



UNIVERSIDADE ESTADUAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

DAVY MACGYVER DA SILVA MESSIADES

Estudo das propriedades biológicas, fitoquímicas e toxicológicas de
Aspidosperma pyrifolium Mart.

CAMPINA GRANDE – PB

JUNHO/2014

DAVY MACGYVER DA SILVA MESSIADES

**Estudo das propriedades biológicas, fitoquímicas e toxicológicas de
Aspidosperma pyrifolium Mart.**

Dissertação apresentada à Universidade Estadual da Paraíba como parte dos requisitos exigidos pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, área de concentração Desenvolvimento e Controle de Qualidade de Produtos Farmacêuticos, para a obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof.^a Dr.^a Ana Claudia Dantas de Medeiros

Coorientador: Prof. Dr. Harley da Silva Alves

CAMPINA GRANDE – PB

JUNHO/2014

É expressamente proibida a comercialização deste documento, tanto na sua forma impressa como eletrônica. Sua reprodução total ou parcial é permitida exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, desde que na reprodução figure a identificação do autor, título, instituição e ano da dissertação

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA CENTRAL – UEPB

M585e Messiades, Davy Macgyver da Silva.
 Estudos das propriedades biológicas, fitoquímicas e toxicológicas de
Aspidosperma pyrifolium Mart [manuscrito] / Davy Macgyver da Silva
Messiades. – 2014.
 137 p. : il.

 Digitado.
 Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas) –
Universidade Estadual da Paraíba, Pró-Reitoria de Pós-Graduação e Pesquisa,
2014.

 “Orientação: Profa. Dra. Ana Cláudia Dantas de Medeiros, Departamento
de Farmácia.”
 “Co-Orientação: Prof. Dr. Harley da Silva Alves, Departamento de
Farmácia.”

 1. Pereiro. 2. Fitoquímica. 3. Microbiologia. 4. Toxicologia. I. Título.

21. ed. CDD 583

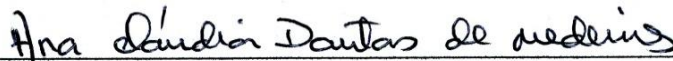
DAVY MACGYVER DA SILVA MESSIADES

**Estudo das propriedades biológicas, fitoquímicas e toxicológicas de
Aspidosperma pyrifolium Mart.**

Dissertação apresentada à Universidade Estadual da Paraíba como parte dos requisitos exigidos pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, para a obtenção do título de Mestre pela Comissão Julgadora composta pelos membros:

Aprovado em 06 de Junho de 2014.

BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr.^a Ana Cláudia Dantas de Medeiros – UEPB

Orientadora



Prof. Dr. Harley da Silva Alves – UEPB

Co-orientador



Prof.^a Dr.^a Vanda Lúcia dos Santos – UEPB

Membro Interno



Prof.^a Dr. Ionaldo José Lima Diniz Basílio – UFPB

Membro Externo

AGRADECIMENTOS

A Deus

Por me conceder a vida e todas as ferramentas para superar os obstáculos e conquistar, a cada dia, meu lugar ao sol.

A minha Mãe

Por toda a força, carinho e atenção que me deu e continua a me dar, ajudando-me nos momentos de tristeza e compartilhando dos meus momentos de felicidade.

Aos meus amigos

Pelas palavras de apoio, pela força e por sempre me incentivarem.

A minha orientadora Ana Cláudia

Por me aceitar, mesmo eu tendo “caído de paraquedas”. Por todo o apoio e orientação. Espero, algum dia, ser ao menos dez por cento da pessoa batalhadora que você é.

Aos meus colegas do LABDEM e o pessoal de Química

Não só pela ajuda braçal, mas também pelo companheirismo. Em especial a Jocimar, por sempre estar ao meu lado, me ajudando a perceber que mesmo na escuridão da pior dificuldade ainda resta uma centelha de esperança.

Aos meus colegas do Mestrado

Pelo apoio, pelos conselhos e até pelas brincadeiras “é Davi?”

A professora Vanda e seus alunos de iniciação científica

Por toda a força que me deram na realização das análises farmacológicas, sempre presentes e proativos.

E a todos àqueles que mesmo não citados, me ajudaram de alguma forma seja atuando na minha pesquisa ou mesmo proporcionando conforto através de suas palavras.

*Do mesmo modo que a ave empurra o filhote em seu primeiro voo, a vida nos “empurra” ao crescimento, colocando obstáculos em nosso caminho. Cabe a nós escolher alçar voos tão altos quanto as estrelas ou fixar raízes e nunca sentir a liberdade de voar...
A coragem para “voar” – se lançando ao desconhecido – não está na ausência do medo, mas sim, na capacidade de enfrentá-lo na busca dos nossos sonhos...*

MESSIADES, Davy Macgyver da Silva. **ESTUDO DAS PROPRIEDADES BIOLÓGICAS, FITOQUÍMICAS E TOXICOLÓGICAS DE *Aspidosperma pyrifolium* Mart.** Campina Grande, PB: UEPB, 2014. (Dissertação – Mestrado em Ciências Farmacêuticas).

RESUMO

Aspidosperma pyrifolium Mart. é uma espécie que ocorre na caatinga, sendo popularmente conhecida como Pereiro. Essa espécie é economicamente importante por ter multiplicidade de usos, principalmente na utilização como planta ornamental (inclusive em processos de recuperação de mata ciliar), como madeira (carpintaria, carvão vegetal e lenha) e como forragem. Estudos fitoquímicos mostraram a presença de alcaloides indólicos, aos quais foram atribuídas atividades hipotensoras, antimicrobianas, tripanossomicidas e citotóxicas. Assim, o objetivo dessa pesquisa foi realizar um estudo fitoquímico, biológico e toxicológico da *A. pyrifolium* Mart. Os extratos foram produzidos por diferentes técnicas de extração e por três distintas concentrações hidroalcoólicas e de proporção de material vegetal. Para a realização da primeira atividade biológica foi utilizado um planejamento fatorial 3^3 , com a finalidade de se determinar o extrato de melhor ação antimicrobiana frente às cepas *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) e *klebsiella pneumoniae* (ATCC 4352). Este extrato foi utilizado na realização dos demais estudos biológicos. Os resultados mostraram que a melhor atividade antimicrobiana foi obtida com o extrato produzido por turbólise, utilizando 30 g de material vegetal dissolvido em solução de 90% de etanol/água. O estudo fitoquímico mostrou a presença de compostos fenólicos e saponinas. Nos ensaios farmacológicos observou-se que o extrato, nas doses testadas, apresentou potencial analgésico e anti-inflamatório, e embora o extrato bruto tenha apresentado indícios de toxicidade, estes não foram evidenciados nos ensaios farmacológicos.

Palavras-chave: Nocicepção, Inflamação, Microbiologia, Fitoquímica, Toxicologia.

ABSTRACT

Aspidosperma pyrifolium Mart. is a species that occurs in the caatinga, being popularly known as Pereiro. This species is economically important to have multiple uses, primarily for use as an ornamental plant (even in recovery of riparian vegetation), as wood (carpentry, charcoal and firewood) and as fodder. Phytochemical studies revealed the presence of indole alkaloids, which were attributed hypotensive, antimicrobial, trypanosomicide and cytotoxic activities. The objective of this research was to realize a phytochemical, toxicological and biological study of *A. pyrifolium* Mart. The extracts were produced by different extraction techniques and by three different hydroalcoholic concentrations and of proportion of plant material. To perform the first biological activity a factorial design 3^3 was used to order to determine the extract of best antimicrobial action against the strains *Escherichia coli* (ATCC 25922) , *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) and *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 4352). This extract was used in the realization of the other biological studies. The results showed that the best antimicrobial activity was obtained with the extract produced by turbólise using 30 g of plant material dissolved in solution of 90% ethanol/water. The phytochemical studies showed the presence of phenolic compounds and saponins. In pharmacological testing was observed that the extract, in the doses tested, exhibited an analgesic and anti-inflammatory potential, and although the crude extract has shown signs of toxicity, these were not evidenced in the pharmacological assays.

Keywords: Nociception, Inflammation, Microbiology, Phytochemistry, Toxicology.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AINEs	Anti-inflamatórios não-esteroidais
AlCl ₃	Cloreto de Alumínio
ALT	Alanina aminotransferase
ANOVA	<i>Analysis of Variance</i>
ARC	<i>Acinetobacter</i> resistentes à carbapenens
ASE	<i>Accelerated Solvent Extraction</i>
AST	Aspartatoaminotransferase
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
CHCM	Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média
CIM	Concentração Inibitória Mínima
Cl ₅₀	Concentração Letal média
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
COX	Ciclo-oxigenase
DL ₅₀	Dose Letal média
EDTA	<i>Ethylene Diamine Tetra-acetic Acid</i>
EEM-Ap	Extrato Etanólico por Maceração de <i>A. pyrifolium</i> Mart.
EET-Ap	Extrato Etanólico por Turbólise de <i>A. pyrifolium</i> Mart.
EEU-Ap	Extrato Etanólico por Ultrassom de <i>A. pyrifolium</i> Mart.
GABA	<i>Gamma-AminoButyric Acid</i>
HCl	Ácido clorídrico
HCM	Hemoglobina Corpuscular Média
HPHTSE	<i>High Pressure High Temperature Solvent Extraction</i>
HPSE	<i>High Pressure Solvent Extraction</i>
HPWE	<i>High Pressure Water Extraction</i>
kHz	Kilohertz
KPC	<i>Klebsiella pneumoniae</i> resistente à Carbapenemase
m/v	Massa por Volume
mg EAG.g ⁻¹	Miligrama equivalente a um grama de Ácido Gálico
mg ECAT.g ⁻¹	Miligrama equivalente a um grama de Catequina
mg EDI.g ⁻¹	Miligrama equivalente a um grama de Diosgenina
mg EQC.g ⁻¹	Miligrama equivalente a um grama de Quercetina
mg/mL	Miligrama por mililitro
MHz	Megahertz
Mpa	Megapascal
MRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente a metilina
Na ₂ CO ₃	Carbonato de Sódio
nm	Nanômetro
OECD	<i>Organisation for Economic Cooperation and Development</i>
OMS	Organização Mundial de Saúde
PBS	Phosphate Buffered Saline

PCR	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> resistente à carbapenens
PG	Prostaglandina
pH	Potencial hidrogeniônico
PLE	<i>Pressure Liquid Extraction</i>
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada
RPM	Rotação por minuto
SSE	<i>Subcritical Solvent Extraction</i>
VCM	Volume Corpuscular Médio
VRE	<i>Enterococcus spp.</i> resistente à vancomicina

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1 Processamento e métodos extrativos de plantas medicinais: um estudo de revisão.

Tabela 1 – Processos de secagem de material vegetal.....	58
Tabela 2 – Tipos de moinhos utilizados no processamento de plantas	60
Tabela 3 – Constantes dielétricas de solventes usados na extração de plantas medicinais.....	61
Tabela 4 – Solventes utilizados em processos extrativos e compostos que extraem.....	61
Tabela 5 – Resumo com algumas características das técnicas extrativas descritas.....	73

CAPÍTULO 2 Análise fitoquímica e otimização do potencial antimicrobiano dos extratos hidroalcoólicos de *Aspidosperma pyrifolium* Mart.

Tabela 1 – Organização das variáveis e dos níveis, segundo o planejamento fatorial 3^3	92
Tabela 2 – ANOVA da determinação do teor de resíduo (rendimento) de <i>A. pyrifolium</i>	97
Tabela 3 – ANOVA do perfil antimicrobiano de <i>A. pyrifolium</i> frente a <i>E. coli</i>	99
Tabela 4 – ANOVA do perfil antimicrobiano de <i>A. pyrifolium</i> frente a <i>K. pneumoniae</i>	101
Tabela 5 – ANOVA do perfil antimicrobiano de <i>A. pyrifolium</i> frente a <i>P. aeruginosa</i>	103
Tabela 6 – ANOVA do perfil antimicrobiano de <i>A. pyrifolium</i> frente <i>S. aureus</i>	105
Tabela 7 – Média da CIM do extrato etanólico por turbólise de <i>A. pyrifolium</i> (EET-Ap) e das partições deste extrato frente as cepas bacterianas.....	107

Tabela 8 – Teor de polifenóis, flavonoides, taninos e saponinas presentes na espécie <i>A. pryriifolium</i> Mart.....	108
--	-----

CAPÍTULO 3 Avaliação da atividade farmacológica e toxicológica de *Aspidosperma pryriifolium* Mart.

Tabela 1 – Efeito da administração via oral do controle (solução salina 0,9%) e diferentes doses do EET-Ap na evolução ponderal (alteração na massa corpórea) e, no consumo de ração e de água em ratos <i>Wistar</i> albinos adultos.....	123
Tabela 2 – Efeito da administração via oral do controle (solução salina 0,9%) e diferentes doses do EET-Ap no peso dos órgãos em ratos <i>Wistar</i> albinos adultos.....	124
Tabela 3 – Efeito da administração via oral do controle (solução salina 0,9%) e diferentes doses do EET-Ap nos parâmetros hematológicos em ratos <i>Wistar</i> albinos adultos.....	125
Tabela 4 – Efeito da administração via oral do controle (solução salina 0,9%) e diferentes doses do EET-Ap nos parâmetros bioquímico sem ratos <i>Wistar</i> albinos adultos.....	126
Tabela 5 – Efeito anti-inflamatório do EET-Ap sobre o volume (mm ²) do edema de pata induzido por carragenina.....	127
Tabela 6 – Efeito anti-inflamatório do EET-Ap sobre o número de leucócitos totais no exsudato da peritonite induzida pela carragenina.....	128
Tabela 7 – Efeito antinociceptivo do EET-Ap sobre o número de contorções abdominais induzidas pelo ácido acético.....	130
Tabela 8 – Efeito do EET-Ap sobre a nocicepção induzida por formalina (fase I e II)	131

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Gráfico de Pareto da determinação do teor de resíduo (rendimento) de <i>A. pyrifolium</i>	98
Figura 2 – Gráfico de Pareto do perfil antimicrobiano de <i>A. pyrifolium</i> frente a <i>E. coli</i>	100
Figura 3 – Gráfico de Pareto do perfil antimicrobiano de <i>A. pyrifolium</i> frente a <i>K. pneumoniae</i>	102
Figura 4 – Gráfico de Pareto do perfil antimicrobiano de <i>A. pyrifolium</i> frente a <i>P. aeruginosa</i>	104
Figura 5 – Gráfico de Pareto do perfil antimicrobiano de <i>A. pyrifolium</i> frente a <i>S. aureus</i>	106

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	16
2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	18
2.1. <i>Aspidosperma piryfolium</i> Mart.....	18
2.2. Planejamento experimental	19
2.3. Atividades biológicas	20
2.3.1. Atividade antimicrobiana	20
2.3.1.1. Cilindros ou <i>Templates</i> e Cavidade em placa.....	22
2.3.1.2. Impregnação em discos de papel (Kirby-Bauer)	23
2.3.1.3. Microdiluição.....	23
2.3.2. Atividade antinociceptiva	24
2.3.2.1. Nocicepção	24
2.3.2.2. Formalina.....	25
2.3.2.3. Contorções por ácido acético.....	26
2.3.2.4. Placa quente	26
2.3.2.5. Analgesímetro digital	27
2.3.3. Atividade anti-inflamatória.....	27
2.3.3.1. Inflamação	27
2.3.3.2. Peritonite.....	28
2.3.3.3. Edema de pata.....	29
2.3.3.4. Edema de orelha	29
2.3.3.5. Pleurisia	29
2.4. Caracterização fitoquímica.....	30
2.4.1. Polifenóis	31
2.4.2. Flavonoides.....	31
2.4.3. Taninos	32
2.4.4. Alcaloides	32
2.4.5. Saponinas.....	33
2.5. Toxicidade	34
2.5.1. Toxicidade aguda.....	35
2.5.2. Toxicidade crônica	36
2.5.3. Citotoxicidade.....	36
3. REFERÊNCIAS	38

CAPÍTULO 1 Processamento e métodos extrativos de plantas medicinais: um estudo de revisão.....	53
RESUMO	53
ABSTRACT	54
1. INTRODUÇÃO	55
2. METODOLOGIA	56
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	56
3.1. Processamento do material vegetal	56
3.1.1.Secagem.....	56
3.1.2.Moagem.....	59
3.2. Escolha da solução extratora	60
3.3. Métodos extrativos	62
3.3.1.Técnicas farmacopeicas.....	63
3.3.1.1. Maceração.....	63
3.3.1.2. Percolação.....	64
3.3.1.3. Soxhlet.....	65
3.3.2.Técnicas não farmacopeicas	66
3.3.2.1. Ultrassom.....	66
3.3.2.2. Turbólise.....	67
3.3.2.3. Fluido Supercrítico	68
3.3.2.4. Micro-ondas.....	70
3.3.2.5. Extração acelerada por solvente	71
4. CONCLUSÃO	75
5. REFERÊNCIAS	76
CAPÍTULO 2 Análise fitoquímica e otimização do potencial antimicrobiano dos extratos hidroalcoólicos de <i>Aspidosperma pyrifolium</i> Mart.....	87
RESUMO	87
ABSTRACT	88
1. INTRODUÇÃO	89
2. MATERIAIS E MÉTODOS	91

2.1. Material botânico.....	91
2.2. Preparo dos extratos	91
2.2.1. Para o <i>screening</i> antimicrobiano dos extratos e teor de resíduo seco	91
2.2.2. Para o <i>screening</i> antimicrobiano das partições do melhor extrato	91
2.2.3. Para a análise fitoquímica semiquantitativa	92
2.3. Planejamento experimental	92
2.4. Determinação do teor de resíduo seco.....	92
2.5. <i>Screening</i> antimicrobiano.....	93
2.5.1. Padronização da suspensão bacteriana	93
2.5.2. Verificação da atividade antibacteriana dos extratos vegetais – Determinação da concentração inibitória mínima (CIM)	93
2.5.3. Verificação da atividade antibacteriana das partições do melhor extrato vegetal – Determinação da concentração inibitória mínima (CIM).....	94
2.6. Análise fitoquímica semiquantitativa	94
2.6.1. Determinação de Polifenóis totais	94
2.6.2. Determinação de Flavonoides totais.....	95
2.6.3. Determinação de Taninos totais	95
2.6.4. Determinação de Saponinas totais	96
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	96
3.1. Otimização do processo extrativo quanto ao resíduo seco (rendimento).....	97
3.2. Otimização do processo extrativo quanto à concentração inibitória mínima (CIM)	99
3.3. Seleção da partição de maior potencial antimicrobiano	107
3.4. Caracterização fitoquímica semiquantitativa	108
4. CONCLUSÃO.....	110
5. REFERÊNCIAS.....	111
CAPÍTULO 3 Avaliação da atividade farmacológica e toxicológica de <i>Aspidosperma pyrifolium</i> Mart.	114
RESUMO	114
ABSTRACT.....	115
1. INTRODUÇÃO	116

2. MATERIAIS E MÉTODOS	118
2.1. Material botânico.....	118
2.2. Obtenção do extrato.....	118
2.3. Animais	118
2.4. Avaliação da toxicidade	119
2.4.1. Teste de toxicidade aguda.....	119
2.4.2. Avaliação de parâmetros hematológicos e bioquímicos.....	119
2.5. Ensaio farmacológico.....	120
2.5.1. Avaliação da atividade anti-inflamatória.....	120
2.5.1.1. Edema de pata induzida por carragenina.....	120
2.5.1.2. Peritonite induzida por carragenina.....	120
2.5.2. Avaliação de atividade antinociceptiva	121
2.5.2.1. Nociceção induzida por formalina.....	121
2.5.2.2. Contorções abdominais induzidas por ácido acético.....	121
2.6. Análise estatística	122
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	122
3.1. Toxicidade	122
3.2. Ensaio farmacológico.....	127
3.2.1. Atividade anti-inflamatória.....	127
3.2.2. Atividade antinociceptiva	130
4. CONCLUSÃO	132
5. REFERÊNCIAS	133

1. INTRODUÇÃO

O uso das plantas medicinais para a cura e/ou prevenção de doenças é uma prática que data de tempos remotos. Mesmo antes da utilização por humanos, as plantas já eram usadas com finalidade medicinal por animais e a observação dessa prática foi uma das primeiras fontes de conhecimento, para a humanidade, sobre tal uso.

A utilização de plantas medicinais não se restringe apenas aos países de primeiro mundo, segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), 65-80% da população dos países em desenvolvimento recorrem à medicina tradicional para o tratamento de enfermidades e desses, 85% utilizam plantas medicinais (ou suas preparações) como forma de acesso aos cuidados básicos de saúde, sendo, por vezes, sua a única alternativa (BRASÍLIA *et al.* 2006; SILVEIRA *et al.* 2008).

Todavia, até a década de 80 do século XX houve uma negligência quanto à utilização de plantas medicinais, por parte dos órgãos regulatórios do governo federal. Essa realidade mudou com a descoberta de novos usos, a comprovação científica de diversas atividades e as pressões do mercado, visto que os medicamentos convencionais não supriam o constante surgimento de novas doenças e/ou a resistência destas; as plantas medicinais e suas preparações retornaram como uma promissora alternativa, gerando lucros, atualmente, na casa dos bilhões nos países desenvolvidos, especialmente França e Alemanha (ETHUR *et al.* 2011).

Embora o Brasil detenha um das maiores biodiversidades do planeta, ainda está obsoleto no tocante às pesquisas com plantas com finalidade medicinal, tendo suas riquezas perdidas pela ação da biopirataria e/ou da própria extinção, e o seu conhecimento medicinal popular esquecido (BENINI *et al.* 2010).

Entretanto com a política de inclusão da fitoterapia no Sistema Único de Saúde (SUS), o Ministério da Saúde determinou prioridade na investigação das plantas medicinais e deste modo tornou essencial que os profissionais da área de saúde conheçam as atividades farmacológicas e a toxicidade das plantas de cada bioma brasileiro, de acordo com os costumes, tradições e condição socioeconômicas da população (VEIGA-JUNIOR, 2008; BRASÍLIA *et al.* 2006).

O semiárido nordestino, cuja vegetação predominante é a caatinga, possui altas temperaturas, baixo índice pluviométrico (abaixo de 800 mm/ano) e solos rasos. Entretanto, sua vegetação é extremamente adaptada às condições climáticas e apresenta vários usos como

forrageiras, madeireiras, ornamentais, frutíferas, apícolas, plantas produtoras de fibra, ceras, óleos e taninos (QUEIROZ, 2011).

Não obstante, as plantas do semiárido nordestino também possuem múltiplos usos na medicina popular local. Esse uso baseia-se no conhecimento de raizeiros ou mesmo no que passa de geração em geração. Muitas vezes, esse conhecimento não possui qualquer comprovação científica, carecendo portanto, de estudos que comprovem as atividades biológicas ao passo que garantam a segurança quanto ao uso, pois a premissa “o que é natural não faz mal” quase nunca é válida (AGRA *et al.* 2007).

Com a evolução dos patógenos, o uso de plantas com finalidade antimicrobiana passou a ser uma alternativa ao tratamento convencional cada vez mais obsoleto frente as cepas multirresistentes. Embora os pesquisadores ainda tentem “salvar” alguns princípios ativos através da modificação de suas estruturas, o mecanismo de resposta microbiano responde a altura e em pouco tempo inviabiliza os novos medicamentos. Isso se deve principalmente ao uso irracional de antibióticos promovido tanto pela automedicação, quanto pelos erros nas prescrições que, segundo a OMS, chegam a 50% do total (BRAOIOS *et al.* 2013).

Outro problema relacionado ao uso indiscriminado de medicamentos é a perda e/ou dessensibilização de receptores, gerando a chamada tolerância que pode acontecer com apenas um medicamento ou com vários ao mesmo tempo, o que chamamos de tolerância cruzada. Neste caso, os principais afetados são os analgésicos e os anti-inflamatórios. Na tentativa de sobrepujar tal problemática, diversas plantas veem sendo usadas no combate às dores (especialmente as cefaleias) e às inflamações, gerando uma mercado que cresce a cada ano (FERREIRA *et al.* 2013).

Ante o que foi exposto, este trabalho procurou realizar um estudo sobre as propriedades biológicas de *Aspidosperma pyriforme* Mart., não esquecendo da verificação da segurança quanto ao uso do mesmo. Deste modo, pode-se aproveitar o potencial botânico do semiárido para suprir a necessidade de novos compostos capazes de controlar a atividade de agentes patogênicos e/ou de doenças ligadas a inflamação e a nocicepção.

2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 *Aspidosperma pyriforme* Mart.

Aspidosperma é pertencente ao reino Plantae, divisão Magnoliophyta, classe Magnoliopsida, subclasse Asteridae, ordem Gentianales, família Apocynaceae, (BARCHUK *et al.* 1999).

As espécies pertencentes a esse gênero são arbóreas, de grande porte, medindo em torno de 2 a 60 m de altura. Possuem copas amplas com folhagem alternada, grande número de flores e sementes, podendo ainda apresentar látex em seus ramos. Em sua maioria, localizam-se na América do sul, em regiões como o Cerrado, a Caatinga e em algumas florestas (ALZUGARAY *et al.* 2007; BARCHUK *et al.* 1999).

Esse gênero possui 52 espécies estudadas, porém algumas delas possuem maior relevância, tanto na medicina popular, quanto em estudos científicos. Alguns exemplos de espécies com enfoque científico foram: *A. ramiflorum* (MARQUES *et al.* 1996), *A. pyriforme* (LIMA *et al.* 2010), *A. quebracho blanco* Schlecht (ALZUGARAY *et al.* 2007; BARCHUK *et al.* 1999), *A. parvifolium* (JÁCOME *et al.* 2003), *A. vargasii* (KAUR *et al.* 2009), *A. pruinatum* (TAVEIRA, 1992), *A. megalocarpon* Mull. Arg. (OFFER *et al.* 2002), *A. australe* Arg. Muell. (OLIVEIRA *et al.* 2010), *A. cuspa* (Kunth) Blake (PEREZ *et al.* 2002) e *A. rigidum* Rusby (VIEIRA *et al.* 2013).

Aspidosperma pyriforme Mart. é uma espécie que ocorre na caatinga, sendo popularmente conhecida como Pereiro, Pau-pereiro, Pereira-branca, Pereiro-branco, Pereiro-de-saia, Pereiro-preto, Pereiro-vermelho, Peroba-paulista, Peroba-rosa e Trevo. Essa espécie é economicamente importante por ter multiplicidade de usos, principalmente na utilização como planta ornamental (inclusive em processos de recuperação de mata ciliar), como madeira (carpintaria, carvão vegetal e lenha) e como forragem (SANTOS *et al.* 2009).

Macroscopicamente apresenta-se como uma árvore de altura variando entre três e oito metros, de tronco com diâmetros que entre 15 a 20 cm. Sua casca de sabor amargo é lisa, acinzentada, com lenticelas brancas quando jovem, rugosa, e com desprendimento de placas irregulares, quando idosa. Possui folhas simples, alternas, ovais, de 4 a 9 cm de comprimento, amargosas e coriáceas. As flores, aglomeradas em pequenas cimeiras terminais, são alvas, pequenas e de perfume muito agradável. Os frutos são lenhosos, em forma de gota achatada, de 5 a 6 cm de comprimento, castanho-claros, ricos em lenticelas de cor cinza, abrem-se em

duas bandas e deixam cair as sementes aladas, planas, papiráceas (com projeções que lembram folhas de papel). Sua madeira tem cor amarelo-clara ou creme, ora com manchas avermelhadas, ora com faixas acastanhadas, moderadamente pesada, macia e fácil de trabalhar, textura fina e uniforme, resistente e muito durável (MAIA *et al.* 2004).

