão em ágar por discos.....	65

13 Método de CIM em microplacas para os extratos etanólicos de *P. acre* e *S. carinatum,* além do extrato clorofórmico de *S carinatum*, contra os microrganismos *S. aureus* e *E. coli*..... 66

14 Percentual de mortes e tempo médio decorrido das mortes, com os devidos desvios-padrão no teste de toxicidade aguda de amostras diversas à concentração de 2,0 g/kg de extrato etanólico 70% das drogas vegetais..... 67

15 Média e desvio padrão da massa corpórea final (g) pós-morte de todos os grupos testados na avaliação de toxicidade aguda, e seus respectivos órgãos correspondente à dose 2 g/kg das soluções-teste..... 68

16 Percentual de mortes e tempo médio decorrido das mortes, com os devidos desvios-padrão no teste de toxicidade aguda na dose de 1 g/kg dos extratos etanólicos 70% de *P. acre* e látex de *S. carinatum*..... 69

17 Média e desvio padrão da massa corpórea final (g) pós-morte dos grupos testados na avaliação de toxicidade aguda, e seus respectivos órgãos na dose 1 g/kg do extrato etanólico 70% da droga vegetal *P. acre*..... 69

18 Percentual de mortes e tempo médio decorrido das mortes, com os devidos desvios-padrão no teste de toxicidade aguda na dose 0,5 g/kg do extrato etanólico 70% da droga vegetal *P. acre*..... 69

19 Média e desvio padrão da massa corpórea final (g) pós-morte dos grupos testados na avaliação de toxicidade aguda, e seus respectivos órgãos na dose 0,5 g/kg do extrato etanólico da droga vegetal *P. acre*..... 70

20 Média do percentual relativo dos órgãos analisados com relação à massa corporal total dos camundongos no teste de toxicidade aguda..... 70

21 Controle de qualidade microbiológico dos extratos de *P. acre* e *S. carinatum*..... 72

LISTA DE ABREVIATURAS

Ac:H2O: acetona:água AcOH: ácido acético

AcOH: ácido acético

ATCC: “American Type Culture Collection”

BHI: “Brain-Heart Infusion” meio infusão cérebro coração

CBM: Concentração bactericida mínima

CCD: Cromatografia em camada delgada

$CHCl_3$: clorofórmio

CIM: Concentração inibitória mínima

CLSI: “Clinical and Laboratory Standards Institute”

AcOEt: acetato de etila

DMSO: dimetilsulfóxido

EtOH 70: etanol 70%

$FeCl_3$: cloreto férrico

HCl: ácido clorídrico

HCOOH: ácido fórmico

H_2O: água destilada

HRCB: Herbário Rioclarense

H_2SO_4: ácido Sulfúrico

IUPAC: “International Union of Pure and Applied Chemistry”

DL: dose letal

MeOH: metanol

NaOH: hidróxido de sódio

NCCLS: “National Committee for Clinical Laboratory Standards””

PrOH: propanol

SOD1: superóxido dismutase

Tris-HCl: tris ácido clorídrico

TSI: “Triple Sugar Iron”

TTC: 2,3,5-trifenil tetrazólio

U.V.: ultravioleta

XLD: xilose lisina desoxicolato

WHO: “World Health Organization”

SI: “Système Internationale d’Unités“

RESUMO

Embora milhares de espécies vegetais sejam utilizadas na medicina tradicional do mundo, estima-se que apenas 1% são conhecidas por estudos científicos, com valor terapêutico demonstrado. As espécies *Polygonum acre* e *Synadenium carinatum* são de fácil cultivo, estando largamente distribuídas no Brasil, e possuindo um alto índice de utilização na medicina popular. Entre os usos populares da espécie *Polygonum acre* podem ser citados: anti-séptico, antiinflamatório, hipotensor, anti-hemorroidal, diurético, vermicida e anti-diarréico. A espécie *Synadenium carinatum* é popularmente utilizada para o tratamento de cânceres. No entanto, não existem estudos científicos que comprovem esses efeitos, nem informações sobre a segurança de utilização dessas drogas pelos seres humanos além de haver poucos estudos fitoquímicos destas espécies. Neste trabalho foram realizados os estudos fitoquímico, microbiológico, a busca de atividades biológicas dos extratos dessas plantas e a investigação de aspectos relativos à segurança de utilização. Os testes fitoquímicos indicaram a presença de flavonóides, taninos, saponinas, mono, sesqui e diterpenos, e derivados cinâmicos nas espécies *P. acre* e *S. carinatum*, enquanto que apenas a espécie *P. acre* respondeu positivamente quanto à presença de proantocianidinas condensadas e leucoantocianidinas. Na avaliação da atividade antimicrobiana através do método de difusão em ágar e da técnica de Concentração Inibitória Mínima, a espécie *P. acre* apresentou atividade antimicrobiana nas concentrações de 300 mg/mL, enquanto a atividade antimicrobiana para os extratos de *S. carinatum* não foi evidenciada. Nos testes de toxicidade aguda, pode-se observar que na dose de 2 g/kg, o extrato etanólico 70% de *P. acre* apresentou taxa de mortalidade de 50%, enquanto o extrato etanólico 70% de *S. carinatum* não apresentou toxicidade aguda. Na dose de 1g/kg, o extrato etanólico 70% de *P. acre* apresentou taxa de mortalidade de 50%, enquanto o látex de *S. carinatum* levou a 100% de morte os camundongos. O extrato etanólico 70% de *P. acre* não apresentou toxicidade aguda na dose de 0,5 g/kg. O extrato etanólico 70% de *P. acre* apresentou citotoxicidade 50% na concentração de 100 µg/mL. Os resultados obtidos nesse trabalho indicam a importância e a necessidade de estudos adicionais na busca de atividades biológicas, e da necessidade de mais estudos em relação à segurança de utilização destas drogas vegetais.

Palavras-chave: *Polygonum; Synadenium;* testes biológicos; análises fitoquímicas; testes pré-clinicos; toxicidade aguda; cega-olho; erva-de-bicho

ABSTRACT

Although there are thousands of plant species used in traditional medicines in the world, it is estimated that only 1% are known by scientific studies with demonstrated therapeutic value. The species *Polygonum acre* and *Synadenium carinatum* are easy to culture, being widely distributed in Brazil, and having a high rate of use in folk medicine. Among the popular uses of the species *Polygonum acre* may be cited anti-septic, anti-inflammatory, hypotensive, anti-hemorrhoid, diuretic, vermifuge, and anti-diarrheal. The *Synadenium carinatum* species is popularly used in the treatment against cancer. However, there are no scientific studies that show these effects, no information about the safe use of these drugs by human beings and there are few phytochemical studies of this species. In this work, the phytochemical study and microbiological quality control, the search for biological activities of the extracts of plants and the investigation of aspects related to safe use were done. The phytochemical tests indicated the presence of flavonoids, tannins, saponins, mono, sesqui and diterpenes, and cinnamic derivatives in *P. acre* and *S. carinatum* species, while only the species *P. acre* responded positively about the presence of condensed proanthocyanidins and leucoanthocianidins. In the evaluation of antimicrobial activity by the ágar diffusion method and Minimum Inhibitory Concentration technique, the *P. acre* species had antimicrobial activity at concentrations of 300 mg / mL, while the antimicrobial activity for the extracts of *S. carinatum* was not demonstrated. In the tests of acute toxicity the ethanol extract 70% of *P. acre* at a dose of 2 g/kg showed 50% of mortality while the ethanol extract 70% of *S. carinatum* has no toxicity. At the dose of 1 g/kg the 70% ethanol extract of *P. acre* showed 50% of mortality while the latex of *S. carinatum* caused 100% of death the mice. The ethanol extract 70% of *P. acre* not indicate acute toxicity at a dose of 0,5 g/kg. The 70% ethanol extract of *P. acre* showed 50% cytotoxicity in concentration of 100 mg / mL. The results of this study indicate the importance of additional studies in the search for biological activities, and the need for further studies regarding the safety of using these drugs plant.

Keywords: *Polygonum; Synadenium;* biological tests; phytochemical analysis; pre-clinical tests; acute toxicity; cega-olho; erva-de-bicho.

1 INTRODUÇÃO

Considerada em tempos remotos como uma manifestação divina, a utilização de plantas medicinais é tão antiga quanto à própria civilização (YAMADA, 1998). O potencial das plantas superiores como fonte de medicamentos é pouco explorado, estima-se a existência de 250.000-500.000 espécies de plantas no mundo, sendo que o estudo fitoquímico foi realizado em apenas uma minúscula parcela (HAMBURGER e HOSTETTMANN, 1991). Estima-se que existam de 25.000 a 75.000 espécies vegetais utilizadas nas medicinas tradicionais do mundo, das quais apenas 1% são conhecidas por estudos científicos, com demonstração de seu valor terapêutico, quando administradas em seres humanos (PRIMACK, 1993).

Os produtos naturais extraídos de plantas exercem um papel importante no processo de descoberta de fármacos, sejam como modelos estruturais para a síntese de moléculas novas ou pelas suas propriedades farmacológicas. Desde a Antiguidade, os humanos já utilizavam as plantas tanto para proteção quanto para cura e alimentação (PINTO et al., 2002; KIRBY, 1996). Tradicionalmente, acredita-se que produtos formulados com estas matérias-primas, especialmente plantas, produzem ação desejada causando menos efeitos tóxicos que as de origem sintética, levando ao emprego crescente dos mesmos como terapêuticos ou cosméticos (YAMAMOTO et al., 2004). Atualmente, a prescrição de plantas como recurso terapêutico alternativo vem crescendo na comunidade médica, desde que estas tenham sido investigadas cientificamente, comprovando sua eficácia e segurança. Na Europa, a fitoterapia já faz parte da medicina alopática, sendo que extratos de plantas e componentes ativos, além de produtos medicinais acabados, estão descritos em várias literaturas (PINTO et al., 2002). No Brasil, ainda a utilização de fitoterápicos está, em sua maioria, fundamentado no uso popular, havendo poucas espécies descritas na farmacopéia Brasileira (YUNES et al., 2001).

O mercado mundial de fitoterápicos movimenta cerca de US$ 22 bilhões por ano e vem seduzindo a cada ano mais adeptos nos países desenvolvidos. Em 2000, o setor faturou US$ 6,6 bilhões nos EUA e US$ 8,5 bilhões na Europa, sendo a Alemanha, de longe, o maior mercado mundial de fitoterápicos. Nesse contexto, o Brasil tem contribuído na pesquisa por novos princípios ativos derivados de produtos naturais, o que pode ser promissor para um futuro aumento da exportação de produtos naturais de origem brasileira. O país já exporta cerca de US$ 7 milhões em extratos vegetais de catuaba, aloés, bardana, ipeca e quina. Entretanto, importa uma

quantidade considerável de hormônios esteroidais, produtos cosméticos de fonte natural, verdadeiro contra-senso para uma nação que possui uma das maiores populações vegetais do planeta (PINTO et al., 2002).

Por outro lado, apesar dos benefícios associados ao uso correto de plantas medicinais no tratamento de enfermidades, seu uso empírico e pouco cuidadoso, fora do contexto original e sem respaldo científico, se mostra inadequado. Os órgãos governamentais têm recomendado a implementação da fitoterapia como um sólido recurso terapêutico no atendimento de algumas necessidades básicas dos serviços de saúde, mas isto deverá ocorrer segundo parâmetros de eficácia e segurança (SOUZA et al., 2003). Dessa maneira, é fundamental o estudo de plantas medicinais, para garantir a qualidade de seus extratos, sua segurança e eficácia, através do exame de suas ações por testes farmacognósticos e toxicológicos em animais e, finalmente, a análise da eficácia e segurança no homem (MELLO & PETROVICK, 2000).

As espécies em estudo, *Synadenium carinatum* e *Polygonum acre* possuem pouco, ou nenhum estudo comprobatório de suas atividades utilizadas na medicina popular, e são largamente utilizadas no Brasil. Por não haver estudos ao menos da segurança de seu uso, há a possibilidade de intoxicação e outros efeitos colaterais, gerando problemas para a saúde pública pelo uso indiscriminado, tais como os provocados pela "*Symphytum officinale*.", ou confrei, na década de 80, que provocou várias mortes por intoxicação e problemas hepáticos. Neste contexto, o presente trabalho tem por finalidade gerar informações relevantes iniciais à segurança do uso de *P. acre* e *S. carinatum,* alem da padronização fitoquímica e físico-química destas espécies e suas atividades biológicas.

2. REVISÃO DA LITERATURA

As plantas medicinais possuem uma ilimitada habilidade para sintetizar metabólitos secundários. Em muitos casos, estas substâncias fitoquímicas servem como mecanismos de defesa da planta contra a predação por microrganismos, insetos e herbívoros (SCHULTES, 1978); além das características de proteção da planta, os metabólitos secundários podem possuir efeitos diretos sobre os organismos em contato, podendo ser benéficos, como em uma atividade antimicrobiana ou antiparasitária para um vertebrado, ou mesmo tóxico ou mutagênico, como é o caso de várias plantas que possuem laticíferos (FERREIRA et al., 2006).

Agentes antimicrobianos vêm sendo utilizados desde o século XVII para o tratamento de doenças infecciosas. Um agente antimicrobiano ideal exibe toxicidade seletiva, e isto implica que uma substância deve ser eficiente contra a bactéria alvo, porém seguro quanto à toxicidade no paciente (BROOKS et al., 2001; DAVIS, 1990). Por outro lado, com a utilização inadequada alguns antimicrobianos estão perdendo muito rapidamente sua eficácia, pois é crescente o número de microrganismos patogênicos resistentes aos agentes antimicrobianos atualmente utilizados, devido, principalmente, ao uso indiscriminado desses agentes. Assim as perspectivas para uso de drogas antimicrobianas no futuro é incerta. Portanto, devem ser tomadas atitudes que possam remediar este problema, como o controle do uso destes compostos potencialmente prejudiciais (VARGAS et al., 2004).

A pesquisa com plantas demonstrou sua importância como fonte de novos agentes antimicrobianos (ARIAS et al., 2004.; ZAMPINI et al., 2005). A atividade antimicrobiana apresentada por estas plantas pode ser devida a compostos fenólicos, flavonóides, taninos, alcalóides, saponinas e terpenos (SCALBERT, 1991).

Uma planta promissora para apresentar atividade antimicrobiana pertence ao gênero *Polygonum* que já possui aplicações na medicina popular. *Polygonum acre* H. B. K. var. Aquatile (figura 1) é da família Polygonaceae, conhecida como “erva-de-bicho” (JOLY, 1976; LIMA et al., 2001). Sua família possui cerca de 40 gêneros, 800 espécies e é encontrada em regiões temperadas, tropicais e subtropicais (JOLY, 1976; HEYWOOD, 1978). Aspectos morfo-anatômicos das espécies foram reportados anteriormente por Metcalfe e Chalk (1950), Inamdar (1969), Kapoort et al. (1971), Mitchell (1971), Esau (1974), Mauseth (1988), Fahn (1990), Lersten e Curtis (1992), Rocha e Rocha (1994), Rudall (1994) Silva-Brambilla e Moscheta (2001) e

Budel et al. (2007). Muitas espécies de *Polygonum* (Polygonaceae) são também conhecidas como “erva-de-bicho”, a exemplo de *P. spectabile, P. acuminatum, P. hydropiper* e *P. hydropiperoides* (CORRÊA, 1969; JÁCOME et al., 2004), no entanto, somente uma espécie *(P. bistorta*) consta na primeira edição da Farmacopéia Brasileira (1926), não fazendo parte das outras edições subseqüentes (JÁCOME et al., 2004). A maioria das espécies (ou membros) desta família é cosmopolita e algumas são cultivadas para ornamentação (*Triplaris, Ruprechtia, Antigonum, Coccoloba*), ou utilizadas como fontes forrageiras e medicinais (*Rumex, Polygonum e Fagopyrum*) (HEYWOOD, 1978). Além disso, as espécies arbóreo-arbustivas representam importantes componentes fitogeográficos, principalmente por ocorrerem em densas populações (MELO, 1991). Há varias espécies de *Polygonum* encontradas no Brasil, dentre elas *Polygonum acuminatum, P. ferrugineum, P. hydropiperoides, P. meisnerianum, P. acre, P. stelligerum*. A distinção anatômica das espécies pode ser efetuada através da anatomia foliar, diferenciada pelos pêlos tectores, cavidades epidérmicas e, mais dificilmente, pelas aréolas e terminações das nervuras (SILVA-BRAMBILLA; MOSCHETA, 2001).

Figura 1: Partes aéreas e estrutura floral da espécie *P. acre*

Esta família é constituída, em sua maioria, por exemplares herbáceos, com caule ereto ou ascendente, com até 1 metro de altura e ramos glabros. Folhas alternas lanceoladas a oval-lanceoladas 6-12 x 1,5-4 cm, ápice atenuado, base aguda, glabras, glândulas punctiformes em ambas as faces, margens ciliadas, estípulas axilares estreitas, esparsamente pilosas; ócrea 1-1,5 cm, pecíolo 1-1,5 cm, racemos 6-11 cm, pedúnculos glabros, ocréolas cônicas, afuniladas. Flor com 2 a 3 mm, perianto com glândulas punctiformes, glândulas nectaríferas pouco desenvolvidas. Inflorescência em espigas terminais, filiformes, com cálice glanduloso, fruto núcula trígona. Fruto com 1,5 a 2 mm, liso e brilhante, perianto frutífero punctato-glanduloso. A anatomia foliar de *P. acre* apresenta células epidérmicas das folhas com paredes anticlinais retas na face adaxial e pouco sinuosas na face abaxial, idioblastos epidérmicos são observados na face adaxial. O bordo da folha apresenta pêlos tectores aglomerados, longos e bastante inclinados, rentes a superfície, em toda a sua extensão (MELO, 1991; GRACIOTTO et al., 2001).

Estas espécies são perenes e tipicamente encontradas em ambientes pantanosos, úmidos, águas pouco profundas, beiras de rios e de transição entre brejos e campos. Desenvolvem-se em solo de boa fertilidade, areno-argiloso ou argiloso e com alto teor de matéria orgânica (LIMA et al., 2001; BIESKI, 2005; LOPES et al., 2003).

Espécies de *Polygonum* são consideradas como plantas invasoras, sendo combatidas sob o pretexto de serem prejudiciais ao cultivo agrícola, dentre estas, se destacando a espécie *P. acre* (JÁCOME et al., 2004; GRACIOTTO et al., 2001). Além disso, as espécies de *Polygonum* são muito comercializadas no Brasil, “o que deixa claro a necessidade de monografias que estabeleçam parâmetros para o controle de qualidade das espécies utilizadas na fabricação de medicamentos fitoterápicos” (JÁCOME et al., 2004).

A espécie *P. acre* é sinônima de P. *punctatum* Elliott e *Persicaria punctata*, e é conhecida popularmente pelos nomes de “erva-de-bicho, capiçoba, pimenta-d’água, pimenta-do-brejo, cataia, potincoba, percicária-do-Brasil, petincobe, erva-pulgueira, cataria, capetiçoba, acataia e catalã”, demonstrando a importância da taxonomia e da sistemática vegetal na denominação do nome científico para a caracterização das espécies vegetais. A denominação popular da espécie como erva-de-bicho é caracterizada por se acreditar que os mamilos hemorroidários eram

ocasionados por um “bicho” (ALVES et al., 2001, BIESKI, 2005; CORRÊA, 1969; JÁCOME et al., 2004; LOPES et al., 2003). Esta espécie é originária da Ásia e encontra-se aclimatada no Brasil em todos os Estados, particularmente no Rio Grande do Sul, Pará, Maranhão, Bahia, Distrito Federal, Goiás, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Rio de Janeiro, Minas Gerais, São Paulo, Paraná e Santa Catarina (LOPES et al., 2003; BIESKI, 2005; MELO, 1991).

P. acre é largamente empregada na medicina popular, algumas vezes até de forma antagônica. É usada principalmente na forma de infusos, tinturas ou banhos, no tratamento de problemas circulatórios (varizes inflamadas, úlceras varicosas, reumatismo, na diminuição da fragilidade capilar e como hemostático, hipertensivo, hipotensor), de pele (contra infecções cutâneas, erisipela, escabiose, picada de insetos, sarna, feridas, e como anti-séptico de uso tópico, adstringente e cicatrizante), respiratório (laringite, gripes, resfriados e contra o vírus respiratório sincicial), gastrointestinal (diarréia, hemorróida e como vermicida, vermífugo e estomáquico), sistema reprodutor (hemorragias uterinas e como emenagogo e abortivo), além de seu uso contra insônia, úlceras, câncer, e como diurético, antitérmico, antiviral, anti-histamínico, antiinflamatório, sudorífico e na proteção do fígado, (LIMA et al., 2001; ALVES et al., 2001; JÁCOME, 2004; ALMEIDA et al., 1995; LOPES et al., 2003; BUDEL et al., 2007; GRACIOTTO et al., 2001; BIESK, 2005; KOTT et al., 1999; PENNA et al., 2001).

No nordeste da Argentina, infusões com a planta inteira de *P. acre* são usadas na medicina tradicional dos Índios Toba como desinfetante e para casos de hemorróidas, em forma de banho de assento (PENNA et al., 2001).

Mesmo havendo uma intensa utilização de *P. acre* pela população, existem ainda poucos estudos comprobatórios que certifique seu uso, demonstrando a urgência de mais estudos de base e clínicos para esta espécie.