Segundo Lima (2010), investigações fitoquímicas sobre a *A. pyriformium* revelaram a presença de alcaloides indólicos como aspidofractinina, 15-demetoxipirifolina e N-formilaspidospermidina. Adicionalmente Pereira (2007) acrescenta outros alcaloides dessa classe como vincadiformina, pirifolidina, aspidospermina, desacetilaspidospermina, palosina e O-Desmetilpalosina, atribuindo aos mesmos, atividades como hipotensora, antimicrobiana, citotóxica em células cancerosas, tripanosomicida e inibitória sobre monoamino oxidase, além da toxicidade de algumas espécies desse gênero.

Embora os alcaloides indólicos seja a classe de metabólitos em maior quantidade e a mais estudada, outras como triterpenoides, esteroides, iridoides, saponinas, taninos e flavonoides também foram detectados (análise qualitativas) na *A. pyriformium* Mart. – podendo levar a estudos que descubram outras atividades biológicas dessa espécie (SOUZA *et al.* 2011).

2.2. Planejamento experimental

Na pesquisa, o conhecimento de como as variáveis influenciam determinado experimento, assim como dos níveis de valores destas variáveis, é deveras importante. Deste modo, a partir da escolha das variáveis e de seus níveis (limites inferior e superior de valores, e algumas vezes pontos médios), devem-se realizar ensaios experimentais a fim de se obter respostas para cada variável e para cada possível interação. Os resultados devem então ser analisados por técnicas estatísticas, de modo a se concluir algo em relação à dependência das variáveis, obtendo-se a configuração mais vantajosa (quanto ao tempo, ao custo, ao processo, ao rendimento etc.) à determinada pesquisa, além da comprovação estatística da confiabilidade do resultado (SANTOS *et al.* 2007).

Neste contexto, o planejamento experimental aparece como uma técnica estatística quimiométrica, sendo amplamente aceita entre a comunidade científica, especialmente os de caráter fatorial, todavia não sendo uma regra, pois a escolha do melhor planejamento deve obedecer à necessidade e a conveniência da pesquisa e do pesquisador (CAMPOS, 2006). Por exemplo, quando se deve comparar médias de experimentos ou mesmo um grupo controle aos

grupos testes, utilizam-se comumente o teste de Tukey e o teste de Dunnett, respectivamente, além de outros testes como o de Bonferroni (ASSINI *et al.* 2013; RODRIGUES *et al.* 2013).

Assim, o planejamento fatorial permite otimizar o sistema, com um pequeno número de experimentos, torna possível a verificação dos efeitos entre os fatores nos diferentes níveis estudados e garante a confiabilidade e significância (geralmente 5% em testes como o T de Student e o F de Fisher) dos resultados; sendo comumente representado pela tabela de análise de variância (ANOVA) e pela análise dos efeitos através do diagrama de Pareto (MIGLIATO *et al.* 2011; SKEIKA *et al.* 2010; VICENTINI *et al.* 2011).

2.3. Atividades biológicas

2.3.1. Atividade antimicrobiana

Os microrganismos, patogênicos ou não, possuem uma infinidade de mecanismos de defesa (bomba de efluxo, alteração de receptores de membrana, enzimas, dentre outros) que permitem a rápida adaptação às pressões ambientais, não sendo a resposta à ação dos antibióticos uma exceção. Deste modo, uma das consequências do uso de agentes antimicrobianos é a seleção de microrganismos cada vez mais resistentes e isso contribui para a ineficácia da terapia antibiótica atual (BRITO *et al.* 2012).

Dentre os microrganismos patogênicos mais estudados, quanto a ação de compostos com provável ação antimicrobiana, encontram-se *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* e *Escherichia coli*, seja na forma *American Type Culture Collection* (ATCC) ou nas suas formas multirresistentes (CATÃO *et al.* 2005; SARAIVA *et al.* 2013).

De acordo com Trabulsi (2008) e Tortora (2012), os estafilococos são cocos Gram-positivos, esses microrganismos são sensíveis à ação da lisostafina, característica esta que permite a sua diferenciação dos *Micrococcus*. O *Staphylococcus aureus* é uma espécie de bactéria com cerca de 1 micrómetro de diâmetro que forma grupos com aspecto de cachos de uvas de coloração amarelada, devido à produção de carotenoides, sendo daí o nome de "estafilococo dourado" (MARSHALL *et al.* 1981). Cresce bem em ambientes salinos e geralmente é encontrada nas narinas de 20 a 40% da população podendo estar envolvida em infecções humanas, tanto de origem comunitária quanto hospitalar, sendo, conseqüentemente, a mais extensivamente estudada (KONEMAN, 2008). As infecções mais comuns envolvem a

pele (celulite, impetigo) e feridas em locais diversos. Algumas infecções por *S. aureus* são agudas e podem disseminar para diferentes tecidos e provocar focos metastáticos. Episódios mais graves, como bacteremia, pneumonia, osteomielite, endocardite, miocardite, pericardite e meningite, também podem ocorrer (ANVISA, 2014; LOPATA *et al.* 2011; KONEMAN, 2008).

A *Pseudomona aeruginosa* é uma bactéria gram-negativa, aeróbia e baciliforme. Seu ambiente de origem é o solo, mas é capaz de viver mesmo em ambientes hostis. É um patógeno oportunista, ou seja, que raramente causa doenças em um sistema imunológico saudável, mas explora eventuais fraquezas do organismo para estabelecer um quadro de infecção (KONEMAN, 2008). Essa característica, associada à sua resistência natural a um grande número de antibióticos e antissépticos a torna uma importante causa de infecções hospitalares, especialmente em consequência de processos cirúrgicos ou queimaduras que podem resultar em bacteremias severas (PICOLI, 2008).

Para Trabulsi (2008) e Tortora (2012) a *Escherichia coli* é um bacilo gram-negativo, pertencente à família das *Enterobacteriaceae*, podendo ser aeróbia e anaeróbia facultativas. O seu habitat natural é o lúmen intestinal dos seres humanos e de outros animais de sangue quente. Possui múltiplos flagelos (dispostos em volta da célula) e fímbrias ou adesinas que permitem a sua fixação, impedindo o arrastamento pela urina ou diarreia. Sua patogenicidade consiste na capacidade de invadir e se espalhar lateralmente pelas células adjacentes à mucosa do cólon, aderindo fortemente a mesma (por meio de adesinas), onde proliferam, levando à morte celular. A *E. coli* raramente causa infecção extra intestinal, entretanto, três infecções são mais frequentes: urinárias, meningite do recém-nascido e bacteremia (CARRARO-EDUARDO *et al.* 2012).

Klebsiella pneumoniae é uma espécie de bactéria gram-negativa, encapsulada, anaeróbia facultativa em forma de bastonete. É o mais importante membro do gênero *Klebsiella* e da Família das Enterobactérias. Pode causar pneumonia, embora seja mais comum a sua implicação em infecções hospitalares (aparelho urinário e feridas), em particular em doentes imunologicamente deprimidos (CABRAL *et al.* 2012). Sendo produtora de β -lactamases é geralmente suscetíveis apenas aos carbapenens (TUON *et al.* 2012).

Devido a essa característica e em resposta ao uso indiscriminado de antimicrobianos, a cada dia, surgem diversos microrganismos resistentes dentre eles podemos citar: *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (MRSA), *Enterococcus* spp. resistente à vancomicina (VRE); *Pseudomonas aeruginosa* resistente à carbapenens (PCR); *Acinetobacter*

resistentes à carbapenems (ARC) e a mais recente *Klebsiella pneumoniae* resistente à Carbapenemase (KPC) (MORAES, 2013; BRITO, 2012). Ambos são encontradas principalmente em enfermos de hospitais, ambientes de saúde e pessoas que frequentam estas instalações, mas devido a rápida disseminação bacteriana, passaram a habitar outros ambientes, tornando-se graves problemas de saúde pública, ao ponto de forçar os órgãos governamentais responsáveis pela saúde, como a ANVISA, a tomar medidas drásticas (RDC Nº20/2011 – controle dos antimicrobianos) que inibissem o surgimento de novas superbactérias (MORAES *et al.* 2013; LOPATA *et al.* 2011; BRITO *et al.* 2012).

Uma alternativa ao uso da terapia antibiótica atual é a fitoterapia, pois fitocompostos (saponinas, terpenos, alcaloides, flavonoides e taninos), derivados do metabolismo secundário dos vegetais, apresentam notável capacidade antimicrobiana, sendo capazes não só de deter o crescimento (bacteriostático) destes organismos, mas podendo também matá-los (bactericida) ou mesmo modular a ação de antibióticos, reduzindo as doses dos mesmos ou protegendo-os do ataque dos mecanismos de defesas desses microrganismos (SOUZA *et al.* 2007; LOPATA *et al.* 2011; OLIVEIRA *et al.* 2012).

Para tanto, diversas técnicas podem ser utilizadas para avaliar a presença de atividade desses compostos, dentre elas pode-se citar a técnica de cilindros, a de impregnação em discos (Kirby-Bauer) e a da microplaca, todas elas recomendadas pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute* (ANVISA, 2012).

2.3.1.1. Cilindros ou *Templates* e Cavidade em placa

Consiste em colocar sob um meio base (Ágar Mueller-Hinton, por exemplo) estéril e solidificado, um outro meio inoculado com o microrganismo escolhido. Após a solidificação do meio inoculado, colocam-se cilindros de aço, de vidro, de porcelana ou de alumínio (previamente esterilizados) e nestes cilindros são inseridas as substâncias a serem testadas. Neste método, os compostos irão se difundir pelo meio a partir da base dos cilindros e por esse motivo deve-se ter cuidado na colocação dos mesmos a fim de se evitar pressões exacerbadas que comprometam a difusão dos composto testes (BRASIL, 2010; ALVES *et al.* 2008).

Outra técnica, a de cavidade em placa, segue esse mesmo procedimento, entretanto ocorre a substituição dos cilindros por poços feitos com canaletas previamente esterilizadas, sendo o meio inoculado denominado de “*seed*” (BRASIL, 2010). Tanto a técnica de cilindros

como a de poços apresentam a desvantagem de só se aplicarem a compostos que apresentem difusibilidade em ágar ou que sejam previamente tratadas com substâncias que concedam, a estes, esta característica – como alguns tensoativos, como o Polisorbato 80 (PACKER *et al.* 2007).

2.3.1.2. Impregnação em discos de papel (Kirby-Bauer)

O teste de sensibilidade aos antibióticos "Kirby-Bauer" é um método que envolve a inoculação de uma cultura pura de microrganismo, que deseja tratar, em uma placa de Petri contendo meio adequado ao crescimento deste microrganismo. Posteriormente são colocados, sobre o meio, discos de papel embebidos em várias substâncias testes (ou com diluições de uma mesma substância) seguida pela incubação, em condições que garantam o crescimento microbiano. Durante este período as substâncias testes, que estão no papel embebido, se difunde lentamente em torno da área do disco ficando mais diluída na medida em que se afasta do disco (BAUER *et al.* 1966).

Após a incubação verifica-se a possibilidade de inibição do crescimento através da mensuração dos halos (áreas de coloração mais clara) e assim, determina-se quais são os compostos mais eficazes para matar (ou ao menos parar) o microrganismo em questão. Deste modo, quanto maior for o halo maior o perfil de inibição provocado e conseqüentemente menor será a dose necessária à inibição (RABELO *et al.* 2013; BAUER *et al.* 1966).

Apresenta a mesma desvantagem da técnica em cilindros, além disso, a impregnação dos discos pode ocorrer de maneira não uniforme, ou mesmo incompleta (não absorção pelo papel), comprometendo os resultados (MAIA-ARAÚJO *et al.* 2011).

2.3.1.3. Microdiluição

A técnica de microdiluição em caldo é uma adaptação da macrodiluição em caldo. Denomina-se assim, pois envolve o uso de pequenos volumes (cerca de 100 µl) de caldo colocados em placas de 80, 96 ou mais poços de fundo redondo ou cônico estéreis, próprias para esta técnica. As placas, contendo meio adequado ao crescimento do microrganismo, controles (positivos e negativos), compostos a serem testados e inóculo, são então inoculadas a 35 °C por 16-24 horas e, completado o período de incubação, são submetidas a análise visual (através da formação de precipitados ou com a utilização de reveladores como a

resazurina) ou a análise por métodos mais sensíveis e precisos como os leitores de Elisa, leitura por meio da absorbância (CLSI, 2009).

Fatores primários como a sensibilidade do organismo, o diluente utilizado, o estágio e a taxa de crescimento bacteriano, que influenciam os valores de concentração inibitória mínima (CIM) no método de diluição em caldo, são os mesmos tanto para a técnica de macrodiluição como para de microdiluição (ALVES *et al.* 2008).

Por meio dessa técnica é possível testar composto que apresentam baixa difusibilidade em ágar e que poderiam ocasionar falsos negativos pela falta de contato entre a substância teste com o microrganismo escolhido. Além disso, tem-se a vantagem de economia de espaço e de reagentes, reprodutibilidade dos resultados (preparação de grande quantidade de placas a partir da mesma série de diluições de compostos testes), geração de um resultado quantitativo e a possibilidade de utilização de sistemas automatizados. Todavia, o alto custo e principalmente a dificuldade em discernir o crescimento bacteriano da amostra inoculada daquele causado por bactérias contaminantes, apresentam-se como as principais desvantagens deste método (ANVISA, 2013).

2.3.2. Atividade antinociceptiva

2.3.2.1. Nocicepção

A dor é caracterizada por experiências sensoriais e emocionais, podendo ser crônica (quando perdura por um longo tempo) ou aguda (quando finda em um curto espaço de tempo). Por vezes, a percepção de dor é entendida como um mecanismo de proteção, no qual o corpo inibe comportamentos que levem à uma injúria maior (KLAUMANN *et al.* 2008; CORTES *et al.* 2013).

Segundo Bento-Silva *et al.* (2010) e Klaumann *et al.* (2008), o conjunto das percepções de dor que somos capazes de distinguir denomina-se nocicepção e pode ser induzida em um receptor de três formas específicas:

- mecânica: quando estímulos mecânicos tais como impacto, fricção, rompimento, são capazes de excitar um mecanorreceptor de dor.
- térmica: desencadeados por estímulos térmicos capazes de excitar um termorreceptor de dor, por exemplo, nos casos de calor ou frio extremos.

- química: quando um estímulo mediado por mecanismo químico afeta um quimioceptor de dor, alterações químicas do meio ou ligação de um mediador químico ou neurotransmissor, no processo inflamatório, por exemplo, ocorre destruição de algumas células e/ou mesmo liberação de substâncias que são capazes de estimular terminações nervosas ou hipersensibilizá-las a outro estímulo.

Todavia, quando a dor passa a um estágio na qual ela própria pode ocasionar risco à saúde, o corpo é forçado a liberar, na corrente sanguínea, um neurotransmissor endógeno denominado β -endorfina cujos efeitos compreendem a diminuição da sensação dolorosa, e a facilitação de sensações de relaxamento e bem-estar (BERTOLINI *et al.* 2011).

Entretanto nem sempre o estímulo é forte o suficiente para promover a liberação de β -endorfina ou mesmo a quantidade liberada é insuficiente para amenizar a dor, nestes casos faz-se o uso de medicamentos com ação analgésica que vão de um simples paracetamol (acetaminofeno) a compostos mais potentes como opiáceos (morfina), muito utilizado em dores profundas e/ou crônicas (CASTRO *et al.* 2013).

Não só a morfina, mas outros compostos foram descobertos a partir da avaliação do potencial terapêutico de plantas medicinais e de alguns de seus constituintes, tais como flavonoides, alcaloides, triterpenos, sesquiterpenos, taninos, lignanas, possuem ação analgésica, às vezes, superior à fornecida por medicamentos convencionais (CECHINEL FILHO *et al.* 1997). Flavonoides como a astilbina (*Hymenaea martiana*), a rutina e quercetina (*Bauhinia splendens* HBK), e a 2"-O-ramnose swertisina (*Aleurites moluccana* L. Willd.) apresentam notável ação analgésica (antinociceptiva), assim como os triterpenos folidotina e 24-metileno-cicloartanol (*Epidendrum mosenii* Rchb. f.) e alcaloides como a cafeína (CECHINEL FILHO, 2000; TAVARES *et al.* 2012).

Dentre os testes aplicados à avaliação do potencial antinoceptivo de plantas e/ou seus metabólitos secundários encontram-se o de contorções induzidas por ácido acético, placa quente, analgesímetro digital e o da formalina geralmente realizados em ratos e/ou camundongos (ADEDAPPO *et al.* 2013).

2.3.2.2. Formalina

O teste da formalina geralmente é dividido em 2 fases, na qual a fase I (primeiros cinco minutos) é avaliada a resposta à estimulação química nociceptiva e na fase II (décimo

quito ao trigésimo minuto) a influência da ação inflamatória na resposta dolorosa. Sendo a hipernocicepção química avaliada por meio desse ensaio (CARVALHO *et al.* 2011).

Na prática, após a administração das substâncias testes e dos controles (negativos e positivos - geralmente indometacina ou morfina), são contados o número de vezes que o animal ergue o membro no qual foi injetado a formalina. A contagem perdura continuamente por 30 minutos sendo números de elevação parciais registrados a cada 5 minutos. (CARVALHO *et al.* 2011).

2.3.2.3. Contorções por ácido acético

Segundo Collier *et al.* (1968) em resposta à injeção intraperitoneal de um agente nocivo, o rato e/ou camundongo desenvolve um comportamento que consiste de uma onda de constrição e alongamento que prossegue ao longo da parede abdominal, por vezes, acompanhada de torção do tronco e seguida por extensão dos membros posteriores.

Deste modo, o teste de contorções consiste na administração das substâncias testes e dos controles (negativos e positivos - geralmente indometacina ou morfina) seguida pela aplicação de ácido acético via intraperitoneal (agente indutor das contorções). O número de contorções é obtido pela soma das contrações musculares abdominais com as extensões das patas, registadas durante 30 minutos. A partir desse teste, avalia-se a hipernocicepção química (FLORENTINO *et al.* 2013).

2.3.2.4. Placa quente

Neste experimento, avalia-se a hipernocicepção térmica posterior a exposição do animal a temperaturas capazes de estimular seus termorreceptores de dor. Assim, após a administração das substâncias testes e dos controles (negativos e positivos – geralmente indometacina ou morfina) o animal teste é submetido a um estímulo térmico (a cada trinta minutos por noventa minutos), provocado pela exposição de seus membros a uma placa quente (por volta de 50 °C), por até quarenta segundos (para se evitar lesões), a partir de então é mensurado a latência na resposta a esse estímulo, sendo considerados os comportamentos como lambar, agitação ou levantamento da pata (RODRIGUES *et al.* 2013).

2.3.2.5. Analgesímetro digital

Esse método consiste em aplicar pressão na pata traseira do animal, utilizando um aparelho composto por um transdutor de pressão ligado a um detector digital de força (expressa em gramas), e com isso, verificar a resposta do animal frente ao aumento do estímulo, correspondendo a avaliação da hipernocicepção mecânica (KARVAT *et al.* 2013; SANTOS, 2011).

2.3.3. Atividade anti-inflamatória

2.3.3.1. Inflamação

A inflamação apresenta-se muitas vezes ligada a nocicepção. Na indução química, por exemplo, a ação de mediadores inflamatórios como bradicinina, endotelina e aminas simpatomiméticas ocasionam a sensibilização de nociceptores, levando ao fenômeno dor (VERRI JR *et al.* 2007).

No entanto, os processos inflamatórios consistem em uma reação de defesa (reparo ou cura) do organismo frente a uma agressão que pode vir de agentes físicos (cortes, contusões, queimaduras), químicos (agentes irritantes, corrosivos, dentre outros) e/ou biológicos (infecções em geral); sendo caracterizados inicialmente por sintomas como calor, eritema, edema, hipersensibilidade e dor, podendo evoluir para a perda da função da região afetada (SILVA *et al.* 2011).

Deste modo, diversas são as formas capazes de ativar essa reação do organismo, contudo em muitos casos ela pode se tornar exacerbada, e conseqüentemente prejudicial, necessitando da utilização de substâncias anti-inflamatórias que podem ser do tipo esteroidais (glicocorticoides) ou não-esteroidais (AINEs).

Os glicocorticoides têm a capacidade de modificar o processo inflamatório dos tecidos que, ao serem agredidos, apresentam um extravasamento de fluidos intracelulares para o espaço perithecidual. Doses farmacológicas de cortisol e seus análogos induzem a produção de anexinas (antigas lipocortinas) que atuam modulando a função da fosfolipase A2, responsável por hidrolisar fosfolipídios de membrana e liberar ácido araquidônico (precursor dos eicosanoides). Além disso, acredita-se que os glicocorticoides possuam ação supressora sobre a ciclooxigenase 2 e que essa atividade esteja mais relacionada a sua ação anti-inflamatória do

que a própria inibição da fosfolipase A2. Entretanto, o uso prolongado de glicocorticoides pode acarretar efeitos que mascarem processos infecciosos e comprometam as funções cardiovasculares, metabólicas, imunológicas e homeostáticas. (BRUNTON, 2012).

Os anti-inflamatórios não-esteroides (AINEs) são um grupo variado de fármacos que têm em comum a capacidade de controlar a inflamação, promover analgesia (reduzir a dor), e de combater a hipertermia (febre). Caracterizam-se por inibir a atividade de subtipos da ciclooxigenase (COX 1 e 2), impedindo assim a síntese de prostaglandinas pela via metabólica da cascata do ácido araquidônico. Todavia, especialmente para os AINEs não seletivos, pode ocorrer comprometimento (toxicidade) do sistema gástrico pela inibição da COX 1, levando os pacientes, especialmente os de uso prolongado, a utilizarem medicamentos com ação gastroprotetora (BRUNTON, 2012; IWALEWA *et al.* 2007).

Os flavonoides, dentre os fitocompostos, talvez sejam os que detêm o maior número de integrantes com atividade anti-inflamatória, todavia, terpenos e esteroides também possuem notável aplicação nessa área (IWALEWA *et al.* 2007). Por exemplo, o gênero *Lychnophora* apresenta terpenos e flavonoides como substâncias predominantes, sendo o goiazensolido e a centraterina (ambas lactonas sesquiterpênicas) os mais potentes representantes anti-inflamatórios, embora, também possua algumas C-flavonas (C-glucosil-flavona, por exemplo) com ação anti-inflamatória (SILVA *et al.* 2013).

Nas pesquisas, visando a seleção de compostos naturais com atividade anti-inflamatória, são comumente aplicados ensaios como peritonite, edema de pata, edema de orelha e pleurisia, tais testes são geralmente realizados em ratos e/ou camundongos (ZANUSSO-JUNIOR *et al.* 2011; BARROS *et al.* 2004).

2.3.3.2. Peritonite

O ensaio consiste em avaliar o potencial que compostos possuem de inibir a resposta inflamatória na região peritoneal quando está submetida a ação de agentes irritantes como a carragenina. Assim, posterior a administração das substâncias testes e dos controles (negativos e positivos - geralmente indometacina) é aplicado carragenina diluída em tampão PBS heparinizado (pH 7,4), via intraperitoneal, sendo os animais sacrificados, após quatro horas, e seus exsudatos intraperitoneais colhidos para quantificação de leucócitos, o que evidencia, após análise estatística, a significância da inibição da resposta inflamatória (BARROS *et al.* 2004).

2.3.3.3. Edema de pata

O ensaio consiste em avaliar o potencial que compostos possuem de inibir a resposta inflamatória (edematogênica) na região subplantar, quando está é submetida a ação de agentes irritantes como a carragenina. Deste modo, depois da aplicação do agente nocivo (carragenina) na pata direita e da solução salina na pata esquerda, o volume de ambas as patas é então medido com o auxílio de um pletismômetro (variações de volume produzidas pela imersão das patas dos animais até o maléolo lateral do calcâneo) ou com paquímetro, no qual o volume corresponde a multiplicação da altura e largura da pata pelo valor de π (3,14). Portanto, a perfil anti-inflamatório é maior quanto menor a diferença entre o volume da pata esquerda e da direita de cada animal (SANTOS, 2011; LIMA *et al.* 2013).

2.3.3.4. Edema de orelha

O ensaio consiste em avaliar o potencial que compostos possuem de inibir a resposta inflamatória (antiedematogênica) na região auricular interna quando está é submetida a ação de agentes irritantes como o óleo de cróton. Para tanto, os animais recebem uma solução de óleo de cróton (2,5%, v/v em acetona) sobre a superfície interna da orelha direita, enquanto a mesma região da orelha esquerda é tratada com o mesmo volume de acetona, a fim de se comprovar que o edema formado deve-se exclusivamente a ação do óleo de cróton. Após seis horas da aplicação do agente flogístico, disco de aproximadamente seis milímetros são removido de ambas as orelhas dos animais (eutanasiados) e então pesados. Assim, o potencial de inibição da resposta inflamatória é maior quanto menor for a diferença entre o peso dos discos obtidos da orelha esquerda e da direita de cada animal (MOTTA *et al.* 2013).

2.3.3.5. Pleurisia

O ensaio consiste em avaliar o potencial que compostos possuem de inibir a resposta inflamatória na região pleural, quando está é submetida a ação de agentes irritantes como a carragenina. As substâncias testes e os controles (negativos e positivos) são administrados por gavagem e posteriormente, é aplicada carragenina diluída em tampão PBS (pH 7,4), via intrapleural, na região do mediastino esquerdo (entre a terceira e quarta costelas), sendo os animais sacrificados, após quatro horas, e seus exsudatos intrapleurais colhidos para

quantificação de leucócitos – o que evidencia, após análise estatística, a significância da inibição inflamatória (ZANUSSO-JUNIOR *et al.* 2011).

2.4. Caracterização fitoquímica

Metabólitos secundários são compostos orgânicos que geralmente são biossintetizados a partir de carboidratos, proteínas e/ou lipídeos (metabólitos primários). Esses metabolitos estão geralmente associados a uma infinidade de atividades que vão desde a defesa vegetal contra um ataque microbiológico (fitoalexinas) à defesas interespécies, ação alelopática, por exemplo (GOBBO-NETO *et al.* 2007; OOTANI *et al.* 2013).

Devido a esse potencial, essas substâncias começaram a despertar o interesse dos pesquisadores passando a ser a fonte dos mais variados princípios ativos e tendo como principais representantes os terpenoides, os alcaloides, os polifenóis (taninos, flavonoides etc.), as saponinas e os esteroides. Esses compostos possuem diversas ações farmacológicas que incluem atividade analgésica (alcaloides e flavonoides, por exemplo); antimicrobianas (taninos, flavonoides, saponinas etc.); anti-inflamatórias (terpenos, esteroides, flavonoides, entre outros); ação laxativa e expectorante (saponinas) (PEREIRA *et al.* 2012).

Deste modo, a fitoquímica surgiu como uma ferramenta ao estudo desses compostos, sendo por vezes empregada no direcionamento de experimentos voltados às atividades biológicas de plantas medicinais (inferir uma atividade ou mesmo um mecanismo de ação) assim como, para a taxonomia (uso na diferenciação de espécies) e para a química, estudos das vias metabólicas que originam as diferentes substâncias presentes nos vegetais (CZELUSNIAK *et al.* 2012; MARTINS *et al.* 2010).

Para tanto, utiliza-se de metodologias que abrangem extração, fracionamento químico, separação, isolamento e elucidação estrutural; e reúne técnicas qualitativas (Dragendorff, Shinoda etc.), semiquantitativas (espectrofotometrias – determinação de taninos totais, por exemplo) e quantitativas como espectroscopias (Massas), cromatografias (líquida de alta eficiência, gasosa etc.) e ressonância magnética, a depender do objetivo e dos compostos de interesse envolvidos no estudo (SIMÕES, 2004).

2.4.1. Polifenóis

Polifenóis são substâncias caracterizadas por possuírem ao menos um anel aromático e a este uma ou mais hidroxilas ligadas. Geralmente são sólidos, cristalinos, tóxicos, ácidos, solúveis em água e visíveis na luz ultravioleta. Os mais importantes são constituídos a partir dos ácidos benzoicos ou dos cinâmicos, como as cumarinas, os taninos, as lignanas e os flavonoides (SIMÕES, 2004).

Podem ser identificados em reações qualitativas de precipitação com compostos metálicos, de oxidação (por ação da luz, do calor ou substâncias alcalinas) resultando no seu escurecimento, ou mesmo por reações semiquantitativas com a utilização do reagente de Folin-Ciocalteu em uma oxi-redução, na qual o compostos fenólicos são oxidados sob condições alcalinas, resultando em uma solução de coloração azul que pode ter sua absorvância (no comprimento de onda de 725 nm) medida e comparada a uma curva de calibração geralmente obtida com o padrão ácido gálico, determinando assim, o teor de polifenóis totais (SIMÕES, 2004; CHANDRA *et al.* 2004).

2.4.2. Flavonoides

Flavonoides formam um grande grupo de metabólitos secundários da classe dos polifenóis, componentes de baixo peso molecular encontrados em diversas espécies vegetais. Possuem uma biossíntese mista, através da condensação dos produtos da via do ácido chiquímico com a do acetil coenzima A, originando uma chalcona que é a precursora dos demais flavonoides (SIMÕES, 2004).

Diferentes tipos são encontrados em frutas, em flores e nos vegetais em geral, assim como em alimentos processados, chá e vinho; sendo responsável por atividades biológicas importantes como antibiótica, analgésica, antioxidante e anti-inflamatória (MEDEIROS *et al.* 2010).

Reações de coloração como Shinoda, de Wilson, de Martini-Nettolo e com H₂SO₄ concentrado, são amplamente utilizadas na avaliação qualitativa da presença de flavonoides. Além disso, a determinação de flavonoides totais pode ser obtida por meio de uma reação com solução de cloreto de alumínio (AlCl₃) em metanol, ocasionando um desvio de absorção para maiores comprimentos de onda e uma intensificação dessa absorção que quando lida, em

415 nm, pode ser comparada a valores de uma curva de calibração obtida com o padrão quercitina (SIMÕES, 2004; MEDA *et al.* 2005).

2.4.3. Taninos

São compostos fenólicos, com massa entre 500 e 3000 Daltons, solúveis em água e com a capacidade de formar complexos insolúveis com alcaloides, gelatina e com outras proteínas. Podem ser classificados como hidrolisáveis (galotaninos e elagiotaninos) ou como condensados, a depender da seu arcaouço estrutural (SIMÕES, 2004; BHARTI *et al.* 2012).

Sua propriedade de complexação lhes confere atividades como o combate aos insetos, ações antimicrobianas, cicatrização tecidual, ação antioxidante e anti-inflamatória, bem como sua ampla utilização no curtimento de couro a nível industrial (MOREIRA *et al.* 2013; BHARTI *et al.* 2012).

Testes de precipitação com alcaloides (cafeína, por exemplo), com proteínas (gelatina, por exemplo) ou com solução de formaldeído-ácido clorídrico são comuns dentre os teste qualitativos, assim como reações colorimétricas com cloreto férrico (SIMÕES, 2004).

Ainda, o método da vanilina-HCl pode utilizado na determinação dos taninos condensados. Neste ensaio ocorre a formação de complexos vermelho brilhante, em meio ácido, apresentando os valores de absorbância que quando comparados aos obtidos com o padrão catequina em 500 nm fornecem a concentração de taninos condensados totais (MAKKAR *et al.* 1993).

2.4.4. Alcaloides

São substâncias orgânicas, cíclicas, contendo um nitrogênio em estado de oxidação negativa, na sua maior parte alcalinos e encontrados principalmente em angiospermas. Atividades biológicas tais como anticolinesterásica, analgésicas, sedativas, anestésicas, antitumoral, anti-inflamatória, antiviral e antimalárica têm sido atribuídas aos alcaloides. Entretanto, propriedades citotóxicas e toxicológicas são características marcantes desses compostos (BALADRIN *et al.* 1993; CASTILHOS *et al.* 2007; LUCENA *et al.* 2010).

Na presença de reagentes de Dragendorff, de Mayer e de Bertrand ocorre a precipitação dos alcaloides, sendo essas algumas das formas de detecção qualitativa desses

compostos, assim como as reações de coloração com cloreto férrico, com reativo Vitali-Morin (alcaloides tropânicos) ou de Urk – alcaloides indólicos (SIMÕES, 2004).

Na determinação do teor de alcaloides totais, o ensaio descrito por Sreevidya *et al* (2003), consiste na precipitação dos alcaloides pela ação do reagente de Dragendorff, em meio ácido, com posterior tratamento deste precipitado como sulfeto dissódico, seguida de ressuspensão em ácido nítrico e adição de tiouréia. A absorvância da solução resultante é então comparada a curva de calibração construída com o padrão nitrato de bismuto pentahidratado.

2.4.5. Saponinas

As saponinas são glicosídeos de elevado peso molecular (600 a 2000 Daltons) formadas por esteroides ou por terpenos policíclicos combinados a uma porção açúcar. Apresentam uma parte hidrofóbica (porção esferoidal ou terpênica) e uma hidrofílica (porção açúcar) o que lhes confere propriedades de detergentes e de surfactantes, estando, normalmente presentes em misturas complexas que dificultam seu isolamento e estudo (SANTOS, F.M. *et al.* 2011; SIMÕES, 2004).

Uma das característica principais das saponinas é a formação de espumas, são também altamente solúveis em água e devido ao seu caráter detergente e tensoativo são capazes de desestabilizar membranas biológicas e se complexar com esteroides, ações essas responsáveis por sua atividade hemolítica (emprego em testes laboratoriais), e por sua ação antifúngica, respectivamente. Além Disso, possuem outras ações como antibacteriana, anti-inflamatória, expectorante e laxante (SANTOS, F.M. *et al.* 2011)

Testes de hemólise e formação de espuma persistente, mesmo após adição de ácidos minerais, compõem os ensaios qualitativos para as saponinas. Já os experimentos semiquantitativos (saponinas totais) baseiam-se na formação de complexos colorimétricos em presença de compostos como a vanilina em meio ácido, por exemplo, relacionando-se os valores de absorvância encontrados (em 544 nm) com a concentração determinada pela curva de calibração obtida na análise de padrões como a diosgenina (MAKKAR *et al.* 2007).

2.5. Toxicidade

A avaliação da toxicidade, para o desenvolvimento de produtos naturais, tem por objetivo determinar o potencial que novas substâncias e/ou produtos têm de gerar danos à saúde humana. Testes que avaliam a toxicidade são utilizados para classificar substâncias de acordo com o seu potencial de letalidade ou toxicidade como estabelecido pelas legislações vigentes (VALADARES, 2006).

Além da letalidade, parâmetros como potencial tóxico em órgãos específicos, toxicocinética e a relação-dose resposta também são investigados. Outras informações podem ainda ser obtidas em uma avaliação de toxicidade como indicativos sobre o mecanismo de ação tóxica, diagnóstico e tratamento das reações tóxicas, estabelecimento das doses para estudos adicionais de toxicidade, informações para a comparação de toxicidade entre substâncias de mesma classe, ou mesmo informações sobre quais seriam as consequências de exposições acidentais no trabalho ou no ambiente doméstico (VALADARES, 2006).

Os testes de toxicidade de produtos naturais são realizados geralmente em ratos ou camundongos, sendo que ao longo do tempo houve uma drástica redução no número de animais, bem como na forma de condução dos ensaios. Inicialmente, os testes utilizavam 100 animais e o parâmetro dose letal mediana (DL_{50}) era universal, mas com a eliminação desse parâmetro, desde 2002, outros protocolos foram criados (BOTHAM, 2004).

Atualmente, os ensaios de toxicidade utilizam normalmente 5 animais de cada sexo e embora os alguns testes ainda usem a estimativa da DL_{50} , outros protocolos trabalham com a dose máxima não letal, diretrizes que melhoram o tratamento com o animal ou mesmo com culturas de células (testes *in vitro*) para a seleção das doses a serem testadas *in vivo*, reduzindo assim o número de animais mortos bem como a sofrimento causado aos mesmos (COSTA *et al.* 2012; MARIZ *et al.* 2006; MARTINS *et al.* 2009).

Todavia, a determinação da toxicidade aguda, da crônica e mais recentemente da citotoxicidade são considerados como parâmetros essenciais à garantia da segurança de qualquer produto seja ele natural ou não, não sendo exceção os produtos fitoterápicos que têm seus ensaios regido pela Resolução N° 90, de 16 de março de 2004 (RDC 90/2004), da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (BRASIL, 2004).

2.5.1. Toxicidade aguda

No ensaios toxicológicos pré-clínicos, a toxicidade aguda manifesta-se imediatamente ou com até 14 dias após a exposição de uma dose única de um xenobiótico por ingestão, inalação ou através da pele de animais e do homem. Deste modo, através da determinação toxicidade aguda pode-se identificar uma dose claramente tóxica, sub-letal ou letal e definir os órgãos alvos da substância em estudo. O teste de toxicidade aguda estima a dose letal mediana (DL₅₀) e classifica os toxicantes quanto à periculosidade, inclusive para extratos de plantas (CUNHA *et al.* 2013; TRESVENZOL *et al.* 2013).

Segundo a RDC 90/2004 (BRASIL, 2004), o teste de toxicidade aguda avalia a toxicidade após exposição a uma dose única ou dose fracionada administrada no período de 24 horas, sendo testados mamíferos adultos (sem características genéticas especiais), em número não inferior a 6 (de cada sexo). A via de administração deve ser a mesma que for proposta para o produto e a dose deve ser suficiente para observação de possíveis efeitos adversos e estimativa da DL₅₀, ou seja, na ausência de efeitos adversos observáveis deve-se utilizar a dose máxima possível que segundo a *Organisation for Economic Cooperation and Development* (OECD) pode partir de 2000mg/Kg podendo chegar até 5000 mg/Kg.

Além disso, segundo a mesma resolução, sinais de toxicidade tais como alteração da locomoção, frequência respiratória, piloereção, diarreia, sialorréia, alteração do tônus muscular, hipnose, convulsões, hiperexcitabilidade do sistema nervoso central, contorções abdominais, incluindo tempo de aparecimento, progressão e reversibilidade destes sintomas devem ser anotados; bem como a variação de peso e o consumo de alimentos, e o número de animais mortos com possível causa de morte e respectivo exames histopatológicos.

Por fim a RDC 90/2004 determina que o período de observação deve perdurar por 14 dias, prazo que pode ser ampliado dependendo do aparecimento de sinais de toxicidade, visando observar reversão ou não destes sinais. Ao fim do período de observação todos os animais sobreviventes devem ser sacrificados e autopsiados. Caso sejam observadas alterações nas autópsias (peso, cor, textura e aspecto dos órgãos), estudos histopatológicos dos órgãos acometidos devem ser realizados.

Ainda, visando uma maior confiabilidade dos resultados, alguns trabalhos utilizam parâmetros recomendados pela RDC 90/2004 no que concerne aos testes de toxicidade crônica como, por exemplo, realização de exames hematológicos e bioquímicos (MARTINS *et al.* 2009).

2.5.2. Toxicidade crônica

Na determinação da toxicidade crônica avalia-se a exposição a doses repetidas. Difere da toxicidade aguda quanto (BRASIL, 2004):

- às espécies de animais usadas: ao menos duas mamíferas, sendo uma roedora e uma não-roedora – desprovidas de características genéticas especiais;
- ao número de animais: mínimo de 10 para roedores e 3 para não-roedores, de cada sexo;
- ao período de observação: assentado conforme o número de dias de uso do produto, por ano – varia de 4 a 12 semanas;
- às doses: no mínimo três, sendo uma com efeito terapêutico (menor dose), uma que produza um efeito adverso detectável (maior dose), limitada pelo volume da dose, e uma dose intermediária, por exemplo, a média geométrica entre a dose maior e menor dose;
- aos parâmetros a serem observados: além dos da toxicidade aguda incluem-se o hemograma completo e análises bioquímicas de sangue (sódio, potássio, gama-glutamiltanspeptidase, aminotransferases, fosfatase alcalina, uréia, creatinina, ácido úrico, colesterol, triglicerídeos, glicose, proteínas totais e bilirrubina);
- aos exames histopatológicos: que passam a ser obrigatórios nos animais tratados com a maior dose, sendo o material retirado desses animais, mantido em estado de conservação por até cinco anos.

2.5.3. Citotoxicidade

Citotoxicidade pode ser definida como a propriedade nociva de uma substância em relação às células. Na maioria das vezes, avalia-se a citotoxicidade basal que é o resultado da interferência em estruturas (permeabilidade de membrana e lise celular) e/ou processos celulares essenciais para a sobrevivência, proliferação e/ou função comum a todas as células do organismo, ou seja, as funções celulares basais (MARTINS *et al.* 2009).

Nas pesquisas de novos compostos ou de compostos de atividade desconhecida, a citotoxicidade, é utilizada como uma ferramenta à análise de biocompatibilidade através de estudos *in vitro*. Deste modo, pode-se avaliar o comportamento celular (frente aos compostos

estudados) em meio controlado e livre de interações entre os sistemas dos organismos, sendo um método de fácil execução, rápido, reprodutível e de baixo custo (MARTINS *et al.* 2009).

Além disso, os ensaios citotoxicológicos permitem a seleção de substâncias a serem testadas em modelos *in vivo* (animais), reduzindo assim a quantidade dos mesmos, o que torna-se interessante posto que a comunidade científica preconizam experimentos toxicológicos que primem pela redução do número de animais na busca do princípio dos 3 ERRES: substituição (*replacement*) de experimentos que utilizam animais por outro que não necessitem, a redução (*reduction*) do número de animais e o refinamento (*refinement*) com a diminuição da severidade dos processos (BEDNARCZUK *et al.* 2010; VALADARES, 2006).

O parâmetro referente à avaliação de citotoxicidade denomina-se concentração letal média (Cl₅₀) e geralmente é obtido em ensaios que envolvem culturas de linhagens celulares como fibroblastos murinos, melanoma e adenocarcinoma gástrico humano (método de difusão em ágar e de incorporação do vermelho neutro, por exemplo) ou mesmos nos testes de hemólise em eritrócitos animais ou humanos, em placas de ágar sangue (formação de halos); análise visual ou com auxílio de espectrofotômetros, na região do ultravioleta (ANVISA, 2003; YAMAGUCHI *et al.* 2013).

3. REFERÊNCIAS

ADEDAPO, A. ADEWUYI, T.; SOFIDIYA, M. Phytochemistry, anti-inflammatory and analgesic activities of the aqueous leaf extract of *Lagenaria breviflora* (Cucurbitaceae) in laboratory animals. **Revista de Biologia Tropical**, v.61, p.281-290, 2013.

AGRA, M. F.; FREITAS, P.F.; BARBOSA-FILHO, J.M. Synopsis of the plants known as medicinal and poisonous in Northeast of Brazil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.17, p.114-140, 2007.

ALVES, E.G.; VINHOLIS, A.H.C.; CASEMIRO, L.A.; FURTADO, N.A.J.C.; SILVA, M.L.A.; CUNHA, W.L.; MARTINS, C.H.G. Estudo comparativo de técnicas de *screening* para avaliação da atividade antibacteriana de extratos brutos de espécies vegetais e de substâncias puras. **Química Nova**, v.31, n.º.5, p.1224-1229, 2008.

ALVES, N.M. **Estudo farmacognóstico e da toxicidade experimental (aguda e subaguda) do extrato etanólico da casca do guatambu (*Aspidosperma subincanum* Mart.)**. 2007. 73f. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) – Universidade de Brasília, Brasília, Distrito Federal.

ALZUGARAY, C.; CARNEVALE, N.J.; SALINAS, A.R.; PIOLI, R. Factores bióticos y abióticos que afectan la calidad de las semillas de *Shinopsis balansae* Engl. y *Aspidosperma quebrocho-blanco* Schl. **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 24, n. 1, p. 142- 147, 2007.

ANVISA - AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Guia para avaliação de segurança de produtos cosméticos. Brasília. 2003.

ANVISA - AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Manual *Clinical and Laboratory Standards Institute* - CLSI (antigo NCCLS). Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/servicosaude/manuais/clsi.asp>. Acessado em: 20/12/2012.

ANVISA - AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Módulo 2: Interpretação de dados microbiológicos. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/servicosaude/controlere/rede_rm/cursos/atm_racional/modulo2/metodos2.2.htm. Acessado em: 15/09/2013.

ANVISA - AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Módulo 3: Resistência microbiana – Mecanismos e impacto clínico. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/servicosaude/controlere/rede_rm/cursos/rm_controlere/opas_web/modulo3/gramp_staphylo.htm. Acessado em 05/01/2014.

ASSINI, F.L.; FABRÍCIO, E.J.; LANG, K.L. Efeitos farmacológicos do extrato aquoso de *Solidago chilensis* Meyen em camundongos. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.15, n.1, p.130-134, 2013.

BALANDRIN, M.F.; KINGHORN, D.; FARNSWORTH, N.R. (1993), “Plant-Derived Natural Products in Drug Discovery and Development”, in BALANDRIN, M. F. et al., *Human Medicinal Agents from Plants Kinghorn, ACS Symposium Series 534*, p.2-12.

BARCHUK, A.H. , M.P. Regeneration and structure of *Aspidosperma quebracho-blanco* Schl. In the Arid Chaco (Córdoba, Argentina). **Forest Ecology and Management**, v. 118, n. 1 p. 31- 36, 1999.

BARROS, F.C.; SAGATA, E.; FERREIRA, L.C.C.; JULIATTI, F.C. Indução De Resistência Em Plantas Contra Fitopatógenos. **Bioscience Journal**, v.26, n.2, p.231-239, 2010.

BARROS, F.E.V.; SOUSA, M.G.T.; COSTA, J.L.; OLEA, R.S.G.; FREIRE, S.M.F.; BORGES, A.C.R.; BORGES, M.O.R. Avaliação das atividades analgésica e antiinflamatória do extrato metanólico de *Calotropis procera*, R. Br. (ciúme). **Infarma**, v.16, n.9-10, p.60-64, 2004.

BAUER, A.W., KIRBY E. M. Antibiotic Susceptibility Testing by Standardized Single Disk Method. **American Journal of Clinical Pathology**, v.45, p.493-496, 1966.

BEDNARCZUK, V.O.; Verdam, M.C.S.; Miguel, M.D.; Miguel, O.G. Testes in vitro e in vivo utilizados na triagem toxicológica de produtos naturais. **Visão Acadêmica**, v.11, n.2, p.43-50, 2010.

BENINI, E. B.; SARTORI, M.A.B.; BUSCH, G.C.; REMPEL, C.; SCHULTZ, G.; STROHSCHOEN, A.A.G. Valorização da flora nativa quanto ao potencial fitoterápico. **Revista Destaques Acadêmicos**, n.3, p.11-17, 2010.

BENTO-SILVA, M.T.; SANTOS, M.A.P; ALMEIDA, F.R.C. Treinamento físico de intensidade leve diminui nocicepção induzida por estímulos térmico e químico em ratos. **Brazilian Journal of Biomotricity**, v.4, n.1, p.14-23, 2010.

BERTOLINI, G.R.F.; MATOS, C.M.P; ARTIFON, E.L.; FERRARI, D.; VITURI, R.F. Functional assessment of knee nociception of rats treated with low-level laser therapy and swimming. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**. v.17, n.1, p.45-48, 2011.

BHARTI, S.; VIJAYA, K. Extraction of tannin by *Terminalia bellirica* (Gaertner) roxb seed from different provenances. **Journal of Phytology**, v.4, n.6, p.9-13, 2012.

BODOKI, E.; OPREAN, R.; VLASE, L.; TAMAS, M.; SANDULESCU, R. Fast determination of colchicine by TLC-densitometry from pharmaceuticals and vegetal extracts. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.37, p.971–977, 2005.

BORELLA, J.C.; CARVALHO, D.M.A.; TEIXEIRA, J.C.L.; RIBEIRO, N.S. Influência do processo extrativo nas propriedades físico-químicas dos extratos de *Calendula officinalis* (asteraceae). **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. IX, n.2, 25 - 36, 2012.

BOTHAM, P. A. Acute systemic toxicity – prospects for tiered testing strategies. **Toxicology in Vitro**, v.18, p.227-230, 2004.

BRAOIOS, A.; PEREIRA, A.C.S.; BIZERRA, A.A.; POLICARPO, O.F.; SOARES, N.C.; BARBOSA, A.S. Uso de antimicrobianos pela população da cidade de Jataí (GO), Brasil. **Ciência & Saúde Coletiva**, v.18, n.10, p.3055-3060, 2013.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Formulário de Fitoterápicos da Farmacopeia Brasileira**. 1ª ed. Brasília: Anvisa, 2011.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa). **Resolução – RE nº90/2004. Normas para estudos toxicológicos de produtos fitoterápicos**. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Poder Executivo, Brasília, DF, 16 de março de 2004.

BRASIL. **Farmacopéia Brasileira**. 5ª ed. Brasília: Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2010.

BRASÍLIA. A Fitoterapia no SUS e o Programa de Pesquisas de Plantas Medicinais da Central de Medicamentos. Brasília, 2006.

BRITO, M.A.; CORDEIRO, B.C. Necessidade de novos antibióticos. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**. v.48, n.4, p.247-249, 2012.

BRUNTON, L.L. **Goodman & Gilman - As Bases Farmacológicas da Terapêutica**. 12. ed. Rio de Janeiro: McGraw Hill, 2012.

CABRAL, A.B.; MELO, R.C.; MACIEL, M.A.; LOPES A.C. Multidrug resistance genes, including *bla_{KPC}* and *bla_{CTX-M-2}*, among *Klebsiella pneumoniae* isolated in Recife, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.45, n.5, p.572-578, 2012.

CAMPOS, L.F.A.; AMORIM, L.V.; FERREIRA, H.C. Utilização do planejamento experimental no estudo do efeito da composição de misturas de bentonitas na reologia de fluidos de perfuração. Parte I: composições binárias. **Cerâmica**, v.52, p.69-75, 2006.

CARRARO-EDUARDO, J.C.; GAVA, I.A. O uso de vacinas na profilaxia das infecções do trato urinário. **Jornal Brasileiro de Nefrologia**, v.34, n.2, p.178-183, 2012.

CARVALHO, C.; ALVES, N.C.; MONTEIRO, A.C.; PELÓGIA, N.C.C. Efeito antinociceptivo e anti-inflamatório do *Agaricus blazei* Murill em ratos submetidos ao teste da formalina modificado. **Revista Dor**, v.12, n.1, p.50-53, 2011.

CARVALHO, J.L.S.; CUNICO, M.M.; DIAS, J.F.G.; MIGUEL, M.D.; MIGUEL, O.G. Termoestabilidade de processos extrativos de *Nasturtium officinale* R. Br., Brassicaceae por sistema soxhlet modificado. **Química Nova**, v.32, n.4, p.1031-1035, 2009.

CASTILHOS, T.S.; GIORDANI, R.B.; HENRIQUES, A.T.; MENEZESF.S.; ZUANAZZI, J.A.S. Avaliação in vitro das atividades antiinflamatória, antioxidante e antimicrobiana do alcalóide montanina. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.17, n.2, p.209-214, 2007.

CASTRO, R.J.A.; LEAL, P.C.; SAKATA, R.K. Pain Management in Burn Patients. **Revista Brasileira de Anestesiologia**, v.63, n.1, p.149-158, 2013.

CATÃO, R. M. R.; BARBOSA-FILHO, J.M.; GUTIERREZ, S.J.C.; LIMA, E.O.L.; PEREIRA, M.S.V.; ARRUDA, T.A.; ANTUNES, R.M.P. Avaliação da Atividade Antimicrobiana de Riparinas sobre Cepas de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* Multirresistentes. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, v.37, n.4, p.247-249, 2005.

CECHINEL FILHO, V.; YUNES, R.A. Estratégias para a obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais. Conceitos sobre modificação estrutural para otimização da atividade. **Química Nova**, v.21, n.1, p. 99-105, 1997.

CECHINEL FILHO, V. Principais avanços e perspectivas na área de produtos naturais ativos: estudos desenvolvidos no Niqfar/Univali, **Química Nova**, v.23, n.5, p.680-685, 2000.

CHANDRA, S.; DE MEJIA GONZALEZ, E. Polyphenolic Compounds, Antioxidant Capacity, and Quinone Reductase Activity of an Aqueous Extract of *Ardisia compressa* in Comparison to Mate (*Ilex paraguariensis*) and Green (*Camellia sinensis*) Teas. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.52, p. 3583, 2004.

CLINICAL LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). Methods for dilution antimicrobial susceptibility test for bacteria that grow aerobically, seventh edition. Approved standard M7-A8. CLSI, Wayne, PA, 2009.

COLLIER, H.O.; DINNEEN, J.L.C.; JOHNSON, C.A.; SCHNEIDER, C. The abdominal constriction response and its suppression by analgesic drugs in the mouse. **British Journal of Pharmacology Chemother**, v.32, p.295-310, 1968.

CORDEIRO, C.H.G.; SACRAMENTO, L.V.S.; CORRÊA, M.A.; PIZZOLITTO, A.C.; BAUAB, T.A. Análise farmacognóstica e atividade antibacteriana de extratos vegetais empregados em formulação para a higiene bucal. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v.42, n.3, p.395-404, 2006.

CORTES, M.L.; CASTRO, M.M.C.; JESUS, R.P.; NETO, J.A.B.; KRAYCHETE, D.C. Uso de terapêutica com ácidos graxos ômega-3 em pacientes com dor crônica e sintomas ansiosos e depressivos. **Revista Dor**, v.14, n.1, p.48-51, 2013.

COSTA, J.P.; LOURENÇO, N.V.L.; SANTOS, C.C.M.P.; TOMÉ, A.R.; SOUSA, G.F.; SOUSA, D.P.; ALMEIDA, R.N.; FREITAS, R.M. Avaliação da toxicidade aguda e das alterações histopatológicas em camundongos tratados com fitol. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v.33, n.3, p.421-428, 2012.

CUNHA, L.C.; MELO, D.F.A.; PEREIRA, M.E.; MELO, D.S.; PARENTE, L.L.; SILVA, M.A.C.; CONCEIÇÃO, E.D.; GONZAGA, L.Q.S. Avaliação da toxicidade aguda do extrato aquoso de *Apeiba tibourbou* Aubl (Tiliaceae), em camundongos e ratos. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v.34, n.3, p.357-352, 2013.