Dentre os estudos científicos de *P. acre*, extrato aquoso bruto das folhas foi testado em hemorragias pulmonares artificiais em roedores, obtendo como resultado um efeito protetor sobre as hemorragias produzidas, não sendo este efeito dose dependente (TEIXEIRA et al., 1989). Extrato aquoso e alcoólico de *P. acre* demonstrou o potencial de redução do efeito da ocitocina e acetilcolina no útero de ratos; o extrato aquoso bruto tem o potencial de aumentar a absorção de água em algumas porções do intestino, sendo este efeito possivelmente provocado pela

presença de taninos (ALMEIDA et al., 1995). O extrato diclorometano das partes aéreas mostra grande atividade nos ensaios autobiográficos com o fungo *Cladosporium sphaerospermum*, sendo este também comprovadamente ativo contra fungos filamentosos, leveduras e dermatófitos, entretanto, testes similares com o extrato de raízes não apresentaram os mesmos efeitos, se mostrando inativos contra *Cladosporium curcumerium* e *Candida albicans* (ALVES et al., 2001). O fracionamento químico do extrato evidenciou que sesquiterpenos dialdeídicos e poligodial (Figura 2) são os compostos ativos principais de *P. acre*. Isoladamente, este último também é conhecido pelo seu potencial antifúngico, repelente, antibiótico e antiinflamatório, e pode estar restrito apenas nas partes aéreas da planta (ALVES et al., 2001). Na Argentina, a espécie *P. acre* é usada popularmente no tratamento de doenças infecciosas, sendo a mesma já testada sua atividade antimicrobiana contra *Bacillus subtilis, Micrococcus luteus*, *Staphylococcus aureus* sp e *Aspergillus niger*, o qual demonstrou ação antimicrobiana contra todos os microrganismos testados com o extrato diclorometânico, e apenas *Bacilus subtilis* foi inibido em formulação metanólica (PENNA et al., 2001). Estudos toxicológicos do extrato metanólico e aquoso em ratos indicaram toxicidade aguda DL_{50} = 1g/kg (ALVES et al., 2001; BHAKUNI et al., 1969), além de ser considerado venenoso e até fatal no consumo humano (LIMA et al., 2001).

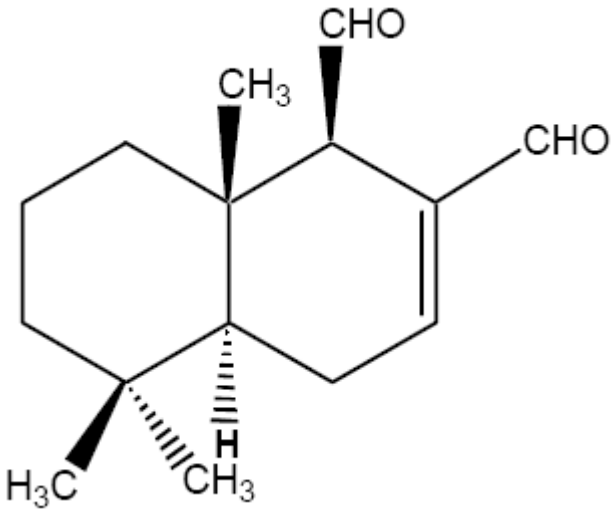

Figura 2: Estrutura química de Poligodial

As ações terapêuticas das espécies da família Polygonaceae são geralmente atribuídas aos altos teores de taninos, flavonóides, sesquiterpenos do tipo drimano,

dialdeído poligodiol, sulfatos de estilbenos, nor-sesquiterpeno, poligonal, cumarinas e uma isocumarina, identificada como poligonolídeo, para a qual foi atribuída atividade antiinflamatória (LIMA et al., 2001; JÁCOME et al., 2004). Várias espécies, inclusive *P. acre*, contêm grandes quantidades de taninos, quercetina, sesquiterpenóides (com atividade antimicrobiana), óleos essenciais, cumarinas, flavonóides (rutina, quercitina e luteolina), ácido poligônico e uma poligonona (ALMEIDA et al., 1995; BIESKI, 2005; DUARTE et al., 2002). Taninos condensados foram encontrados nas partes aéreas de *P. hispidum*, porém não foram detectadas cumarinas. Foi descrita a presença de cumarinas em raízes de *Polygonum convolvulus* e em *P. acre* (DUARTE et al., 2002). A espécie *Polygonum hydropiperoides* Michaux L. também apresenta princípios ativos semelhantes à *P. acre* (BIESKI, 2005).

O estudo e levantamento de outros gêneros de Polygonaceae são importantes pela proximidade genética com *P. acre*, podendo haver similaridade em vários aspectos, como na produção de princípios ativos, o que pode ser usado como referência e direcionamento nos estudos desta espécie.

A espécie *Polygonum hispidum* foi testada com o extrato obtido por infusão e decocção contra as bactérias *Micrococcus luteus, Bacillus subtilis* e *Pseudomonas aeruginosa* a fim de avaliar sua atividade antimicrobiana, obtendo halos de inibição equivalentes a 7,0 a 10,0 mm pelo método de difusão em ágar, porém, nos testes contra *Escherichia coli* e *Salmonella typhimurium*, houve apenas a inibição pelo extrato obtido por infusão (DUARTE et al., 2002).

Na medicina tradicional chinesa e japonesa*, Polygonum cuspidatum* é muito utilizada no tratamento de gonorréia, pé de atleta e dermatite supurativa (ATTA-UR-RAHMAN, 1988).

A raiz de *Polygonum multiflorum* Thumb é comumente utilizada na medicina oriental, e conhecida por suas propriedades antifúngica, antibacteriana e antienvelhecimento, e há relatos de atividade antioxidante celular pelo aumento da atividade do Cu, Zn superóxido dismutase (SOD1), pela inibição da formação de lipídios oxidados e por reprimir a peroxidação lipídica na mitocôndria de coração de rato. Análises sugerem também que seus extratos são capazes de inibir fortemente a destruição de SOD1 (superóxido dismutase) pelas radiações ultravioletas, relatando seu potencial anti-fotoenvelhecimento da pele (HWANG et al., 2006). Seu

extrato metanólico ainda possui efeito inibitório sobre a acetilcolinesterase e a angiotensina (BARBOSA-FILHO et al., 2006a; BARBOSA-FILHO et al., 2006b).

De origem européia, *Polygonum persicaria* L. possui seu nome botânico derivado da palavra “Pérsia”, atual Irã. Erva anual, de ambientes úmidos, mas não encharcados, pois prefere solos arejados e ricos em matéria orgânica (YANO et al., 2004).

Indígenas das Guianas utilizam preparações de *Polygonum hydropiperoides* Michaux como diuréticas, estimulantes, antigonorréicas e no tratamento de diarréias, febres perniciosas, parasitoses intestinais e astenias, além de inflamações oftálmicas, sendo esta ainda potencialmente abortiva (YANO et al., 2004). Na avaliação dos extratos de *P. hydropiperoides* quanto a sua toxicidade, os extratos etanólico e aquoso não apresentaram toxicidade em camundongos nas doses de 250 e 500 mg/kg, por via intraperitoneal. O extrato hidroalcóolico a 70%, conhecidamente composto de flavonóides, esteróides ou triterpenos, cumarinas, polifenóis, heterosídeos flavônicos, saponinas, taninos e poligodial, apresentou acentuada atividade antiedematogênica em camundongos, nas doses de 250 e 500 mg/kg, por via intraperitoneal, sendo que, por via oral, observou-se uma inibição média do edema de 52% (JÁCOME et al., 2004; ALVES et al., 2001; BUNDEL et al., 2007). O poligodial é um composto com propriedades inseticidas, repelentes, antifúngica, antibiótica, eficiente contra *C. albicans*, e pode ser mais ativo que a anfoteracina B contra outras leveduras e fungos (ALVES et al., 2001).

Em análise por CCD de *P. spectabile*, comprovou-se a presença de rutina nesta espécie, assim como já foram detectados a presença de esteróides ou triterpenos, cumarinas, polifenóis, heterosídeos flavônicos, saponinas e taninos (JÁCOME et al., 2004).

Estudos anatômicos e fitoquímicos de *Polygonum persicaria* L. var. biforme (Wahlenberg) foram desenvolvidos por Scavone (1970), Mitchell (1971), Kawasaki e colaboradores (1986) e Isobe e Noda (1987), pesquisaram os constituintes fitoquímicos desta espécie, descrevendo a predominância de flavonóis 3-O-glicosídicos, quercetina 3-O-ramnósido e quercetina 3-O-glicósido. Comprovou-se a atividade antiinflamatória e sedativa na aplicação do extrato liofilizado hidroetanólico dos órgãos aéreos de *P. persicaria* em ratos (YANO, 1999)

Polygonum hydropiperoides Michaux., *P. acuminatum* Kunth. e *P. punctatum* Ell. São popularmente empregadas contra lesões dérmicas, erisipela, hemorróidas e dores reumáticas (YANO et al., 2004).

A família Euphorbiaceae no Brasil se destaca pelo valor nutricional, econômico e social, sendo a seringueira um exemplar histórico na economia nacional, a qual é extraída o látex usado para a manufatura de borracha natural. Ainda temos a mamona nesta família, sendo desta extraído o óleo de rícino, compostos químicos usados na medicina e óleos lubrificantes aplicados em propulsores de ônibus espaciais, e a mandioca, que além de ser consumida em todo o território nacional como fonte de carboidratos, ainda é cultivada em programas sociais no assentamento de sem-terras e na agricultura familiar. Ainda podem sem encontradas espécies produtoras de óleos que apresentam diversos usos na indústria de tintas, plásticos, plastificantes, sabões duros, sabões têxteis, fibras sintéticas, pigmentos para tecidos, perfumes, batons, cosméticos, dentifrícios, papel e fertilizantes (BRAGA, 1976). As euforbiáceas também são conhecidas pelo grande número de espécies tóxicas, dentre elas pode-se citar a *Euphorbia pulcherrima* Willd (bico-de-papagaio), *Euphorbia milii* L. (coroa-de-cristo) e a *Euphorbia tirucalli* L. (avelós). O princípio tóxico desta família ainda não é totalmente conhecido, podendo ser uma toxoalbumina, saponina ou outra fração solúvel em água a responsável pelas intensas irritações gastrintestinais e complicações hidreletrolíticas, com cólicas, vômitos e diarréias intensas (ALBUQUERQUE et al. 2004)

A planta *Synadenium carinatum* (Euphorbiaceae) é comumente utilizada como planta ornamental no Brasil (figura 3), e o preparo aquoso com seu látex é usado na medicina popular contra várias doenças, tais como inflamações, doenças alérgicas e principalmente contra câncer, não havendo nenhuma comprovação científica de suas ações terapêuticas (SOUZA et al., 2005; ROGÉRIO, 2007)

Figura 3: Partes aéreas e estrutura floral da espécie *S. carinatum*

A espécie botânica *S. carinatum* pertence à ordem Geraniales e à Família Euphorbiaceae, e conhecida popularmente como “cega-olho”, é utilizada principalmente contra o câncer. Esta família compreende cerca de 290 gêneros e aproximadamente 7500 espécies, nas quais são encontradas algumas das principais plantas tóxicas conhecidas, podendo conter látex extremamente cáustico para pele e mucosa, e quando ingerido, pode causar distúrbios digestivos e depressores do sistema respiratório e cardiovascular, além de insuficiência renal (OLIVEIRA et al., 2005; MARIZ et al., 2006). Existem de 12 a 35 mil espécies de plantas que possuem látex, e freqüentemente apresentam compostos tóxicos contra insetos e herbivoria, além do fato do látex também ser conhecido como uma fonte rica em enzimas, tais como as proteases, quitinases, e linamarases (KONNO et al., 2004).

Extratos de *S. carinatum* são amplamente utilizados pela medicina popular contra uma variedade de desordens inflamatórias, sendo as lectinas uma das prováveis responsáveis pelo efeito antiinflamatório. Foram testados a lectina isolada do látex de *S. carinatum* em modelos de inflamação aguda e crônica por via oral,

sugerindo através dos seus resultados que o látex pode ser útil no tratamento de inflamações alérgicas.

O látex é uma secreção vegetal de aspecto leitoso, sendo uma emulsão complexa constituída de proteínas, aminoácidos, carboidratos, lipídeos, vitaminas, alcalóides, carbonatos, resinas e gomas, taninos, terpenos, materiais cerosos e enzimas hidrolíticas (AGUIAR, 2006; RAJESHA et al., 2006). Essa secreção é um fluido pegajoso, geralmente esbranquiçado, contido internamente sob pressão dentro dos canais lactíferos em quase todos os tecidos da planta. Quando a planta sofre um dano, esses canais se rompem e o látex é secretado externamente, ocorrendo um fenômeno de coagulação quando este é exposto ao ar, resultante de reação de oxidação. O processo tipo coagulação envolve a formação de uma rede de polímeros de isopreno que formam uma estrutura denominada de borracha. O látex, na sua emissão, além de ter ação colante, que paralisa os insetos herborívoros, pode possuir potencial tóxico contra fungos e vírus. Algumas famílias de plantas lactíferas são: Euphorbiaceae, Apocynaceae, Clusiaceae, Moraceae, Sapotaceae, Asclepiadaceae, Cichorieae (Asteraceae) e Guttiferae (AGUIAR, 2006).

A espécie arbustiva *Synadenium grantii* Hook foi estudada quanto à presença de enzimas proteolíticas em seu látex, no qual foram desenvolvidos o isolamento, purificação e caracterização de proteases, sendo encontradas duas frações contendo enzimas proteolíticas nesta espécie. O látex de plantas costuma ser uma boa fonte de proteases, as quais já foram encontradas serinas na mesma família estudada. A protease desempenha um importante papel nas células de mamíferos, agindo contra algumas fisiopatologias, tais como asma, câncer e AIDS (MRINALINI MENON, 2002).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVOS

A facilidade de cultivo e a larga distribuição das espécies *Polygonum acre* e *Synadenium carinatum* pelo território nacional, promoveu um alto índice de utilização dessas espécies na medicina popular. O uso antagônico destas plantas pela medicina popular e o desconhecimento das reais atividades dos metabólitos secundários no organismo humano incentivou a busca maiores informações sobre estas espécies. Este trabalho tem como objetivo o estudo preliminar fitoquímico, a busca por atividades biológicas dos extratos dessas plantas e também a investigação de aspectos relativos à segurança de utilização dessas drogas

Para cumprimento desses objetivos, foram desenvolvidos os objetivos secundários:

- análise físico-química das drogas vegetais *P. acre* (caule e folhas) e *S. carinatum* (folhas)*;*
- triagem fitoquímica preliminar das principais classes de metabólitos secundários das drogas vegetais *P. acre* e *S. carinatum* por meio de reações químicas de caracterização;
- preparo dos extratos etanólicos 70% e clorofórmicos das folhas de *S. carinatum* e caule e folhas de *P. acre;*
- avaliação do perfil cromatográfico dos extratos de *P. acre* e *S. carinatum* e do látex de *S. carinatum;*
- avaliação das atividades antimicrobianas dos extratos vegetais de *P. acre* e *S. carinatum*;
- avaliação da toxicidade aguda dos extratos de *P. acre* e *S. carinatum* e do látex de *S. carinatum;*
- estimativa da citotoxicidade dos extratos de *P. acre* e *S. carinatum;*
- verificação da capacidade de seqüestro de radicais livres dos extratos de *P. acre* e *S. carinatum.*

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1. MATERIAL E EQUIPAMENTOS

4.1.1. Solventes, reagentes e meios de cultura

- 2,3,5-trifenil tetrazólio (TTC) – Merck
- acetato de chumbo – Reagen
- acetato de etila – Labsynth
- acetona – Labsynth
- ácido bórico – Labsynth
- ácido clorídrico – Labsynth
- ácido etilborilaminoéster
- ácido oxálico – Labsynth
- ácido sulfúrico – Labsynth
- ágar desidratado – Acumedia
- água MILLI-Q
- água oxigenada - Labsynth
- ampicilina – Medley, comprimidos de 500 mg
- anidrido acético - Labsynth
- azul de metileno – Labsynth
- β-amirina
- β-sitosterol – Difco
- caldo lactosado – Difco
- carbonato de sódio – Vetec
- carvão ativo
- cloreto de alumínio – Reagen
- cloreto férrico – Reagen
- clorofórmio – Labsynth
- dimetilsulfóxido – Labsynth
- etanol – Labsynth
- éter de petróleo – Labsynth
- éter etílico – Labsynth
- gelatina – Kraft Foods
- glicerina – Labsynth
- hidróxido de amônia – Labsynth

- hidróxido de sódio – Labsynth
- ipolimida
- loperamida
- magnésio metálico – Reagen
- meio ágar bismuto sulfito – Acumedia
- meio ágar eosina-azul de metileno (EMB) – Difco
- meio ágar Sabouraud – Acumedia
- meio ágar MacConkey – Acumedia
- meio ágar-Mueller-Hinton – Acumedia
- meio ágar tioglicolato – Difco
- meio ágar-verde brilhante – Acumedia
- meio ágar Vogel Johnson –Oxoid
- meio ágar-XLD – Acumedia
- meio de infusão de cérebro e coração (BHI) – Biobrás
- meio selenito cistina – Acumedia
- meio tetrationato – Acumedia
- meio tioglicolato – Acumedia
- metanol – Labsynth
- *n*-butanol – Labsynth
- *n*-propanol – Labsynth
- propilenoglicol 4000
- reagentes de Dragendorff, Bouchardat, Mayer e Bertrand
- resazurina – Sigma-Aldrich
- sacarose
- Tris-HCl – Sigma-Aldrich
- xantidrol
- zinco metálico – Reagen

4.1.2 Equipamentos

- Autoclave vertical – Fabbe 103
- Balança analítica – Micronal AB 204
- Balança de infravermelho – Mettler LP12
- Balança semi-analítica – Owa Labor
- Banho de aquecimento – Fistom

- Bomba de vácuo – Motores Elétricos Brasil
- Câmara de fluxo laminar – Veco
- Câmara de ultravioleta 254 nm
- Espectrofotômetro – Shimadzu-1603
- Estufa de ar circulante – FABBE
- Estufa de esterilização – Fanem 315 SE
- Estufa de incubação bacteriológica – Olidef cz
- Evaporador rotatório – Marconi TE120
- Liofilizador – Solab
- Microscópio – Carl Zeiss Jena
- Moinho de facas – Fabbe
- Paquímetro digital – Starrett
- Peagômetro – Micronal B374
- Vórtex – Biomixer Mult-Mixer MVS-1

4.1.3 Outros Materiais

- Algodão hidrófilo – Nathalya
- Papel de filtro
- Placa de alumínio de gel de sílica F_{254} – Merck
- Placas de 96-wells – TPP 92096
- *Templates* de aço (peça única) com 6 orifícios de 6 mm de diâmetro interno
- Vidrarias de uso geral

4.2 MÉTODOS

4.2.1 Material vegetal

As partes aéreas de *Polygonum acre* H.B.K. (Polygonaceae) (caule e folhas) e as folhas de *Synadenium carinatum* Boiss (Euphorbiaceae) foram coletadas no Horto de Plantas Medicinais e Tóxicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP, Campus de Araraquara, SP, cujo posicionamento geográfico é 24º48'53.46'''S; 48º12'07.63''O. Foram confeccionadas exsicatas de ambas as espécies, as quais foram identificadas e depositadas no Herbário Rioclarense (HRCB) do Instituto de Biociências, UNESP, Campus de Rio Claro, SP, sob responsabilidade do Prof. Dr. Marco A. Assis. A espécie *S. carinatum* recebeu o tombo HRCB 48.939, e a *P. acre* recebeu o tombo HRCB 50.288. As folhas de *S. carinatum* e os ramos aéreos de *P. acre* foram coletadas em abril de 2007, sempre no início da manhã de cada dia de colheita. Após o processo de estabilização e secagem de *S. carinatum* e *P. acre,* executado em estufa de ar circulante a 40ºC, as folhas de *P. acre* e as folhas e caule de *S. carinatum* foram pulverizadas em moinho de facas e armazenadas em frascos escuros em local fresco e isento de umidade.

4.2.2 Caracterização da matéria-prima vegetal

4.2.2.1 Determinação da perda por dessecação em balança com infravermelho

Para a determinação da perda por dessecação, ou teor de umidade, amostras de 4,0 g das drogas vegetais foram submetidas a aquecimento (110 ^{o}C), em balança com fonte de aquecimento que utiliza raios infravermelhos, pelo período de 1 hora aproximadamente. Após o equipamento estar previamente tarado, fez-se a leitura da massa inicial, e leituras posteriores em intervalos de 1 hora até que a massa das amostras não variasse mais do que 0,25%. Os valores foram expressos em porcentagem (%, p/p), através da média das determinações de três amostras testadas (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 1988).

4.2.2.2 Perda por dessecação em estufa

Amostras pesando cerca de 2,0 g das drogas vegetais foram colocadas em pesa filtros previamente tarados e colocados em estufa por 2 horas, à temperatura de 105 ^{o}C. Após resfriamento em dessecador, os filtros foram pesados e recolocados em estufa por mais 30 minutos. Repetiu-se este procedimento até peso constante. Os resultados foram expressos em perda de massa percentual (p/p), através da média de três determinações (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 1988).

4.2.2.3 Determinação do teor de extrativos

A massa de 1 g da droga vegetal de *P. acre e S. carinatum* foi submetida ao processo de decocção com 100 g de água, durante 10 minutos. Após o resfriamento, o volume foi completado para 100 mL e a solução resultante foi filtrada em papel de filtro, sendo os primeiros 20 mL desprezados. Do restante do filtrado foi separada uma alíquota equivalente a 20 g em pesa-filtros tarados, e submetidos à evaporação até a secura em banho-maria, sob agitação ocasional. O resíduo foi colocado em balança dessecadora a temperatura de 110 ^{o}C até peso constante (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 1988).

O teor de extrativos foi calculado em massa percentual, pela média de cinco determinações segundo a equação abaixo:

$$TE = g.FD.100 / m$$

onde: TE = teor de extrativos (%, m/m) ; g= massa do resíduo seco (g); m= massa da amostra (g); FD= fator de diluição (5)

4.2.2.4 Determinação do pH

Para a determinação do pH, três soluções aquosas a 1% de cada droga vegetal (*P. acre* e *S carinatum*) prepararam-se separadamente por infusão, pesando 99 g de água e mantendo-as sob ebulição em chapa aquecedora durante 5 minutos, sendo esta água logo depois vertida sobre 1 g da droga vegetal, mantido em recipiente fechado por 15 minutos. Depois de filtrada a solução, procedeu-se a leitura do pH da solução e da água utilizada em peagômetro calibrado. O experimento foi realizado em triplicatas (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 1988).