CZELUSNIAK, K.E.; BROCCO, A.; PEREIRA, D.F.; FREITAS, G.B.L. Farmacobotânica, fitoquímica e farmacologia do Guaco: revisão considerando *Mikania glomerata* Sprengel e *Mikania laevigata* Schulyz Bip. ex Baker. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.14, n.2, p.400-409, 2012.

DAVID, M.Z.; DAUM, R.S. *Staphylococcus aureus*: Epidemiologia e conseqüências clínicas de uma epidemia emergente. **Clinical Microbiology Reviews**, v.23 n.3, p.616-687, 2010.

ETHUR, L.Z.; JOBIM, J.C.; RITTER, J.G.; OLIVEIRA, G.; TRINDADE, B.S. Comércio formal e perfil de consumidores de plantas medicinais e fitoterápicos no município de Itaqui – RS. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.13, n.2, p.121-128, 2011.

FERREIRA, T.R.; FILHO, S.B.; BORGATTO, A.F.; LOPES, L.C. Analgésicos, antipiréticos e anti-inflamatórios não esteroides em prescrições pediátricas. **Ciência & Saúde Coletiva**, v.18, n.12, p.3695-3704, 2013.

FLORENTINO, I.F.; NASCIMENTO, M.V.; GALDINO, P.M.; BRITO, A.F.; ROCHA, F.F.; TONUSSI, C.R.; LIMA, T.C.; PAULA, J.R.; COSTA, E.A. Evaluation of analgesic and anti-inflammatory activities of *Hydrocotyle umbellata* L., Araliaceae (acariçoba) in mice. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v.85, n.3, p.987-997, 2013.

FONSÊCA, S. G. C. **Farmacotécnica de Fitoterápicos**. 1ª ed. Fortaleza/Ceará: Universidade Federal do Ceará, 2005.

GIL-CHÁVEZ, G.J.; VILLA, J.A.; AYALA-ZAVALA, J.F.; HEREDIA, J.B.; SEPULVEDA, D.; YAHIA, E.M.; GONZÁLEZ-AGUILAR, G.A. Technologies for Extraction and Production of Bioactive Compounds to be Used as Nutraceuticals and Food Ingredients: An Overview. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 12, p.5-23, 2013.

GOBBO-NETO, L.; LOPES, N.P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química Nova**, v.30, n.2, p.374-381, 2007.

HANDA, S.S. **Extraction Technologies for Medicinal and Aromatic Plants**. 1ª ed. Trieste/Italy: United Nations Industrial Development Organization and the International Centre for Science and High Technology, 2008.

HEMWIMOL, S.; PAVASANT, P.; SHOTIPRUK, A. Ultrasound-assisted extraction of anthraquinones from roots of *Morinda citrifolia*. **Ultrasonics Sonochemistry**, v.13, p.543–548, 2006.

ISAAC, V.L.B.; CEFALI L.C.; CHIARI, B.G.; OLIVEIRA, C.C.L.G.; SALGADO H.R.N.; CORRÊA, M.A. Protocolo para ensaios físico-químicos de estabilidade de fitocosméticos. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica Aplicada**, v.29, n.1, p.81-96, 2008.

IWALEWA, E.O.; MCGAW, L.J.; NAIDOO, V.; ELOFF, J.N. Inflammation: the foundation of diseases and disorders. A review of phytomedicines of South African origin used to treat pain and inflammatory conditions. **African Journal of Biotechnology**, v.6, n.25, p.2868-2885, 2007.

JÁCOME, R.L.R.P. SOUZA, R.A.; OLIVEIRA, A.B. Comparação Cromatográfica entre o extrato de *Aspidosperma parvifolium* e o fitoterápico “pau-pereira”. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 13, n. 1, p. 39- 41, 2003.

KARVAT, J.; MEIRELES, A.; ROCHA, B.P.; ROSA, C.T.; SILVA, L.I.; BERTOLINI, G.R.F. Efeitos das Correntes diadinâmicas de Bernard sobre a nociceptividade e edema no trauma tendíneo de ratos. **Revista Fisioterapia em Movimento**, v.26, n.3, p.617-622, 2013.

KAUR, K.; JAIN, M.; KAUR, T.; JAIN, R. Antimalarials from nature. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 17, n. 1, p. 3229- 3256, 2009.

KLAUMANN, P.R.; WOUK, A.F.P.F.; SILLAS, T. Patofisiologia da dor. **Archives of Veterinary Science**, v.13, n.1, p.1-12, 2008.

KONEMAN, E.W. Diagnóstico Microbiológico: texto e atlas colorido. 6 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008. 1565p.

LAGOS, J.B.; GEMIN, G.A.B.; DIAS, J.F.G.; MIGUEL, M.D.; CAMPOS, R.; CARVALHO, J.L.S.; DUARTE, M.R.; MIGUEL, O.G. Contribution to the Study of Phytosterols and Phenolics from the Barks and Leaves of the *Trichilia catigua* A. Juss. Meliaceae. **Journal of Analytical Sciences, Methods and Instrumentation**, v. 2, p.37-41, 2012.

LIMA, L.R.; CAVALCANTE, R.R.L.; MARTINS, M.C.C.; PARENTE, D.M.; CAVALCANTE, A.A.M.C. Avaliação da atividade antiedematogênica, antimicrobiana e

mutagênica das sementes de *Amburana cearensis* (A. C. Smith) (Imburana-de-cheiro).

Revista Brasileira de Plantas Mediciniais, v.15, n.3, p.415-422, 2013.

LIMA, M.C.J.S.; SOTO-BLANCO, B. Poisoning in goats by *Aspidosperma pyrifolium* Mart.: Biological and cytotoxic effects. **Toxicon**, v. 55, n. 1, p. 320- 324, 2010.

LOPATA, V.J.; GARDONI, B.L.K. NOWACKI, L.; RIBEIRO, C.N.M., SOUZA, W.M. Triagem fitoquímica e atividade antimicrobiana da *Stachytarpheta cayennensis* – Gervão (L.C. Ich) Vahl. **Revista Eletrônica de Biociências, Biotecnologia e Saúde**, n.2, 2011.

LUCENA, R.B.; RISSI, D.R.; MAIA, L.A.; FLORES, M.M.; DANTAS. A.F.M.; NOBRE, V.M.T.; RIET-CORREA, F.; BARROS, C.S.L. Intoxicação por alcaloides pirrolizidínicos em ruminantes e equinos no Brasil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.30, n.5, p.447-452, 2010.

MAIA, G.N. **Caatinga: árvores, arbustos e suas utilidades**, 1ª ed. São Paulo: editora G&Z Computação Gráfica e Editora, 2004.

MAIA-ARAÚJO, Y.L.F.; MENDONÇA, L.S.; ORELLANA, S.C.; ARAUJO, E.D. Comparação entre duas técnicas utilizadas no teste de sensibilidade antibacteriana do extrato hidroalcoólico de própolis vermelha. **Scientia Plena**, v.7, n.4, p.1-4, 2011.

MAKKAR, H.P.S.; BECKER, K. Vanillin-HCl method for condensed tannins: Effect of organic solvents used for extraction of tannins. **Journal of Chemical Ecology**, v.19, n.4, 1993.

MAKKAR, H.P.S.; SIDDHURAJU, P.; BECKER, K. **Plant Secondary Metabolites**. Totowa, New Jersey: Humana Press, 2007.

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

MARQUES, M.F.S.; KATO, L.; FILHO, H.F.L.; REIS, F.A.M. Indole alkaloids from *Aspidosperma ramiflorum*. **Phytochemistry**, v. 41, n. 3, p. 963- 967, 1996.

MARSHALL, J.H.; WILMOTH, G.J. Pigments of *Staphylococcus aureus*, a Series of Triterpenoid Carotenoids. **Journal of Bacteriology**, v.147, n.3, p. 900-913, 1981.

MARTINS, M. B. G. CARAVANTE, A.L.C; APPEZZATO-DA-GLÓRIA, B; SOARES, M.K.M; MOREIRA, R.R.D; SANTOS, L.E. Caracterização anatômica e fitoquímica de folhas e rizomas de *Hedychium coronarium* J. König (Zingiberaceae). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.12, n.2, p.179-187, 2010.

MARTINS, M.D.; MARQUES, M.M.; BUSSADORI, S.K.; MESQUITA-FERRARI, R.A.; PAVESI, V.C.S.; WADI, N.S.; FERNANDES, K.P. Citotoxicidade *in vitro* de extratos de arnica brasileira (*Solidago microglossa*) e arnica paulista (*Porophyllum ruderale*). **ConScientiae Saúde**, v.8, n.1, p.99-104, 2009.

MEDA, A.; LAMIENA, C.E.; ROMITOB, M.; MILLOGOC, J.; NACOUMLAA, O.G. Determination of the total phenolic, flavonoid and proline contents in Burkina Fasan honey, as well as their radical scavenging activity. **Food Chemistry**, v.91, p.571-577, 2005.

MEDEIROS, A.A.N.; MEDEIROS, F.A.; QUEIROZ, T.M.; TAVARES, J.F.; SILVA, M.S.; MEDEIROS, I.A. Effects of extract, fractions and 2,3-dihydromyricetin-3-O- α -L-rhamnoside from *Pradosia huberi* (Ducke) Ducke on rat isolated mesenteric arteries. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.20, n.4, p.542-548, 2010.

MIGLIATO, K.F.; CORRÊA, M.A.; SALGADO, H.R.N.; TOGNOLLI, J.O.; SACRAMENTO, L.V.S.; MELLO, J.C.P.; GIANNINI, M.J.S.M.; ALMEIDA, A.M.F.; PIZZOLITTO, A.C. Planejamento experimental na otimização da extração dos frutos de *Syzygium cumini* (L.) Skeels. **Química Nova**, v.34, n.4, p.695-699, 2011.

MIN, Gao; CHUN-ZHAO Lu. Comparison of techniques for the extraction of flavonoids from cultured cells of *Saussurea medusa* Maxim. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v.21, p.1461–1463, 2005.

MORAES, G.M.; COHRS, F.M.; BATISTA, R.E.A.; GRINBAUM, R.S. de Infecção ou colonização por micro-organismos resistentes: identificação de preditores. **Acta Paulista de Enfermagem**, v.26, n.2, p.185-191, 2013.

MOREIRA, J.; KLEIN-JÚNIOR, L.C.; CECHINEL, F.V.; CAMPOS, B.F. Anti-hyperalgesic activity of corilagin, a tannin isolated from *Phyllanthus niruri* L. (Euphorbiaceae). *Journal of Ethnopharmacology*, v.146, p.318-323, 2013.

MOTTA, E.V.S.; PINTO, N.C.C.; DUQUE, A.P.N.; MENDES, R. F.; BELLOZI, P.M.Q.; SCIO, E. Atividades antioxidante, antinociceptiva e anti-inflamatória das folhas de *Mucuna pruriens* (L.) DC. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.15, n.2, p.264-272, 2013.

NAVARRO, D. F. **Estudo químico, biológico e farmacológico das espécies *Allamanda blanchetti* e *Allamanda schottii* para a obtenção de frações e moléculas bioativas de potencial terapêutico**. 2005. 293 f. Tese (Doutorado em Química) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Santa Catarina.

NORDMANN, P.; CUZON, G.; NAAS, T. The real threat of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing bactéria. **The Lancet Infectious Diseases**, v.9, p.228-236, 2009.

OFFER, A.C.M.; SAUVAIN, M.; VALENTIN, A.; CALLAPA, J.; MALLIÉC, M.; ZÈCHES-HANROTA.M. Antiplasmodial activity of *Aspidosperma* indole alkaloids. **Phytomedicine**, v. 9, n. 1, p. 142-145, 2002.

OLIVEIRA, D.C.; ISAIAS, R.M.S. Cytological and histochemical gradients induced by a sucking insect in galls of *Aspidosperma australe* Arg. Muell (Apocynaceae). **Plant Science**, v. 178, n. 1, p. 350- 358, 2010.

OLIVEIRA, K.A.M.; OLIVEIRA, G.V.; Batalini, C.; ROSALEM, J.A.; RIBEIRO, L.S. Atividade antimicrobiana e quantificação de Flavonoides e Fenóis totais em diferentes extratos de Própolis. **Semina: Ciências Biológicas e da Saúde**, v.33, n.2, p.211-222, 2012.

OOTANI, M.A.; AGUIAR, R.W.; RAMOS, A.C.C.; BRITO, D.R.; SILVA, J.B.; CAJAZEIRA, J.P. Use of Essential Oils in Agriculture. **Journal of Biotechnology and Biodiversity**, v.4, n.2, p.162-174, 2013.

Organisation for Economic Cooperation and Development - OECD. Guidelines for the Testing of Chemicals, OECD 423. Acute Oral Toxicity-Acute Toxic Class Method. Paris: Organisation for Economic Cooperation and Development; 2001.

PACKER, J.F., LUZ, M.M.S. Método para avaliação e pesquisa da atividade antimicrobiana de produtos de origem natural. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.17, n.1, p.102-107, 2007.

QUEIROZ, M.A. Recursos Genéticos Vegetais da Caatinga para o Desenvolvimento do Semiárido Brasileiro. **Revista Brasileira de Geografia Física**, v.6, p.1135-1150, 2011.

PEIXOTO, M. P. G. **Saponinas dos frutos de *ilex paraguariensis* a. St. Hil. (mate): desenvolvimento de metodologia analítica, estudo físicoquímico e biológico.** 2009. 153 f. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Rio grande do Sul.

PEREIRA, M.M.; JÁCOME, R.L.R.P.; ALCÂNTARA, A.F.C.; ALVES, R.B.; RASLAN, D.S. Alcaloides indólicos isolados de espécies do gênero *aspidosperma* (Apocynaceae). **Química Nova**, v. 30, n.4, p.970-983, 2007.

PEREIRA, R.J.; CARDOSO, M.G. Vegetable secondary metabolites and antioxidants benefits. **Journal of Biotechnology and Biodiversity**, v.3, n.4, p.146-152, 2012.

PEREZ, N.M.; TORRICO, F.B.; MORALES, A. Acute toxicity, anti-nociceptive activity and indole alkaloids of aqueous extract from bark of *Aspidosperma cuspa* (Kunth) Blake. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 143, n. 2, p. 599- 603, 2012.

PICOLI, S.U. Metalo- β -lactamase e *Pseudomonas aeruginosa*. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, v.40, n.4, p.273-277, 2008.

RABELO, M.A.; BEZERRA NETO, A.M.; SILVA, E.C.B.F.; OLIVEIRA, W.L.M.; MELO, F.L.; LOPES, A.C.S.; LEAL, N.C.; MACIEL, M.A.V. Phenotypic methods for determination of methicillin resistance in *Staphylococcus spp.* from health care workers. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v.49, n.2, p 91-96, 2013.

RODRIGUES, J.A.G.; VANDERLEI, E.S.O.; QUINDERÉ, A.L.G.; MONTEIRO, V.S.; VASCONCELOS, S.M.M.; BENEVIDES, N.M.B. Antinociceptive activity and acute toxicological study of a novel sulfated polysaccharide from *Caulerpa cupressoides* var. *lycopodium* (Chlorophyta) in Swiss mice. **Acta Scientiarum. Technology**, v.35, n.3, p.417-425, 2013.

ROMANIK. G.; GILGENAST, E.; PRZYJAZNY, A.; KAMIŃSKI, M. Techniques of preparing plant material for chromatographic separation and analysis. **Journal of Biochemical and Biophysical Methods**, v.70, p.253–261, 2007.

SANTOS, A.P.B.; NASCIMENTO, M.F.S; SANTOS, F.S.E. **Guia de campo de árvores da caatinga.** v.1, p.16-17. Petrolina, Pernambuco. 2009.

SANTOS, D. S. **Avaliação do efeito anti-inflamatório do Toque Terapêutico no modelo experimental de edema de pata induzido por adjuvante Completo de Freund em camundongos.** 2011. 61 f. Tese (Doutorado em Enfermagem) – Escola de enfermagem da Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, São Paulo.

SANTOS, D.T.; ARAÚJO, M.O.P.H.; MALVEZZI, C.K.; OLIVEIRA, M.A.F.; SILVA, M.B.; SILVA, S.S. Utilização da metodologia de planejamento de experimentos para a melhoria da qualidade de vida. **Revista Analytica**, n.28, 2007.

SANTOS, F.M.; SIMÕES, J.C.; SILVA, J.R.A.; BARTHUS; R.C.; POPPI, R.J.; AMARAL, A.C.F. Otimização das condições de extração de saponinas em *ampelozizyphus amazonicus* usando planejamento experimental e metodologia de superfície de resposta. **Química Nova**, v.34, n.9, p.1629-1633, 2011.

SARAIVA, A.M.; SARAIVA, C.L.I; CORDEIRO, R.P.; SOARES, R.R.; XAVIER, H.S.; CAETANO, N. Atividade antimicrobiana e sinérgica das frações das folhas de *Schinopsis brasiliensis* Engl. frente a clones multirresistentes de *Staphylococcus aureus*. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.15, n.2, p.199-207, 2013.

SILVA, F.O.C.; MACEDO, D.V. Physical exercise, inflammatory process and adaptive condition: an overview. **Revista Brasileira de Cineantropometria & Desempenho Humano**, v.13, n.4, p.320–328, 2011.

SILVA, I. D. D.; ARAGÃO, C.F.S. Avaliação de parâmetros de extração da *Cinchona* Vahl por métodos farmacopéicos e não farmacopéicos. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.19 n.3, p.776-780, 2009.

SILVA, P.S.S.; LINHARES, J.F.P; MARQUES, M.O.M. Caracterização morfológica, perfil químico, atividade biológica e conservação in situ do gênero *Lychnophora* Mart. (Asteraceae: Vernonieae: Lychnophorinae), Brasil. **Biotemas**, v.26, n.2, p.9-18, 2013.

SILVEIRA, P.F.; BANDEIRA, M.A.M.; ARRAIS, P.S.D. Farmacovigilância e reações adversas às plantas medicinais e fitoterápicos: uma realidade. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.18, n.4, p.618-626, 2008.

SIMÕES, C.M.O. **Farmacognosia: da planta ao medicamento.** 5ª ed. Porto Alegre/Florianópolis: editora da UFRGS / editora da UFSC, 2004.

SKEIKA, T.; PESSOA, C.; FUJIWARA, S.T.; NAGATA, N. Otimização das condições de preparação de eletrodos à base de carbono cerâmico utilizando-se planejamento fatorial. **Química Nova**, v.33 n.3, 2010.

SOUSA, O.V.; DEL VECHIO VIEIRA, G.; ALMEIDA, B.H.; MIRANDA, M.A.; FILGUEIRAS, R.C.; CAMPOS, A.C.; SILVERIO, M.S. Efeitos farmacológicos e toxicológicos do extrato de *Posoqueria acutifolia* Mart. (Rubiaceae) em roedores. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v.28, n.1, p.51-56, 2007.

SOUZA, A.P.T.B.; BARNI, S.T.; FERREIRA, R.A.; COUTO, A.G. Desenvolvimento Tecnológico de Soluções Extrativas Hidroetanólicas das Flores de *Calendula officinalis* L. Empregando Planejamento Fatorial. **Latin American Journal of Pharmacy**, v.29, n.1, p.13-21, 2010.

SOUZA, I.A.; SANTOS, T.B.F. Abordagem do perfil fitoquímico e avaliação da atividade antimicrobiana de *Aspidosperma pyriforme* Mart. **XIX Congresso de Iniciação Científica da UFPE**, 2011.

SOUZA, T. M.; SEVERI, J.A.; SILVA, V.Y.A.; SANTOS, E.; PIETRO, R.C.L.R. Bioprospecção de atividade antioxidante e antimicrobiana da casca de *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville (Leguminosae-Mimosoidae). **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v.28, n.1, p. 221-226, 2007.

SREEVIDYA, N.; MEHROTRA, S. Spectrophotometric Method for Estimation of Alkaloids Precipitable with Dragendorff's Reagent in Plant Materials. **Journal of AOAC International** v.86, n.6, 2003.

TAVARES, C.; SAKATA, R.K. Cafeína para o Tratamento de Dor. **Revista Brasileira de Anestesiologia**, v.62, n.3, p.387-401, 2012.

TAVEIRA, J.J. Indole alkaloids from *Aspidosperma pruinosum*. **Phytochemistry**, v. 31, n. 7, p. 2507- 2511, 1992.

TOMA, M.; PANIWNKY, L.; MASON, T.J. investigation of the effects of ultrasound on vegetal tissues during solvent extraction. **Ultrasonics Sonochemistry**, v.8, p.137-142, 2001.

TORTORA, G. J. et al. **Microbiologia**. 10. ed. São Paulo: Artmed, 2012.

TRABULSI, L. R. et al. **Microbiologia**. 5. ed. Rio de Janeiro: Atheneu, 2008.

TRESVENZOL, L.M.F.; PARENTE, L.M.L.; LINO JÚNIOR, R.S.; FIUZA, T.S.; BARA, M.T.F.; CUNHA, L.C.; LAXOR, L.P.; MIGUEL, M.P.; PAULA, J.R. Avaliação da toxicidade aguda e da atividade cicatrizante dos extratos etanólicos das folhas e raízes da *Memora nodosa* (Silva Manso) Miers (Bignoniaceae). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.15, n.3, p.423-430, 2013.

TUON, F.F.; ROCHA, J.L.; TOLEDO, P.; AREND, L.N.; DIAS, C.H.; LEITE, T.M.; PENTEADO-FILHO, S.R.; PILONETTO, M.; ZAVASCKI, A.P. Risk factors for KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* bacteremia. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v.16, n.5, p.416–419, 2012.

VALADARES, M.C. Acute toxicity evaluation: strategies post “DL₅₀ test era”. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v.3, n.2, p.93-98, 2006.

VEIGA-JUNIOR, V. F. Estudo do consumo de plantas medicinais na Região Centro-Norte do Estado do Rio de Janeiro: aceitação pelos profissionais de saúde e modo de uso pela população. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.18, n.2, p.308-313, 2008.

VERRI JR, W. A. et al. Cytokine Inhibitors and Pain Control. *Revista Brasileira de Reumatologia*, v 47, n.5, p.341-353, 2007.

VICENTINI, F.C.; FIGUEIREDO-FILHO, L.C.S.; JANEGITZ, B.C.; SANTIAGO, A.; PEREIRA-FILHO, E.R.; FATIBELLO-FILHO, O. Planejamento fatorial e superfície de resposta: otimização de um método voltamétrico para a determinação de ag(i) empregando um eletrodo de pasta de nanotubos de carbono. **Química Nova**, v.34, n.5, 2011.

VIEIRA, M. N. LEITÃO, S.G.; PORTO, P.C.; OLIVEIRA, D.R.; PINTO, S.C.; BRAZ-FILHO, R; LEITÃO, G.G. Application of pH-zone-refining countercurrent chromatography for the separation of indole alkaloids from *Aspidosperma rigidum* Rusby. **Journal of Chromatography A**, v. 13, n. 19, p. 166- 171, 2013.

WÓJCIAK-KOSIOR, M. ; SOWA, I.; KOCJAN, R.; NOWAK, R. Effect of different extraction techniques on quantification of oleanolic and ursolic acid in *Lamii albi flos*. **Industrial Crops and Products**. v.44, p.373-377, 2013.

XIN-SHENG, W.; WU, Y.F.; DAI, S.L.; CHEN, R.; SHAO, Y. Ultrasound-assisted extraction of geniposide from *Gardenia jasminoides*. **Ultrasonics Sonochemistry**, v.19, p.1155–1159, 2012.

YAMAGUCHI, K.K.L.; VEIGA-JUNIOR, V.F.; PEDROSA, T.N.; VASCONCELLOS, M.C.; LIMA, E.S. Atividades biológicas dos óleos essenciais de *endlicheria citriodora*, uma lauraceae rica em geranato de metila. **Química Nova**, v.36, n.6, p.826-830, 2013.

YINSHI, S.; LIU, Z.; WANG, J.; YANG, S.; LI, B.; XU, N. et al. Aqueous ionic liquid based ultrasonic assisted extraction of four acetophenones from the Chinese medicinal plant *Cynanchum bungei* Decne. **Ultrasonics Sonochemistry**, v.20, p.180–186, 2013.

ZANUSSO-JUNIOR, G. MELO, J.O.; ROMERO, A.L.; DANTAS, J.A.; CAPARROZ-ASSEF, S.M.; BERSANI-AMADO, C.A.; CUMAN, R.K.N. Avaliação da atividade antiinflamatória do coentro (*Coriandrum sativum* L.) em roedores. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.13, n.1, p.17-23, 2011.

ZIZOVIC, I.; IVANOVIC, J.; MISIC, D.; STAMENIC, M.; DJORDJEVIC, S.; KUKIC-MARKOVIC, J.; PETROVIC, S.D. SFE as a superior technique for isolation of extracts with strong antibacterial activities from lichen *Usnea barbata* L. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 72, p.7-14, 2012.

CAPÍTULO 1

MESSIADES, Davy Macgyver da Silva. **Processamento e métodos extrativos de plantas medicinais: um estudo de revisão**. Campina Grande, PB: UEPB, 2014. (Dissertação – Mestrado em Ciências Farmacêuticas).

RESUMO

No estudo da avaliação biológica, toxicológica e/ou fitoquímica das plantas medicinais, a escolha do melhor método de secagem e de moagem, e mesmo a seleção do solvente e da técnica extrativa são vistas, geralmente, apenas como ferramentas. Esse pensamento leva os pesquisadores a cometerem erros que acarretam na perda de compostos naturais e, conseqüentemente, de uma ou mais atividades biológicas das plantas estudadas, resultando na perda de tempo e dinheiro. Deste modo, essa revisão aborda informações sobre alguns dos segmentos que compõe o processo extrativo de plantas medicinais, baseando-se em informações obtidas de artigos de coletados dos bancos de dados como o Google Acadêmico, Science Direct, Scielo, Scopus e Medline, entre os anos de 1990 e 2013. Os cuidados com a secagem reduzem a chances de contaminação biológica, enquanto que, uma moagem bem executada favorece a extração de compostos. Além disso, controle sobre variáveis como temperatura e pressão são essenciais tanto ao processo extrativo, quanto preservação dos compostos extraídos. Ainda, a escolha de solventes com polaridades semelhantes a dos compostos que se deseja extrair é tão importante quanto à preferência por uma ou outra técnica extrativa. Metodologias mais complexas e modernas (extração acelerada por solvente, micro-ondas, ultrassom e turbólise) ou as consagradas (maceração, soxhlet e percolação) nem sempre são as melhores escolhas, cabendo essa decisão ao bom senso do pesquisador e à necessidade de cada pesquisa.

Palavras-chave: Solvente, Temperatura, Pressão, Farmacopeica, Secagem, Moagem.

ABSTRACT

In the study of biological, toxicological and/or phytochemistry evaluation of medicinal plants, the choose of the best method of drying and grinding, and even the selection of the solvent and extraction technique are seen usually only as tools. This thought leads researchers to make mistakes that cause loss of natural compounds and, consequently, one or more biological activities of the studied plants, resulting in loss of time and money. Thus, this review approaches information about some of theses segments that composse the extraction process of medicinal plants, based on information from articles collected from databases like Google Scholar, Science Direct, SciELO, Scopus and Medline, among years 1990 and 2013. The care with drying reduce the chance of biological contamination while that, a well-executed grinding increases the extraction of compounds. Furthermore, control over variables such as temperature and pressure are essential to both the extraction process and the preservation of the extracted compounds. Still, the choice of solvents with similar polarities to the compounds that you want to extract is as important as the preference for one or another extraction technique. More complex and modern methodologies (accelerated solvent extraction, microwave, ultrasound and turbólise) or consecrated methods (maceration, percolation and soxhlet) are not always the best choices, leaving this decision to the judgment of the researcher and the need for each research.

Key words: Solvent, Temperature, Pressure, Pharmacopoeic, Drying, Milling.

1. INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas cresceu o consumo de fitoterápicos a nível mundial, em paralelo com as pesquisas que visam a descobertas de drogas “milagrosas”, de alto valor agregado (ETHUR *et al.* 2011).

Apesar desse cenário, o Brasil, que detém uma das maiores biodiversidades do planeta e um vasto conhecimento na medicina popular tradicional, ainda está muito atrasado quanto às pesquisas que levem a produção de fitoterápicos (BENINI *et al.* 2010).

Até o momento, coube ao mercado brasileiro apenas a posição de telespectador a “onda verde” iniciada na década de 80, pois compra o que poderia facilmente produzir, e quando produz, ainda o faz mediante tecnologia estrangeira, já que não dispõe nem ao menos de pesquisadores que foquem em pesquisas para inovação e desenvolvimento, por exemplo, das técnicas de extração vegetal, fundamentais em qualquer pesquisa desse gênero (KLEIN *et al.* 2009).

Embora as técnicas extrativas sejam o berço de qualquer pesquisa com plantas, estas ainda tem todo o seu foco na sua finalidade, ou seja, uma atividade biológica, a descoberta de substâncias inéditas, entre outras – restando às técnicas de extração uma posição marginalizada, sendo quase sempre vistas como apenas mais uma ferramenta, embora detenha um papel crucial em qualquer pesquisa que necessite de extratos vegetais.

Alguns trabalhos tentam reverter esse quadro realizando estudos comparativos entre as diversas técnicas, enfatizando principalmente rendimento, custo, tempo e melhoramento na atividade biológica (MAZZUTTI *et al.* 2012; POLITI *et al.* 2011; WÓJCIAK-KOSIOR *et al.* 2013). Esses trabalhos são muito requisitados especialmente por pesquisadores iniciantes e por aqueles que almejam reduzir os custos da pesquisa a partir da utilização de procedimento extrativos já consolidados.

Ainda que técnicas como maceração, percolação e soxhlet sejam há muito tempo utilizadas e consolidadas no campo científico (inclusive pelas farmacopeias), restam dúvidas quanto as suas execuções, proporção de planta, solvente, tempo, custo, temperatura etc, ocasionando a perda de tempo e dinheiro que poderiam ser gastos em outras etapas se existissem estudos que padronizassem ou mesmo direcionassem essa fase. Além disso, com as crescentes inovações tecnológicas, novos métodos de extração, ou mesmo, adaptações dos já existentes vêm surgindo a todo instante. Exemplos clássicos são a turbólise, o ultrassom, o

fluido supercrítico e, mais recentemente, a extração por micro-ondas e a extração por solvente acelerada (DAWIDOWICZ *et al.* 2012; WÓJCIAK-KOSIOR *et al.* 2013).

Deste modo, esse trabalho fornece uma visão geral sobre alguns dos critérios a serem observados na elaboração de um processo extrativo, bem como sobre algumas das principais técnicas de extração farmacopêicas e não farmacopêicas dentre elas as consideradas mais modernas, visando promover um direcionamento, tanto aos novos pesquisadores, quanto aos que buscam reduzir os recursos gastos com o melhoramento dessa etapa (KAUFMANN *et al.* 2002; SILVA *et al.* 2009; WÓJCIAK-KOSIOR *et al.* 2013).

2. METODOLOGIA

Foram realizadas pesquisas em artigos e outros textos que abordavam o preparo do material vegetal, seu processamento e as técnicas extrativas utilizadas na obtenção de extratos vegetais. As bases de dados consultadas foram Google Acadêmico, Science Direct, Scielo, Scopus e Medline, entre os anos de 1990 e 2013.

Como referências de busca foram usadas os como grupos de palavras-chaves: “métodos e técnicas extrativas usados em plantas medicinais”, “processos extrativos farmacopêicos”, “processos de secagem”, “processos de moagem”, “solventes orgânicos e suas constantes dielétricas” e “polaridade dos solventes orgânicos”.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Processamento do material vegetal

3.1.1. Secagem

O conhecimento de material vegetal e dos compostos a serem extraídos é importantíssimo na preferência por um método de secagem. Dentre os métodos apresentados pela literatura (Tabela 1), a secagem à sombra e a secagem em estufa com circulação de ar são os mais utilizados, tendo seus usos geralmente condicionados a presença ou ausência, respectivamente, de compostos termossensíveis. Deste modo, a presença de óleos essenciais é a primeira justificativa para a utilização de técnicas de secagem a baixas temperaturas (abaixo de 40° C) como a secagem a sombra (MARCHESE *et al.* 2005).

Entretanto, Alberton *et al.* (2001), ao trabalharem com *Syzigium cumini* (L.) Skeels, observou que embora a secagem a sombra em temperatura ambiente (cerca de 30 °C) se mostrasse mais eficaz, a presença de água residual, gerava contaminação microbiológica, em especial por fungos, o que impossibilitava a sua utilização em outros ensaios, por exemplo, o de atividade biológica. Além da contaminação microbiológica, a presença de umidade residual é um dos principais fatores que contribuem para a degradação de compostos por reações químicas, especialmente as enzimáticas (AMARAL *et al.* 2003).

Ao avaliar a perda de compostos do *Cymbopogon citratus* em detrimento ao processo de secagem, Costa *et al.* (2005), chegaram à conclusão que a secagem a com desumidificador de ambiente é preferível à promovida em estufa com ventilação forçada, pois a temperatura exercida no segundo processo é suficiente para reduzir, por exemplo, em 8,25% o conteúdo de citral desse vegetal.

Assim, a escolha de um processo de secagem deve garantir não só a remoção da umidade, como também a preservação dos compostos presentes evitando-se perdas por influência da temperatura, contaminantes biológicos etc., sendo necessário um olhar atento quanto às características de cada material vegetal, especialmente o teor de água e a presença de compostos termolábeis.

Tabela 1 – Processos de secagem de material vegetal.

Processo	Característica	Temperatura	Tempo	Vantagens	Desvantagens	Referências
Secagem ao sol	Secagem por incidência direta da luz solar	Ambiente	Variável	Método barato e simples	Fotodecomposição e decomposição de constituintes termolábeis	CORRÊA <i>et al.</i> (2004); VIGO <i>et al.</i> (2004).
Secagem à sombra	Secagem ao abrigo da luz solar sem controle da umidade do local	Ambiente	Variável	Barato, simples e menos destrutivo aos compostos	Influência da umidade local, umidade residual nos materiais secos podendo levar a contaminação microbiológica	ALBERTON <i>et al.</i> (2001)
Secagem com desumidificador de ambiente	Secagem ao abrigo da luz solar com controle da umidade do local	Abaixo de 25 °C ou ambiente	20 dias	Redução da influência da umidade do local	Custo para implantação e manutenção.	ANDRADE <i>et al.</i> (2012); COSTA <i>et al.</i> (2005); ROSADO <i>et al.</i> (2011).
Secagem com estufa comum	Secagem com ar estagnado e temperatura controlada	35 a 80 °C	Cerca de 14 dias	Método rápido de secagem	Degradação de composto termolábeis, sem uniformidade na secagem.	ALBERTON <i>et al.</i> (2001)
Secagem com estufa com ventilação	Secagem com circulação de ar e temperatura controlada	35 a 80 °C	Cerca de 12 dias	Método rápido e uniforme de secagem	Decomposição de constituintes termolábeis	ALBERTON <i>et al.</i> (2001)
Secagem por Liofilização	Secagem por congelamento seguida por sublimação	-22±2 °C (Temperatura de congelamento)	Tempo > o por estufa	Estabilidade microbiológica, organoléptica e química.	Método caro, tempo de secagem maior que o promovido por estufas.	SANTOS <i>et al.</i> (2012)
Secagem por Micro-ondas	Secagem por interação de ondas eletromagnéticas com as moléculas do material a ser seco	-	Minutos	Método ultrarrápido e uniforme de secagem	Método caro (micro-ondas de laboratório), limitação quanto à massa que pode ser seca em uma única vez, saturação da umidade local (quando não há sistema de troca de ar), possível degradação de compostos fenólicos.	BORGO <i>et al.</i> (2010); ROSINI <i>et al.</i> (2004).

3.1.2. Moagem

Mesmo a extração realizada pela técnica mais moderna e utilizando o solvente mais seletivo pode ter seu rendimento afetado se não conseguir penetrar suficientemente no material vegetal. Assim, a seleção do procedimento de moagem merece destaque, pois a depender do tamanho de partícula formada pode-se obter diferentes rendimentos de metabólitos secundários para a mesma planta.

Krishnan *et al.* (2013), ao trabalhar com modelagem cinética de extração de tempero de *Syzygium aromaticum* e *Cinnamomum cassia*, percebeu que o rendimento da extração variava em detrimento ao tamanho da partícula do pó vegetal, chegando à conclusão que quanto menor o tamanho, maior o rendimento. Isso acontece devido a maior superfície de contato entre o soluto e o solvente, bem como ao aumento na destruição da parede celular vegetal que pode levar a melhora na cinética de transferência de massa e, conseqüentemente, na liberação dos seus metabólitos (KRISHNAN *et al.* 2013; MAKSIMOVIC *et al.* 2012).

Embora a observação do tamanho de partícula seja fundamental, a escolha do moinho também desempenha um papel importante no processo extrativo. Dentre os tipos de moinhos (Tabela 2), o mais comumente usado, no que tange as plantas medicinais, é o de facas, pois as pesquisas geralmente trabalham com folhas, cascas e ervas que são facilmente pulverizadas por esse tipo de moinho (SIMÕES, 2004).

Todavia, na escolha do moinho, é importante observar o seu funcionamento, as características (dureza, friabilidade, elasticidade, etc.) inerentes ao material a ser moído e as propriedades dos compostos que se deseja extrair especialmente se apresentam ou não caráter termolábil e/ou volátil, pois esse procedimento tem caráter exotérmico, fornecendo calor ao material vegetal que pode gerar destruição de alguns compostos químicos (LIEBERMANN, 1990).

Tabela 2 – Tipos de moinhos utilizados no processamento de plantas.

Tipo de moinho	Características	Utilização
Pinos	Princípios da concussão	Pulverização de material duro, quebradiço, como cascas e raízes.
Jatos de ar	Princípios da concussão	Pulverização de material duro, quebradiço, como cascas e raízes.
Discos	Princípios do atrito	Pulverização de sementes, frutos dessecados e extratos secos.
Martelos	Princípios da concussão	Moagem grosseira de folhas, cascas, raízes e ervas.
Facas	Princípios do corte	Pulverização de materiais moles, não friáveis, folhas, cascas, flores, rizomas e ervas.

FONTE: SIMÕES, 2004.

3.2. Escolha da solução extratora

A escolha do solvente mais adequado deve ocorrer em conjunto com a da melhor técnica de extração, existindo exceção para técnicas que possuem solventes pré-determinados como fluido supercrítico e hidrodestilação (CO₂ e água, respectivamente), por exemplo. Essa seleção deve ser realizada de forma bastante criteriosa, caso contrário conduzirá a resultados errôneos como a negatização de uma atividade biológica, a redução no rendimento de extração de um composto ou mesmo a ausência deste.

A primeira coisa a ser pensada, quanto à escolha do solvente, é determinar quais substâncias se deseja extrair, pois, baseando-se na regra “semelhante dissolve semelhante”, a utilização de solventes polares deve ser a primeira escolha quando se deseja extrair compostos polares, assim como, substâncias apolares são geralmente extraídas por solventes apolares (PIRES, 2007).

Tendo em mente essa regra percebe-se que é fundamental conhecer as características das substâncias a serem extraídas e deste modo selecionar solventes (ou misturas de solventes) que garantam solubilidade, difusividade, pureza e seletividade para tais substâncias, enquanto que para outras devam possuir nenhuma ou mínima afinidade (MUSTAFA *et al.* 2011).

Deste modo, o conhecimento da polaridade do solvente ou de um indicador de polaridade como a constante dielétrica (Tabela 3), é vital à seleção do que se deseja extrair, podendo-se até mesmo antecipar quais metabólitos primários e/ou secundários serão extraídos (Tabela 4), poupando-se tempo e recursos em ensaios desnecessários, utilizados em determinações e/ou isolamentos de analitos que dificilmente se encontrariam numa extração

feita por determinado solvente, ou mesmo perceber reações que poderiam levar a degradação química dos componentes presentes no extrato (ERCELEN *et al.* 2002; HANDA, 2008; JESUS *et al.* 1997).

Tabela 3 – Constantes dielétricas de solventes usados na extração de plantas medicinais.

Solvente	Constante dielétrica	Característica de Polaridade
Hexano	1,88	Apolar
Benzeno	2,27	Apolar
Clorofórmio	4,71	Apolar
Dietil-éter	4,24	Apolar
Acetato de etila	5,99	Polar
2-propanol	19,9	Polar
Acetona	20,7	Polar
Acetonitrila	37,5	Polar
Dimetilsulfóxido	46,83	Polar
n-butanol	17,33	Polar
Etanol	24,3	Polar
Metanol	32,6	Polar
Água	78,5	Polar

FONTE: BURDICK & JACKSON SOLVENTES, 2013; MARENICH *et al.* 2009.

Tabela 4 – Solventes utilizados em processos extrativos e compostos que extraem.

Solvente	Compostos extraídos	Referências
Hexano, éter de petróleo	Lipídeos, ceras, pigmentos, furanocumarinas, esteroides, monoterpenos.	AHMED <i>et al.</i> 2012; ELANGO <i>et al.</i> 2012; SIMÕES, 2004.
Clorofórmio, diclorometano	Bases livres de alcaloides, antraquinonas livres, óleos voláteis, glicosídeos cardiotônicos, terpenos, esteróis, flavonoides.	AHMED <i>et al.</i> 2012; MAIYO <i>et al.</i> 2010; SIMÕES, 2004.
Acetato de etila, n-butanol	Cumarinas simples, glicosídeos cardiotônicos, terpenos, esteróis, flavonoides.	ELANGO <i>et al.</i> 2012; MAIYO <i>et al.</i> 2010; SIMÕES, 2004.
Etanol, Metanol	Heterosídeos em geral, taninos, saponinas, flavonoides, alguns alcaloides, compostos fenólicos, sesquiterpenos.	ELANGO <i>et al.</i> 2012; MAIYO <i>et al.</i> 2010; NATHAN <i>et al.</i> 2012; SIMÕES, 2004.
Misturas hidroalcoólicas, água.	Saponinas, taninos, compostos glicosilados e/ou muito hidroxilados, compostos fenólicos.	AMARAL <i>et al.</i> 2013; SIMÕES, 2004.
Água acidificada	Alcaloides	SIMÕES, 2004.
Água alcalinizada	Saponinas	SIMÕES, 2004.
CO ₂	Óleos essenciais	MARTÍN <i>et al.</i> 2011; MAZZUTTI <i>et al.</i> 2012;
CO ₂ + etanol (co-solvente)	Óleos essenciais e alguns compostos polares	MARTÍN <i>et al.</i> 2011; MAZZUTTI <i>et al.</i> 2012;

A utilização de modelos matemáticos, como o parâmetro de solubilidade Hildebrand/Hansen (), Equação 1, também podem auxiliar no processo extrativo ao fornecer informações sobre as interações entre moléculas do solvente e do soluto, e avaliar a solvência de uma dada mistura de solventes. A partir dessa equação pode-se escolher solventes – com base no coeficiente de dispersão (), polaridade () e pontes de hidrogênio () – que assegurem a solvatação e a liberação de certos analitos e, conseqüentemente, melhorar a eficácia do processo extrativo (VILLA *et al.* 2011).

Equação 1 - Equação de Hildebrand/Hansen.

Outra questão a se observar é o destino do extrato. Pesquisas que sirvam de base à produção de fitoterápico devem estar atentas à toxicidade do solvente escolhido. Não adianta ter uma solução extratora efetiva se a mesma não poderá originar um extrato seguro a utilização humana.

Em geral, solventes orgânicos apresentam alta toxicidade, por esse motivo extratos a base de hexano, clorofórmio, diclorometano, entre outros, geralmente são aplicados a investigações fitoquímicas. No entanto, alguns solventes como etanol, água e suas misturas, são amplamente utilizados na elaboração de extratos para o desenvolvimento de medicamentos, sendo inclusive indicados nas farmacopeias e formulários de fitoterápicos, especialmente na composição de tinturas com 70° de graduação alcoólica (BASSETTI *et al.* 1994; BRASIL, 2011; BRITO *et al.* 2010; VULIMIRI, 2011).

3.3. Métodos extrativos

Após o processamento do material vegetal, surge a dúvida sobre qual metodologia de extração escolher. Custo financeiro, rendimento, tempo e, especialmente, compostos a serem extraídos são utilizados como parâmetros para essa escolha que, como já foi citado, deve ocorrer simultaneamente com a seleção do solvente.

Alguns métodos extrativos consagrados estão listados em farmacopeias, outros, embora não citados em compêndios oficiais, possuem uso maciço em diversas pesquisas e ainda há aqueles que apesar de já serem utilizados para outras finalidades, passaram, nas

últimas décadas, a integrar o grupo das técnicas extrativas utilizadas em plantas (KAUFMANN *et al.* 2002; SILVA *et al.* 2009; WÓJCIAK-KOSIOR *et al.* 2013).

Deste modo, a próxima seção será destinada ao entendimento dessas técnicas, onde serão abordados aspectos pertinentes a cada um dos processos escolhidos e, ao final, será apresentada uma tabela resumo (Tabela 5) com algumas características de cada processo.

Os métodos extrativos serão divididos em dois grupos, técnicas farmacopeicas e não farmacopeicas, com base na sua presença ou ausência nas farmacopeias.

3.3.1. Técnicas farmacopeicas

3.3.1.1. Maceração

Neste processo, o material vegetal íntegro ou pulverizado é posto em contato com o solvente em um recipiente fechado ficando em repouso ao abrigo da luz e a temperatura ambiente por um período prolongado, que pode variar entre horas e dias, com agitação em intervalos regulares, de modo que o solvente possa interagir com a droga vegetal e extrair seus compostos por meio de difusão simples. Após o período de extração, a mistura é submetida à decantação, retirando-se o sobrenadante, ou à filtração (com ou sem vácuo), obtendo-se o macerado. Na maioria das vezes é necessário umedecer previamente o material vegetal com a solução extratora reduzindo-se a perda do solvente por absorção ou por evaporação (BRASIL, 2011; FONSÊCA, 2005; HANDA, 2008; ISAAC *et al.* 2008).

Como não há renovação do solvente, pode ocorrer saturação ou estabelecimento de um equilíbrio difusional entre o meio extrator e o interior da célula, levando muitas vezes ao não esgotamento do material vegetal (SIMÕES, 2004).

Além disso, fatores como pH, tempo, tamanho de partícula (área de contato), proporção entre quantidade de droga e solvente (concentração da droga variando de 1% a 20%), e temperatura interferem fortemente na qualidade do extrato obtido. Por esse motivo, esta técnica é aplicada a drogas vegetais com compostos facilmente extraíveis (sem resinas, gomas ou alginatos), em preparações homeopáticas e fitoterápicas (tinturas com soluções hidroalcoólicas) e como procedimento preliminar à extração por percolação (FONSÊCA, 2005; HEMWIMON *et al.* 2006; SIMÕES, 2004; SOUZA *et al.* 2010; WANG *et al.* 2012; ZIZOVIC *et al.* 2012).

Procedimentos como remaceração ou maceração dinâmica (com agitação constante) podem ser utilizados para evitar a perda de compostos devido à saturação do solvente. A agitação da mistura é importante por quebrar as zonas de concentração formadas pelo contato inicial entre a droga e a solução extratora aumentando assim o processo difusional dos compostos químicos (SIMÕES, 2004; SOUZA *et al.* 2010).

As principais vantagens desse método consistem na simplicidade de sua execução e no baixo valor (poucas vidrarias e quantidade relativa de solvente). Todavia, o não esgotamento do material vegetal, a difícil remoção do solvente e o longo tempo necessário para a extração devem ser considerados quando se for verificar a viabilidade dessa metodologia (SIMÕES, 2004).

3.3.1.2. Percolação

Consiste em submeter à droga vegetal a passagens sucessivas de uma ou mais soluções extratoras, promovendo o esgotamento da planta por meio do gotejamento lento do material. Também denominada de lixiviação, a percolação, apresenta-se como um processo dinâmico (ao contrário da maceração) permitindo a obtenção de extratos mais concentrados (maior rendimento), com gradiente de polaridade e em tempo relativamente mais curto que o utilizado na maceração. Os extratos obtidos são geralmente decantados (recolhimento do sobrenadante) ou filtrados, sendo posteriormente rotaevaporados para que ocorra a remoção de parte do solvente, concentrando-se o extrato (BOUABDELLI *et al.* 2012; BRASIL, 2011; FONSÊCA, 2005; NAVARRO, 2005; RAVIKUMAR *et al.* 2012).

O percolador é o recipiente comumente utilizado nesse processo, apresentando-se com a forma cônica, geralmente feito de aço, e composto por tampa, copo, separador, torneira e suporte. O valor desse material é relativamente baixo, sendo o tipo e principalmente a quantidade de solvente gasta, os principais responsáveis pela desvantagem desse processo: o alto custo de manutenção, pelo uso excessivo de solvente para evitar a saturação do mesmo ou o equilíbrio difusional, impossibilitando o esgotamento do material vegetal (BRASIL, 2011; FONSÊCA, 2005; HANDA, 2008).

Entretanto, o uso demasiado de solvente confere, a percolação, rendimentos superiores aos observados em metodologias como turbólise (turboextração), decocção, infusão e maceração (POLITI *et al.* 2011).

Devido à renovação do solvente, essa técnica pode usar proporções (planta x solvente) de 1:2, impensável na maceração devido à saturação rápida, e ser utilizada para obtenção de compostos pouco solúveis ou que se apresentam em pequenas quantidades, sendo muitas vezes tida como etapa subsequente da maceração. (NAVARRO, 2005; ZIZOVIC *et al.* 2012).

Cuidados como umedecimento da droga (antes da colocação no percolador), compactação em camadas uniformes que garantam a passagem da substância extratora, adição sucessiva e gradual do solvente e velocidade de recolhimento do extrato (taxa de gotejamento) são fatores preponderantes a serem observados para que se garanta a eficácia dessa metodologia (BORELLA *et al.* 2012; BRASIL, 2011).

3.3.1.3. Soxhlet

É um método que se fundamenta na extração contínua da droga vegetal, sendo a solução extratora reciclada pelo próprio sistema. É utilizado principalmente em extrações que usam solventes voláteis exigindo-se, para tanto, o aparelho de soxhlet. O equipamento necessário à realização desse processo consiste em uma manta aquecedora, balão de fundo redondo, cartucho, soxhlet e condensador (FONSÊCA, 2005; LAGOS *et al.* 2012; MELO *et al.* 2012; SIMÕES, 2004).

Neste processo, a droga vegetal finamente dividida é acomodada em um cartucho poroso (filtro de papel, por exemplo), sendo este colocado em uma câmara do aparelho de Soxhlet. O solvente é aquecido em um balão, conectado ao aparelho, e seus vapores condensados (condensador refrigerado com água, solução salina etc.) recaem sobre a droga, extraíndo seus compostos. Quando o nível de líquido na câmara atinge um determinado volume, ele é então sifonado de volta ao balão, sendo o solvente reciclado, pela destilação promovida pela alta temperatura de aquecimento. Esse processo contínuo é realizado até que o solvente sifonado não exiba resíduo quando evaporado (HANDA, 2008; MAZZUTTI *et al.* 2012; ZIZOVIC *et al.* 2012).

A vantagem deste método, em comparação com os métodos anteriormente descritos, é que uma maior proporção de droga pode ser extraída com uma quantidade menor de solvente. Todavia, a temperatura utilizada na ebulição do solvente compromete a qualidade do extrato, que, quando sifonado, entra em contato direto com o balão aquecido, promovendo a degradação térmica de diversos compostos, pois a depender do solvente usado podem-se ter

razões de aquecimento da ordem de 78 °C (ponto de ebulição do etanol) (ASPÉ *et al.* 2011; VEGGI *et al.* 2011).

Quanto ao rendimento, essa metodologia, pode superar (a depender dos compostos a serem extraídos) o apresentado por métodos mais modernos como o ultrassom, fluido supercrítico (devido à seletividade do processo), turbólise e mesmo micro-ondas. Entretanto essa vantagem pode ser perdida quando se compara o tempo gasto e principalmente a degradação promovida pelo aquecimento exercido em cada processo (ASPÉ *et al.* 2011; GAO *et al.* 2005; MA *et al.* 2008; ZIZOVIC *et al.* 2012).

Embora a alta temperatura seja responsável por perdas (degradação) de compostos químicos, essa também exerce um papel fundamental na extração dos componentes da droga vegetal ao aumentar o coeficiente de solubilidade do solvente empregado e, conseqüentemente, quebrar o equilíbrio difusional favorecendo o processo de transferência de massa entre o material vegetal e a solução extratora (LAGOS *et al.* 2012; GAO *et al.* 2005).

Além disso, o aquecimento confere a solução extratora menor tensão superficial e viscosidade (quando comparada a solventes usados em métodos a frio) permitindo maior penetração na matriz vegetal e, portanto uma extração mais efetiva. Entretanto, promove também uma desordem na matriz do soluto ao romper as interações de suas moléculas (forças de *van der Waals*, pontes de hidrogênios, atrações dipolares etc.) facilitando ainda mais o processo extrativo (ONG, 2004; MAZZUTTI *et al.* 2012).

3.3.2. Técnicas não farmacopeicas

3.3.2.1. Ultrassom

Sendo por sonificador ou por banho de ultrassom, esse método de extração utiliza-se de correntes de alta frequência (20 a 2000 kHz), inaudíveis aos humanos e geradas por um transdutor (converte energia elétrica em mecânica), para promover a fragmentação de membranas e de outras estruturas celulares do material vegetal, facilitando a liberação dos compostos químicos e sua interação com o solvente escolhido (HANDA, 2008; NAVARRO, 2005; SILVA *et al.* 2009; SUN *et al.* 2013).

A extração promovida pelas ondas ultrassônicas é atribuída ao que os autores denominam pressão acústica. Essa se desenvolve através de três processos: cavitação (formação e colapso de cavidades vazias dentro da solução extratora), fricção entre as

superfícies interfaciais e aumento da taxa de difusão. Dentre esses processos a cavitação é o mais importante, pois atua diretamente sobre o líquido extrator, sendo responsável pela formação de microbolhas que ao implodirem (colapso) liberam pressão e temperatura no meio, reduzindo as partículas do material vegetal e facilitando a ação do solvente (GIL-CHÁVEZ *et al.* 2013; ROMANIK *et al.* 2007).