4.2.2.5 Determinação do teor de cinzas totais

Cadinhos de porcelana foram calcinados previamente em mufla a 450 ^{o}C por 30 minutos, resfriados em dessecador (15 minutos), suas massas foram determinadas em balança semi-analítica. A cada cadinho foram adicionados exatamente cerca de 3,0 g da droga vegetal triturada, pesados em balança semi-analítica, os quais foram incinerados (levados ao estado de carvão) em chapa quente e, posteriormente, submetidos à calcinação em mufla à temperatura de 450 ^{o}C por duas horas. A pesagem foi realizada após total arrefecimento dos cadinhos em dessecador por 15 minutos Estes procedimentos foram repetidos até peso constante. O resultado foi expresso em porcentagem de massa de cinza na droga (%, p/p) através da determinação de três amostras (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 1988).

4.2.2.6 Determinação do teor de cinzas insolúveis em ácido

Às cinzas previamente obtidas no ensaio de cinzas totais foram adicionadas 25 mL de solução de ácido clorídrico 10% (p/v) e mantidas em ebulição por 5 minutos, completando seu volume posteriormente para 100 mL com água destilada. A solução obtida foi filtrada e lavada até esgotamento do filtrado. Transferiu-se o papel de filtro com as cinzas retidas para um cadinho e incinerou em mufla a 800 ºC até peso constante. Os resultados foram expressos em porcentagem de peso de cinzas insolúveis em ácido (%, p/p) e equivalem à média de 3 determinações (COSTA, 1994; FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 1988).

4.2.2.7 Análise granulométrica

Com o objetivo de verificar se a moagem foi eficiente para ambas as drogas e a fim de padronizar a granulometria, baseado na Farmacopéia Brasileira (1988), as partes aéreas pulverizadas de *P. acre* e *S. carinatum* foram submetidos à passagem forçada por vibração, através de tamises com abertura de malhas e coletor correspondentes a 0,125; 0,177; 0,42; 0,84; 2,0 mm, utilizando tamisador vibratório, na escala oito do aparelho, durante trinta minutos. Após este procedimento, as frações foram retiradas dos tamises e do coletor e quantificadas suas massas. Este procedimento foi realizado em triplicata, e calculado o tamanho médio das partículas

da droga vegetal. Para os estudos de passagem e retenção a partir da quantidade de pó recolhido de cada tamis, foram elaboradas planilhas no software Excel®, onde se calcularam as freqüências percentuais e também as freqüências percentuais cumulativas. O tamanho médio das partículas das partículas foi estimado segundo a metodologia de VOIGT (1993), utilizando a equação:

$$dav = \frac{\Sigma \text{ \% retida . abertura média}}{100}$$

dav: Tamanho médio das partículas

4.2.3 Análise fitoquímica preliminar

A triagem fitoquímica dos metabólitos secundários das plantas *S. carinatum* e *P. acre* foram desenvolvidos de acordo com as metodologias propostas por Costa (1994), Souza et al. (2003) e Simões et al. (2004) através de reações químicas de caracterização.

4.2.3.1 Pesquisa de alcalóides

Em gral de porcelana, trituraram-se 5 g das drogas vegetais, alcalinizando-se com carbonato de sódio a 10%, sendo adicionado posteriormente 25 mL de clorofórmio. Filtrou-se a mistura em papel previamente embebido em clorofórmio diretamente em um funil de separação. Ao filtrado foram adicionados 7 mL de ácido clorídrico 2% e homogeneizou-se. A fase ácida foi separada para a realização das reações de caracterização de alcalóides, empregando-se os reagentes de Dragendorff, Bouchardat, Mayer e Bertrand. Sobre uma lâmina para microscopia, a união da fase ácida com os respectivos reagentes indicará positivação do teste empregado caso haja a formação de precipitados.

4.2.3.2 Flavonóides

Em um béquer foram adicionados 3 g de droga os quais foram tratados com 20 mL de éter de petróleo. Agitou-se durante 10 minutos, com aquecimento em banho-maria e filtrando-se ainda quente. Em outro Becker, foram adicionados 20 mL de metanol ao resíduo, sendo aquecido em seguida em banho-maria por 10 minutos.

Ainda quente a solução foi filtrada, e ressuspendida em 10 mL de etanol (extrato final).

4.2.3.2.1 Reações de Shinoda

Em um tubo de ensaio foi adicionado 1 mL do extrato final, um fragmento de magnésio metálico e gotas de HCl concentrado a fim de se observar, após o desprendimento de hidrogênio nascente, o aparecimento de coloração rósea ou vermelha no caso da presença do metabólito buscado.

4.2.3.2.2 Reação de Taubock

Evaporou-se em tubo de ensaio 3 mL do extrato final até a secura, umedecendo o resíduo, após resfriamento, com gotas de acetona. Adicionaram-se alguns cristais de ácido bórico e ácido oxálico, evaporando-se novamente em banho-maria até a secura, evitando-se um aquecimento prolongado. Dissolveu-se o resíduo em 5 mL de éter etílico e observou-se em luz U.V. Em casos positivos aparecem fluorescência amarelo esverdeada na solução etérea analisada.

4.2.3.2.3 Reação de Pew

Foram evaporados até a secura em banho-maria 3 mL do extrato final em tubo de ensaio; ao resíduo adicionaram-se 3 mL de metanol e uma pequena porção de zinco metálico, sendo posteriormente adicionadas aproximadamente 3 gotas de HCl concentrado. A coloração vermelha declara resultado positivo.

4.2.3.2.4 Reação do cloreto férrico

Em 1 mL do extrato final foi adicionado algumas gotas de $FeCl_3$ a 2%. A coloração verde, amarela ou ainda violácea, dependendo do flavonóide presente, representa caracteristicamente sua presença.

4.2.3.2.5 Reação do Cloreto de Alumínio

Em papel de filtro foi umedecido áreas diferentes com o extrato e sobre uma das manchas foi instilado uma gota de cloreto de alumínio 5% em etanol. Sob luz U.V. o resultado se apresenta positivo com intensificação da fluorescência verde amarelado.

4.2.3.3 Antraquinonas

4.2.3.3.1 Antraquinonas livres

A massa equivalente a 1 g da droga em pó foi agitada com 10 mL de éter etílico sendo filtrada no fim do processo. À solução etérea foi adicionado 1 mL de amônia diluída e agitado em seguida. A camada aquosa torna-se róseo caso positivo.

4.2.3.3.2 Glicosídeos antraquinônicos (Reação de Borntrager)

Ao pó anterior seco, foram adicionados 20 mL de água, fervido por 5 minutos, e após esfriar, o extrato foi filtrado. Ao filtrado juntou-se 10 mL de HCl 1 *N* e 3 mL de água oxigenada 30% e a solução foi fervida por 5 minutos, esfriada e filtrada. Foi realizada a extração por duas vezes com 5 mL de éter etílico, juntando ao final as fases etéreas e agitando com 3 mL de solução de hidróxido de amônia. A camada aquosa torna-se rósea quando positivo.

4.2.3.4 Glicosídeos cardiotônicos

Em um béquer foram colocados 5 g de droga vegetal moída e adicionado 50 mL de etanol:água (70:30). Submeteu-se a aquecimento suave em banho-maria durante 10 minutos. Após esfriar, o extrato foi filtrado para um balão de 30 mL, foi lavado o resíduo e o filtro com a mistura etanol/água, e acertou-se o menisco.

Na purificação, ao filtrado foi adicionado 30 mL de água e 15 mL de acetato de chumbo a 10%, agitado bem e filtrado. O filtrado, em funil de separação, foi extraído por duas vezes com 15 mL de clorofórmio cada vez, juntando as fases orgânicas. A solução final foi tratada com sulfato de sódio anidro e evaporada até a metade do volume (12 mL no mínimo).

4.2.3.4.1Reações de caracterização de glicosídeos

4.2.3.4.1.1 Reações com o anel lactônico insaturado

4.2.3.4.1.1.1 Reação de Legal

Foram evaporados 2 mL de extrato clorofórmico em um tubo de ensaio, e o resíduo formado foi dissolvido em 1 mL de piridina e adicionado 0,5 mL de NaOH a

10% e 0,5 mL de nitroprussiato de Na 10%. Coloração vermelha intensa indica resultado positivo.

4.2.3.4.1.1.2 Reação de Kedde

Em tudo de ensaio, 2 mL de extrato foram evaporados e o resíduo formado foi dissolvido com 0,5 mL de reagente de Kedde e adicionado 1 mL de uma mistura de NaOH 10% em MeOH 1:1, preparada pouco antes do uso. Resulta positivamente o teste na apresentação de coloração vermelho violácea até castanha (fugaz).

4.2.3.4.1.2 Reações com os desoxi-açúcares

4.2.3.4.1.2.1 Reação de Pesez

Foram evaporados 2 mL do extrato em um tubo de ensaio. Adicionou-se ao resíduo 1 mL do reagente de Pesez A (Xantidrol 0,5% em MeOH) e aqueceu-se a aproximadamente 100ºC por 3 minutos. Após resfriado foi adicionado o reagente de Pesez B (HCl a 2% em ácido acético). Em caso positivo, deverá aparecer coloração vermelha.

4.2.3.4.1.2.2 Reação de Keller-Kiliani

Foram evaporados 2 mL do extrato em um tubo de ensaio e o resíduo foi tratado com 1 mL de ácido acético. Adicionou-se 2 gotas de $FeCl_3$ 2% (m/m) e transferiu-se o conteúdo deste tubo cuidadosamente para outro contendo 2 mL de H_2SO_4 concentrado. Na zona de contato dos líquidos deve aparecer um anel castanho-avermelhado, e a camada acética deve tomar coloração verde-azulada em resultado positivo.

4.2.3.4.1.3 Reação de anel esteroidal

4.2.3.4.1.3.1 Reação de Liebermann Burchard

Em tubo de ensaio foram evaporados 2 mL do extrato. Ao resíduo foi adicionado 1 mL de anidrido acético e 10 gotas de ácido sulfúrico concentrado. Coloração castanha indica resultado positivo.

Formulação dos reagentes utilizados:

Reagente de Kedde: ácido 3-5 dinitrobenzóico 1% em MeOH

Reagente de Pesez A – Xantidrol 0,5% em MeOH recente

Reagente de Pesez B – HCl a 2% em ácido acético

4.2.3.5 Taninos

Para análise da presença de taninos, foi preparado um decocto (15 minutos) com 5 g da droga vegetal pulverizada e 100 mL de água destilada, filtrado e deixado esfriar (solução extrativa A).

4.2.3.5.1 Reação de gelatina

Foram misturados 2 mL da solução A, com 2 gotas de HCl diluído e solução de gelatina 2,5% gota a gota. A formação de precipitado indica resultado positivo.

4.2.3.5.2 Reação de sais de ferro

Na reação foram misturados 2 mL da solução A, com 10 mL de água destilada e 2 a 4 gotas de solução de $FeCl_3$ 1% (m/m) em metanol. Em caso positivo aparece coloração azul (taninos hidrolisáveis) ou verde (taninos condensados).

4.2.3.5.3 Reação de acetato de chumbo

Nesta reação foram misturados 5 mL da solução A com 10 mL de solução de ácido acético 10% (v/v) e 5 mL de solução de acetato de chumbo a 10%. Em caso positivo aparece formação de precipitado esbranquiçado (taninos hidrolisáveis).

4.2.3.6 Saponinas

Foram fervidos, durante 10 minutos sobre refluxo, 2 g de droga vegetal rasurada com 10 mL de água destilada, sendo esfriado e filtrado em um tubo de ensaio, completando para 10 mL o volume final, agitando o tubo no sentido do seu comprimento, vedado com uma rolha, durante 15 segundos. Deixou-se em repouso por 15 minutos. No caso de presença de taninos há o aparecimento de um anel de espuma persistente, de aproximadamente 1 cm de altura, que não desaparece pela adição de 1 mL de HCl 2N (20%).

4.3 Obtenção dos extratos

O processo de obtenção dos extratos foi o de percolação, segundo o Processo Geral P, descrito na Farmacopéia dos Estados Unidos do Brasil, 1977. Foram utilizados como solventes extratores etanol 70% (EtOH 70) e clorofórmio ($CHCl_3$). Cada percolação foi realizada com 20,00 g de folhas e caules de *P. acre* e folhas de *S. carinatum* com velocidade média de 4 gotas por minuto.

Todos os extratos assim obtidos foram rotaevaporados. Após rotaevaporação, o fim da secagem do extrato clorofórmico foi realizado a temperatura ambiente, em capela, enquanto que os demais extratos foram liofilizados.

4.4 Cromatografia em camada delgada

Para obter informações sobre os grupos de metabólitos produzidos por *P. acre* e *S. carinatum* foram feitos os testes de triagem segundo Evans (1996), Caetano e Duarte et al. (1996) e Wagner et al. (1984).

Com a finalidade de avaliar o perfil fitoquímico dos extratos brutos de *S. carinatum, P. acre* e do látex de *S. carinatum* foi realizada cromatografia em camada delgada (CCD) dos extratos brutos, frente a diversos solventes como fases móvel, de diferentes polaridades e proporções, e reveladores. Utilizando-se como fase estacionária, placa de alumínio (20 x 20 cm) recobertas com sílica gel GF254 (MERCK®) pré-ativadas.

A coloração de banda e a luminescência em lâmpada de UV foram os parâmetros utilizados na obtenção dos resultados do perfil fitoquímico destas espécies.

Unidades e símbolos estão baseados no Système Internationale d'Unités (SI) de acordo com a recomendação da IUPAC.

4.4.1 Alcalóides

Na caracterização de alcalóides por CCD, foram utilizadas cromatoplacas MERCK® de sílica gel F 250, 20 cm por 20 cm. Aplicou-se 10 µl de cada amostra, intercalando-os com as referências (1 mg/mL) solubilizadas em metanol. Utilizou-se a fase móvel acetato de etila: *n*-propanol: água (5,7 : 3,2 : 1,3 v/v). As placas foram reveladas por nebulização com reagente de Dragendorff. As manchas de coloração

alaranjada intensa foram usadas como critério para acusar a existência de alcalóides (WAGNER, 1996).

4.4.2 Monoterpenóides, sesquiterpenóides e diterpenóides

Na detecção de monoterpenóides, sesquiterpenóides e diterpenóides, utilizando-se de cromatoplacas MERCK® de sílica gel F 250, 20 cm por 20 cm, amostras foram aplicadas a CCD volume de 10 µl, intercalando-as com os padrões (1 mg/mL) solubilizados em metanol. Utilizou-se a fase móvel benzeno: acetato de etila, na proporção (97 : 3 v/v). As placas foram reveladas por nebulização com vanilina sulfúrica 2% em etanol a 100 ºC durante 5 minutos. O surgimento de manchas com coloração azul escura foi usado como critério de presença dos compostos analisados (WAGNER, 1996).

4. 4.3 Triterpenóides e esteróides

Na cromatografia de detecção de triterpenóides e esteróides em cromatoplacas MERCK® de sílica gel F 250, 20 cm por 20 cm, amostras foram aplicadas no volume de 10 µl, intercalando-os com as referências β-amirina e β-sitosterol solubilizadas com metanol. Utilizou-se a fase móvel acetato de etila: tolueno na proporção (20 : 80 v/v), e revelou-se por nebulização através do reagente Liebermann Buchard (100^0C, durante 5 minutos). Utilizou-se uma visualização no visível e em câmara de UV (365 nm), sendo caracterizada a presença de triterpenóides e esteróides através do surgimento de manchas com coloração levemente rósea a avermelhada (SHARMA e BAKHASHI, 1991).

4.4.4 Iridóides

Em cromatoplacas e utilizando como referência o padrão de ipolimida, 10 µl de amostra foram aplicadas utilizando como fase móvel acetato de etila: ácido fórmico: acetato acético: água (100 : 11 : 11 : 26 v/v), sendo revelado com vanilina sulfúrica, seguida de aquecimento em estufa (100^0C, durante 5 minutos), o surgimento de manchas com coloração violeta caracteriza evidência de iridóides (HARBONE, 1998).

4. 4.5 Cumarinas

Amostras aplicadas em cromatoplacas MERCK® de sílica gel F 250 (10 µl), utilizando-se fase móvel éter:tolueno:ácido acético 10% na proporção (50 : 50 : 50 v/v), foram reveladas em câmara de UV (365 nm). Manchas de fluorescência azul foram usadas como critério de evidência de cumarinas (WAGNER, 1996).

4. 4.6 Derivados cinâmicos

Na caracterização de derivados cinâmicos por CCD, utilizando-se de cromatoplacas MERCK® de sílica gel F 250 20 cm por 20 cm. Aplicou-se 10 µl de cada amostra. Utilizou-se a fase móvel acetato de etila: ácido fórmico: ácido acético: água (100 : 11 : 11 : 26 v/v). As placas foram reveladas por nebulização com reagente de Dragendorff. Antes e após as revelações com os reativos de Neu (NEU, 1956). Manchas de fluorescências tenuamente azuladas do cromatograma no UV (365 nm) caracterizam presença de derivados cinâmicos.

4. 4.7 Fenilpropanoglicosídeos

Na detecção de fenilpropanoglicosídeos, em cromatoplacas MERCK®, utilizou-se como revelador o reagente de Neu e como fase móvel acetato de etila: ácido fórmico: ácido acético: água na proporção (100 : 11 : 11 : 26 v/v). Manchas de fluorescências tenuamente azuladas na observação em UV (365 nm), e nova observação no UV (365 nm), apresentando-se então com fluorescência verde-limão, foram usadas como indicativo da presença de fenilpropanoglicosídeos (WAGNER, 1996).

4. 4.8 Pesquisa de flavonóides

Na análise de flavonóides, alíquotas de 10 µl de amostra foram aplicadas em cromatoplacas MERCK® com fase móvel acetato de etila: ácido fórmico: ácido acético: água (100 : 11 : 11 : 26 v/v), e reveladas com reagente de Neu. A presença de flavonóides foi observada em câmara de UV (365 nm), no qual manchas de fluorescência alaranjada (as vezes vermelha), amarela ou verde representam a presença de flavonóides (MARKHAM, 1982; HARBORNE, 1998).

4.4.9 Proantocianidinas condensadas e leucoantocianidinas

No teste de presença de proantocianidinas condensadas e leucoantocianidinas, os extratos foram submetidos à CCD, utilizando-se cromatoplacas Merck de sílica gel. Aplicou-se 1 µl de extrato Utilizou-se a fase móvel acetato de etila: ácido fórmico: ácido acético: água (100 : 11 : 11 : 26 v/v) . A revelação se deu através de vanilina clorídrica através de nebulização. Manchas de coloração vermelha após revelação representam existência destes compostos no material testado (ROBERTSON, 1955).

A Tabela 1 apresenta um resumo dos metabólitos, sistemas de eluição, reveladores e referências bibliográficas utilizadas para a abordagem fitoquímica utilizando cromatografia de camada delgada.

Tabela 1: Metabólitos, sistemas de eluição, reveladores e referências bibliográficas utilizadas para a abordagem fitoquímica de *P. acre* e *S. carinatum*

METABÓLITO	*SISTEMA DE ELUIÇÃO*	*REVELADOR*	*REFERÊNCIA*
Alcalóides	AcOEt - n - PrOH – H_2O (5,7 : 3,2 : 1,3 v/v)	Dragendorff	(WAGNER, 1996)
Monoterpenóides, Sesquiterpenóides e Diterpenóides	Benzeno – AcOEt (97 : 3 v/v)	vanilina sulfúrica	(WAGNER, 1996)
Triterpenóides e Esteróides	AcOEt – C_7H_8 (20 : 80 v/v)	Liebermann Burchard	(SHARMA, 1991)
Iridóides	AcOEt – HCOOH – AcOH – H_2O (100 : 11 : 11 : 26 v/v)	vanilina sulfúrica	(HARBONE, 1998)
Cumarinas	Éter-tolueno-AcOH 10% (50 : 50 : 50 v/v)	U.V.	(WAGNER, 1996)
Derivados cinâmicos	AcOEt – HCOOH – AcOH – H_2O (100 : 11 : 11 : 26 v/v)	Neu	(WAGNER, 1996)
Fenilpropanoglicosídeos	AcOEt – HCOOH – AcOH – H_2O (100 : 11 : 11 : 26 v/v)	Neu	(WAGNER, 1996)
Flavonóides	AcOEt – HCOOH– AcOH – H_2O (100 : 11 : 11 : 26 v/v)	Neu	(MARKHAM, 1982) (HARBORNE, 1998)
Proantocianidinas Condensadas e Leucoantocianidinas	AcOEt – HCOOH – AcOH – H_2O (100 : 11 : 11 : 26 v/v)	vanilina clorídrica	(ROBERTSON, 1955)

AcOEt: acetato de etila; ***n* – PrOH:** n-propanol; **H_2O:** água destilada; **HCOOH:** ácido fórmico; **AcOH:** ácido acético.

4.5 Avaliação da atividade biológica

4.5.1 Avaliação da atividade antimicrobiana

4.5.1.1 Preparo dos antimicrobianos

Como substância controle com atividade antimicrobiana já comprovada, foi utilizada contra as bactérias o antibiótico ampicilina. O preparo procedeu-se dissolvendo 500 mg de ampicilina em 1000 mL de água destilada, sendo feita uma nova diluição dessa solução, 1:10 em água destilada, chegando à concentração final de 50 µg/mL (solução estoque). Esta solução é diluída na proporção 1:10 nos testes antimicrobianos.

4.5.1.2 Preparo dos extratos testados

No teste de atividade antimicrobiana foram preparadas soluções com os extratos etanólico 70% e clorofórmico de *P. acre* e *S. carinatum* nas concentrações de 100 mg/mL a 400 mg/mL, ressuspendidos em dimetilsulfóxido (DMSO) e água destilada estéril. O extrato preparado com o látex de *Synadenium carinatum* foi dissolvido em água e tampão tris-HCl - sacarose, na concentração de 100 mg/mL (m/v).

A preparação do tampão tris-HCl foi desenvolvida com uma solução 0,05 *M* de tris-HCl / 0,03 *M* de sacarose, ajustado para pH 7,0 com NaOH.

4.5.1.3 Preparo das suspensões de bactérias

Culturas bacterianas de *Escherichia coli* (ATCC 25922) *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 12228), *Bacillus subtilis* (ATCC 9362) *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), desenvolveram-se a 37 ºC durante 24 horas em caldo de infusão de cérebro e coração (BHI). A partir deste material foram preparadas as suspensões em salina 0,9% até a concentração final de aproximadamente 1,5 x 10^8 células/mL, utilizando a escala 0,5 de McFarland.

4.5.1.4 Teste de difusão em ágar por “templates”

Placas de Petri foram preparadas com ágar Müller Hinton (MH), nas quais foram semeadas, com o auxílio da alça de Drigalsky, 100 µL de cada suspensão bacteriana preparada anteriormente.

Sobre a superfície do ágar de cada placa foram dispostos “templates” com 6 orifícios de 6 mm de diâmetro, sendo nestes dispostos 50 µL das amostras, controle negativo e controle positivo. Como controle positivo foi utilizada a ampicilina, e como controle negativo DMSO.

Antes da incubação das placas, o material permaneceu 30 minutos em geladeira para permitir a difusão do extrato, e então foi realizada a incubação a 37 ºC por 24 h.

O diâmetro formado pelo halo de inibição promovido pelos extratos e controles é usado como parâmetro do poder de inibição de cada substância contra o microrganismo testado, e são mensurados através de paquímetro digital. O potencial antimicrobiano é avaliado por sua equivalência proporcional ao controle positivo.

4.5.1.5 Determinação da Concentração Inibitória Mínima

4.5.1.5.1 Método de difusão em ágar utilizando discos

A determinação da Concentração Inibitória Mínima utilizando o teste de difusão em ágar por discos foi realizada para o extrato etanólico 70% e para o látex de *S. carinatum* e extrato etanólico 70% de *P. acre.*

Foram preparadas soluções do extrato etanólico 70% de *P. acre* em DMSO nas concentrações 3, 30 e 300 mg/mL, e soluções do látex de *S. carinatum,* coletado momentos antes do experimento, em água destilada nas concentrações 300, 500 e 750 mg/mL.

As suspensões de bactérias *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) e *Escherichia coli* (ATCC 25922) *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 12228)*, Bacillus subtilis* (ATCC 9362) preparadas anteriormente foram diluídas na proporção 1/10 em caldo BHI e aplicadas às placas de Petri.

Discos de papel de filtro foram embebidos nas soluções dos extratos de *P. acre* e *S. carinatum.* Foram utilizados como controle positivo a ampicilina (0,05 mg/mL) e negativo o meio BHI. Os discos foram distribuídos sobre a superfície das placas já

contendo o inóculo bacteriano. Após duas horas em geladeira, as placas foram incubadas por 24 horas a 37 ℃. Foi efetuada a leitura das placas visualmente com o auxílio de paquímetro digital para determinar a Concentração Inibitória Mínima (CIM).

4.5.1.5.2 Método de diluição em tubos

A determinação da Concentração Inibitória Mínima utilizando o teste de diluição em tubos foi realizada para o látex de *S. carinatum.* Imediatamente antes do experimento, foi preparada uma solução do látex de *S. carinatum* em água destilada na concentração 1 g/mL.

As suspensões de bactérias *Staphylococcus aureus* (ATCC25923) e *Escherichia coli* (ATCC25922) preparadas anteriormente foram diluídas na proporção 1/10 em caldo BHI.

Foram preparadas 1 mL das soluções do látex de *S. carinatum* em BHI nas concentrações 300, 500 e 750 mg/mL. Adicionaram-se 100 µL da suspensão de bactérias diluída aos tubos contendo as amostras. Foram feitos os controles de crescimento bacteriano, controle negativo do meio e controle da amostra, e todos os tubos foram incubados por 24 horas a 37℃. As leituras de CIMs nos tubos foram desenvolvidas através da turvação dos mesmos e foram retiradas alíquotas que foram subcultivadas em placas com meio MH ágar sólido por 24 h a 37 ºC para verificar a CBM.

4.5.1.5.3 Método de diluição em microplaca

A determinação da Concentração Inibitória Mínima utilizando o teste de microplacas foi realizada para o látex de *S. carinatum,* para o extrato etanólico 70% e o clorofórmico de *S. carinatum* e para o extrato etanólico 70% seco e clorofórmico seco de *P. acre*.

Foram preparadas as seguintes soluções:

a) solução do látex de *S. carinatum* em água na concentração 1 g/mL;

b) solução de extrato etanólico 70% de *P. acre* na concentração de 100 mg/mL em DMSO;

c) soluções de extrato etanólico 70% de *S. carinatum* em DMSO na concentração de 40 mg/mL;

d) solução de extrato clorofórmico de *S. carinatum* em DMSO na concentração de 40 mg/mL;
e) solução de extrato etanólico 70% de *P. acre* em DMSO na concentração de 40 mg/mL;
f) solução de extrato clorofórmico de *P. acre* em DMSO na concentração de 40 mg/mL.

Todas as análises foram desenvolvidas em triplicata. As suspensões de bactérias *S. aureus* (ATCC25923) e *E. coli* (ATCC25922) preparadas anteriormente foram diluídas na proporção 1/300 em salina 0,9% estéril, de forma a obter a concentração final de 2,5. 10^5 células/ mL. Foi utilizada como controle solução de ampicilina 50 µg/mL.

Aos 96 orifícios da microplaca foram adicionados 100 µL de BHI. No primeiro orifício das linhas A até D, foram adicionados 100 µL da solução de extrato vegetal (Figura 4). Homogeneizou-se e fez-se a diluição seriada nos demais orifícios até a coluna 10. As concentrações finais foram: 1/2; 1/4; 1/8; 1/16; 1/32; 1/64; 1/128; 1/256 e 1/512 da concentração inicial. Para o controle dos solventes utilizados, na coluna 11, a partir da linha A, iniciou-se uma diluição seriada dos solventes DMSO e BHI na proporção 1:5. Na coluna 12, os poços A, B e C foram utilizados para controle da bactéria testada, o poço D para controle do Meio. Os poços 12 E a 12 H, foram reservados para o controle microbiológico dos extratos. A linha E foi utilizada para a solução de Ampicilina, com dissolução seriada até a coluna 10. Todos os poços utilizados receberam 100 µL da suspensão bacteriana, exceto os de controle de esterilidade do meio e microbiológico dos extratos os quais foram completados com 100 µL de BHI. As microplacas foram incubadas por 24 h a 37 ºC. A inibição do crescimento bacteriano foi evidenciada pela adição de 20 µL de solução de resazurina 0,01% em água, após incubação por mais 1 hora aproximadamente. A concentração inibitória mínima é revelada pela menor concentração que promoveu a inibição do crescimento bacteriano, evidenciado pela mudança de coloração.

A concentração bactericida mínima é realizada em placa de Petri de 15 cm de diâmetro, contendo 50 mL de ágar Müller Hinton, realizando uma subcultura de cada microplaca antes da aplicação da resazurina. As placas são incubadas por 24 h a 37 ºC, sendo a concentração bactericida mínima a menor concentração que apresentar ausência de crescimento bacteriano.

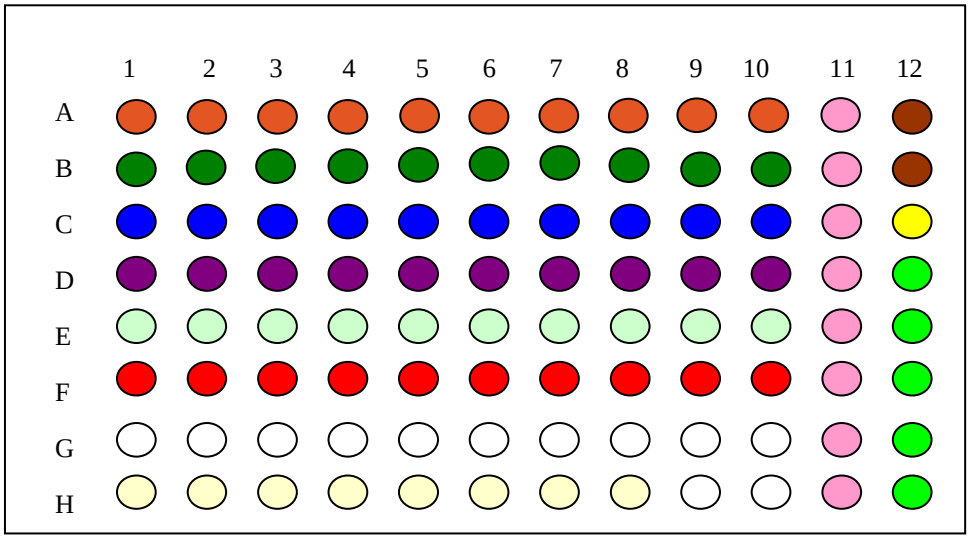

Figura 4: Esquema da microplaca utilizada para determinação da concentração inibitória mínima para bactérias

- Ampicilina
- Controle positivo microrganismo
- Controle negativo DMSO e BHI
- Controle negativo meio de cultura
- Controle negativo dos extratos de *P. acre, S. carinatum* e látex
- Látex de *S. carinatum*
- Extrato etanólico 70% de *S. carinatum*
- Extrato clorofórmico de *S. carinatum*
- Extrato etanólico 70% de *P. acre*
- Extrato clorofórmico de *P. acre*

4.6 Testes pré-clínicos

4.6.1 Teste de toxicidade em dose única

No ensaio de toxicidade em dose única foram utilizadas as doses 0,5, 1 e 2 g/kg de extrato etanólico 70% de *P. acre,* extrato etanólico 70% de *S. carinatum* e de látex de *S. carinatum.*

Nos testes de toxicidade em dose única foram utilizados camundongos Swiss (*Mus musculus*), machos, com 30 dias de idade, pesando entre 27 e 40 g, os quais foram adaptados ao biotério experimental por 5 dias antes do início dos ensaios biológicos. Os animais, mantidos em livre acesso à alimentação e à água, foram

mantidos em ambiente com temperatura de 20 ± 1 ^{o}C, umidade monitorada e fotoperíodo de 12 horas claro/escuro. No dia do experimento, os animais foram mantidos em jejum por 3 horas e recebendo água *ad libitum*. Os animais foram divididos em quatro grupos de seis animais cada. Este projeto foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Farmacêuticas do Campus de Araraquara da UNESP (CEP/FCF/CAr. 31/2008).

O grupo controle recebeu solução fisiológica (2 mL/kg). Os outros grupos receberam as amostras anteriormente preparadas. Após a administração, por gavage, os animais foram observados de acordo com a resolução RE nº 90 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária, Portaria nº13, nos períodos 0, 15, 30 minutos, 1, 2, 4, 12 h e diariamente até 18 dias, em relação à alteração do peso, de pêlos, pele e mucosas, sistemas respiratório e circulatório, sistemas nervosos centrais e periféricos, atividade somatomotriz, comportamento e especial atenção a sintomas, tais como: tremores, convulsões, salivação, diarréia, letargia e coma. No 18º dia, os animais foram sacrificados em câmara de CO_2 e em seguida foram retirados os pulmões, rins, coração, pâncreas e fígado para posterior pesagem. A fim de encontrar a dose letal, esta metodologia foi utilizada para as doses de 2, 1 e 0,5 g/kg.

4.7 Controle de qualidade microbiológico das preparações

O controle de qualidade microbiológica das preparações consiste na determinação do número total de microrganismos e pesquisa de *Salmonella* sp, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus*. Nestas análises foram utilizadas amostras representativas do conteúdo dos produtos conforme métodos preconizados na Farmacopéia Brasileira (1988), British Pharmacopeia (2001).

O controle de qualidade microbiológico foi aplicado a amostras das três preparações de ambos os extratos, após verificação da atividade anti-séptica, sendo estes os extratos etanólicos, clorofórmicos e metanólicos de *P. acre* e *S. carinatum.*

4.7.1 Contagem do número total de microrganismos

Foram transferidos, assepticamente, 10,00 g de cada amostra para 90 mL de solução tampão fosfato pH 7,2, para a contagem dos microrganismos totais. Após 10 minutos sob agitação para homogeneização, foi pipetado 1 mL para placas de Petri, adicionando 20 mL ágar tioglicolato para contagem do número total de bactérias e ágar Sabouraud para contagem do número total de fungos. O material foi colocado em estufa incubadora de 35 ºC durante 24 h e 25 ºC durante 7 dias, para a pesquisa de bactérias e fungos, respectivamente. Após este período, foi observada a formação e contado o número de colônias com o auxílio de contador, calculando o número de unidades formadoras de colônias.

4.7.2 Pesquisa de *Salmonella* sp. e *Escherichia coli*

Foram transferidos, assepticamente, 10,00 g de cada amostra para 90 mL de caldo lactosado, para pesquisa de *Salmonella* e *E. coli*. O caldo foi incubado a 35 ºC durante 24 h. Após este período, foi observado o meio quanto ao crescimento e foi transferido 1 mL do caldo lactosado para tubos contendo caldo tetrationato e caldo selenito cistina, incubando a 35 ºC durante 24 h. Após este período, amostra do caldo tetrationato foi semeada com alça de platina para um tubo contendo ágar inclinado verde brilhante, outro tubo contendo ágar bismuto sulfito e uma placa de Petri contendo ágar xilose lisina desoxicolato (XLD). O mesmo procedimento foi feito à amostra inoculada no caldo selenito cistina, transferindo para os três meios e incubando a 35 ºC durante 24 h. O crescimento e as características das colônias foram observados. As colônias suspeitas foram semeadas com alça reta em tubo contendo ágar inclinado de ferro-tríplice-açúcar (TSI). Foram incubadas a 35 ºC durante 24 h. Para a confirmação da presença de *Salmonella*, o método de coloração de Gram foi utilizado.

Para a pesquisa de *E. coli*, foi transferido 1 mL do caldo lactosado para placa de Petri contendo ágar MacConkey. Foi incubado a 35 ºC durante 24 h. O crescimento e as características das colônias foram observados. As colônias suspeitas foram semeadas com alça de platina em placa de Petri contendo ágar eosina azul de metileno (EMB) e as placas foram incubadas a 35 ºC durante 24 h. Para a confirmação da *E. coli* o método de coloração de Gram foi utilizado.

4.7.3 Pesquisa de *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*

Foram transferidos, assepticamente, 10,00 g de cada amostra para 90 mL de caldo peptonado, para a pesquisa de *S. aureus* e *P. aeruginosa*, incubando a 35 ºC durante 24 h. Após este período, o meio foi observado quanto ao crescimento e foi transferido 1 mL do caldo para placas de Petri contendo ágar Vogel Johnson, para a pesquisa de *S. aureus* e ágar cetrimida, para a pesquisa de *P. aeruginosa*, incubando a 35 ºC durante 24 h. Foram observados o crescimento e as características das colônias. Foi feita a confirmação através de método de coloração de Gram. Além disto, foi realizado o teste da coagulase e da oxidase, para a confirmação de *S. aureus* e de *P. aeruginosa*, respectivamente.

Todos os ensaios de controle de qualidade microbiológico das preparações contendo o extrato de *P. acre e S. carinatum* foram feitos em triplicata.

4.8 Avaliação de citotoxicidade

As células de fibroblastos foram mantidas em garrafas de cultura incubadas em estufa a 37 ºC sob atmosfera de 5% de CO2 em meio Eagle (pH 7) suplementado com 50% de meio Leibovitz L-15, 15% de soro bovino fetal e sem bicarbonato de sódio.

Para o preparo das amostras foram solubilizados 10 mg dos extratos clorofórmicos e etanólicos 70% de *P. acre* e *S. carinatum* em 100 µL de DMSO que, posteriormente, foram diluídos 1:5 em meio Eagle não-suplementado para aplicação na microplaca.

A técnica consistiu em coletar as células por raspagem, centrifugá-las a 1500 RPM por 10 minutos e contá-las com auxílio do corante Turk, em câmara de Neubauer, ajustando para a concentração de 1 x 10^5 células/mL em meio Eagle suplementado. As células desta suspensão foram incubadas em microplaca de 96 poços a 37 ºC em atmosfera de 5% de CO2 por 72 h. Após este período, foi observada a formação de tapete celular e, subseqüentemente, foi retirado o meio existente, já inadequado para a manutenção celular. Foram colocados 100 µL de meio novo, exceto no primeiro poço de cada coluna no qual foram colocados 180 µL de meio Eagle suplementado, e 20 µL de cada amostra. Posteriormente, foi realizada uma diluição seriada 1:1 (v/v) nos demais poços da respectiva coluna da

microplaca. A microplaca foi incubada por 24 h a 37 ºC em estufa com atmosfera de 5% de CO2 (LEI et al., 2008; OHNO et al., 1998; TAKAHASHI et al., 2008). As concentrações das amostras variaram de 100 µg/mL a 0,78 µg/mL. Posteriormente, adicionaram-se 15 µL de solução aquosa de resazurina 0,1 mg/mL, incubando a microplaca em estufa sob atmosfera a 5% de CO2 a 37 ºC para leitura após 3 h. A coluna 11 foi utilizada como controle do solvente colocando-se 20 µL de solução DMSO:Eagle (1:5; v/v), e quatro poços da coluna 12 foram utilizados para controle positivo do crescimento celular e quatro como controle negativo de ausência de crescimento. A leitura dos resultados foi feita visualmente pela diferenciação entre a cor azul (ausência de células vivas) e cor-de-rosa (presença de células vivas) (O'BRIEN et al., 2000) e por meio de leitor de fluorescência utilizando filtros de 530 e 590 nm.

4.9 Determinação da capacidade de seqüestro de radicais livres

Na determinação da atividade entioxidante, as análises dos extratos foram baseadas na atividade sequestrante da solução de DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazila). As amostras dos extratos etanólicos 70% e clorofórmicos de *P. acre* e *S. carinatum* foram preparadas na concentração de 250 µg/mL em metanol, e os controles com reconhecida atividade antioxidante (vitamina C e ácido tânico) foram utilizados nas mesmas proporções. Preparou-se as soluções teste com 1 mL de solução de amostra adicionada 2,5 mL de solução de SPPH 0,004% em metanol. Agitou-se em vórtex e manteve-se esta solução no escuro por 30 minutos em temperatura ambiente. O branco consiste de 1 mL de solução metanólica das amostras adicionado a 2,5 mL de metanol, e o controle negativo consiste de uma solução de 1 mL de metanol com 2,5 mL de solução DPPH (MACHADO, 2005; FALÇÃO et al, 2006).

Os cálculos são baseados na porcentagem de descoloração do DPPH, segundo a equação:

$$\% = (Ad-Aa/Ad).100$$

% = Percentual de inibição

Ad = Absorbância da solução DPPH

Aa = Absorbância da amostra

4.10 Análise estatística

Os resultados foram expressos como a média e os respectivos valores de desvio-padrão dos valores obtidos. A significância estatística foi avaliada usando a análise de variância e o teste t, sendo que foi tomado como significativamente diferente $p < 0,05$.

5 RESULTADOS

5.1 Matéria vegetal

5.1.1 Caracterização da matéria-prima vegetal

5.1.1.1 Determinação da perda por dessecação em balança com infravermelho (INFRATEST)

Após três determinações a média do teor de umidade para *P. acre* e *S. carinatum* estão determinadas na Tabela 2.

Tabela 2: Teor de umidade das drogas vegetais *P. acre* e *S. carinatum*

Droga	Teor de umidade médio (%; p/p)
P. acre	6,02 ± 0,12
S. carinatum	7,73 ± 0,18

5.1.1.2 Perda por dessecação em estufa

Três amostras, contendo aproximadamente 2,0 g de droga vegetal de *Polygonum acre* cada, foram avaliadas para a perda por dessecação em estufa, os valores encontrados após a constância de massa encontra-se na Tabela 3.

Tabela 3: Perda por dessecação de *Polygonum acre* e *S. carinatum* em estufa

Droga	Teor de umidade médio (%; p/p)
P. acre	12,34 ± 0,29
S. carinatum	9,41 ± 0,10

5.1.1.3 Determinação do teor de extrativos

Para a determinação do teor de extrativos, foram avaliadas três amostras de 1 g de droga vegetal de *P. acre* de acordo com a metodologia apresentada no item 4.2.2.3. As massas obtidas para o cálculo do teor de extrativos de *P. acre* e *S. carinatum* estão demonstradas nas Tabelas 4 e 5.

Tabela 4: Determinação do teor de extrativos de *Polygonum acre* e *S. carinatum*

Droga	Teor de extrativos (%; m/m)
P. acre	30,8
S. carinatum	33,3

5.1.1.4 Determinação do pH das soluções vegetais

Os resultados obtidos para os pós de drogas vegetais *P. acre* e *S. carinatum* estão apresentados na Tabela 5, considerando como referência o pH da água utilizada de 5,86 ± 0,07.

Tabela 5: pH das drogas vegetais *P. acre* e *S. carinatum* apresentado em média e desvio padrão

	S. carinatum	***P. acre***
pH	5,95 ± 0,06	6,70± 1,12

5.1.1.5 Determinação do teor de cinzas totais

Três cadinhos de porcelana para cada droga foram calcinados em mufla a 450 ^{o}C por 30 minutos, resfriados em dessecador e pesados em balança analítica, obtendo os resultados apresentados na Tabela 6.