Fatores como solvente, tipo e quantidade de material vegetal e, especialmente, polaridade e tempo de extração, podem ser modificados a fim de se aperfeiçoar esse método. Por exemplo, a extração exercida pelo tempo de 12 horas tem rendimento comparável ao obtido em 1h. Para alguns autores, o aumento no tempo de extração pode levar a degradação de compostos químicos, reduzindo assim, o rendimento dos extratos obtidos (GAO *et al.* 2005; ROMANIK *et al.* 2007).

Embora, apresente-se como um método rápido (geralmente de 30 a 60 minutos), seletivo, seguro, econômico e de considerável rendimento, seu uso é limitado devido à interação entre a energia ultrassônica e os compostos presentes no material vegetal, podendo levar a formação de radicais livres (reações enzimáticas como hidrólise) e ao aumento da temperatura da solução extrativa, comprometendo o extrato final (HANDA, 2008; ROMANIK *et al.* 2007; SILVA *et al.* 2009).

As principais vantagens desse método são a intensificação da transferência de massa, a promoção da ruptura da célula e demais estruturas celulares, e o aumento da penetração do solvente. Esses processos estão diretamente relacionados ao fenômeno da cavitação. Além disso, usa-se menos solvente do que a quantidade necessária a métodos tradicionais como a maceração, apresentando, por vezes, maior rendimento (GAO *et al.* 2005; SILVA *et al.* 2009; TOMA *et al.* 2001).

3.3.2.2. Turbólise

A extração exercida por essa técnica acontece através de forças de cisalhamento que reduzem ainda mais o tamanho de partícula do material vegetal (previamente processado), lavando o conteúdo celular, ao passo que quebra as zonas de concentração, desfavorecendo o equilíbrio difusional e, conseqüentemente, aumentando a troca de compostos entre a droga e a solução extratora (CARVALHO *et al.* 2009; FONSÊCA, 2005; SIMÕES, 2004).

Basicamente, o processo consiste em colocar o material vegetal (previamente triturado) em contato com o solvente escolhido e submetê-los ao movimento rotacional

(cisalhamento) promovido por equipamentos como liquidificadores industriais, moinhos coloidais e mais comumente o Ultra-turrax[®] (BORELLA *et al.* 2012; CARVALHO *et al.* 2009; ISAAC *et al.* 2008).

Nesse tipo de extração, a taxa de rotação varia de 3.500 a 24 mil rpm (valores para ultra-turrax[®]), fornecendo calor a mistura, o que aumenta a difusibilidade do solvente, porém, podendo destruir compostos termossensíveis. Por esse motivo, as pesquisas que utilizam esse tipo de extração a fazem em curtos espaços de tempo (5 a 15 minutos) controlando a temperatura (quase sempre abaixo de 40 °C), aproveitando o calor gerado para promover a extração sem, no entanto, deixar a solução vegetal aquecida por um tempo capaz de degradar substancialmente os compostos presentes (BODOKI *et al.* 2005; CORDEIRO *et al.* 2006; FONSÊCA, 2005; PEIXOTO, 2009; SOUZA *et al.* 2010).

Para facilitar a separação do material vegetal do extrato propriamente dito pode-se utilizar de filtração a vácuo ou, de forma mais eficaz, de uma centrifuga, pois, mesmo sob vácuo, o filtro tende a ter seus poros rapidamente obstruídos pelas partículas finamente divididas do material vegetal (CORDEIRO *et al.* 2006; LAGOS *et al.* 2012).

A temperatura atingida e o pouco tempo de contato entre a droga e a solução extratora são apontados como as principais desvantagens dessa técnica. Todavia, para outros autores esses problemas são vistos como vantagens que tornam a turbólise um processo rápido, algumas vezes seletivo e de rendimento aceitável (ISAAC *et al.* 2008; MIGLIATO *et al.* 2011; SOUZA *et al.* 2010).

3.3.2.3. Fluido Supercrítico

Extração com fluido supercrítico é considerado um método alternativo a hidrodestilação largamente empregado na obtenção de compostos apolares, como os óleos essenciais (COSTA *et al.* 2012; MELO *et al.* 2012). Sua utilização reduz do uso de solventes orgânicos, aumenta a reprodutibilidade e a seletividade, reduz o tempo de extração, e melhora o rendimento das amostras vegetais (GHASEMI *et al.* 2011).

Temperatura, pressão, volume da amostra, adição ou não de co-solvente orgânicos (etanol, por exemplo) e fluxo são fatores a serem considerados nesse tipo de extração. Outro ponto importante é a coleta do extrato, pois se realizada de forma incorreta pode acarretar em perdas que signifiquem um rendimento pobre ou mesmo a ausência de um determinado composto (HANDA, 2008).

Embora o argônio possa ser utilizado, o principal solvente ainda é o dióxido de carbono (CO₂). Isso se deve a uma alta difusibilidade (penetração de um gás) associada a uma excelente dissolubilidade (arraste de metabólitos, das células vegetais, comparáveis a de um líquido), baixa toxicidade e polaridade, considerável inércia e segurança (presente normalmente na atmosfera). Além disso, possui valor de mercado significativamente baixo, sendo utilizado principalmente nas indústrias farmacêuticas, de alimentos e de perfumes, na extração de pesticidas, de amostras ambientais e outros produtos naturais, e em polímeros (GHASEMI *et al.* 2011; HANDA, 2008; MAUL *et al.* 1996).

Normalmente a utilização do CO₂ é suficiente para promover a extração dos compostos, pois, como já foi dito, essa metodologia é usualmente empregada na obtenção de compostos apolares como os óleos essenciais. Entretanto, essa característica de extração é a principal limitação do CO₂, sendo necessária a incorporação de um co-solvente orgânico para que seja promovida a extração de compostos polares (HANDA, 2008; MARTÍN *et al.* 2011; MAUL *et al.* 1996).

Basicamente esse equipamento possui um reservatório pressurizado de CO₂, um banho termostático, uma bomba de ar, uma coluna de aço inoxidável (câmara de extração) e uma câmara de separação, tudo isso regulado por diversas válvulas e manômetros que controlam o fluxo e a pressão do sistema (PARISOTTO *et al.* 2012).

Assim, o CO₂ líquido (pressurizado por uma bomba) passa por um medidor de fluxo tendo sua pressão e vazão ajustadas, a corrente líquida é então aquecida e levada ao compartimento extrator, onde o solvente (no estado supercrítico) flui através da amostra. A solução obtida segue para uma câmara separadora refrigerada onde é despressurizada, separando-se o gás e o extrato vegetal que é então condensado e recolhido. O CO₂ gasoso passa por um trocador de calor, sendo refrigerado, comprimido e liquefeito, podendo ser novamente utilizado no processo (MAUL *et al.* 1996; MELO *et al.* 2012).

As taxas de recuperação de componentes geralmente aumentam com o aumento da pressão e/ou temperatura. Quando há utilização de co-solventes orgânicos, como o etanol, esses podem ser removido por evaporação sob vácuo (MARTÍN *et al.* 2011).

Os principais entraves para a execução desse método são a limitação quanto à extração de compostos polares e, principalmente, o capital necessário para a instalação do equipamento. Entretanto, todo o valor investido é recompensado pelo baixo valor do solvente utilizado e pelo fato do mesmo poder ser recuperado ao final do processo (HANDA, 2008; MAUL *et al.* 1996).

3.3.2.4. Micro-ondas

O uso de micro-ondas surgiu na 2ª guerra mundial, sendo aplicado em radares. Posteriormente sua aplicação foi estendida a aparelhos domésticos e mais tarde a ensaios laboratoriais que visavam à digestão por ácidos, à preparação de analitos (extração de contaminantes, por exemplo) para análises posteriores e à aceleração da degradação de compostos visando determinar a validade de produtos alimentícios e farmacêuticos. Recentemente, vem crescendo o uso das micro-ondas em processos de extrações vegetais (GONZÁLEZ-NUÑEZ *et al.* 2011; HEMWIMON *et al.* 2007; KAUFMANN *et al.* 2002).

A aplicação desse método no âmbito extrativo se baseia na utilização da radiação eletromagnética (frequência entre 300 a 300.000 MHz) para promover o movimento de íons e de dipolos, gerando atrito entre as moléculas da matriz vegetal com as do solvente, atrito esse que ocasiona um aquecimento rápido e uniforme da mistura, fazendo dessa técnica um processo rápido, simples e eficiente (MELO *et al.* 2012; CAMEL, 2000; KAUFMANN *et al.* 2002; LU *et al.* 2008).

O aquecimento e as interações provocadas pelas colisões entre as moléculas promovem a quebra de membranas celulares e de pontes de hidrogênio, além de favorecer uma maior penetração do solvente e, conseqüentemente, o aumento da solvatação dos compostos. Assim, as substâncias do material vegetal se desprendem da matriz (dessorção), sendo transferidas ao solvente (CAMEL, 2000; GIL-CHÁVEZ *et al.* 2013; PARTHASARATHI *et al.* 2013; RODRIGUEZ-JASSO *et al.* 2011).

Conceitos como polaridade, pressão (sistemas fechados), tempo, temperatura, proporção e natureza do solvente e do material a ser extraído, e principalmente a propriedade dielétrica e o grau de interação do solvente com as micro-ondas devem ser considerados ao utilizar essa metodologia. Por exemplo, com base na constante dielétrica e na afinidade do solvente pelas micro-ondas, pode-se melhorar o poder de penetração do solvente, aumentando seu poder de arraste, ou mesmo reduzir o nível de degradação térmica dos compostos extraídos ao utilizar solventes de baixa constante dielétrica (absorvem menos a energia das microndas) que permanecem frios mesmo sobre efeito das micro-ondas (BALASUBRAMANIAN *et al.* 2011; GIL-CHÁVEZ *et al.* 2013; MADEJ, 2009).

Existem diversos métodos extrativos que se utilizam das micro-ondas, inclusive por combinação com outras técnicas extrativas como a extração ultrassônica assistida por micro-ondas, extração dinâmica assistida por micro-ondas, extração a vácuo assistida por micro-

ondas etc. Entretanto, essas metodologias podem ser agrupadas em dois tipos: sistema de recipiente aberto e o sistema de recipiente fechado, este, presente na maioria dos artigos (CHUNG-HUNG *et al.* 2011; ESKILSSON *et al.* 2000).

Os sistemas do tipo aberto utilizam células (recipientes) de quartzo acopladas a condensadores para acondicionar a matriz vegetal, tornando esse sistema muito semelhante ao soxhlet, pois o solvente condensado recai sobre a amostra extraindo seus compostos. O processo consiste em manter o material vegetal em um sistema sobre refluxo utilizando ondas eletromagnéticas primeiramente como fonte de aquecimento para o solvente e posteriormente auxiliando na homogeneização e na interação entre o solvente e a matriz vegetal – quando ambos estão sobre efeito das micro-ondas (CAMEL, 2000; CHUNG-HUNG *et al.* 2011; KAUFMANN *et al.* 2002).

Já os sistemas do tipo fechado são utilizados quando se deseja submeter a extração a pressões acima da atmosférica, trabalhar com solventes voláteis ou muito inflamáveis e ainda quando há possibilidade de perda das substâncias de interesse por volatilização. Neste sistema a amostra é acondicionada em células e colocada sobre plataformas giratórias semelhantes às dos fornos de micro-ondas comuns. Essas células são submetidas a temperaturas e pressões que aquecem o solvente acima do ponto de ebulição promovendo a extração dos compostos (CAMEL, 2000; CHUNG-HUNG *et al.* 2011; KAUFMANN *et al.* 2002).

Rapidez, controle de parâmetros como temperatura e pressão, consumo de solvente e segurança quanto a substâncias voláteis são as principais vantagens do sistema fechado sobre o aberto, entretanto a dificuldade no manuseio e limitação quanto à tamanho da amostra a ser extraída por vez são apontadas como suas principais desvantagens diante do outro sistema (CAMEL, 2000; CHUNG-HUNG *et al.* 2011; KAUFMANN *et al.* 2002).

3.3.2.5 Extração acelerada por solvente

A extração acelerada por solvente (ASE) também denominada extração por líquido pressurizado (PLE), extração por solvente pressurizado, extração por solvente sobre alta pressão (HPSE), extração por solvente quente e pressurizado (HPHTSE), extração por água quente e pressurizada (HPWE) e extração por solvente subcrítico (SSE) é um método que trabalha com solvente em temperaturas (50 a 200 °C) acima do ponto de ebulição (porém abaixo do nível supercrítico) e com pressões (10 a 15 Mpa) suficientes para manter a extração no estado líquido. Essa técnica pode apresentar caráter estático (sem renovação do solvente

em um ou mais ciclo de extração) ou dinâmico – quando há a renovação do solvente (BJOËRKLUND *et al.* 2000; SUN *et al.* 2012; HERRERO *et al.* 2013).

Muito utilizada na preparação de amostras e análises de solo, de contaminantes, de material biológico, de alimentos e de plantas, tem como sua principal vantagem, utilizar baixa quantidade de solvente e desenvolve-se em um curto espaço de tempo, podendo inclusive ser automatizada (BREITHAUPT, 2004; SUN *et al.* 2012; HERRERO *et al.* 2013; NZOUGHET *et al.* 2013).

O Dionex™ ASE™ é o equipamento utilizado por essa técnica consistindo basicamente em uma bomba para pressurizar o solvente, um forno contendo o recipiente de extração, um controlador da pressão interna e um recipiente de retenção (coleta). Opcionalmente outros acessórios podem ser agregados a esse sistema como uma bomba modificada ou um tanque de Nitrogênio (purga do sistema) e bobinas de aquecimento, melhorando assim, o controle sobre a pressão, o fluxo e a temperatura do solvente e, conseqüentemente, a sua capacidade extrativa, ao passo que encarece o custo total dessa metodologia, sendo o alto custo de implantação uma de suas desvantagens (BJOËRKLUND *et al.* 2000; CHITESCU *et al.* 2012; SUN *et al.* 2012; VEGGI *et al.* 2011; ZHANG *et al.* 2011).

Normalmente, esse processo extrativo se baseia em três fases: dessorção do composto químico da matriz vegetal, penetração do solvente na matriz e transferência dos compostos da matriz para o solvente de extração. Isso se deve à utilização de altas taxas de temperatura e pressão que promove o melhoramento da cinética de transferência de massas por meio do aumento da solubilidade dos compostos e redução da viscosidade e tensão superficial do solvente – facilitando sua penetração e aumentando sua capacidade de arraste. Todavia, as altas temperaturas utilizadas também são responsáveis pela degradação térmica de alguns compostos, sendo necessário o conhecimento das características do material vegetal antes de submetê-lo a esse processo (SUN *et al.* 2012; HE *et al.* 2009; MÖLLER *et al.* 2008).

Tabela 5 – Resumo com algumas características das técnicas extrativas descritas.

Técnica	Solvente utilizado	Quantidade de solvente	Temperatura (°C) utilizada	Pressão utilizada	Compostos extraídos	Tempo	Vantagens	Desvantagens	Referências
Maceração	Etanol, água, solventes orgânicos misturas etc.	De mL a Litros	Ambiente	Não se aplica	Compostos polares e apolares (dependendo do solvente)	Horas a dias	Barato, simples	Processo lento, não esgotamento da droga vegetal (baixo rendimento), difícil remoção do solvente,	ASPÉ <i>et al.</i> 2011; BOUABDELLI <i>et al.</i> 2012; SIMÕES, 2004.
Percolação	Etanol, água, Hexano, Metanol e misturas etc.	De ml a Litros	Ambiente	Não se aplica	Compostos polares e apolares (dependendo do solvente)	Horas a dias	Simple, esgotamento do material vegetal	Processo lento, e difícil remoção do solvente, alto custo (alto consumo de solvente)	BOUABDELLI <i>et al.</i> 2012; SIMÕES, 2004; ZIZOVIC <i>et al.</i> 2012.
Soxhlet	Diclorometano, etanol, água, acetato de etila	150-200 mL	Ponto de ebulição do solvente	Não se aplica	Compostos polares e apolares (dependendo do solvente)	1 a 20 h	Reciclagem do solvente, bom rendimento com uso de pouco solvente.	Degradação térmica dos compostos	ASPÉ <i>et al.</i> 2011; ONG, 2004; MAZZUTTI <i>et al.</i> 2012; VEGGI <i>et al.</i> 2011.
Turbólise	Etanol, água, Hexano, Metanol e misturas etc.	50 a 100 mL	Ambiente	Não se aplica	Compostos polares e apolares (dependendo do solvente)	15 a 45 min (fracionados em 5 min)	Rapidez, consumo relativamente baixo de solvente, aumento do coeficiente de saturação do solvente	Degradação térmica, limitado a pequenos volumes	BODOKI <i>et al.</i> 2005; ISAAC <i>et al.</i> 2008; PEIXOTO, 2009.
Ultrassom	Etanol, água, Hexano, Metanol e misturas etc.	50 a 100 mL	Ambiente	Não se aplica	Compostos polares e apolares (dependendo do solvente)	15 a 60 min	Extração relativamente rápida, eficiente e consumo baixo de solvente	O calor e pressão gerados podem degradar alguns compostos	ASPÉ <i>et al.</i> 2011; ONG, 2004; WANG <i>et al.</i> 2012.

Fluido supercrítico	CO ₂ e CO ₂ + co-solvente (etanol, metanol etc.)	-	31,1 °C	250-450 atm	do solvente) Compostos apolares, alguns polares e óleos essenciais	30 a 100 min	Baixa degradação térmica, rapidez, reprodutibilidade, seletividade, alto rendimento, baixo custo do solvente e fácil remoção do solvente	Limitação quanto à extração de compostos polares e alto custo inicial	ONG, 2004; GHASEMI <i>et al.</i> 2011; HANDA, 2008; HERRERO <i>et al.</i> 2013; MARTÍN <i>et al.</i> 2011.
Micro-ondas	Solventes com larga faixa de polaridade (Ex. água e hexano)	Pequenas quantidades	80 a 150 °C	Ambiente para sistema aberto e diferentes níveis para o fechado	Compostos polares e apolares (dependendo do solvente)	10 min a 1 hora (dependendo da potência do aparelho)	Rapidez, baixo consumo de solvente, controle da temperatura e da pressão utilizadas	O solvente deve ser capaz de interagir com as micro-ondas, tempo gasto com a limpeza e resfriamento	ASPÉ <i>et al.</i> 2011; ONG, 2004; ESKILSSON <i>et al.</i> 2000; RODRIGUEZ-JASSO <i>et al.</i> 2011.
Extração acelerada por solvente	A maioria dos solventes	10 a 50 mL	Temperaturas acima do ponto de ebulição do solvente usado	10 a 15 MPa	Compostos polares e apolares (dependendo do solvente)	10 a 30 min	Baixo consumo de solvente, rápida e eficiente extração, automação.	Pode ocorrer degradação térmica	ASPÉ <i>et al.</i> 2011; ONG, 2004; HERRERO <i>et al.</i> 2013.

4. CONCLUSÃO

Observa-se que resultados satisfatórios ou ao menos não equivocados são provenientes da cautela aplicada a todas as etapas da pesquisa, tanto nas referentes a sua finalidade (os ensaios biológicos ou fitoquímicos), como também nas fases que originaram o material de estudo, ou seja, desde o preparo das amostras vegetais até a obtenção dos extratos.

Neste contexto, procedimentos de secagem, moagem e, primordialmente, a seleção do solvente devem estar na mente do pesquisador a fim de se evitar surpresas como a ausência de compostos em plantas, nas quais os mesmos já foram identificados, ou mesmo negação de atividade biológica, já elucidada por outros pesquisadores.

Embora parâmetros como pressão e, principalmente, temperatura sejam apontados como os principais responsáveis pela degradação de compostos químicos, percebe-se que estes possuem, em contrapartida, uma alta importância sobre a eficiência das diversas técnicas extrativas, seja por aumentar a solubilidade e difusibilidade de solventes, seja por promover uma maior interação entre a matriz vegetal e a solução extratora ou ainda por ser a única forma de utilização de determinados solventes como, por exemplo, o CO₂ na extração por fluido supercrítico.

Nem sempre as técnicas mais modernas ou mais caras são as mais apropriadas ao experimento. Isso vai sempre depender de fatores como tempo, recursos disponíveis, quantidade de material e principalmente a natureza química do que se deseja extrair. Portanto, técnicas como maceração e percolação não podem ser tidas como obsoletas, bem como fluido supercrítico, micro-ondas e extração acelerada por solvente como absolutas, pois todas as técnicas possuem limitações, cabendo ao pesquisador selecionar determinada metodologia com base na sua necessidade.

Diante do exposto, percebe-se a importância de se ter conhecimento desde os processos de preparação da amostra vegetal até o funcionamento das mais modernas técnicas de extração disponíveis, pois todos esses processos apresentam vantagens e desvantagens que podem ser cruciais quanto ao rendimento, atividade biológica ou mesmo isolamento de compostos em vegetais.

5. REFERÊNCIAS

AHMED, S.; RAHMAN, A.; MUSLIM, T.; SOHRAB, M. H.; AKBOR, M.A.; SIRAJ, S.; SULTANA, N.; AL-MANSUR, M.A. Antimicrobial cytotoxicity and phytochemical activities of *Spilanthes acmella*. **Bangladesh Journal of Scientific & Industrial Research**, v.47, n.4, p.437-440, 2012.

ALBERTON, J.R.; RIBEIRO, A.; SACRAMENTO, L.V.S.; FRANCO, S.L.; LIMA, M.A.P. Caracterização farmacognóstica do jambolão (*Syzygium cumini* (L.) Skeels). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.11, n.1, p.37-50, 2001.

AMARAL, F.M.M.; COUTINHO, D.F.; RIBEIRO, M.N.S.; OLIVEIRA, M.A. Avaliação da qualidade de drogas vegetais comercializadas em São Luís/Maranhão. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.13, p. 27-30, 2003.

AMARAL, G.P.; CARVALHO, N.R.; BARCELOS, R.P.; DOBRACHINSKI, F.; PORTELLA, R.L.; SILVA, M.H.; LUGOKENSKI, T.H.; DIAS, G.R.; LUZ, S.C.; BOLIGON, A.A.; ATHAYDE, M.L.; VILLETTI, M.A.; ANTUNES SOARES, F.A.; FACHINETTO, R. Protective action of ethanolic extract of *Rosmarinus officinalis* L. in gastric ulcer prevention induced by ethanol in rats. **Food and Chemical Toxicology**, v.55, p.48–55, 2013.

ANDRADE, F.M.C.; CASALI, V.W.D.; CECON, P.R.C. Efeito de dinamizações de *Arnica montana* L. no metabolismo de chambá (*Justicia pectoralis* Jacq.). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.14, p.159-162, 2012.

ASPÉ, E.; FERNÁNDEZ, K. The effect of different extraction techniques on extraction yield, total phenolic, and anti-radical capacity of extracts from *Pinus radiata* Bark. **Industrial Crops and Products**, v.34, p.838-844, 2011.

BALASUBRAMANIAN, S. ALLEN, J.D.; KANITKAR, A; BOLDOR, D. Oil extraction from *Scenedesmus obliquus* using a continuous microwave system – design, optimization, and quality characterization. **Bioresource Technology**, v.102, p.3396–3403, 2011.

BASSETTI, L.; TRAMPER, J. Organic solvent toxicity in *Morinda citrifolia* cell suspensions. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 16, 1994.

BENINI, E. B.; SARTORI, M.A.B.; BUSCH, G.C.; REMPEL, C.; SCHULTZ, G.; STROHSCHOEN, A.A.G. Valorização da flora nativa quanto ao potencial fitoterápico. **Revista Destaques Acadêmicos**, n.3, p.11-17, 2010.

BJOËRKLUND, E.; NILSSON, T. Pressurised liquid extraction of persistent organic pollutants in environmental analysis. **Trends in Analytical Chemistry**, v.19, n.7, p.434-445, 2000.

BODOKI, E. OPREAN, R.; VLASE, L.; TAMAS, M.; SANDULESCU, R. Fast determination of colchicine by TLC-densitometry from pharmaceuticals and vegetal extracts. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.37, p.971-977, 2005.

BORELLA, J. C.; CARVALHO, D.M.A.; TEIXEIRA, J.C.L.; RIBEIRO, N.S. Influência do processo extrativo nas propriedades físico-químicas dos extratos de *calendula officinalis* (asteraceae). **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. IX, n.2, 25 - 36, 2012.

BORGO, J.; XAVIER, C.A.G.; MOURA, D.J.; RICHTER, M.F.; SUYENAGA, E.S. Influência dos processos de secagem sobre o teor de flavonoides e na atividade antioxidante dos extratos de *Baccharis articulata* (Lam.) Pers., Asteraceae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.20, n.1, p.12-17, 2010.

BOUABDELLI, F.; DJELLOULB, A.; KAID-OMARB, Z.; SEMMOUDC, A.; ADDOU, A. Antimicrobial Activity of 22 Plants Used in Urolithiasis Medicine in Western Algeria. **Asian Pacific Journal of Tropical Disease**, p.530-535, 2012.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Formulário de Fitoterápicos da Farmacopeia Brasileira**. 1ª ed. Brasília: Anvisa, 2011.

BREITHAUPT, D.E. Simultaneous HPLC determination of carotenoids used as food coloring additives: applicability of accelerated solvent extraction. **Food Chemistry**, v.86, p.449-456, 2004.

BRITO, S.A.; COUTINHO, H.D.M.; BARROS, A.R.C.; RODRIGUES, F.F.G.; COSTA, J.G.M. Prospecção fitoquímica e avaliação da atividade antibacteriana e toxicidade do látex de *calotropis procera* (asclepidaeae). **Caderno de Cultura e Ciência**, v.2, n.2, 2010.

BURDICK & JACKSON SOLVENTES. Dielectric Constant. Disponível em: <http://macro.lsu.edu/HowTo/solvents/Dielectric%20Constant%20.htm>. Acessado em: 10/03/2013.

CAMEL, Valeèrie. Microwave-assisted solvent extraction of environmental samples. **Trends in Analytical Chemistry**, v.19, n.4, 2000.

CARVALHO, J.L.S.; CUNICO, M.M.; DIAS, J.F.G.; MIGUEL, M.D.; MIGUEL, O.G. Termoestabilidade de processos extrativos de *Nasturtium officinale* R. Br., Brassicaceae por sistema soxhlet modificado. **Química Nova**, v.32, n.4, p.1031-1035, 2009.

CHITESCU, C.L.; OOSTERINK, E; JONG, J ; STOLKER, A.A. Ultrasonic or accelerated solvent extraction followed by U-HPLC-high mass accuracy MS for screening of pharmaceuticals and fungicides in soil and plant samples. **Talanta**, v.88, p.653-662, 2012.

CHUNG-HUNG, C.; YUSOFF, R.; NGOH, G.; KUNG, F.W. Microwave-assisted extractions of active ingredients from plants. **Journal of Chromatography A**, v.1218, p.6213-6225, 2011.

CORDEIRO, C.H.G.; SACRAMENTO, L.V.S; CORRÊA, M.A.; PIZZOLITTO, A.C.; BAUAB, T.M.; Análise farmacognóstica e atividade antibacteriana de extratos vegetais empregados em formulação para a higiene bucal. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v.42, n.3, p.395-404, 2006.

CORRÊA, R.M.; BERTOLUCCI, S.K.V; PINTO, J.E.B.P.; REIS, E.S.; ALVES, T.L. Rendimento de óleo essencial e caracterização organoléptica de folhas de assa-peixe submetidas a diferentes métodos de secagem. **Ciência e Agrotecnologia**, v.28, n.2, p.339-344, 2004.