Tabela 6: Teor de cinzas da espécie *P. acre* e *S. carinatum*

Droga	**Teor de cinzas (%)**
P. acre	13,76 %
S. carinatum	12,98 %

5.1.1.6 Determinação do teor de cinzas insolúveis em ácido

O teor de cinzas insolúveis em ácido das espécies *S. carinatum* e *P. acre* podem ser observados na Tabela 7.

Tabela 7: Teor de cinzas insolúveis em ácido das espécies vegetais *P. acre* e *S. carinatum*

Droga Vegetal	Teor de cinzas totais (%)
P. acre	1,38 ± 0,46
S. carinatum	1,15 ± 0,19

5.1.1.7 Análise granulométrica

A distribuição granulométrica das drogas vegetais *P. acre* e *S. carinatum* pulverizada em moinho de facas resultaram nos dados apresentados nas Tabelas 8 e 9 e a distribuição granulométrica nas figuras 5 e 6.

Tabela 8: Freqüências percentuais, freqüências cumulativas e tamanho médio das partículas na análise granulométrica de *P. acre*

Abertura da malha (mm)	**Faixa granulométrica (mm)**	**Abertura média (mm)**	**Fração resíduo ± DP (%)**		**Fração retida acumulada (%)**	d_{av}
2,000	2,000 ⊢ 2,500	2,250	0,200	0,147	0,200	0,450
0,840	0,840 ⊢ 2,000	1,420	30,348	15,122	30,548	43,094
0,420	0,420 ⊢ 0,840	0,630	42,007	13,305	72,555	26,464
0,177	0,177 ⊢ 0,420	0,299	17,095	2,918	89,649	5,103
0,125	0,125 ⊢ 0,177	0,151	4,269	1,220	93,919	0,645
Coletor	0,000 ⊢ 0,125	0,063	5,063	0,152	98,981	0,316
Tamanho médio						**0,761**

d_{av} : fórmula de VOIGT (1993)

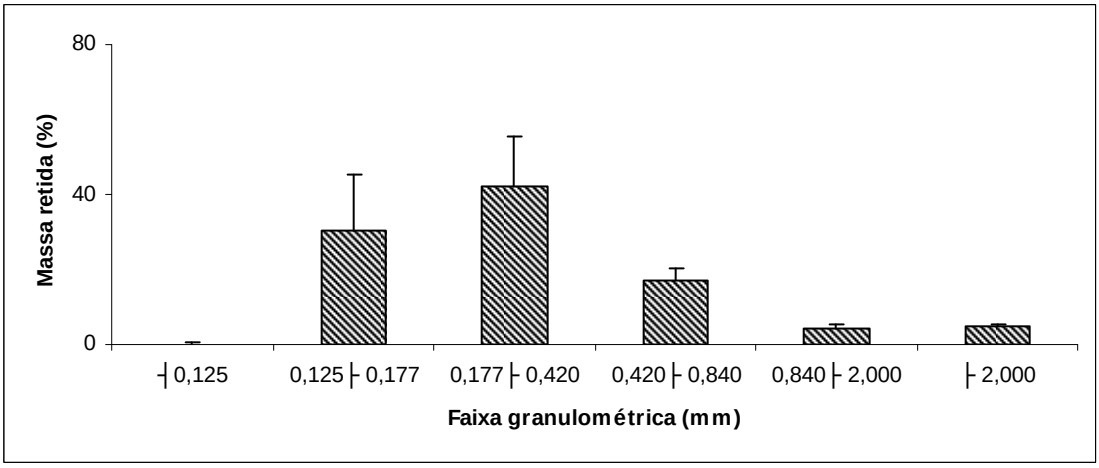

Figura 5: Distribuição granulométrica do pó obtido a partir de *P. acre*

Tabela 9: Freqüências percentuais, freqüências cumulativas e tamanho médio das partículas na análise granulométrica de *S. carinatum*

Abertura da malha (mm)	Faixa granulométrica (mm)	Abertura média (mm)	Fração resíduo ± DP (%)		Fração retida acumulada (%)	d_{av}
2,000	2,000 ├ 2,500	2,250	1,258	0,832	1,258	2,829
0,840	0,840 ├ 2,000	1,420	11,758	3,615	13,016	16,696
0,420	0,420 ├ 0,840	0,630	49,596	13,171	62,612	31,245
0,177	0,177 ├ 0,420	0,299	19,178	6,283	81,789	5,724
0,125	0,125 ├ 0,177	0,151	4,503	2,124	86,292	0,680
Coletor	0,000 ├ 0,125	0,063	11,817	5,755	98,108	0,739
Tamanho médio						**0,579**

d_{av} : fórmula de VOIGT (1993)

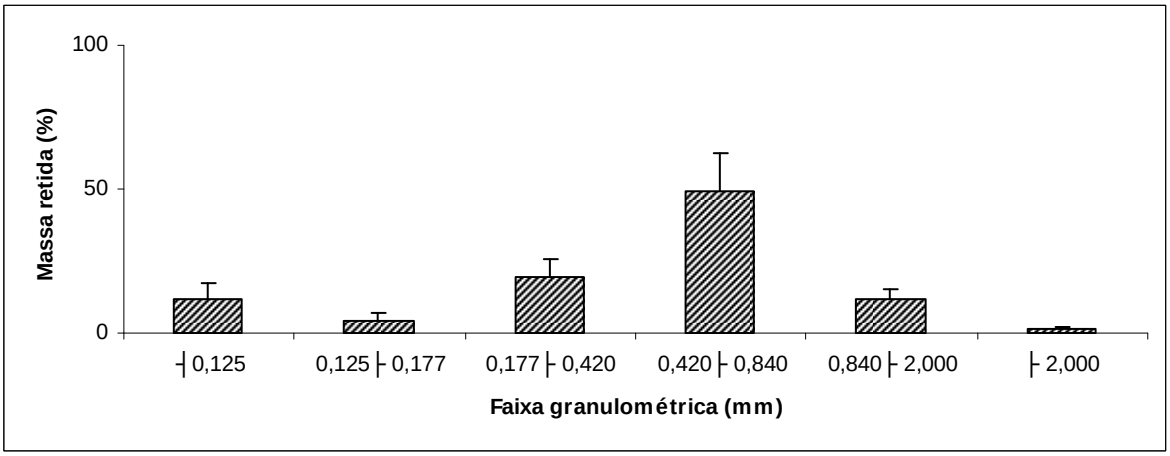

Figura 6: Distribuição granulométrica do pó obtido a partir de *S. carinatum*

5.1.2 Perfil fitoquímico: análises preliminares e utilizando CCD

A Tabela 10 reúne os resultados descritos na seção 4.2.3 referente à análise fitoquímica preliminar e na seção 4.2.4 referente às análises utilizando cromatografia de camada delgada

Tabela 10: Análise fitoquímica preliminar utilizando reações químicas de caracterização e cromatografia em camada delgada

CLASSES	REAÇÕES / REVELADORES	*P. acre*	*S. carinatum*
ANÁLISE FITOQUÍMICA PRELIMINAR			
FLAVONÓIDES	Shinoda	-	-
	Taubock	+	-
	Pew	-	-
	Cloreto férrico	+	+
	Cloreto de alumínio	+	+
ALCALÓIDES	Dragendorff	-	-
	Bouchardat	-	-
	Mayer	-	-
	Bertrand	-	-
ANTRAQUINONAS	livres	-	-
	glicosiladas	-	-
GLICOSÍDEOS CARDIOTÔNICOS	Liebermann Burchard	+	+
	Legal	-	+
	Kedde	+	+
	Pesez	-	-
TANINOS	Keller-Killiani	-	-
	gelatina	+	+
	sais de ferro	+	-
	acetato de chumbo	+	+
SAPONINAS	formação e permanência de espuma	+	+

CLASSES	REAÇÕES / REVELADORES	*P. acre*	*S. carinatum*	*S. carinatum Látex*
CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA				
ALCALÓIDES	Dragendorff	-	-	-
MONO, SESQUI E DITERPENOS	vanilina sulfúrica	+	+	+
TRITERPENOIDES E ESTERÓIDES	Liebermann Burchard	+	+	+
IRIDÓIDES	vanilina sulfúrica	-	-	-
CUMARINAS	U.V.	-	-	-
DERIVADOS CINÂMICOS	Neu	+	+	-
FLAVONÓIDES	Neu	+	+	+
FENILPROPANÓIDES	Neu	-	-	NR
PROANTOCIANIDINAS CONDENSADAS E LEUCOANTOCIANIDINAS	vanilina clorídrica	+	-	-

NR: não realizado

5.2 Avaliação da atividade biológica

5.2.1 Avaliação da atividade antimicrobiana

5.2.1.1 Teste de difusão em ágar

Houve crescimento bacteriano ao redor dos poços selecionados para controle positivo de crescimento. Houve crescimento bacteriano nos poços onde foram colocados os controles de solvente DMSO e água, indicando que este solvente não interfere nos resultados de crescimento bacteriano. Os resultados obtidos dos testes antimicrobianos de *S. carinatum* estão apresentados na Tabela 11.

Tabela 11: Percentual de formação dos halos de inibição com relação à ampicilina no teste de atividade antibacteriana de *P. acre* e *S. carinatum* extrato etanólico 70% e *S. carinatum* látex, em concentrações, microrganismos e solventes diversos, analisados em triplicata

	Concentração (mg/mL)	Solvente	*S. aureus*	*S. epidermidis*	*E. coli*	*B. subtilis*
S. carinatum	100 (L)	H_2O	-	-	-	-
	300	DMSO	-	-	-	-
	300	H_2O	-	-	-	-
	300 (L)	H_2O /Tris	-	**NR**	-	**NR**
	400	DMSO	-	-	-	-
	500 (L)	H_2O	-	**NR**	-	**NR**
	750 (L)	H_2O	-	**NR**	-	**NR**
P. acre	3	DMSO	-	**NR**	-	**NR**
	30	DMSO	-	**NR**	-	**NR**
	100	DMSO	-	**NR**	-	**NR**
	300	DMSO	103 ± 5[a]	167 ± 3	91 ± 4	-
	DMSO	-	-	-	-	-
	H_2O	-	-	-	-	-

a: Razão percentual e o desvio padrão dentre os halos formados e o controle positivo (ampicilina) em %. C/S: concentração (mg/mL) – solução; (L): látex; DMSO: dimetilsulfóxido; NR: não realizado; Tris: tampão Tris-HCl/sacarose; - : ausência de halo formado.

Pode-se observar que os extratos de *S. carinatum,* pela Tabela 11, não apresentaram atividade antimicrobiana em nenhuma concentração utilizada, inclusive nas concentrações utilizadas contra *S. epidermidis* e *B. subtilis,* mesmo alterando o meio solvente. O extrato de *P. acre* apresentou atividade antimicrobiana na concentração de 300 mg/mL, com exceção de *B. subtilis.*

5.2.1.2 Determinação da Concentração Inibitória Mínima/ Concentração Bactericida Mínima (CIM/CBM)

5.2.1.2.1 Teste de difusão em ágar utilizando discos

No método de difusão em ágar utilizando discos com o extrato etanólico 70% de *P. acre* contra *S. aureus,* só obteve-se inibição na maior concentração testada (300 mg/mL), com um halo médio de 13,5 mm. Esse valor foi maior que o encontrado para o controle de ampicilina (12,5 mm), demonstrando assim uma atividade bacteriana considerável. Para *E. coli* não houve inibição para as concentrações de extrato testadas (Tabela 12). No teste utilizando o látex de *S. carinatum* não ocorreu inibição do crescimento contra as duas linhagens bacterianas testadas (Tabela 12).

Tabela 12: Halos de inibição e desvio padrão do crescimento bacteriano (mm) para o extrato etanólico 70% de *P. acre* e látex de *S. carinatum* no teste de difusão em ágar por discos

Concentração das amostras (mg/mL)	*S. aureus*		*E. coli*	
	P. acre	*S. carinatum*	*P. acre*	*S. carinatum*
3	-	**NR**	-	**NR**
30	-	**NR**	-	**NR**
300	13,5 ± 2,1[a]	-	-	-
500	**NR**	-	**NR**	-
750	**NR**	-	**NR**	-
ampicilina	12,0 ± 0,0	12,0 ± 0,0	12,0 ± 0,0	12,0 ± 0,0
DMSO	-	-	-	-

- ausência de halo formado; **NR:** não realizado; **a**: valores expressos em mm pela média ± desvio-padrão.

5.2.1.2.2 Teste de diluição em tubos

Na determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) do látex de *S. carinatum* pelo método de diluição em tubos não foi verificada efetividade do extrato em nenhuma das concentrações testadas, desta forma não foi possível determinar a

CIM, tampouco a CBM. Considerando a instabilidade de compostos provenientes de látex, este teste foi desenvolvido com técnica, horário e época do ano diferentes da análise de CIM por difusão em ágar utilizando discos, a fim de confirmar o resultado de ausência de atividade antimicrobiana apresentada no teste anterior.

5.2.1.2.3 Método de diluição em microplaca

Na avaliação da CIM em microplaca houve atividade antimicrobiana contra o microrganismo *S. aureus* e *E. coli,* dos extratos etanólicos 70% de *P. acre* e *S. carinatum,* além do extrato clorofórmico de *S carinatum,* todos nas concentrações iniciais de 40 mg/mL. Como pode ser observado na Tabela 13, o teste de CBM correspondeu proporcionalmente aos resultados encontrados para CIM (Tabela 13).

Tabela 13 CIM em microplacas para os extratos etanólicos de *P. acre* e *S. carinatum,* além do extrato clorofórmico de *S carinatum*, contra os microrganismos *S. aureus* e *E. coli*

Amostras[a]	***S. aureus***		***E. coli***	
	CIM[b]	**CBM**[b]	**CIM**	**CBM**
S.c. – EtOH	5	20	10	-
S.c. – $CHCl_3$	2,5	10	20	-
P.a. – EtOH	10	-	5	-
ampicilina[c]	0,024	0,024	0,78	0,78

a – Amostras testadas: S.c. – EtOH: extrato etanólico 70% *S. carinatum*; S.c. – $CHCl_3$: extrato clorofórmico de *S. carinatum;* P.a. – EtOH: extrato etanólico 70% de *P. acre*.
b - os resultados de CIM e CBM expressos em mg/mL e representam a média de triplicatas.
c - valores expressos em µg/mL.

Para CIM através do teste de microdiluição em placa, o látex de *S. carinatum*, na proporção 1:1 (m/v) em água destilada, não apresentou atividade contra os microrganismos testados. A análise dos resultados foi prejudicada pela coloração esbranquiçada característica do látex, interferindo na leitura pela turvação do meio. A revelação por aplicação do corante resazurina apresentou resultado bastante peculiar, por resultar positivamente em todos os poços testados, inferindo a possibilidade de um resultado falso-positivo, devido à reação de redução deste revelador com o próprio látex (O'BRIEN et al., 2000). Para confirmação dos dados obtidos buscou-se uma opção de revelador que não reduzisse em contato com o látex, sendo a substituição da resazurina por TTC 2% (cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio) a mais indicada. A substituição confirmou que os resultados

encontrados eram falso-positivos, não havendo, portanto, atividade antimicrobiana neste teste para o látex.

5.3 Testes pré-clínicos preliminares

5.3.1 Teste de toxicidade

Na análise de toxicidade aguda das drogas vegetais administradas na dose de 2 g/kg, não foi detectada ação tóxica na solução do extrato de *S. carinatum,* entretanto observou-se 10% de mortes na solução de látex de *S. carinatum* e 50% na solução de *P. acre.* Todas as mortes ocorreram entre 37 e 41 h após a administração.

O percentual de mortes ocorridas no experimento, e o tempo decorrido médio das mortes após a administração das doses de 2, 1 e 0,5 g/kg encontram-se nas Tabelas 14, 16 e 18. Decorrido os 18 dias, os animais foram sacrificados e os pesos dos órgãos foram mensurados, como se pode notar nas Tabelas 15,17 e 19.

Tabela 14. Percentual de mortes e tempo médio decorrido das mortes, com os devidos desvios-padrão no teste de toxicidade aguda de amostras diversas à concentração de 2,0 g/kg de extrato etanólico 70% das drogas vegetais

Látex de *S. carinatum*		***S. carinatum* 70%**		***P. acre***		**Controle**	
%	**T**	**%**	**T**	**%**	**T**	**%**	**T**
10	37 ± 3	-	-	50	39 ±1	-	-

% : Percentual de mortes ocorridas
T : Tempo médio de ocorrência das mortes (h)
(-) : ausência de dados

Devido à baixa mortandade apresentada pelo látex, procuramos otimizar o processo de coleta e conservação, a fim de verificar alterações nos resultados obtidos, devido à tendência de formação de polímeros característico do látex, e conseqüente oxidação de seus constituintes, principalmente pela queda do pH.

Tabela 15: Média e desvio padrão da massa corpórea final (g) pós-morte de todos os grupos testados na avaliação de toxicidade aguda, e seus respectivos órgãos correspondente à dose 2 g/kg das soluções-teste

	Látex de *S. carinatum*	***S. carinatum***	***P. acre***	**Controle**
Massa corpórea	45,90 ± 5,60	46,41 ± 5,28	34,94 ± 7,49	40,38 ± 5,60
Pâncreas	0,2 ± 0,036	0,20 ± 0,06	0,162 ± 0,055	0,157 ± 0,046
Fígado	3,31 ± 0,45	3,48 ± 0,53	2,50 ± 0,64	2,33 ± 0 ,50
Rim	0,74 ± 0,14	0,695 ± 0,079	0,53 ± 0,13	0,92 ± 0, 09
Coração	0,28 ± 0,04	0,30 ± 0,07	0,28 ± 0,07	0,225 ± 0,056
Pulmão	0,38 ± 0, 09	0,45 ± 0,13	0,37 ± 0,17	0,31 ± 0,11

No teste de toxicidade na dose de 1 g/kg (Tabela 16), foram obtidos 100% de mortandade através da solução de látex de *S. carinatum* e baixa relativa ao controle de 30% com a solução de *P. acre.* O extrato etanólico de *S. carinatum* não participou desta análise por não ter apresentado níveis de toxicidade consideráveis à concentração máxima permitida pela ANVISA de 2 g/kg. O látex coletado momentos antes da administração, e conservado adequadamente, resultou em 100% de mortes nesta segunda avaliação, corroborando com a hipótese levantada no teste anterior de concentração 1 g/kg.

Na avaliação da toxicidade do látex de *S. carinatum* pôde-se observar que no teste de maior concentração houve uma menor toxicidade (10% de mortes) do que o ocorrido no de menor concentração (100% de mortes). Isto se deu pelo fato de que, de acordo com as características físico-químicas do látex (AGUIAR, 2006), pode-se deduzir que o mesmo poderia ser oxidado facilmente em constante contato com o ar, por isso, na segunda avaliação alterou-se a metodologia utilizada, para utilizar o látex recém-coletado, resultando em alta toxicidade, mesmo em menores concentrações. Este teste, além de comprovar o alto nível de toxicidade provocada pelo látex, ainda demonstra seu alto nível de oxidação em contato com o ar, sendo este fato importante para sua caracterização e para a reprodução dos demais testes biológicos.

Tabela 16: Percentual de mortes e tempo médio decorrido das mortes, com os devidos desvios-padrão no teste de toxicidade aguda na dose de 1 g/kg dos extratos etanólicos 70% de *P. acre* e látex de *S. carinatum*

Látex de *S. carinatum*		***P. acre***		**Controle**	
%	**T**	**%**	**T**	**%**	**T**
100	38 ± 30	30	42 ± 11	-	-

%: Percentual de mortes ocorridas;
T : Tempo médio de ocorrência das mortes (h)
(-) : ausência de dados

Tabela 17: Média e desvio padrão da massa corpórea final (g) pós-morte dos grupos testados na avaliação de toxicidade aguda, e seus respectivos órgãos na dose 1 g/kg do extrato etanólico 70% da droga vegetal *P. acre*

	P. acre	**Controle**
Massa corpórea	48,31 ± 12	51 ± 3
Pâncreas	0,47 ± 0,38	0,16 ± 0,02
Fígado	3,10 ± 0,75	2,9 ± 0,3
Rim	0,78 ± 0,21	0,9 ± 0,1
Coração	0,27 ± 0,04	0,28 ± 0,04
Pulmão	0,50 ± 0,30	0,4 ± 0,1

Foi observado tremores nos camundongos que receberam o extrato aquoso de látex de *S. carinatum,* logo quando ministrado via oral, e após alguns minutos detectou-se uma redução nos movimentos de todos os camundongos, apresentando estado de letargia.

Tanto na avaliação de toxicidade a 1 g/kg quanto a 0,5 g/kg encontraram-se, no momento da biópsia, tecidos de crescimento irregular como tumores, de cor e textura muito parecida com os do fígado. Ao redor destes acúmulos celulares, encontrou-se grande acúmulo de pus, de coloração verde-amareladas e textura pastosa, algumas vezes se exteriorizando no animal ainda vivo.

Tabela 18: Percentual de mortes e tempo médio decorrido das mortes, com os devidos desvios-padrão no teste de toxicidade aguda na dose 0,5 g/kg do extrato etanólico 70% da droga vegetal *P. acre*

P. acre		**Controle**	
%	**T**	**%**	**T**
20	38 ± 30	-	-

% : Percentual de mortes ocorridas
T: Tempo médio de ocorrência das mortes (h).