COSTA, L.C.B.; CORRÊA, R.M.; CARDOSO, J.C.W.; PINTO, J.E.B.P.; BERTOLUCCI, S.K.V.; FERRI, P.H. Secagem e fragmentação da matéria seca no rendimento e composição do óleo essencial de capim-limão. **Horticultura Brasileira**, v. 23, n. 4, p.956-959, 2005.

COSTA, P.; GROSSO, C.; GONÇALVES, S.; ANDRADE, P.B.; VALENTÃO, P BERNARDO-GIL, M.G.; ROMANO, A. Supercritical fluid extraction and hydrodistillation for the recovery of bioactive compounds from *Lavandula viridis* L'Hér. **Food Chemistry**, v.135, p.112-121, 2012.

DAWIDOWICZ, A.L.; CZAPCZYŃSKA, N.B.; WIANOWSKA, D. The loss of essential oil components induced by the Purge Time in the Pressurized Liquid Extraction (PLE) procedure of *Cupressus sempervirens*. **Talanta**, v.94, p.140-145, 2012.

ELANGO, G.; RAHUMAN, A.A.; KAMARAJ, C.; BAGAVAN, A.; ZAHIR, A.A.; SANTHOSHKUMAR, T.; MARIMUTHU, S.; VELAYUTHAM, K.; JAYASEELAN, C.; KIRTHI, A.V.; RAJAKUMAR, G. Efficacy of medicinal plant extracts against Formosan subterranean termite, *Coptotermes formosanus*. **Industrial Crops and Products**, v.36, p.524-530, 2012.

ERCELEN, S.; KLYMCHENKO, A.S.; DEMCHENKO, A.P. Ultrasensitive fluorescent probe for the hydrophobic range of solvent polarities. **Analytica Chimica Acta**, v.464, p.273-287, 2002.

ESKILSSON, C.S.; BJÖRKLUND, E. Analytical-scale microwave-assisted extraction. **Journal of Chromatography A**, v.902, p.227–250, 2000.

ETHUR, L.Z. ; JOBIM, J.C.; RITTER, J.G.; OLIVEIRA, G.; TRINDADE, B.S. Comércio formal e perfil de consumidores de plantas medicinais e fitoterápicos no município de Itaqui – RS. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.13, n.2, p.121-128, 2011.

FONSÊCA, S.G.C. **Farmacotécnica de Fitoterápicos**. 1ª ed. Fortaleza/Ceará: Universidade Federal do Ceará, 2005.

GAO, M.; LIU, C. Comparison of techniques for the extraction of flavonoids from cultured cells of *Saussurea medusa* Maxim. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v.21, p.1461–1463, 2005.

GHASEMI, E.; RAOFIE, F. ; NAJAFI, N.M. Application of response surface methodology and central composite design for the optimisation of supercritical fluid extraction of essential oils from *Myrtus communis* L. leaves. **Food Chemistry**, v.126, p.1449-1453, 2011.

GIL-CHÁVEZ, G.J.; VILLA, J.A.; AYALA-ZAVALA, J.F.; HEREDIA, J.B.; SEPULVEDA, D.; YAHIA, E.M.; GONZALEZ-AGUILA, G.A. Technologies for Extraction and Production of Bioactive Compounds to be used as Nutraceuticals and Food Ingredients: An Overview. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 12, p.5-23, 2013.

GONZÁLEZ-NUÑEZ, L.N.; CAÑIZARES-MACÍAS, M.P. Focused microwaves-assisted extraction of theobromine and caffeine from cacao. **Food Chemistry**, v.129, p.1819–1824, 2011.

HANDA, S.S. **Extraction Technologies for Medicinal and Aromatic Plants**. 1^a ed. Trieste/Italy: United Nations Industrial Development Organization and the International Centre for Science and High Technology, 2008.

HE, J.; BALASUBRAMANIAN, R.; KARTHIKEYAN, S.; JOSHI, U.M. Determination of semi-volatile organochlorine compounds in the atmosphere of Singapore using accelerated solvent extraction. **Chemosphere**, v.75, p.640-648, 2009.

HEMWIMON, S.; PAVASANT, P.; SHOTIPRUK, A. Microwave-assisted extraction of antioxidative anthraquinones from roots of *Morinda citrifolia*. **Separation and Purification Technology**, v.54, p.44-50, 2007.

HEMWIMON, S.; PAVASANT, P.; SHOTIPRUK, A. Ultrasound-assisted extraction of anthraquinones from roots of *Morinda citrifolia*. **Ultrasonics Sonochemistry**, v.13, p.543–548, 2006.

HERRERO, M.; CASTRO-PUYANA, M.; MENDIOLA, J.A.; IBAÑEZ, E. Compressed fluids for the extraction of bioactive compounds. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 43, p.67-83, 2013.

ISAAC, V.L.B.; CEFALI, L.C.; CHIARI, B.G.; OLIVEIRA, C.C.L.G.; SALGADO, H.R.N.; CORREA, M.A. Protocolo para ensaios físico-químicos de estabilidade de fitocosméticos. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica Aplicada**, v.29, n.1, p.81-96, 2008.

JESUS, P.C.; JOÃO, J.J.; SILVA, P.L.F.; BURLIN, G.; NASCIMENTO, M.G. Organo-gel: um novo sistema para a imobilização de lipases e sua aplicação em síntese orgânica. **Química Nova**, v.20, n.6, 1997.

KAUFMANN, B.; CHRISTEN, P. Recent Extraction Techniques for Natural Products: Microwave-assisted Extraction and Pressurised Solvent Extraction. **Phytochemical Analysis**, v.13, p.105-113, 2002.

KLEIN, T.; LONGHINI, R.; BRUSCHI, M.L.; MELLO, J.C.P. Fitoterápicos: um mercado promissor. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica Aplicada**, v.30, n.3, p.241-248, 2009.

KRISHNAN, K.R.; SIVARAJANB, M.; BABUSKINA, S.; ARCHANAA, G.; BABUA, P.A.S.; SUKUMAR, M. Kinetic modeling of spice extraction from *S. aromaticum* and *C. cassia*. **Journal of Food Engineering**, v.117, p.326–332, 2013.

LAGOS, J.B.; GEMIN, C.A.B; DIAS, J.F.G.; MIGUEL, M.D.; CAMPOS, R.; CARVALHO, J.L.S.; DUARTE, M.R.; MIGUEL, O.G. Contribution to the Study of Phytosterols and Phenolics from the Barks and Leaves of the *Trichilia catigua* A. Juss., Meliaceae. **Journal of Analytical Sciences, Methods and Instrumentation**, v. 2, p.37-41, 2012.

LIEBERMANN, H.A. Pharmaceutical Dosage Forms: Tablets. **New York: Marcel Dekker**, v.2, p. 162-186, 1990.

LU, Y.; MA, W.; HU, R.; DAI, X.; PAN, Y. Ionic liquid-based microwave-assisted extraction of phenolic alkaloids from the medicinal plant *Nelumbo nucifera* Gaertn. **Journal of Chromatography A**, v.1208, p.42-46, 2008.

MA, Y.; YE, X.; HAO, Y.; XU, G.; XU, G.; LIU, D. Ultrasound-assisted extraction of hesperidin from Penggan (*Citrus reticulata*) peel. **Ultrasonics Sonochemistry**, v.15, p.227–232, 2008.

MADEJ, K. Microwave-assisted and cloud-point extraction in determination of drugs and other bioactive compounds. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 28, n.4, p.436-446, 2009.

MAIYO, Z.C.; NGURE, R.M.; MATASYOH, J.C.; CHEPKORIR, R. Phytochemical constituents and antimicrobial activity of leaf extracts of three *Amaranthus* plant species. **African Journal of Biotechnology**, v.9 n.21, p.3178-3182, 2010.

MAKSIMOVIC, S.; IVANOVICA, J.; SKALA, D. Supercritical extraction of essential oil from *Mentha* and mathematical modeling – the influence of plant particle size. **Procedia Engineering**, v.42 p.1767–1777, 2012.

MARCHESE, J.A.; FIGUEIRA, G.M. O uso de tecnologias pré e pós-colheita e boas práticas agrícolas na produção de plantas medicinais e aromáticas. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.7, n.3, p.86-96, 2005.

MARENICH, A.V. CRAMER, C.J.; TRUHLAR, D.G. Universal Solvation Model Based on Solute Electron Density and on a Continuum Model of the Solvent Defined by the Bulk

Dielectric Constant and Atomic Surface Tensions. **Journal of Physical Chemistry B**, v.113, n.18, p.6378-96, 2009.

MARQUES, L.C. Preparação de extratos vegetais. **Jornal Brasileiro de Fitomedicina**, v.3, n.2, p.74-76, 2005.

MARTÍN, L.; MAINARA, A.M.; GONZÁLEZ-COLOMA, A.; BURILLO, J.; URIETA, J.S. Supercritical fluid extraction of wormwood (*Artemisia absinthium* L.). **Journal of Supercritical Fluids**, v.56, p.64–71, 2011.

MAUL, A.A.; WASICKY, R.; BACCHI, E.M. Extração por Fluido Supercrítico. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.5, n.2, p.185-200, 1996.

MAZZUTTI, S.; FERREIRA, S.R.S.; RIEHL, C.A.S.; SMANIA JR., A.; SMANIA, F.A.; MARTÍNEZ, J. Supercritical fluid extraction of *Agaricus brasiliensis*: Antioxidant and antimicrobial activities. **Journal of Supercritical Fluids**, v.70, p.48-56, 2012.

MELO, M.M.R.; OLIVEIRA, E.L.G.; SILVA, C.M. Supercritical fluid extraction of triterpenic acids from *Eucalyptus globulus* bark. **Journal of Supercritical Fluids**, v.70, p.37-145, 2012.

MIGLIATO, K.F.; CORRÊA, M.A.; SALGADO, H.R.N.; TOGNOLLI, J.O.; SACRAMENTO, L.V.S.; MELLO, J.C.P.; GIANNINI, M.J.S.M.; ALMEIDA, A.M.F.; PIZZOLITTO, A.C. Planejamento experimental na otimização da extração dos frutos de *Syzygium cumini* (L.) Skeels. **Química Nova**, v.34, n.4, p.695-699, 2011.

MÖLLER, J.; STRÖMBERG, E.; KARLSSON, K. Comparison of extraction methods for sampling of low molecular compounds in polymers degraded during recycling. **European Polymer Journal**, v.44, p.1583-1593, 2008.

MUSTAFA, A.; TURNER, C. Pressurized liquid extraction as a green approach in food and herbal plants extraction: A review. **Analytica Chimica Acta**, v.703, p.8-18, 2011.

NATHAN, V.K.; ANTONISAMY, J.M.; GNANARAJ, W.R.; SUBRAMANIAN, K.M. Phytochemical and bio-efficacy studies on methanolic flower extracts of *Peltophorum pterocarpum* (DC.) Baker ex Heyne. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, S641-S645, 2012.

NAVARRO, D. F. **Estudo químico, biológico e farmacológico das espécies *Allamanda blanchetti* e *Allamanda schottii*Pohl para a obtenção de frações e moléculas bioativas de potencial terapêutico.** 2005. 293 f. Tese (Doutorado em Química) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Santa Catarina.

NZOUGHET, J.K.; CAMPBELL, K.; BARNES, P.; COOPER, K.M.; CHEVALLIER, O.P.; ELLIOTT, C.T. Comparison of sample preparation methods, validation of an UPLC–MS/MS procedure for the quantification of tetrodotoxin present in marine gastropods and analysis of pufferfish. **Food Chemistry**, v.136, p.1584-1589, 2013.

ONG, E.S. Extraction methods and chemical standardization of botanicals and herbal preparations. **Journal of Chromatography B**, v. 812, p. 23-33, 2004.

PARISOTTO, E.B.; MICHELIN, E.M.Z. BISCARO, F.; FERREIRA, S.R.S.; WILHELM FILHO, D.; PEDROSA, R.C. The antitumor activity of extracts from *Cordia verbenacea* D.C. obtained by supercritical fluid extraction. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 61, p.101-107, 2012.

PARTHASARATHI, S.; EZHILARASI, P.N.; JENA, B.S.; C. ANANDHARAMAKRISHNAN, C. A comparative study on conventional and microwave-assisted extraction for microencapsulation of Garcinia fruit extract. **Food and Bioproducts Processing**, v.91, p.103-110, 2013.

PEIXOTO, M.P.G. **Saponinas dos frutos de *Ilex paraguariensis* a. St. Hil. (Mate): desenvolvimento de metodologia analítica, estudo físicoquímico e biológico.** 2009. 153 f. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Rio grande do Sul.

PIRES, R. F. **Determinação experimental da solubilidade de eletrólitos em solventes puros e misturas de solventes.** 2007. 93 f. Dissertação (Mestrado em Pesquisa e Desenvolvimento de Processos Químicos) – Faculdade de Engenharia Química. Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, Minas Gerais.

POLITI, F.A.S.; MELLO, J.C.P.; MIGLIATO, K.F.; NEPOMUCENO, A.L.A.; MOREIRA, R.R.D.; PIETRO, R.C.L.R. Antimicrobial, Cytotoxic and Antioxidant Activities and Determination of the Total Tannin Content of Bark Extracts *Endopleura uchi*. **International Journal of Molecular Science**, v.12, p.2757-2768, 2011.

RAVIKUMAR, S.; INBANESON, S.J.; SUGANTHI, P. *In vitro* antiplasmodial activity of ethanolic extracts of South Indian medicinal plants against *Plasmodium falciparum*. **Asian Pacific Journal of Tropical Disease**, p.180-183, 2012.

RODRIGUEZ-JASSO, R.M.; MUSSATTO, S.I.; PASTRANA, L.; AGUILAR, C.N.; TEIXEIRA, J.A. Microwave-assisted extraction of sulfated polysaccharides (fucoidan) from brown seaweed. **Carbohydrate Polymers**, v.86, p.1137-1144, 2011.

ROMANIK, G.; GILGENAST, E.; PRZYJAZNY, A.; KAMIŃSKI, M. Techniques of preparing plant material for chromatographic separation and analysis. **Journal of Biochemical and Biophysical Methods**, v.70, p.253–261, 2007.

ROSADO, L.D.S.; PINTO, J.E.BP.; BOTREL, P.P.; BERTOLUCI, S.K.V.; NICULAU, E.S.; ALVES, P.B. Influência do processamento da folha e tipo de secagem no teor e composição química do óleo essencial de manjerição CV. Maria Bonita. **Ciência e Agrotecnologia**, v.35, n.2, p.291-296, 2011.

ROSINI, F. NASCENTES, C.C.; NÓBREGA, J.A. Experimentos didáticos envolvendo radiação microondas. **Química Nova**, v.27, n.6, p.1012-1015, 2004.

SANTOS, G.; SOUZA, D.S.; CASTRO, A.A. Cinética de secagem convectiva e liofilização de ramos de coentro (*Coriandrum sativum* L.): Estudo da influência dos processos em sua coloração. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, v.14, n.4, p.329-335, 2012.

SILVA, I.D.D.; ARAGÃO, C.F.S. Avaliação de parâmetros de extração da *Cinchona* Vahl por métodos farmacopéicos e não farmacopéicos. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.19 n.3, p.776-780, 2009.

SIMÕES, C.M.O. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5^a ed. Porto Alegre/Florianópolis: editora da UFRGS / editora da UFSC, 2004.

SOUZA, A.P.T.B. BARNI, S.T.; FERREIRA, R.A.; COUTO, A.G. Desenvolvimento Tecnológico de Soluções Extrativas Hidroetanólicas das Flores de *Calendula officinalis* L. Empregando Planejamento Fatorial. **Latin American Journal of Pharmacy**, v.29, n.1, p.13-21, 2010.

SUN, H.; GE, X.; LU, Y.; WANG, A. Application of accelerated solvent extraction in the analysis of organic contaminants, bioactive and nutritional compounds in food and feed. **Journal of Chromatography A**, v.1237, 1-23, 2012.

SUN, Y.; LIU, Z.; WANG, J.; YANG, S.; LI, B.; XU, N. Aqueous ionic liquid based ultrasonic assisted extraction of four acetophenones from the Chinese medicinal plant *Cynanchum bungei* Decne. **Ultrasonics Sonochemistry**, v.20, p.180–186, 2013.

TOMA, M.; PANIWNKYK, L.; MASON, T.J. investigation of the effects of ultrasound on vegetal tissues during solvent extraction. **Ultrasonics Sonochemistry**, v.8, p.137-142, 2001.

VEGGI, P.C.; SANTOS, D.T.; MEIRELES, M.A.A. Anthocyanin extraction from Jaboticaba (*Myrciaria cauliflora*) skins by different techniques: economic evaluation. **Procedia Food Science**, v.1, p.1725-1731, 2011.

VIGO, C.L.S.; NARITA, E.; MARQUES, L.C. Influências da variação sazonal e tipos de secagem nas características da droga vegetal – raízes de *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen (Amaranthaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.14, n.2, p. 137-144, 2004.

VILLA, R.D.; OLIVEIRA, A.P.; NOGUEIRA, R.F.P. Avaliação dos parâmetros de solubilidade de Hildebrand/Hansen na seleção de solventes para a extração de pesticidas organoclorados do solo. **Química Nova**, v.34, N.9, p.1501-1506, 2011.

VULIMIRI, S.V. **Reproductive and developmental toxicology: toxic solvents and gases**. In: GUPTA, R. C. (editor). *Reproductive and Developmental Toxicology*. 1^a ed. Oxford/England: ELSEVIER, 2011. p.303-315.

WANG, X.S.; WU, Y.F.; DAI, S.L.; CHEN, R.; SHAO, Y. Ultrasound-assisted extraction of geniposide from *Gardenia jasminoides*. **Ultrasonics Sonochemistry**, v.19, p.1155–1159, 2012.

WÓJCIAK-KOSIOR, M. ; SOWA, I.; KOCJAN, R.; NOWAK, R. Effect of different extraction techniques on quantification of oleanolic and ursolic acid in *Lamii albi flos*. **Industrial Crops and Products**. v.44, p.373-377, 2013.

ZHANG, Y.; LIU, C.; YU, M.; ZHANG, Z.; QI, Y.; WANG, J.; WU, G.; LI, S.; YU, J.; HU, Y. Application of accelerated solvent extraction coupled with high-performance counter-

current chromatography to extraction and online isolation of chemical constituents from *Hypericum perforatum* L. **Journal of Chromatography A**, v.1218, p.2827-2834, 2011.

ZIZOVIC, I.; IVANOVICA, J.; MISIC, D.; STAMENIC, M.; DJORDJEVIC, S.; KUKIC-MARKOVIC, J.; PETROVIC, D. SFE as a superior technique for isolation of extracts with strong antibacterial activities from lichen *Usnea barbata* L. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 72, p.7-14, 2012.

CAPÍTULO 2

MESSIADES, Davy Macgyver da Silva. **Análise fitoquímica e otimização do potencial antimicrobiano dos extratos hidroalcoólicos de *Aspidosperma pyrifolium* Mart.** Campina Grande, PB: UEPB, 2014. (Dissertação – Mestrado em Ciências Farmacêuticas).

RESUMO

O objetivo deste estudo foi determinar o melhor método extrativo aos compostos bioativos de *A. pyrifolium* Mart., otimizando assim, o rendimento de seus extratos, bem como o potencial antimicrobiano dos mesmos. Para isso foi utilizado um planejamento fatorial 3^3 , tendo como variáveis: técnica extrativa (maceração, turbólise e ultrassom), concentração alcoólica (50, 70 e 90%) e quantidade de material vegetal (10, 20 e 30 gramas). Para a análise fitoquímica semiquantitativa foram produzidos extratos etanólicos (para cada uma das técnicas) a partir de 30 g de material vegetal. Os extratos hidroalcoólicos produzidos foram testados nas cepas *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) e *klebsiella pneumoniae* (ATCC 4352). O extrato que apresentou a melhor atividade antimicrobiana foi submetido ao particionamento em gradientes crescentes de polaridade. Todos os extratos apresentaram atividade frente às cepas testadas, sendo o obtido por turbólise, a 90% de concentração alcoólica e 30 g de material vegetal, o mais ativo. Quanto ao rendimento, o melhor extrato foi obtido por maceração, a 50% de concentração alcoólica e 30 g de material vegetal. Dentre as partições, a clorofórmica foi a de maior atividade antibacteriana. A análise fitoquímica dos extratos etanólicos por maceração (EEM-Ap), por turbólise (EET-Ap) e por ultrassom (EEU-Ap) revelou presença de polifenóis, flavonóide e saponinas; não sendo possível a determinação dos taninos. Os resultados demonstram a importância do planejamento experimental na condução de pesquisas, sugerem potencial aplicação do extrato de *A. pyrifolium* no tratamento das infecções bacterianas e revelam que extratos de maior rendimento nem sempre possuem melhor atividade biológica.

Palavras-chave: Planejamento fatorial, Maceração, Turbólise, Ultrassom, Partição.

ABSTRACT

The aim of this study was to determine the best method for extraction of bioactive compounds *A. pyriformium* Mart., thus optimizing the yield of their extracts, as well as the antimicrobial potential of the same. For this, a 3³ factorial design was used, with the variables: extraction technique (maceration turbólise and ultrasound), alcohol concentration (50, 70 and 90%) and amount of plant material (10, 20 and 30 grams). For semiquantitative phytochemical analysis were produced ethanolics extracts (for each technique) with 30 g of plant material. The hydroalcoholics extracts produced were tested in the strains *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) and *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 4352). The extract which showed the best antimicrobial activity was submitted to particionamente in increasing gradients of polarity. All extracts showed activity across the tested strains, being obtained by turbólise, 90% alcohol concentration and 30 g of plant material, the most active. As to yield the best extract was obtained by maceration at 50% alcohol concentration to 30 g of plant material. Among the partitions, the chloroform was the highest antibacterial activity. Phytochemical analysis of ethanolic extracts by maceration (EEM-Ap), by turbólise (EET-Ap) and by ultrasound (EEU-Ap) revealed the presence of polyphenols, flavonoids and saponins; not possible the determination of tannins. The results demonstrate the importance of experimental design in the conduct of research, suggest potential application of the extract of *A. pyriformium* in the treatment of bacterial infections and reveal that extracts of higher yield do not always have better biological activity.

Keywords: Factorial design, Maceration, turboextraction, Ultrasound, Partition.

1. INTRODUÇÃO

Os microrganismos, patogênicos ou não, possuem uma infinidade de mecanismos de defesa (bomba de efluxo, alteração de receptores de membrana, enzimas etc.) que permitem a rápida adaptação às pressões ambientais, não sendo a resposta à ação dos antibióticos uma exceção. Deste modo, uma das consequências do uso indiscriminado de agentes antimicrobianos é a seleção de microrganismos cada vez mais resistentes o que contribui para a ineficácia da terapia antibiótica atual (BRITO *et al.* 2012).

Devido a esse perfil de resistência e em resposta ao uso indiscriminado de antimicrobianos, a cada dia, surgem diversos microrganismos resistentes dentre eles pode-se citar: *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (MRSA), *Enterococcus* spp. resistente à vancomicina (VRE); *Pseudomonas aeruginosa* (PCR) e *Acinetobacter* resistentes à carbapenens (ARC); e a mais recente, *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase (KPC) (MORAES *et al.* 2013; BRITO *et al.* 2012). Ambas são encontradas principalmente em infecções nosocomiais, demais ambientes de assistência à saúde e em pessoas que frequentam estas instalações. Porém, devido a rápida disseminação bacteriana, passaram a habitar fora destes ambientes, tornando-se graves problemas de saúde pública, ao ponto de forçar os órgãos governamentais responsáveis pela saúde, como a ANVISA, a tomar medidas drásticas (RDC N°20 - controle dos antimicrobianos) que inibissem o surgimento de novas superbactérias (MORAES *et al.* 2013; LOPATA *et al.* 2011; BRITO *et al.* 2012).

Na tentativa de reverter esse quadro, os pesquisadores buscam alternativas que englobam desde a síntese de novos fármacos até a modificação dos já existentes, no entanto, cresce o interesse na utilização de plantas medicinais, em especial àquelas usadas tradicionalmente.

Assim, a fitoterapia surge como uma alternativa ao uso da terapia antibiótica atual, pois fitocompostos, derivados do metabolismo secundário dos vegetais, como saponinas; terpenos; alcaloides; flavonoides e taninos, apresentam notável capacidade antimicrobiana, sendo capazes não só de deter o crescimento (bacteriostático) destes organismos, mas podendo também matá-los (bactericida) ou mesmo modular a ação de antibióticos, reduzindo as doses destes ou protegendo-os do ataque dos mecanismos de defesas desses microrganismos (SOUZA *et al.* 2007; LOPATA *et al.* 2011; OLIVEIRA *et al.* 2012).

Neste contexto, o Brasil se sobressai tendo em vista a diversidade biológica e o conhecimento popular. Todavia, essa diversidade e conhecimento ainda carecem de

comprovação científica, sobretudo tratando-se de espécimes vegetais oriundas de regiões como o semiárido, como, por exemplo, o *Aspidosperma pyrifolium* Mart., conhecida popularmente como pereiro. Essa espécie é geralmente utilizada como planta ornamental e forrageira, embora alguns estudos apontem atividades como hipotensora, antimicrobiana, citotóxica (em células cancerosas), tripanosomicida e inibitória sobre monoamino oxidase, advinda especialmente da presença marcante de alcaloides indólicos característicos do gênero (PEREIRA *et al.* 2007).

No entanto, pesquisas envolvendo plantas medicinais, geralmente envolvem a utilização de muitos recursos (tempo, mão de obra, dinheiro etc.), bem como, o estudo de diversas variáveis como quantidade de planta, a escolha do solvente e mesmo do procedimento extrativo, por exemplo, levando as empresas privadas a preferir investir em melhorias nas formulações atuais a ter que desenvolver algum medicamento de forma empírica, ficando esta atividade quase sempre restrita as universidades que carecem de recursos financeiros e de infraestrutura.

Neste contexto, o planejamento experimental aparece como uma ferramenta estatística capaz de amenizar tal problemática, maximizando os resultados e reduzindo os custos e tempo empregado. Essa ferramenta, passou a ser amplamente aceita entre a comunidade científica, especialmente os de caráter fatorial, todavia não sendo uma regra, pois a escolha do melhor planejamento deve obedecer a necessidade e a conveniência da pesquisa e do pesquisador (CAMPOS *et al.* 2006).

Assim, esse trabalho objetiva determinar a melhor metodologia de extração, para os compostos, de *Aspidosperma pyrifolium* Mart., através da utilização do planejamento fatorial, usando como parâmetros o teor de resíduo seco e a atividade antimicrobiana.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Material botânico

As cascas de *A. pyrifolium* Mart. foram coletadas no sítio Capim Grande, nas proximidades do Distrito de São José da Mata, Campina Grande, Paraíba, no mês de dezembro de 2012 (coordenadas: S7°13'27,56" – W36°00'53,37"). O material foi identificado pelo Prof. Dr. Leonardo Pessoa Félix e a exsicata depositada no herbário Jayme Coelho de Moraes, Universidade Federal da Paraíba, sob o número 20104.