Tabela 19: Média e desvio padrão da massa corpórea final (g) pós-morte dos grupos testados na avaliação de toxicidade aguda, e seus respectivos órgãos na dose 0,5 g/kg do extrato etanólico da droga vegetal *P. acre*

	P. acre	**Controle**
Massa corpórea	57 ± 5	60 ± 7
Pâncreas	0,5 ± 0,2	0,17 ± 0,03
Fígado	3,8 ± 0,5	3,7 ± 0,3
Rim	0,8 ± 0,1	0,92 ± 0,09
Coração	0,35 ± 0,07	0,34 ± 0,02
Pulmão	0,47 ± 0,09	0,6 ± 0,1

Os órgãos retirados dos animais sacrificados foram pesados e calculados suas equivalências com relação à massa corpórea total, como apresentado na Tabela 20.

Tabela 20: Média do percentual relativo dos órgãos analisados com relação à massa corporal total dos camundongos no teste de toxicidade aguda

	Concentração (g/kg)	**coração**	**fígado**	**rim**	**pulmão**	**pâncreas**
Controle		0,568893	6,049761	1,679824	0,895485	0,298272
Sc1	2	0,60279	7,220763	1,612649	0,829092	0,442393
Sc2	2	0,641508	7,494167	1,501553	1,000504	0,427113
PA	2	0,762442	6,97578	1,424406	0,965465	0,429839
PA	1	0,585459	6,547392	1,610062	1,113704	1,0425
PA	0,5	0,617759	6,784573	1,510407	0,819498	0,840661

Pa: Extrato de *P. acre*; Sc1: Látex de *S. carinatum*; Sc2: folha de *S. carinatum*.

Nos estudos da massa relativa dos órgãos dos animais sacrificado, observou-se nas mensurações do coração que em todos os extratos utilizados houve indícios de cardiomegalia, destacando-se os testes com o extrato de *P. acre* na concentração de 2 g/kg, que apresentou aumento médio de 34,02% deste órgão, e o extrato das folhas de *S. carinatum*, com aumento de 12,76%. No fígado, a maior desproporção com relação aos animais controle foi apresentada pelo extrato das folhas de *S. carinatum*, com aumento médio de 23,88%, seguido da solução de látex com 19,36% e por último os extratos de *P. acre,* variando entre 8,22 e 15,30%. Em todas as análises para os rins foram observadas perda de massa com relação ao controle, destacando-se o extrato de maior concentração de *P. acre*, com queda de

15,21%, seguido dos da folha de *S. carinatum*, com 10,61%. Nos pulmões, observou-se tanto casos de ganho quanto de perda de massa relativa, havendo perdas na análise do látex e de *P. acre* na menor concentração utilizada, e ganho nos demais extratos, tendo destaque o extrato de *P. acre* a 1 g/kg de concentração. Em todas as mensurações do teste de toxicidade aguda observou-se crescimento de massa e volume do pâncreas, com ganho de massa de 249,51% no extrato de *P. acre* a 1 g/kg, 181,84% do mesmo a 0,5 g/kg, e em média 45% nos demais extratos testados.

5.4 AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE

No teste de citotoxicidade dos extratos testados, obteve-se índice de citotoxicidade de 50% apenas nos resultados encontrados com o extrato de *P. acre* etanólico a partir da concentração de 100 µg/mL. Nos demais extratos não foram observados índices de toxicidade relevantes (Figura 7).

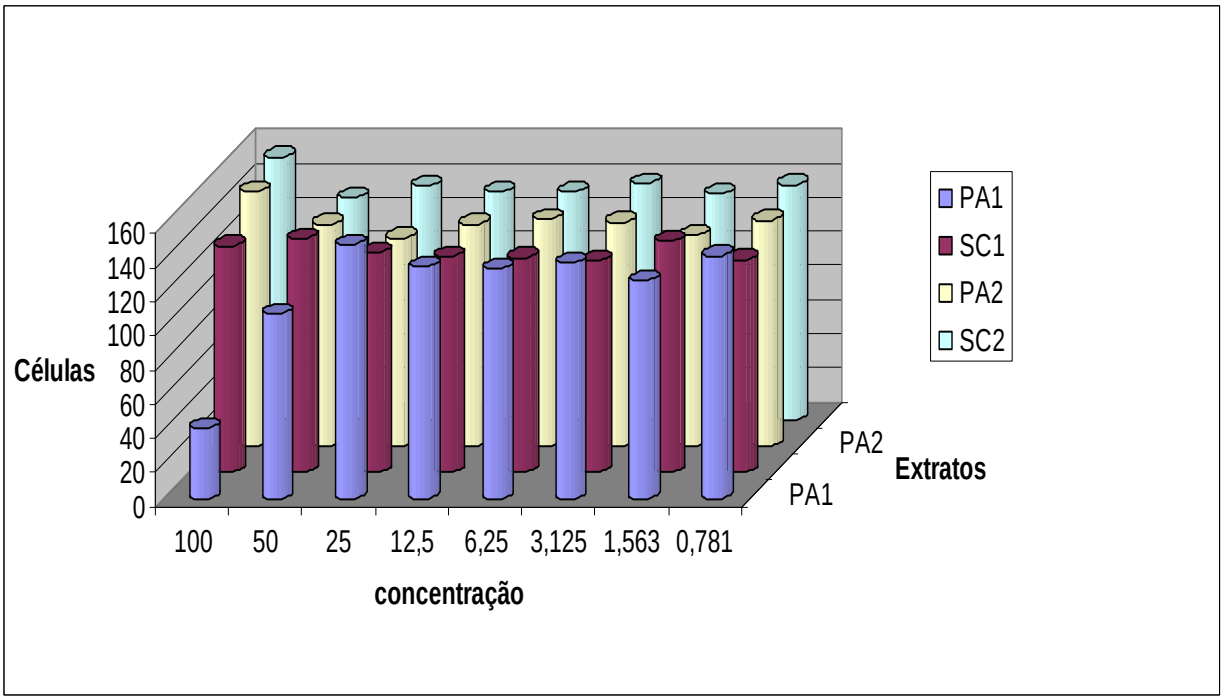

Figura 7: Índice de células sobreviventes no teste de citotoxicidade. PA1: extrato etanólico 70% de *P. acre;* PA2: extrato clorofórmico de *P. acre;* SC1: extrato etanólico 70% de *S. carinatum*; SC2: extrato clorofórmico de *S. carinatum*

5.5 Controle de qualidade microbiológico dos extratos

Os resultados obtidos através do controle microbiológico dos extratos de *P. acre* e *S. carinatum* clorofórmicos, etanólicos 70% e metanólicos, permitiram observar que não houve crescimento dos microrganismos *Salmonella* sp, *E. coli*, *S. aureus* e *P. aeruginosa* nas amostras analisadas, considerados microrganismos patogênicos. Também se observou que na contagem do número total de microrganismos não houve crescimento, como demonstra a Tabela 21, o que permite a sua aprovação, segundo as recomendações oficiais para produtos não estéreis (BRASIL, 1999).

Tabela 21: Controle de qualidade microbiológico dos extratos de *P. acre* e *S. carinatum*

Microrganismos	Recomendação*	Resultado
Bactérias aeróbias	$\leq 10^5$ UFC/g	Ausente
Fungo e leveduras	$\leq 10^3$ UFC/g	Ausente
Enterobactérias	$\leq 10^3$ UFC/g	Ausente
Escherichia coli	Ausência	Ausente
Salmonella sp	Ausência	Ausente
Staphylococcus aureus	Ausência	Ausente
Pseudomonas aeruginosa	Ausência	Ausente

5.6 Determinação da capacidade de seqüestro de radicais livres

Observou-se que a atividade anti-radicalar dos controles vitamina C e ácido tânico resultaram como o esperado, obtendo resultados equivalentes a 96,51% e 96,23%, como pode ser observado na Figura 8. Das amostras testadas, os extratos etanólicos de ambas as drogas foram os que apresentaram os maiores percentuais de atividade anti-radicalar, sendo 32,99% o de *P. acre* e 31,09% de *S. carinatum.*

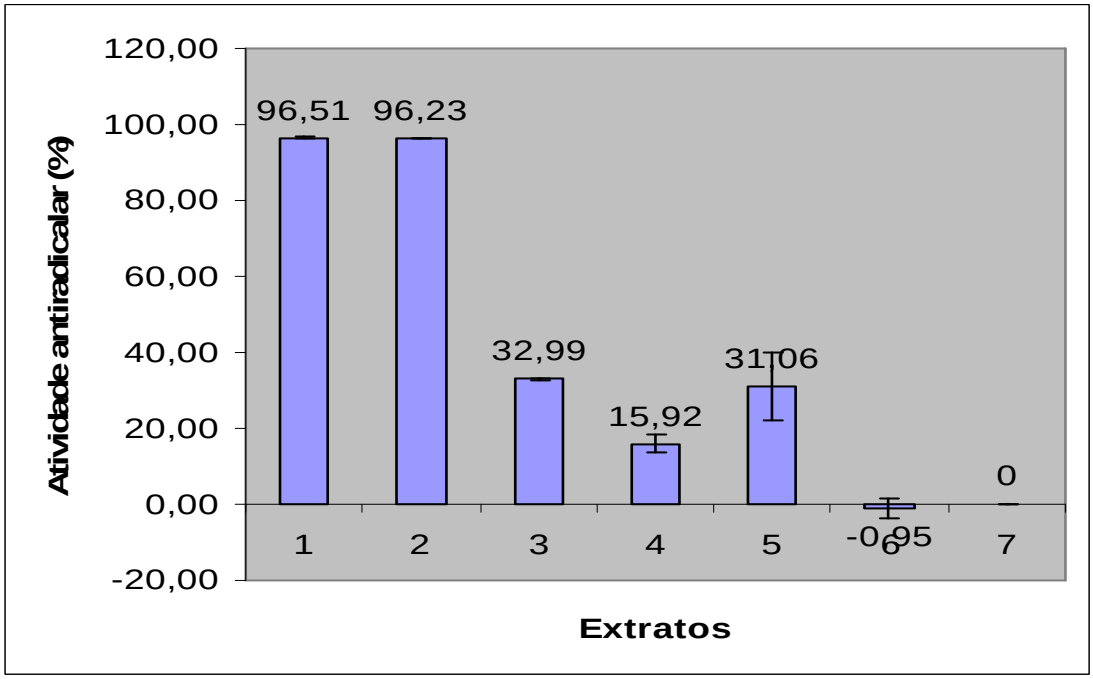

Figura 8: Atividade anti-radicalar percentual das substâncias padrão e dos extratos estudados na concentração de 250 µg/mL. 1: vitamina C; 2: ácido tânico; 3: extrato de *P. acre* etanólico; 4: extrato de *P. acre* clorofórmico; 5: extrato de *S. carinatum* etanólico; 6: extrato de *S. carinatum* clorofórmico; 7: controle negativo

6. DISCUSSÃO

Os parâmetros de controle de qualidade do material vegetal oferecem dados importantes para a sua utilização. A garantia da qualidade de produtos para sua segurança e eficácia no processo de fabricação de fitoterápicos é exigida pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Envolvendo ações neste sentido, implantação das normas de boas práticas de fabricação (BPF) e controle de qualidade de produtos é requerida para manutenção da integridade do produto e proteção do usuário. A garantia da qualidade é um importante aspecto a ser considerado desde a coleta até a liberação do produto ao consumidor. A qualidade microbiológica de produtos constitui um dos atributos essenciais para o seu desempenho adequado, principalmente em relação à segurança, eficácia e aceitabilidade destes produtos. Falhas nas medidas preventivas e de controle do processo de fabricação podem resultar em produtos inadequados ao consumo. As matérias-primas de origem natural incluem grupos de produtos obtidos de plantas, partes de plantas ou mesmo extratos e óleos essenciais extraídos por processos químicos bem como aqueles oriundos de minerais ou animais. A contaminação microbiana pode levar ao comprometimento do desempenho do produto devido à quebra da estabilidade da formulação, alteração das características físicas e aparência e levar a inativação dos princípios ativos e excipientes da formulação e ainda, causar a perda de confiança na empresa. Além disso, a administração de produtos contaminados pode agravar quadros clínicos de pacientes já debilitados pela doença (YAMAMOTO et al., 2004). O uso empírico de drogas vegetais também é um fator relevante e preocupante para a saúde pública, pois na maioria das vezes não possuem estudos científicos de comprovação de eficácia, além de em alguns casos serem utilizados para problemas antagônicos, como é o caso da espécie *P. acre* a qual existem dados de uso popular para hipotensão e hipertensão.

O excesso de umidade em drogas vegetais promove o desenvolvimento de microrganismos que podem acarretar na degradação dos constituintes químicos, além da produção de enzimas que inviabilizam o seu uso. Fungos toxigênicos, como os do gênero *Aspergillus*, são xerofílicos, ou seja, desenvolvem-se mesmo em baixa umidade, por isso é recomendável o limite máximo de 14% de umidade nas drogas vegetais (CIRIO et al., 2003; SIMÕES, 2000; YAMAMOTO et al., 2004). O método utilizado neste trabalho para determinação do teor de umidade foi selecionado visando à dinâmica de análise de um laboratório de análise de controle

de qualidade, sendo o infravermelho vantajoso por ter resposta rápida, favorecendo assim a análise de um número maior de amostras. O valor obtido na determinação do teor de umidade por infravermelho para a espécie *P. acre* foi de 6%, e a perda por dessecação em estufa de 12,33%; os respectivos valores para *S. carinatum* foram de 7,73% e 9,41%, estando todos de acordo com os valores estabelecidos pela Farmacopéia Brasileira (1988), que preconiza teor de umidade inferior a 14%, mostrando-se satisfatório para o controle de qualidade da droga vegetal. Sendo assim, para a espécie *P. acre*, é possível garantir a qualidade dos experimentos desenvolvidos, principalmente os biológicos, desde que a mesma seja adequadamente armazenada, manipulada, estocada em condições especiais de temperatura, umidade e luminosidade apropriada para não afetar direta ou indiretamente as características da matéria prima (ANVISA, 2005).

Outro parâmetro de controle de qualidade das drogas vegetais é o ensaio do teor de extrativos (TE), que indica a quantidade de substâncias a serem extraídas em determinado sistema. Esta análise foi selecionada para complementar a informação sobre os parâmetros de qualidade da droga vegetal, já que a extração aquosa não implica necessariamente obrigatoriedade em conter o princípio ativo de ação biológica buscado neste trabalho. Os teores de extrativos também estão relacionados com fatores ligados à coleta, assim como fatores ambientais e o acondicionamento deste material. O valor de TE encontrado para a droga vegetal *P. acre* foi de 30,8% (m/m) e 33,3% para *S. carinatum.* Esses valores também estão relacionados com diferentes fatores ligados ao local de coleta da matéria-prima bem como período e época da coleta (OLIVEIRA et al., 2001)

Ainda dentro dos parâmetros de controle de qualidade está o pH. A similaridade do pH das drogas vegetais *P. acre* e *S. carinatum* demonstra que ambas as drogas possuem caráter neutro, sendo estes dados importantes na caracterização físico-química destas espécies.

O teor de cinzas totais é uma técnica que avalia as impurezas inorgânicas não voláteis que podem estar presentes na droga vegetal como contaminantes (SIMÕES et al*.,* 2000). De acordo com a Farmacopéia Brasileira (1988), a porcentagem em peso de cinzas (%, p/p) é dada pela relação entre a massa de droga vegetal e a média de três determinações do teor de cinzas totais e foram detectados 13,6% de cinzas de *P. acre* e 15,42% de *S. carinatum.* Por não dispor de referências sobre

determinação de cinzas totais especificamente para a *Polygonum acre* e *Synadenium carinatum,* estes resultados se tornam importantes no processo de padronização, já que o teor de cinzas totais sustenta o controle de qualidade por verificar o teor de impurezas inorgânicas não-voláteis da droga vegetal.

Na análise granulométrica das drogas vegetais *P. acre* e *S. carinatum,* pôde-se constatar que os materiais vegetais pulverizados em moinho de facas apresentaram tamanho médio das partículas entre 0,84 e 0,42 mm, sendo classificados com este intervalo de diâmetro pela Farmacopéia Brasileira (1988) como pó grosso. Partículas de tamanhos não muito pequenos são mais adequados no processo de percolação, pois os pós podem interromper o arraste (LIST; SCHMIDT, 2000). Estes dados são importantes também na padronização dos processos extrativos.

Os flavonóides constituem uma importante classe de polifenóis, presentes entre os metabólitos secundários de vegetais. São compostos derivados da benzo-γ-pirona, apresentando a estrutura química C_6-C_3-C_6. Apresentam-se freqüentemente oxigenados e na maioria dos casos suas moléculas encontram-se conjugadas com açúcares. Ocorrem no estado livre ou, mais comumente, como O-glicosídeos, embora exista um número considerável de C-glicosídeos. Os flavonóides podem ser encontrados em diversas formas estruturais, geralmente constituído de dois anéis aromáticos ("A" e "B") e uma cadeia de três carbonos entre elas. Nos compostos tricíclicos há um anel, chamado "C", de cinco ou seis membros entre os anéis aromáticos "A" e "B". De acordo com as características químicas e biossintéticas, os flavonóides são separados em diversas classes: chalconas, flavonóis, flavonas, dihidroflavonóides (flavanonas e flavanonóis), antocianidinas, isoflavonóides, auronas, neoflavonóides, biflavonóides, entre outros. O grupo é conhecido pelos seus efeitos antiinflamatórios, antialérgicos e vasoprotetores. Rutina e hesperidina são importantes flavonóides empregados em tratamentos de fragilidade capilar. As plantas que possuem este metabólito apresentam possível potencial contra raios ultravioleta, insetos, fungos, vírus e bactérias; atraentes de animais com a finalidade de polinização, antioxidante, no controle de hormônios vegetais e como agentes alelopáticos. Comercialmente plantas contendo estas classes de polifenóis são usadas como pigmentadores de couro, na fermentação de chás e ainda possuem importância como anticarcinogênico, antiinflamatório, antialérgico, antiulcerogênico e antiviral (SIMÕES et al., 2000).

A análise fitoquímica do extrato etanólico de *P. acre* demonstra resultado positivo de presença de flavonóides, referente às reações de Taubock, cloreto férrico e cloreto de alumínio. As reações que não apresentaram resultados, de Pew e Shinoda, são inespecíficas aos flavonóides. A reação de Taubock pode ser explicada pela formação de quelatos, produzindo um deslocamento batocrômico na banda I dos derivados do ácido borínico, que são compostos obtidos do ácido bórico, com substituições na molécula por dois radicais orgânicos. A reação oxalo-bórica, em particular dos flavonóis, determina o aparecimento de fluorescência amarelo-esverdeada encontrada na avaliação da espécie *P. acre*. Na reação de cloreto férrico, as soluções contendo flavonas coram-se de verde-claro, flavonóis e flavanonas de verde-escuro e chalconas de amarelo, e esta espécie analisada apresentou características de flavonóis e flavanonas. Na reação de cloreto de alumínio, obtiveram-se resultados característicos de flavonóis, chalconas e flavonas, apresentando fluorescência amarelada; no caso de presença de flavanonas, o resultado seria azul-esverdeado. Para a espécie *S. carinatum,* obteve-se resultados positivos das análises do teste de flavonóides, os quais correspondem às reações de cloreto férrico e cloreto de alumínio, caracterizando respectivamente a presença de flavonóis e de flavonóis e chalconas. A diversidade de testes de caracterização de flavonóides foi fundamentada na busca de uma caracterização segura deste metabólito considerando as variações existentes.

Os testes de glicosídeos cardiotônicos para *S. carinatum* resultaram positivamente em algumas reações, porém a confirmação da presença de glicosídeos cardiotônicos exige necessariamente a comprovação da existência de núcleo esteroidal, lactona insaturada em C-17 e desóxi-açúcares, no qual se incluem as reações de Pesez e Keller-Killiani, confirmando assim ausência desta classe de metabólito (SIMÕES et al., 2000).

Nos testes de classificação de taninos, a espécie *P. acre* pesquisada apresentou taninos condensados, pela coloração verde característica na reação de sais de ferro e por apresentar resultados característicos na análise cromatográfica em busca de proantocianidinas, que são unidades de flavonóides com ligações carbono-carbono, as quais não são susceptíveis de serem rompidas por hidrólise. Os taninos além de serem usados tradicionalmente contra moléstias do tipo diarréia, hipertensão, reumatismo, hemorragia, feridas, e em processos inflamatórios,

possuem atividades comprovadas, tais como: bactericida, fungicida, antiviral, molusquicida e antitumoral (SIMÕES et al., 2000). O uso popular mais conhecido da *P. acre* ocorre em casos de hemorróidas, no qual, pela presença de grupos de taninos, pode haver auxílio no processo de cura de feridas, através da formação de uma camada protetora, formando complexo tanino-proteína e/ou polissacarídeo sobre a pele ou mucosa danificada. Na espécie *S. carinatum,* os resultados para taninos foram positivos, correspondendo à reação de gelatina (inespecífico) e a reação de acetato de chumbo, que caracteriza a presença de taninos hidrolisáveis.

Na caracterização fitoquímica de produtos naturais a cromatografia é uma das técnicas mais utilizadas atualmente para o isolamento de metabólitos secundários, sendo a cromatografia em coluna aberta (CC), cromatografia em camada delgada (CCD) ou CLAE aplicadas primeiramente na etapa de identificação (PEREIRA; AQUINO NETO, 2000). Esta técnica visa à separação de misturas em seus vários componentes. A separação cromatográfica é de cunho interfacial, sendo que as superfícies imiscíveis, fases móvel e estacionária, podem ser gás-sólido, gás-líquido, líquido-líquido e a utilizada neste trabalho líquido-sólido por CCD, que consiste na separação dos componentes de uma mistura pela migração diferencial sobre uma camada delgada de adsorvente retido sobre uma superfície plana. A CCD é uma das técnicas de separação mais amplamente utilizadas em laboratórios relacionados à Química de Produtos Naturais (Fitoquímica), análises orgânicas e organometálicas, sendo amplamente utilizada devido ao seu alto nível de reprodutibilidade, rapidez na separação, alta sensibilidade e por ser comparativamente mais viável economicamente (SANTOS et al., 2007).

Visando o levantamento dos principais metabólitos constituintes que possam ser responsáveis pelas atividades biológicas aqui analisadas, utilizou-se a técnica de análise cromatográfica em camada delgada nos extratos etanólicos 70% de *P. acre* e *S. carinatum,* e em látex de *S. carinatum* de acordo com os métodos propostos por WAGNER (1996), SHARMA E BAKHASHI (1991), MARKHAM (1982), HARBORNE (1998) e ROBERTSON et al. (1955).

Através do perfil cromatográfico dos extratos, resultados positivos foram obtidos na pesquisa de monoterpenos, sesquiterpenos, diterpenos, triterpenos, esteróides e flavonóides. Derivados cinâmicos foram detectados nos extratos

etanólicos, enquanto proantocianidinas condensadas e leucoantocianidinas só foram detectadas no extrato de *P. acre.*

A presença de triterpenóides e esteróides nos extratos estudados pode ser responsável pela toxicidade desses metabólitos secundários (PEREIRA; CASTRO, 2007; ALMEIDA et al., 2002). Alguns diterpenos ionóforos são altamente conhecidos pelo seu nível de toxicidade, sendo cardiotóxicos e provocando tremores, descordenação motora, paralisia, vômitos, timpanismo, morte por asfixia ou paralisação cardíaca, não havendo registro de antídoto descrito (KOBAYASHI et al., 1990, PLUMLEE, 1992; CRUZ et al., 2001).

Taninos, como os encontrados prioritariamente em *P. acre,* são substâncias fenólicas, usadas tradicionalmente por apresentarem atividades biológicas, principalmente os taninos condensados, que são oligômeros e polímeros formados pela policondensação de duas ou mais unidades flavanoídicas. A habilidade de interação com íons metálicos e macromoléculas, e de formação de complexos com alcalóides, gelatinas e proteínas confere toxicidade a essa classe de substâncias (SIMÕES, 2000; SCALBERT 1991).

A presença de saponinas como glicosídeos de esteróides ou de terpenos policíclicos na *P. acre* e *S. carinatum* equivale às saponinas empregadas farmaceuticamente como expectorantes e diuréticos. Estudos comprovam a ação das saponinas como hipocolesterolemiante, pela formação de complexo do colesterol com as saponinas ministradas via oral e pela eliminação fecal de ácidos biliares. Ainda há evidências das saponinas nas atividades antiinflamatórias, anti-helmínticas e antivirais, além das atividades sobre membranas celulares, relacionando sua ação hemolítica, ictiotóxica e molusquicida (SIMÕES et al., 2000). Saponinas litogênicas e esteroidais também são relatadas por sua não metabolização e toxicidade, por promover fotossensibilização em animais, morte de peixes e invertebrados aquáticos e propriedade hemolítica *in vitro* (RIET-CORREA e MEDEIROS, 2001; PEQUENO e SOTO-BLANCO, 2006; EPA, 2004).

A avaliação da atividade antimicrobiana pelo método de difusão em ágar por “templates” mostrou que o extrato etanólico de *S. carinatum* e o látex desta espécie não apresentaram halos de inibição em nenhuma concentração utilizada, indicando ausência de atividade antimicrobiana. A espécie *P. acre,* em solução com o extrato etanólico 70% na concentração de 300 mg/mL apresentou resultados 66,66%

superiores ao controle positivo para *Staphylococcus epidermidis* e 3% superior para *S. aureus.* Em *E. coli* a atividade obtida correspondeu a 91,17% em relação à ampicilina. Os resultados desta análise, nas concentrações premeditadas para o teste, indicam que este extrato possui atividade antimicrobiana apenas em concentrações superiores a 300 mg/mL para todas as bactérias testadas, sendo a maior atividade antibacteriana obtida frente à bactéria S*taphylococcus epidermidis*. Comparativamente, Souza e colaboradores (2007), utilizando da mesma técnica com extrato de *Stryphnodendron adstringens*, obtiveram atividade bactericida 23,3% superior ao controle contra a mesma bactéria, e Stefanello e colaboradores (2006), com o extrato de *Gochnatia polymorpha* ssp *floccosa* obteve resultado 70% inferior ao controle. A menor atividade do extrato de *P. acre* foi demonstrada frente à bactéria *E. coli*.

Na determinação da atividade antimicrobiana pela técnica de difusão em ágar por discos, obteve-se um percentual de inibição de 108% dos halos formados pelo extrato de *P. acre* (300 mg/mL) com relação à ampicilina, contra o microrganismo *S. aureus,* corroborando assim com os resultados antes obtidos pelo teste de difusão em ágar por templates. A avaliação da atividade do látex de *S. carinatum* foi realizada em altas concentrações, porém novamente não houve formação de halos de inibição, podendo inferir que o látex não possui ação bactericida nestas condições analisadas. Na determinação da concentração inibitória mínima (CIM) pela técnica de diluição em tubo, o látex de *S. carinatum* não apresentou atividade antimicrobiana nas concentrações utilizadas, o mesmo ocorrendo no teste de microdiluição.

Na análise de CIM em microplaca, o extrato etanólico de *P. acre* não apresentou atividade antimicrobiana, entretanto, resultados positivos foram obtidos em todos os demais extratos testados contra *S. aureus*, havendo concordância entre CIM e CBM, o que sugere a possibilidade de ação bacteriostática dos extratos contra esse microrganismo. Também se observou a superioridade de ação do extrato clorofórmico de *S. carinatum* contra *S. aureus* comparativamente com os outros extratos testados. O microrganismo *E. coli* demonstrou maior resistência contra os extratos testados, não promovendo resultados de atividade bactericida, sendo o extrato de *P. acre* o mais ativo contra esta bactéria.

Nos testes de toxicidade, a dose máxima utilizada de 2 g/kg foi escolhida mediante as normas para estudo da Toxicidade e da Eficácia de Produtos Fitoterápicos, regulamentado pela portaria número 116/MS/SNVS da ANVISA de 1996. Observou-se aumento de peso e tamanho no fígado e pulmão dos animais tratados com látex e extrato seco de *S. carinatum,* e aumento no coração e pulmão dos tratados com *P. acre,* assim como considerável perda de peso corpóreo nos tratados com este último. Pôde-se supor que esta droga possa estar provocando algum tipo de vasoconstrição ou alteração cardíaca que eleve a pressão capilar pulmonar, levando a um edema agudo de pulmão, que tem como conseqüência a cardiomegalia (aumento do tamanho do coração) e aumento do pulmão. Análises adicionais são necessárias para comprovação destes efeitos provocados, porém já é um indício importante na caracterização da segurança do uso desta planta.

De modo geral, observou-se em todas as análises de toxicidade aguda que o segundo dia após a administração da solução é o ponto crítico de toxicidade, havendo o maior número de mortes, sendo este fato comum em casos de intoxicação (SOUSA; IRIGOYEN, 1999; ROZZA et al., 2006, TRAVERSO et al., 2002).

Os resultados do teste de toxicidade aguda, na dose de 2 g/kg para o extrato etanólico 70% seco de *S. carinatum* não mostraram toxicidade aguda, considerando a dose máxima permitida pela ANVISA.

O extrato de *P. acre* apresentou taxa de mortalidade de 30% na dose de 1 g/kg, e não apresentou toxicidade aguda na dose de 0,5 g/kg, porém isso não significa a segurança de seu uso nesta concentração, tampouco ausência de toxicidade. Ainda na dose de 1 g/kg, observou-se a formação de tumores de grande porte, ou desenvolvimentos glandulares, na região escapular subepidérmica, súpero-lateral esquerdo ao fígado, chegando a 0,65 g cada um, provocando deformidades localizadas e dificuldade de locomoção no animal. Os desenvolvimentos celulares irregulares, assim como todos os órgãos extraídos, estão sendo analisados por patologistas para melhor compreensão dos dados obtidos.

Na avaliação da toxicidade do látex de *S. carinatum* puderam-se comprovar alterações no nível de toxicidade das soluções ministradas de acordo com a metodologia de extração utilizada, sendo que o material com menos tempo de contato com o ar, e mais bem acondicionado, possui potencial tóxico elevado.

Na mensuração de massas dos órgãos retirados no teste de toxicidade aguda, observou-se cardiomegalia em todos os animais que receberam as amostras teste, destacando-se o extrato de *P. acre* a 2 g/kg com ganho de 34,02%; na análise do fígado houve o mesmo ocorrido, sendo o maior ganho de massa encontrado na análise com *S. carinatum* apresentando 23,88%. Todos os rins analisados apresentaram perda de peso, e os pulmões houve casos de ganho e perda de massa. A maior variância encontrada foi apresentada pelos pâncreas dos animais tratados com *P. acre* a 1 g/kg, apresentando aumento de massa de 249,51% com relação a media do controle.

Na avaliação da citotoxicidade dos extratos de *P. acre* e *S. carinatum* pôde-se observar índice de toxicidade 50% no extrato etanólico de *P. acre* a partir de 100 µg/mL, corroborando com os dados já apresentados de toxicidade aguda no presente trabalho. Os resultados de citotoxicidade dos extratos das folhas de *S. carinatum* também apóiam os encontrados no teste de toxicidade aguda, não apresentando índice de citotoxicidade 50% nas concentrações testadas.

As análises tóxicas e citotóxicas buscam resguardar a segurança relativa do uso popular das drogas vegetais, podendo resultar em dados para sustentação deste uso. Este é o caso do uso da quebra-pedra (*Phyllanthus amarus*) que demonstrou baixa toxicidade e citotoxicidade de acordo com Faria e colaboradores (2004). Ao contrário, tais estudos podem resultar em antagonismo ao uso popular, como é o caso demonstrado neste trabalho por *P. acre,* apresentando toxicidade e citotoxicidade relevantes.

Observou-se na avaliação da capacidade de seqüestro de radicais livres que apenas o extrato clorofórmico de *S. carinatum* não demonstrou atividade antiradicalar, sendo os demais extratos efetivos desta atividade.

Todos os extratos foram aprovados quanto ao controle de qualidade microbiológico. Deve ser ressaltado que os chás são consumidos após fervura em água, o que significa provável redução microbiana, entretanto, a droga vegetal *S. carinatum* é utilizada popularmente através do consumo direto via oral, e a espécie *P. acre* é de uso tópico aumentando a importância do controle microbiológico nestes casos.

O levantamento fitoquímico de plantas brasileiras, a avaliação de suas atividades e a segurança de seu uso em testes *in vivo* são os primeiros passos para

a valoração da flora brasileira quanto ao seu potencial farmacêutico, e estes estudos devem ser incentivados a fim de reduzir a biopirataria internacional de plantas, levar a geração de fármacos com menor custo, além de ressaltar a importância da preservação do meio ambiente.

7 CONCLUSÃO

- Testes fitoquímicos indicaram a presença de flavonóides, taninos, saponinas, mono, sesqui e diterpenos, e derivados cinâmicos nas espécies *P. acre* e *S. carinatum*, enquanto que apenas a espécie *P. acre* respondeu positivamente quanto à presença de proantocianidinas condensadas e leucoantocianidinas.
- A baixa concentração de flavonóides pode ser responsável pela falta de atividades biológicas.
- A alta toxicidade encontrada no látex de *S. carinatum* e no extrato de *P. acre* pode estar relacionada com a presença de taninos, triterpenóides e esteróides.
- Na avaliação da atividade antimicrobiana através do método de difusão em ágar e da técnica de Concentração Inibitória Mínima, a espécie *P. acre* apresentou atividade antimicrobiana nas concentrações de 300 mg/mL, enquanto a atividade antimicrobiana para os extratos de *S. carinatum* não foi evidenciada.
- Nos testes de toxicidade aguda, pode-se observar que na dose de 2 g/kg, o extrato etanólico 70% de *P. acre* apresentou taxa de mortalidade de 50%, apresentando nesta concentração a dose letal 50, enquanto o extrato etanólico 70% de *S. carinatum* não possui toxicidade nesta metodologia aplicada. Na dose de 1g/kg, o extrato etanólico 70% de *P. acre* apresentou taxa de mortalidade de 30%, enquanto o látex de *S. carinatum* levou a 100% de morte os camundongos. O extrato etanólico seco 70% de *P. acre* não apresentou toxicidade aguda na dose de 0,5 g/kg. Os resultados obtidos nos experimentos de toxicidade fundamentam a importância da avaliação de segurança na utilização de fitoterápicos.
- Os resultados de citotoxicidade corroboram com a avaliação de toxicidade aguda caracterizando o potencial de citotoxicidade 50% apenas com o extrato etanólico 70% de *P. acre* na concentração de 100 µg/mL.
- Na avaliação da capacidade de seqüestro de radicais livres o extrato etanólico 70% de *S. carinatum*, e os extratos etanólico 70% e clorofórmico de *P. acre*, apresentaram potencial antiradicalar excetuando o extrato clorofórmico de *S. carinatum.*
- O controle microbiológico de qualidade mostrou que os mesmos poderiam ser usados para outras finalidades como o monitoramento de possíveis contaminações dos produtos fitoterápicos, assegurando melhor qualidade destes e maior segurança ao consumidor

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Boas Práticas de Fabricação Específicas de Produtos Intermediários e Insumos Farmacêuticos Ativos Derivados de Droga Vegetal. 2005. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br. Acesso em: 13 set. 2008.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Guia para a realização de estudos de toxicidade pré-clínica de fitoterápicos. 2004. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br. Acesso em: 13 set. 2008.

AGUIAR, V. C. Aspectos bioquímicos, toxicológicos e alergênicos do látex da planta *Calotropis procera* (Ait.) R. Br**.** Fortaleza: UFC, 2006. 183 p. Tese (Doutorado em Bioquímica) – Universidade Federal do Ceará.

ALBUQUERQUE, H. N.; ALBUQUERQUE, I. C. S.; MENEZES, I. R.; MONTEIRO, J. A. BARBOSA, A. R. CABALCANTI, M. L. F. Utilização da Maniçoba (*Manihot glaziowii* Mull., Euphorbiaceae) na caça de aves em Sertânia-PE. **Rev. Biol. Ciênci. Terra**, v. 4, n. 2, 2004.

ALMEIDA, C. E.; KARNIKOWSKI, M. G. O.; FOLETO, R.; BALDISSEROTTO, B. Analysis of antidiarrhoeic effect of plants used in popular medicine. **Rev. Saúde Pública,** v. 29, n. 6, p. 428-433, 1995.

ALMEIDA, D. P. F. Cucurbitáceas hortícolas. **Apontamentos,** Porto, p. 1-2, 2002. Faculdade de Ciências, Universidade do Porto. Disponível em: <http://dalmeida.com/hortnet/apontamentos/Cucurbitaceas.pdf>. Acesso em: 27 dez. 2008.

ALVES, T. M.; RIBEIRO, F. L. KLOOS, H.; ZANI, C. L. Polygodial, the fungitoxic component from the brazilian medicinal plant *Polygonum punctatum*. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz,** v. 96, n. 6, p. 831-833, 2001.

ARIAS, T. D. **Glosario de medicamentos:** desarollo, evaluación y uso. Washington, DC: Organización Panamericana de la Salud, 1999.

ATTA-UR-RAHMAN. **Studies in natural products chemistry:** bioactive natural products (part C). Pakistan: Elsevier, 1988. 751 p..

BARBOSA FILHO, J. M.; MEDEIROS, K. C. P.; DINIZ, M. F. F. M.; BATISTA, L. M.; ATHAYDE FILHO, P. F.; SILVA, M. S.; CUNHA, E. V. L.; ALMEIDA, J. R. G.S .; QUINTANS-JÚNIOR, L. J. Natural products inhibitors of the enzyme acetylcholinesterase. **Rev. Brás. Farmacogn.,** v.16, p. 258-285, 2006a.

BARBOSA FILHO, J. M.; MARTINS, V. K. M.; RABELO, L. A.; MOURA, M, D.; SILVA, M. S.; CUNHA, E. V. L.; SOUZA, M. F. V.; ALMEIDA, R. N.; MEDEIROS, I. A. Natural products inhibitors of the angiotensin converting enzyme (ACE). A review between 1980 – 2000. **Rev. Brás. Farmacogn.,** v. 13, n. 3, p. 421-446, 2006b.

BHAKUNI, O. S.; DHAR, M. L.; DHAR, M. M.; DHAWAN, B. N.; MEHROTRA, B. N. Screening of Indian plants for biological activity. Part II. **Ind. J. Ex. Bio.,** v. 7, p. 250-262, 1969.

BIESKI, I. G. C. **Plantas medicinais e aromáticas no sistema único de saúde da região sul de Cuiabá-MT**. Lavras, MG: 2006. 63 p. (Monografia) Departamento de Agricultura, Universidade Federal de Lavras.

BRAGA, R. Plantas do Nordeste, principalmente do Ceará. 3. ed. Ceará: Escola Superior de Agricultura de Mossoró, 1976.

BRASIL. Resolução nº 481, de 23 de setembro de 1999. Estabelece os parâmetros de controle microbiológico para os produtos de higiene pessoal, cosméticos e perfumes conforme o anexo desta resolução. **Diário Oficial da União**, Brasília, 1999. Disponível em: <http://e-legis.bvs.br/leisref/public/showAct.php?id=259>. Acesso em: 25 de agosto de 2008.

BRITISH Pharmacopea. London: Her Majesty's Stationery Office, 2001.

BROOKS, G. F.; BUTEL, J. S.; MORSE, S. A. **Jawetz, Melnick & Adelberg's**, **medical microbiology**. 22 th. ed. USA: Lange Medical Books/McGraw-Hill, 2001.

BUDEL, J. M.; FARAGO, P. V.; DUARTE, M. R.;TAKEDA, I. J. M. Morpho-natomical study of the cladodes of *Homalocladium platycladum* (F.J. Muell.) L.H. Bailey (Polygonaceae). **Rev. Bras. Farmacogn.,** v. 17, n. 1, p. 39-43, 2007.

CAETANO, N. N., M. R. DUARTE, et al. **Farmacognosia prática.** Paraná: Universidade Federal do Paraná, 1996. p. 90.

CIRIO, G. M.; DONI FILHO, L; MIGUEL, M. D.; MIGUEL, O. G.; ZANIN, S. M. W. Inter-relação de parâmetros agronômicos e físicos de controle de qualidade de *Maytenus ilicifolia*, Mart. Ex. Reiss (espinheira-santa) como insumo para a indústria farmacêutica. **Visão Acad.,** v. 4, n. 2, p. 67-76, 2003.

CORRÊA, P. **Dicionário de plantas úteis do Brasil**. Rio de Janeiro: Imprensa Nacional, 1969. v. 2.

COSTA, A. F. **Farmacognosia**. 5. ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 1994.

CRUZ, C. M. O.; GUERREIRO, C. I. P. D.; REIS T. A. F. C. **Substâncias tóxicas ou anti-nutricionais dos alimentos para animais**. Lisboa: FMV, 2001. (Curso de Mestrado em Produção Animal Módulo de Nutrição).

DAVIS B. D. Mechanism of bactericidal action of aminoglycosides. **Microbiol. Mol, Biol. Rev.,** v. 51, p. 341-350, 1987.

DUARTE, M. G. R.; SOARES, I. A. A.; BRANDÃO, M.; JÁCOME, R. L. R. P.; FERREIRA, M. D.; SILVA, C. R. F.; OLIVEIRA, A. B. Perfil fitoquímico e atividade antibacteriana in vitro de plantas invasoras. **Ver. Lecta,** Bragança Paulista, v. 20, n. 2, p. 177-182, 2002.

EPA, **U.S. Environmental Protection Agency.** Saponins of *Chenopodium quinoa.* Registration Number 81853-1, on September 16, 2005.

ESAU, K. **Anatomia das plantas com sementes**. São Paulo: E. Blücher, 1974.

EVANS, W. C. **Trease and Evans' pharmacognosy**. 14th ed. London: WB Saunders Company, 1996.

FAHN, A. **Plant anatomy**. 4. th. ed. Oxford: Pergamon, 1990.

FALCÃO, D.Q.; COSTA, E.R.; ALVIANO, D.S.; ALVIANO, C.S.; KUSTER, R.M.; MENEZES, F.S. Atividade antioxidante e antimicrobiana de *Calceolaria chelidonioides* Humb. Bonpl. & Kunth. **Rev. Bras. Farmacogn.**, v. 16, n. 1, p. 73-76, 2006.

FARIA, M. H. G.; PESSOA, C. O.; MORAES FILHO, M. O. Avaliação da citotoxicidade *in vitro* e da toxicidade aguda *in vivo* de extratos da *Phyllanthus amarus.* **Pesq Méd.**, ed. 2, n. 7, 2004.

FARMACOPOEIA DOS ESTADOS UNIDOS DO BRASIL. São Paulo: Companhia Editora Nacional, 1926.

FARMACOPÉIA brasileira. 3.ed. São Paulo: Andrei, 1977.

FARMACOPÉIA brasileira. 4.ed. São Paulo: Atheneu. 1988.

FERREIRA, L. S.; MARSOLA, F. J.; TEIXEIRA, S. P. Anatomia dos órgãos vegetativos de *Dieffenbachia picta Schott* (Araceae) com ênfase na distribuição de cristais, laticíferos e grãos de amido. **Rev. Bras. Farmacogn.**, v. 16, p. 664-670, 2006.

GRACIOTTO, M.; SILVA-BRAMBILLA; MOSCHETA, I. S. Anatomia foliar de Polygonaceae (Angiospermae) da planície de inundação do alto rio Paraná**. Acta Scientiarum,** Maringá, v. 23, n. 2, p. 571-585, 2001.

HAMBURGER, M.; HOSTETTMANN, K. Bioactivity in plants: the link between phytochemistry and medicine. **Phytochemistry,** v. 30, p. 3864-3874, 1991.

HARBORNE, J. B. **Phytochemical methods:** a guide to modern techniques of plant analysis. 2nd. ed. London: Chapman and Hill, 1998. 288 p.

HEYWOOD, V. H. **Flowering plants of the World**. New York: Mayflower Books, 1978.

HWANG, I. K.; YOO, K. Y.; KIM, D. W.; JEONG, S. J.; WON, C. K.; MOON, W. K.; KIM, Y. S.; KWON, D. Y. WON, M. H.; KIM, D. W. An extract of *Polygonum multiflorum* protects against free radical damage induced by ultraviolet B irradiation of the skin. **Braz. J. Med. Biol. Res.,** v. 39, n. 9, 2006.

INAMDAR, J. A. Epidermal structure and development of stomata in some Polygonaceae. **Proc. Ind. Acad. Sci.,** v. 72, p. 91-98, 1969.

ISOBE, T.; NODA, Y. A. Chemotaxonomy study of flavonoids from japanese *Polygonum* species. **Yakugaku Zasshi**, v. 107, n. 12, p. 1001-1004, 1987.

JÁCOME, R. L. R. P.; LOPES, D. E. S.; RECIO, R. A.; MACEDO, J. F.; OLIVEIRA A. B. Caracterização farmacognóstica de *Polygonum hydropiperoides* Michaux e P. spectabile (Mart.) (Polygonaceae). **Rev. Bras. Farmacogn.**, v. 14, n.1 p. 21-27, 2004.

JOLY, A. B. Polygonaceae. In:_. **BOTÂNICA:** introdução à taxonomia vegetal. 3. ed. São Paulo: Companhia Editora naiona, 1976. 777 p.

KAPOORT, L. S.; KAPOORT, S. L.; SHARMA, P. C.; KAPOORT, L. D. Epidermal and venation studies in the Indian species of *Polygonum* Linn. (Polygonaceae). **Bot. Survey Ind.,** v. 13, p. 244-259, 1971.

KAWASAKI, M.; KANOMATA, T.; YOSHITAMA, K. Flavonoids in the leaves of twenty-eight polygonaceous plant. **Bot. Magaz.,** v. 99, p. 63-74, 1986.

KIRBY, G. C. Medicinal plants and the control of protozoal disease, with particular reference to malaria. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.,** v. 90, p. 605, 1996.

KOBAYASHI, T.; YASUDA, M.; SEYAMA, I. Developmental toxicity potential of grayanotoxin i in mice and chicks. **J. Toxicol. Sci.,** v. 15, p. 227-234, 1990.

KONNO, K.; HIRAYAMA, C.; NAKAMURA, M.; TATEISHI, K.; TAMURA, Y.; HATTORI, M.; KOHNOK. Papain protects papaya trees from herbivorous insects: role of cysteine proteases in latex. **Plant J.**, v. 37, p. 370-378, 2004.

KOTT, V.; BARBINI, L.; CRUAÑES, M.; MUÑOZ, J. DE D.; VIVOT, E.; CRUAÑES, J.; MARTINO, V.; FERRÃO, G.; CAVALLARO, L. CAMPOS, R. Antiviral activity in Argentine medicinal plants. **J. Ethnopharmacol.**, v. 64, p. 79-84, 1999.

LEI, J.; YU, J.; YU, H.; LIAO, Z. Composition, cytotoxicity and antimicrobial activity of essential oil from *Dictamnus dasycarpus*. **Food Chem.**, v. 107, p. 1205–1209, 2008.

LERSTEN, N. R.; CURTIS, J. D. Foliar anatomy of Polygonum (Polygonaceae): survey of epidermal and selected internal structure. **Plant Sys. Evol.,** v. 182, p. 71-106, 1992.

LIMA, S. S.; ESQUIBEL, M. A.; HENRIQUES, A. B. SILVA, F. O. SILVA, P. H. B; LAGE, C.L.S. Cultura monoclonal de erva de bicho (*Polygonum acre* H. B. K. var *aquatile*) para produção de um fitoterápico em escala comercial. **Rev. Brás. Plantas Med.,** v. 4, n. 1, p. 51-55, 2001.

LIST, P. H.; SCHMIDT, P. C. **Phytopharmaceutical technology**. Florida: CRC, 2000.

LOPES, R. C.; CASALI, V. W. D.; BARBOSA, L. C. A.; CECON, P. R. Caracterização isoenzimática de oito acessos de Erva-de-bicho. **Horticul. Brás.,** Brasília, v. 21, n. 3, p. 433-437, julho-setembro 2003.

MACHADO, F.A.V. Estudo fitoquímico e avaliação da capacidade antioxidante de extratos das cascas de *Stryphnodendron polyphyllum* Mart., Leguminosae, barbatimão. Araraquara: Universidade Estadual Paulista, 2005. 100 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista.

MARIZ, S. R.; CERQUEIRA, G. S.; ARAÚJO, W. C.; DUARTE, J. C.; MELO, A. F. M.; SANTOS, H. B.; OLIVEIRA, K.; DINIZ, M. F. F. D.; MEDEIROS, I. A. Estudo toxicológico agudo do extrato etanólico de partes aéreas de *Jatropha gossypiifolia* L. em ratos. **Rev. Bras. Farmacogn.,** v. 16, n. 3, p. 372-378, 2006.

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

MAUSETH, J. D. **Plant anatomy**. Menlo Park: Benjamin/Cummings, 1988.

MELO, E. Levantamento da família Polygonaceae no estado da Bahia, Brasil: espécies do semi-árido. In: REUNIÃO ESPECIAL DA SBPC, 4., ("Semi-árido no terceiro milênio, ainda um desafio"), 1991, Bahia. **Anais...** Bahia: UEFS, 1991. .

MELO, E. Levantamento da família Polygonaceae no estado da Bahia, Brasil: espécies do semi-árido. **Rodriguésia,** v. 50, p. 29-47, 1999.

MELLO, J. C. P.; PETROVICK, P. R. Quality control of *Baccharis trimera* (Less.) DC. (Asteraceae) hydroalcoholic extracts. **Acta Farm. Bonaer.,** v. 19, n. 3, p. 211-215, 2000.

METCALFE, C. R.; CHALK, L. **Anatomy of dicotyledons: leaves, stem, and woods in relation to taxonomy with notes on economic uses**. London: Clarendon, 1950.

MITCHELL, L. R. S. Comparative leaf structure of aquatic *Polygonum* species**. Am. J. Bot.,** v. 58, p. 342-360, 1971.

MRINALINI MENON, P. J.; VITHAYATHIL, S. M.; RAJU, C. S**.** Ramadoss. Isolation and characterization of proteolytic enzymes from the latex of *Synadenium grantii* Hook, 'f'**. Plant Sci.,** v. 163, p. 131-139, 2002.

NEU, R. A new reagent for differentiating and determining flavones of paper chromatograms. **Naturswissenchaften**. Berlin / Heidelberg, v. 43, p. 82, 1956.

O'BRIEN, J.; WILSON, I.; ORTON, T.; POGNAN, F. Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. **Eur. J. Biochem.,** v. 267, p. 5421-5426, 2000.

OHNO, Y.; MIYAJIMA, A.; SUNOUCHI, M. Alternative methods for mechanistic studies in toxicology. Screening of hepatotoxicity of pesticides using freshly isolated and primary cultured hepatocytes and non-liver-derived cells, SIRC cells. **Toxicol. Lett.**, v. 102-103, p. 569-573, 1998.

OLIVEIRA, A. L.; PADILHA, C. D.; ORTEGA, G. G.; PETROVICK, P. R. *Achyrocliine satureioides* (lam.) Dc.(marcela), Asteraceae, avaliação comparativa da droga vegetal e Estudos preliminares de otimização da extração**. CAD. Farm.**, v. 17, n. 1, p. 33-38, 2001.

OLIVEIRA, R. B.; CUNHA, L. C.; VALADARES, M. C.; FILHO, M. J. P.; ARAÚJO, D. M.; PAULA, J. R.; BASTOS, M. A. Toxicidade aguda de látex e extrato etanólico de folhas de *Synadenium umbellatum* em camundongos. **Ver. Eletrônica Farm.**, v. 2, n. 2, p. 143-145, 2005.

PENNA, C.; MARINO S.; VIVOT, E.; CRUAÑES, M. C.; MUÑOZ, J. DE D.; CRUAÑES, J.; FERRARO, G.;GUTKIND G.; MARTINO, E**.** Antimicrobial activity of Argentine plants used in the treatment of infectious diseases. Isolation of active compounds from *Sebastiania brasiliensis.* **J. Ethnopharmacol.,** v. 77, p. 37-40, 2001.

PEQUENO, N. F.; SOTO-BLANCO, B. Toxicidade *in vitro* de plantas tóxicas: avaliação do teste de ação hemolítica. **Acta Sci. Vet.,** v. 34, n. 1, p. 45-48, 2006.

PEREIRA, A. C.; CASTRO, D. L. Prospecção fitoquímica e potencial citotóxico de *Unxia kubitzkii* H. Rob. (Asteraceae-Heliantheae**). Ver. Brás. Biociênc.,** v. 5, n. 2, p. 231- 233, 2007.

PEREIRA, A. S.; AQUINO NETO, F. R. Estado da arte da cromatografia gasosa de alta resolução e alta temperatura. **Quím. Nova**, v. 23, n. 3, p. 370-379, 2000.

PINTO, A. C.; SILVA, D. H. S.; BOLZANI, V. S.; LOPES, N. P.; EPIFANIO, R. A. Produtos Naturais: Atualidade, desafios e perspectivas. **Quím. Nova**, v.25, supl.1, p. 45-61, 2002.

PLUMLEE, K. H.; VANALSTINE, W. G.; SULLIVAN, J. M. *Japanese pieris* toxicosis of goats. Journal of Veterinary Diagnostic Investigation. v. 4, p. 363-364, 1992.

PRIMACK, R. B. **Essentials of conservation biology**. Massachusetts: Sunderland, 1993. 546 p.

RAJESH, R.; NATARAJU. A.; GOWDA, C. D. R.;FREY, B. M.; FREY, F. J.; VISHWANATH, B. S. Purification and characterization of a 34-kDa, heat stable glycoprotein from *Synadenium grantii* latex: action on human fibrinogen and fibrin clot. **Biochimie**, v. 88, p. 1313–1322, 2006.

RIET-CORREA, F. E.; MEDEIROS, R. M. T. Intoxicações por plantas em ruminantes no Brasil e no Uruguai: importância econômica, controle e riscos para a saúde pública. **Pesq. Vet. Bras.,** v. 21, n. 1, p.38-42, 2001.

ROBERTSON, E. H.; CARTWRIGHT, R. A.; OLDSCHOOL, M. Phenolic substances of manufactured tea. I. Fractionation and paper chromatography of water-soluble subtances. **J. Sci. Food Agric.**, v. 7, p. 637-640, 1956.

ROCHA J. F.; ROCHA, I. B. Anatomia foliar de *Polygonum acuminatum* H.B.K. (Polygonaceae). **Bradea,** v. 6, p. 312- 319, 1994.

ROGÉRIO, A. P.; CARDOSO, C. R.; FONTANARI, C.; SOUZA, M. A.; AFONSO-CARDOSO, S. R. SILVA E. V. G.; KOYAMA, N. S.; BASEI, F. L.; SOARES, E. G.; CALIXTO, J. B.; STOWELL, S. R.; DIAS-BARUFFI, M.; FACCIOLI, L. H. Anti-asthmatic potential of a D-galactose-binding lectin from *Synadenium carinatum* látex. **Glycobiology**, v. 17, n. 8, p. 795–804, 2007.

ROZZA, D. B.; RAYMUNDO D. J.; CORRÊA, A. M. R.; LEAL, J.; SEITZ A. L.; DRIEMEIER, D.; COLODEL, E. M. Intoxicação espontânea por *Baccharis coridifolia* (Compositae) em ovinos. **Pesq. Vet. Bras.,** v. 26, p. 21-25, 2006.

RUDALL, P. **Anatomy of flowering plants: an introduction to structure and developement**. 2nd, ed. Cambridge: Cambridge University, 1994.

SANTOS, M. H.; MÉGDA, J.; CRUZ P. B. M.; MARTINS, F. T.; MOREIRA, M. E. C. Um espalhador de baixo custo de fase estacionária em placas para cromatografia em camada delgada. **Quím. Nova***,* v. 30, n. 7, p. 1747-1749, 2007.

SCALBERT, A. Antimicrobial properties of tannins. **Phytochemistry**, v. 30, n.12, p.3875-3883, 1991.

SCAVONE, O.; GRAEIRO, A. Contribuição ao estudo anatômico e fitoquímico do *Polygonum persicaria* L. var. *biforme* (Wahlenberg) Fries, Polygonaceae. **Rev. Farm. Bioquim..** São Paulo. v. 8, p. 69-89, 1970.

SCHULTES, R. E. Richard Spruce and the potential for European settlement of the Amazon: an unpublished letter'. **Bot. J. Linnean Soc.,** v. 77, p.131-9, 1978.

SHARMA, R. K.; BAKHASHI, N. N. Catalytic upgrading of biomass-derived oils to transportation fuels and chemicals. **Can. J. Chem. Eng.,** v. 69, p. 1071, 1991.

SILVA-BRAMBILLA, M. G.; MOSCHETA I. S; Anatomia foliar de Polygonaceae (Angiospermae) da planície de inundação do alto rio Paraná. **Acta Sci.,** v. 23, n. 2, p. 571-585, 2001.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia:** da planta ao medicamento**.** 2. ed. UFSC, 2000.

SOUZA, M. A.; FRANCIELLE, A. P.; CARDOSO, C. R. B.; SILVA, A. G.; SILVA, E. G.; LIVIA, A. R.; PENA, J. D. O.; LANZA, H.; AFONSO-CARDOSO, S. R. Isolation and partial characterization of a D-galactose-binding lectin from the latex of *Synadenium carinatum.* **Braz. Arch. Biol. Techno.,** v. 48, n. 5, p. 705-716, 2005.

SOUZA, M. M.; CRUZ, A. B.; SCHUMACHER, M. B.; KREUGER, M. R. O.; FREITAS, R. A.; CRUZ, R. C. B. Métodos de avaliação de atividade biológica de produtos naturais e sintéticos. In: BRESOLIN, T. M. B.; CECHINEL FILHO, V. **Ciências farmacêuticas:** contribuição ao desenvolvimento de novos fármacos e medicamentos. Itajaí: Univali, 2003.

SOUSA, R. S.; IRIGOYEN, L. F. Intoxicação experimental por *Phalaris angusta* (Gramineae) em bovinos. **Pesq. Vet. Brás.,** v. 19, p. 116-122, 1999.

SOUZA, O. V. S.; OLIVEIRA, M. S.; RABELLO, S. V.; CUNHA, R. O.; COSTA, B. L. S.; LEITE, M. N. Estudo farmacognóstico de galhos de *Vanillosmopsis erythropappa* Schult. Bip.- Asteraceae. **Rev. Bras. Farmacogn.**, v. 13, p. 50-53, 2003.

SOUZA, T. M.; MOREIRA, R. R. D; PIETRO, R. C. L. R***;*** ISAAC, V. L. B. Avaliação da atividade anti-séptica de extrato seco de *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville e de preparação cosmética contendo este extrato. **Rev. Bras. Farmacogn.**, v. 17, n. 1, p. 71-75, 2007.

STEFANELLO, M. E. A.; SALVADOR, M. J.; ITO, I. Y.; MACARI, P. A. T. Avaliação da atividade antimicrobiana e citotóxica de extratos de *Gochnatia polymorpha* SSP *floccosa*. **Rev. Bras. Farmacogn.,** v. 16, n. 4, p. 525-530, 2006.

TAKAHASHI, Y.; KOIKE, M.; HONDA, H.; ITO, Y.; SAKAGUCHI, H.; SUZUKI, H.; NISHIYAMA, N. Development of the short time exposure (STE) test: An *in vitro* eye irritation test using SIRC cells. **Toxicol. In Vitro**, v. 22, p. 760–770, 2008.

TEIXEIRA, A. H.; DALOSTO, C.; BOLASSEL, C. CHAGAS, A. M.; BORTOLUZZI, M, A. P. JUNCHEM, W. R. C. Efeito protetor do *Polygonum acre* H. B. K. sobre as hemorragias artificiais em camundongos / Protector effect of *Polygonum acre* H. B. K. on the artificial hemorrhages in mices. **Saúde**, v. 15, p. 105-116, 1989.

TRAVERSO, S. D.; CORRÊA, A. M. R.; PESCADOR, C. A.; COLODEL, E. M.; CRUZ, C. E. F.; DRIEMEIER, D. Intoxicação experimental por *Trema micrantha* (Ulmaceae) em caprinos. **Pesq. Vet. Brás.,** v. 22, p. 141-147, 2002.

VARGAS, A. C.; LOGUERCIO, A, P.; WITT, N. M.; COSTA M. M.; SILVA, M. S.; VIANA, L. R. Atividade antimicrobiana “in vitro” de extrato alcoólico de própolis. **Ciênc. Rural**. Santa Maria, v.34, n. 1**,** p. 159-163, 2004.

VOIGT, R. **Pharmazeutische Thechnologie**. 7. Auflage. Berlin: Ullstein Mosby, 1993

ZAMPINI, I. C.; VATTUONE, M. A.; ISLA, M. I. Antibacterial activity of *Zuccagnia punctata* Cav. Ethanolic extracts. **J. Ethnopharmacol.**, v. 2, n. 3, p. 450-456, 2005.

WAGNER, H. M.; BLADT, S.; ZGAINSKI, E. M. **Plant drug analysis**. Berlin: Springer, 1984. p 303.

WAGNER H. **Plant drug analysis: a thin layer chromatography atlas***.* Berlin: Springer. Bladt S, 1996.

WONG, C. L.; WAY, M. K. Effects of aspirin and paracetamol on naloxone reversal or morphine-induced inhibition of gastrointestinal propulsion in mice. **Eur. J. Pharmacol.**, v.73, p. 11-19, 1981.

YANO, H. **Estudo farmacognóstico e farmacológico de *Polygonum persicaria* L**. São Paulo, 1999. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo.

YANO, H. M.; KATO, E. T. M. BACCHI, E. M. Caracterização farmacognóstica de *Polygonum persicaria* L. **Ver. Inst. Adolfo Lutz,** v. 63, n. 2, p. 143-148, 2004.

YAMADA, C. S. B. Fitoterapia: sua história e importância. **Ver. Racine,** v. *43*, p. 50-51, 1998.

YAMAMOTO, C. H.; PINTO, T. J. A.; MEURER, V. M.; CARVALHO, A. M.; REZENDE, P. Controle de Qualidade Microbiológico de Produtos Farmacêuticos, Cosméticos e Fitoterápicos Produzidos na Zona da Mata, MG. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE EXTENSÃO UNIVERSITÁRIA, 2004, Belo Horizonte. **Anais...** Belo Horizonte, 2004.

YUNES, R. A.; PEDROSA, R. C.; CECHINEL FILHO, V. Fármacos e fitoterápicos: a necessidade do desenvolvimento da indústria de fitoterápicos e fitofármacos no brasil. **Quím. Nova**. v. 24, n. 1, p. 147-152, 2001,

9 ANEXOS

unesp UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Câmpus de Araraquara

Protocolo CEP/FCF/CAr. nº 31/2008
Interessado: FILIPE TONI SOFIATI
Orientador: Profa. Dra. Rosemeire Cristina L. R. Pietro
Projeto: Estudos fitoquímicos e das atividades biológicas de extratos de *Polygonum acre* (Polygonaceae) H.B.K e *Synadenium carinatum* (Euphorbiaceae) Boiss

Parecer nº 06/2009 – Comitê de Ética em Pesquisa

O Comitê de Ética em Pesquisa desta Faculdade, considerou o protocolo para uso de animais na pesquisa "Estudos fitoquímicos e das atividades biológicas de extratos de *Polygonum acre* (Polygonaceae) H.B.K e *Synadenium carinatum* (Euphorbiaceae) Boiss", estruturado dentro dos princípios éticos na experimentação animal do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal – COBEA, manifestando-se FAVORÁVEL à sua execução.

O relatório final do protocolo de pesquisa, com no máximo três folhas (espaço 1,5 e letra 12) deverá ser entregue em abril de 2009.

Araraquara, 30 de janeiro de 2009.

Profª. Drª. AURELUCE DEMONTE
Coordenadora do CEP

Livros Grátis

(http://www.livrosgratis.com.br)

Milhares de Livros para Download:

Baixar livros de Administração
Baixar livros de Agronomia
Baixar livros de Arquitetura
Baixar livros de Artes
Baixar livros de Astronomia
Baixar livros de Biologia Geral
Baixar livros de Ciência da Computação
Baixar livros de Ciência da Informação
Baixar livros de Ciência Política
Baixar livros de Ciências da Saúde
Baixar livros de Comunicação
Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE
Baixar livros de Defesa civil
Baixar livros de Direito
Baixar livros de Direitos humanos
Baixar livros de Economia
Baixar livros de Economia Doméstica
Baixar livros de Educação
Baixar livros de Educação - Trânsito
Baixar livros de Educação Física
Baixar livros de Engenharia Aeroespacial
Baixar livros de Farmácia
Baixar livros de Filosofia
Baixar livros de Física
Baixar livros de Geociências
Baixar livros de Geografia
Baixar livros de História
Baixar livros de Línguas

Baixar livros de Literatura
Baixar livros de Literatura de Cordel
Baixar livros de Literatura Infantil
Baixar livros de Matemática
Baixar livros de Medicina
Baixar livros de Medicina Veterinária
Baixar livros de Meio Ambiente
Baixar livros de Meteorologia
Baixar Monografias e TCC
Baixar livros Multidisciplinar
Baixar livros de Música
Baixar livros de Psicologia
Baixar livros de Química
Baixar livros de Saúde Coletiva
Baixar livros de Serviço Social
Baixar livros de Sociologia
Baixar livros de Teologia
Baixar livros de Trabalho
Baixar livros de Turismo