2.2. Preparo dos extratos

2.2.1. Para o *screening* antimicrobiano dos extratos e teor de resíduo seco

As cascas de *A. pyrifolium* Mart. foram secas em estufa de circulação forçada de ar (40 °C ± 1 °C) e pulverizadas em moinho de facas, com granulometria de 10 mesh. O extrato foi preparado por três métodos: maceração, turbólise (ULTRA-TURRAX® IKA T25 digital) e ultrassom (banho de ultrassom Unique USC – 2500), nas proporções de 1:10, 2:10 e 3:10 (m/v). Como solvente utilizou-se o etanol na forma de soluções hidroalcoólicas a 50, a 70 e a 90%.

2.2.2. Para o *screening* antimicrobiano das partições do melhor extrato

O melhor extrato hidroalcoólico, escolhido com base na ação antimicrobiana, foi rotaevaporado, ressuspenso em solução hidroalcoólica metanol/água a 70%, na proporção 1:5 m/v (planta/solvente), e particionado em gradiente crescente de polaridade (hexano, clorofórmio e acetato de etila) em um funil de separação, obtendo-se cinco frações: hexânica, clorofórmica, fase acetato de etila, fase metanol/água e uma fase pastosa, intermediária entre clorofórmio e metanol/água. Todas as partições foram rotaevaporadas.

2.2.3. Para a análise fitoquímica semiquantitativa

Foram produzidos extratos etanólicos para cada técnica (maceração, turbólise e ultrassom) na proporção 3:10 m/v, objetivando a determinação dos flavonoides, polifenóis, saponinas e taninos totais.

2.3. Planejamento experimental

O planejamento fatorial completo (3^3) foi destinado à verificação dos melhores extratos, em relação ao rendimento e a ação antimicrobiana, considerando três fatores: técnica extrativa (turbólise por 15 minutos, maceração por 5 dias e ultrassom por 1 hora), concentração alcoólica do solvente (solução hidroalcoólica 50, 70 e 90% v/v) e proporção planta/solvente (1:10, 2:10 e 3:10 m/v). Como parâmetro de análise foi utilizado a determinação da concentração inibitória mínima (CIM) e a determinação do resíduo seco, ambas realizadas em triplicata.

A Tabela 1 descreve a organização do modelo do planejamento fatorial 3^3 , segundo o qual foram baseados os ensaios.

Tabela 1 – Organização das variáveis e dos níveis, segundo o planejamento fatorial 3^3 .

Variáveis		Concentração (C)	Quant. Planta (Q)	Técnica extrativa (T)
	-1	50%	10 g	Maceração
Níveis	0	70%	20 g	Ultrassom
	1	90%	30 g	Turbólise

Os resultados foram avaliados estatisticamente empregando-se o programa *Statistica* 6, Tulsa, OK, EUA – tendo $p < 0,05$, como nível de significância mínimo, fornecendo como dados a análise de variância (ANOVA) e análise dos efeitos pelo Gráfico de Pareto.

2.4. Determinação do teor de resíduo seco

Uma alíquota de 2 mL de cada extrato foi transferida para placas de Petri, medindo, aproximadamente, 50 mm em diâmetro e 30 mm de altura. Sendo evaporada até secar em

estufa a 105 °C, por 3 horas. As amostras foram esfriadas em dessecador, sobre sílica gel e pesados em balança analítica. O procedimento foi repetido até a estabilização da massa da amostra, sendo o cálculo do resíduo seco determinado em porcentagem sobre o volume inicial do extrato (BRASIL, 2010).

2.5. Screening antimicrobiano

A atividade antimicrobiana do extrato de *Aspidosperma pyrifolium* Mart. foi avaliada pelo método de microdiluição em caldo, sendo utilizados os seguintes microrganismos: *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) e *klebsiella pneumoniae* (ATCC 4352); as quais foram disponibilizadas pela Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ – RJ). As cepas liofilizadas foram reativadas, em câmara asséptica, seguindo as recomendações da referida Fundação.

2.5.1. Padronização da suspensão bacteriana

Os inóculos bacterianos foram padronizados em tubos contendo 5 mL solução salina estéril a 0,9%, sendo essa suspensão ajustada espectrofotometricamente a 625 nm, equivalendo a 10⁶ UFC/mL.

2.5.2. Verificação da atividade antibacteriana dos extratos vegetais – Determinação da concentração inibitória mínima (CIM)

O ensaio foi realizado pelo método de microdiluição em caldo utilizando microplacas de 96 cavidades em acordo o *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2009) adaptado. Cem microlitros de cada extrato hidroalcoólico foram diluídos em série, em cem microlitros de caldo Mueller Hinton esterilizado. Diluições das misturas de etanol/água, nas proporções correspondentes às utilizadas no preparo dos extratos, foram utilizadas como controle negativo, enquanto que diluições de cefalotina e de gentamicina foram usadas como controle positivo, para cepas gram-positivas e gram-negativas, respectivamente. Dez microlitros de cada cultura de microrganismos foram adicionados em cada poço, exceto na coluna destinada ao controle de esterilidade do meio. A placa foi incubada a 37 ± 1 °C por 24 horas. O crescimento microbiano foi indicado pela adição de 20µL de solução aquosa de

resazurina (Sigma-Aldrich) a 0,01%, com nova incubação a 37 ± 1 °C durante 2 horas. A CIM foi definida como a menor concentração que inibiu a mudança de coloração da resazurina de azul para rosa. Todos os testes foram realizados em triplicata.

2.5.3. Verificação da atividade antibacteriana das partições do melhor extrato vegetal – Determinação da concentração inibitória mínima (CIM)

O ensaio foi realizado pelo mesmo método de microdiluição em caldo aplicado à verificação da atividade antibacteriana dos extratos vegetais. No entanto, as partições foram previamente solubilizadas em uma mistura metanol/dimetilsulfóxido (DMSO) a 50%, ficando na concentração de 2 mg/mL. A mistura metanol/DMSO foi utilizada como controle negativo.

2.6. Análise fitoquímica semiquantitativa

Extratos etanólicos de cada técnica extrativa, foram rotaevaporados e submetidos a análise fitoquímica para a determinação dos polifenóis, flavonoides, saponinas e taninos totais. Todas as leituras espectrofotométricas foram realizadas em espectrofotômetro Shimadzu® (UV mini-1240), utilizando como padrões: ácido gálico, catequina, quercetina e diosgenina, do fabricante Sigma-Aldrich.

2.6.1. Determinação de Polifenóis totais

Para a determinação do teor de polifenóis totais, utilizou-se o método descrito por Chandra *et al.* (2004). Adicionou-se 1 mL da solução aquosa do extrato a 1 mL do reagente de Folin-Ciocalteu 1 N, e esta mistura permaneceu em repouso por 2 minutos. Em seguida, adicionou-se 2 mL de uma solução aquosa de Na₂CO₃ a 20% (m/v), e a mistura permaneceu em repouso por mais 10 minutos. Em seguida, foi feita a leitura da absorbância a 757 nm, contra um branco composto por água destilada, reagente de Folin-Ciocalteu e solução a 20% de Na₂CO₃.

Para a obtenção da curva analítica, uma solução padrão de 100 µg/mL de ácido gálico foi preparada pela dissolução de 10 mg do padrão em 100 mL de água destilada. A partir dessa solução foram feitas diluições em triplicata, de forma a obter soluções de 1, 3, 6, 9, 12,

15, 20, 25, 30, 35, e 40 $\mu\text{g/mL}$. A concentração de polifenóis foi expressa em miligramas equivalentes de ácido gálico (mg EAG.g^{-1}). As análises foram realizadas em triplicata.

2.6.2. Determinação de Flavonoides totais

A determinação do conteúdo de flavonóides totais seguiu o método de Meda *et al.* (2005). A 5 mL de cada solução (em metanol) do extrato foi adicionado o mesmo volume de uma solução (em metanol) de AlCl_3 a 2% (m/v). A mistura permaneceu em repouso por 10 minutos antes da leitura da absorbância a 415 nm, contra um branco composto pela solução de AlCl_3 .

A curva de calibração foi obtida a partir de uma solução padrão a 100 $\mu\text{g/mL}$, preparada pela dissolução de 10 mg de quercetina em 100 mL de metanol. A partir dessa solução, foram feitas diluições em triplicata, obtendo-se soluções de quercetina nas concentrações de 2, 4, 6, 8, 10, 13, 16, 19, 22, 26, 28 e 30 $\mu\text{g/mL}$. A concentração de flavonóides foi expressa em miligramas equivalentes de quercetina (mg EQC.g^{-1}). As análises foram realizadas em triplicata.

2.6.3. Determinação de Taninos totais

O teor de taninos condensados foi quantificado utilizando-se o método de Makkar *et al.* (1993), no qual 0,5 mL da amostra do extrato vegetal foi adicionado a 3 mL de uma solução de vanilina (4% m/v em metanol); em seguida, adicionou-se 1,5 mL de HCl concentrado (37%). A reação ocorreu em tubos de ensaio, mergulhados em água a cerca de 22 °C. A leitura foi feita a 500 nm, contra um branco composto pela solução de vanilina, HCl e uma solução de etanol 50% (v/v) em água.

A curva de calibração para este ensaio foi obtida a partir de uma solução padrão de catequina obtida pela dissolução de 10 mg do padrão em 100 mL de metanol. A partir dessa solução, foram realizadas diluições em triplicata, de forma a obter soluções de catequina nas concentrações de 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 e 100 $\mu\text{g/mL}$. A concentração de taninos condensados foi expressa em miligramas equivalentes de catequina (mg CAT.g^{-1}). As análises foram realizadas em triplicata.

2.6.4. Determinação de Saponinas totais

A quantificação de saponinas totais seguiu o método descrito por Makkar *et al.* (2007). Adicionou-se 250 µL de uma solução de vanilina (8% em etanol) a 250 µL da solução do extrato (em metanol 80%), em seguida, adicionou-se 2,5 mL de ácido sulfúrico (72%). Os tubos foram incubados a 60 °C em banho-maria por 10 minutos, sendo transferido para um banho de gelo, onde permaneceram por 4 minutos. Foi feita a leitura da absorbância a 544 nm, contra um branco composto pela solução de vanilina, metanol 80% e ácido sulfúrico.

A curva de calibração foi obtida a partir de uma solução padrão a 500 µg/mL, preparada pela dissolução de 10 mg de diosgenina em 20 mL de metanol a 80%. A partir dessa solução, foram feitas diluições em triplicata, obtendo-se soluções de quercetina nas concentrações de 100, 200, 300, 400 e 500 µg/mL. A concentração de saponinas foi expressa em miligramas equivalentes de diosgenina (mg EDI.g⁻¹). As análises foram realizadas em triplicata.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O planejamento experimental fundamentado na análise estatística resulta na redução de custos e de tempo, bem como, no melhoramento das respostas obtidas. Baseando-se na ANOVA, pode-se determinar quais variáveis influenciam significativamente o experimento, já a análise do Gráfico de Pareto, além de corroborar com os resultados da ANOVA, ainda fornece a tendência dos níveis (para + ou para -), a partir da análise dos efeitos.

Segundo Migliato (2011), os estudos estatísticos podem ser baseados em variáveis quantitativas e qualitativas, deste modo, concentração e quantidade de planta são variantes quantitativas enquanto que a técnica é qualitativa. Além disso, dependendo das quantidades de níveis analisados pode-se ter variáveis apenas com coeficientes lineares (C, Q e T – para até dois níveis), com também com coeficientes quadráticos (C², Q² e T²), quando existem mais de dois níveis. Podendo haver significância em ambas as variáveis, ou mesmo, em uma e não na outra, e neste caso, a soma delas pode resultar em insignificância (PATIL *et al.* 2013).

3.1. Otimização do processo extrativo quanto ao resíduo seco (rendimento)

A análise estatística visando determinar as variáveis e níveis significantes e conseqüentemente à otimização do processo extrativo, quanto ao teor de resíduo seco, foi realizada através da verificação da ANOVA (Tabela 2) e do Gráfico de Pareto (Figura 1).

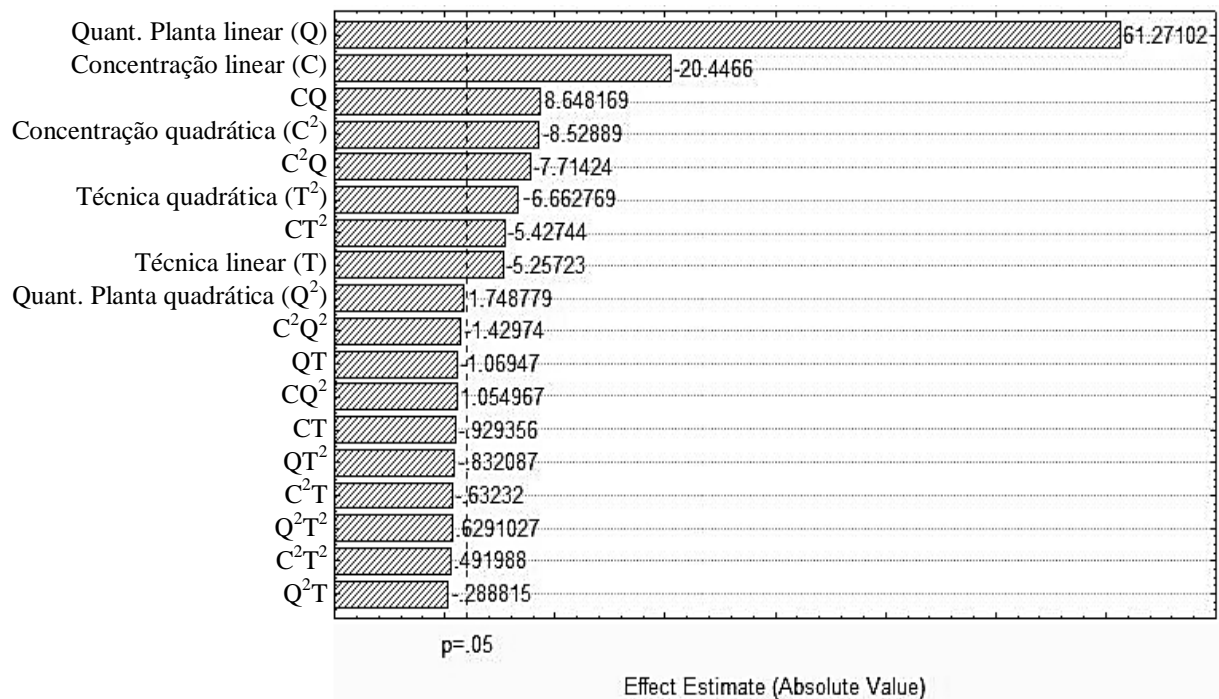
Tabela 2 – ANOVA da determinação do teor de resíduo (rendimento) de *A. pyrifolium*.

Fontes de variação	GL	SQ	MQ	F	p-valor
Concentração linear (C)	1	0.004734	0.004734	418.063	<0,0001
Concentração quadrática (C ²)	1	0.000847	0.000847	74.791	<0,0001
Quant. Planta linear (Q)	1	0.042510	0.042510	3754.138	<0,0001
Quant. Planta Técnica (Q ²)	1	0.000035	0.000035	3.058	0.085278
Técnica linear (T)	1	0.000313	0.000313	27.638	<0,0001
Técnica quadrática (T ²)	1	0.000674	0.000674	59.510	<0,0001
CQ	1	0.000824	0.000824	72.742	<0,0001
CQ ²	1	0.000013	0.000013	1.144	0.289002
C ² Q	1	0.000503	0.000503	44.392	<0,0001
C ² Q ²	1	0.000023	0.000023	2.044	0.157812
CT	1	0.000008	0.000008	0.692	0.408553
CT ²	1	0.000334	0.000334	29.457	<0,0001
C ² T	1	0.000004	0.000004	0.396	0.531593
C ² T ²	1	0.000003	0.000003	0.242	0.624465
QT	1	0.000013	0.000013	1.113	0.295534
QT ²	1	0.000010	0.000010	0.864	0.356309
Q ² T	1	0.000001	0.000001	0.083	0.773686
Q ² T ²	1	0.000005	0.000005	0.400	0.529503
Erro	62	0.000702	0.000011		
Total	80	0.051553			

GL: graus de liberdade; SQ: soma quadrática; MQ: média quadrática; F: valor de teste F (95%); P: valor de significância.

Analisando a ANOVA referente ao resíduo seco (Tabela 2), foi possível identificar que as variáveis principais (C, Q, T, C² e T²), além das interações (CQ, C²Q e CT²) foram altamente significativas (p<0,0001).

Figura 1 – Gráfico de Pareto da determinação do teor de resíduo (rendimento) de *A. pyrifolium*.



Já a análise do Gráfico de Pareto (Figura 1) permitiu verificar que a variável Q apresentou a maior significância dentre as variáveis e interações analisadas (maior estimativa de efeitos) e que a tendência do sinal remete ao nível (+) para a variável quantidade de planta e (-) para as variáveis concentração e técnica estrativa. Nesta análise, percebe-se que alterações na concentração alcoólica, na técnica extrativa e na quantidade de planta influenciam o teor de resíduo seco, embora, como foi dito, a quantidade de planta exerça maior influência.

Deste modo, verificou-se que, para a determinação do resíduo, o melhor extrato foi o obtido por maceração a 50% de álcool e 30 g de material vegetal. Isso significa que provavelmente o maior tempo (5 dias) de contato, entre o material vegetal e a solução extratora, proporcionada pela maceração é mais eficiente do que a rapidez demonstrada pelos outros métodos, ultrassom (1 hora) e turbólise (15 minutos). Além disso, a maior parte dos compostos possivelmente possuem caráter mais polar, visto que o teor alcoólico de 50% extraiu uma maior quantidade de substâncias. Ainda, a proporção 3:10 (planta/ solvente) foi a selecionada demonstrando que, ao menos para essa espécie, não ocorre saturação da solução extratora com quantidades superiores a proporção 2:10, geralmente escolhida em outros trabalhos observados na literatura científica (ALVARENGA *et al.* 2009).

3.2. Otimização do processo extrativo quanto à concentração inibitória mínima (CIM)

A análise antimicrobiana demonstrou que todos os extratos possuem, em maior ou menor grau, ação inibitória (determinada pela quantidade de microlitros capaz de inibir o crescimento bacteriano) frente às cepas *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *E. coli* e *K. pneumoniae*. As respostas obtidas com a determinação da concentração inibitória mínima (CIM) foram dadas em $\mu\text{L}/\mu\text{L}$ (extrato/meio) e utilizadas para análise estatística (ANOVA e Gráfico de Pareto).

A análise estatística do perfil antimicrobiano dos extratos de *A. pyrifolium* frente a *E. coli* é apresentada na ANOVA (Tabela 3) e no Gráfico de Pareto (Figura 2).

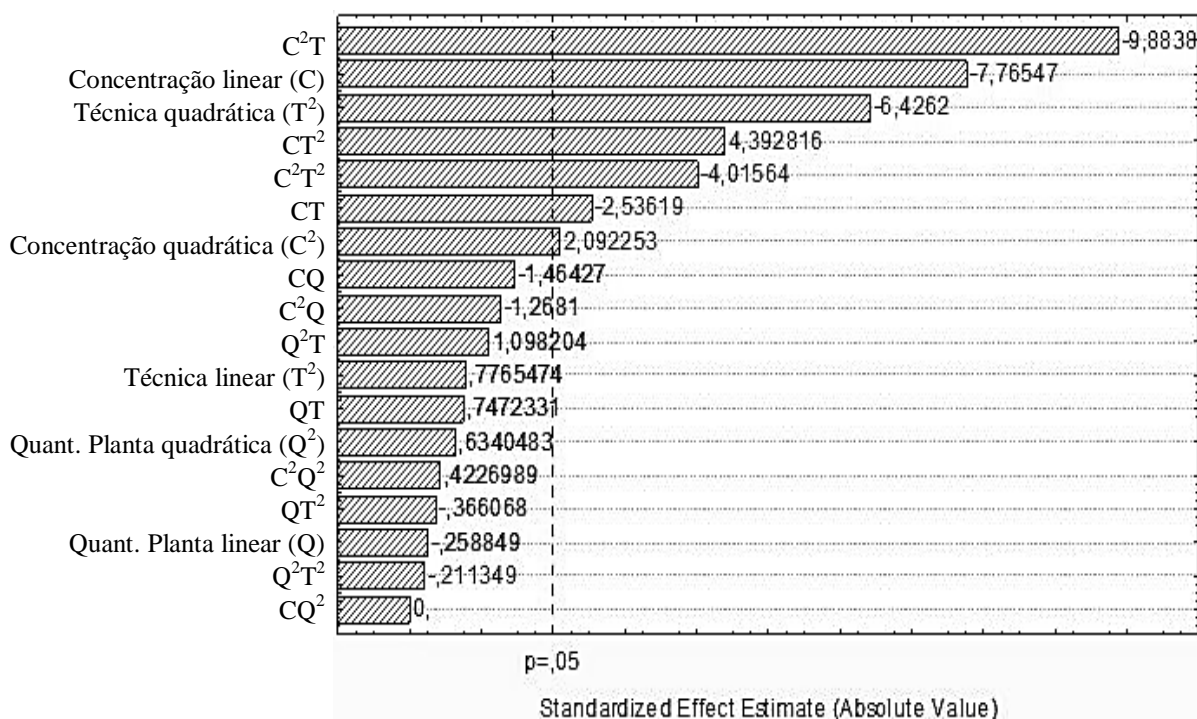
Tabela 3 – ANOVA do perfil antimicrobiano de *A. pyrifolium* frente a *E. coli*.

Fontes de variação	GL	SQ	MQ	F	p-valor
Concentração linear (C)	1	0,065104	0,065104	60,30259	<0,0001
Concentração quadrática (C ²)	1	0,004726	0,004726	4,37752	0,040517
Quant. Planta linear (Q)	1	0,000072	0,000072	0,06700	0,796609
Quant. Planta Técnica (Q ²)	1	0,000603	0,000603	0,55836	0,457747
Técnica linear (T)	1	0,000651	0,000651	0,60303	0,440378
Técnica quadrática (T ²)	1	0,044584	0,044584	41,29611	<0,0001
CQ	1	0,001736	0,001736	1,60807	0,209505
CQ ²	1	0,000000	0,000000	0,00000	1,000000
C ² Q	1	0,002315	0,002315	2,14409	0,148172
C ² Q ²	1	0,000193	0,000193	0,17867	0,673977
CT	1	0,006944	0,006944	6,43228	0,013740
CT ²	1	0,020833	0,020833	19,29683	<0,0001
C ² T	1	0,105469	0,105469	97,69020	<0,0001
C ² T ²	1	0,017409	0,017409	16,12536	0,000163
QT	1	0,000434	0,000434	0,40202	0,528382
QT ²	1	0,000145	0,000145	0,13401	0,715561
Q ² T	1	0,001302	0,001302	1,20605	0,276362
Q ² T ²	1	0,000048	0,000048	0,04467	0,833308
Erro	62	0,066937	0,001080		
Total	80	0,339506			

GL: graus de liberdade; SQ: soma quadrática; MQ: média quadrática; F: valor de teste F (95%); P: valor de significância.

Avaliando a ANOVA (Tabela 3) percebe-se que, para *E. coli*, as variáveis C e T², bem como as interações CT², C²T foram altamente significativas (p<0,0001, enquanto que a variável C² e as interações CT e C²T² foram significativas (p<0,05).

Figura 2 – Gráfico de Pareto do perfil antimicrobiano de *A. pyrifolium* frente a *E. coli*.



Já a avaliação do Gráfico de Pareto (Figura 2) demonstra que influência destas variáveis e interações tende ao nível (-), sendo a interação C²T, a mais significativa. Assim, as variáveis concentração e técnica extrativa, bem como suas interações influenciaram na obtenção dos extratos com as melhores atividades antimicrobianas diante da bactéria *E. coli*.

A análise estatística do perfil antimicrobiano dos extratos de *A. pyrifolium* frente a *K. pneumoniae* é apresentada na ANOVA (Tabela 4) e no Gráfico de Pareto (Figura 3).

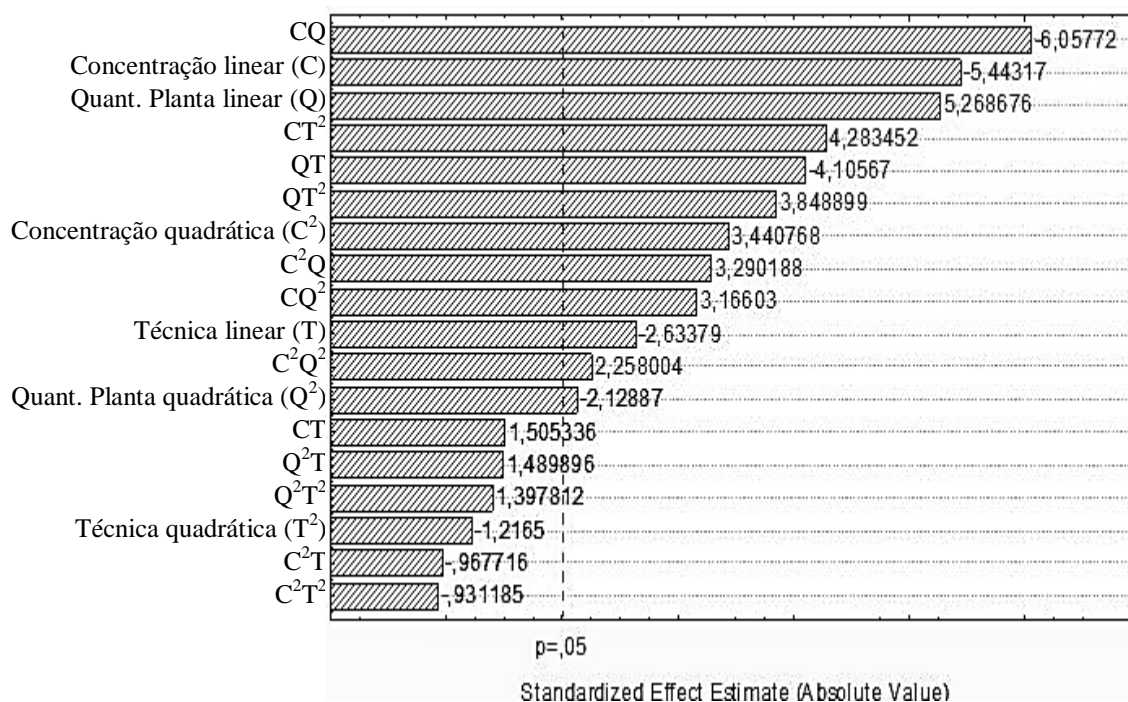
Tabela 4 – ANOVA do perfil antimicrobiano de *A. pyrifolium* frente a *K. pneumoniae*.

Fontes de variação	GL	SQ	MQ	F	p-valor
Concentração linear (C)	1	0,086100	0,086100	36,69592	<0,0001
Concentração quadrática (C ²)	1	0,039551	0,039551	16,85654	0,000120
Quant. Planta linear (Q)	1	0,069517	0,069517	29,62805	<0,0001
Quant. Planta Técnica (Q ²)	1	0,010634	0,010634	4,53207	0,037245
Técnica linear (T)	1	0,016276	0,016276	6,93685	0,010648
Técnica quadrática (T ²)	1	0,003472	0,003472	1,47986	0,228407
CQ	1	0,065131	0,065131	27,75895	<0,0001
CQ ²	1	0,023519	0,023519	10,02374	0,002397
C ² Q	1	0,025400	0,025400	10,82534	0,001654
C ² Q ²	1	0,011963	0,011963	5,09858	0,027476
CT	1	0,004584	0,004584	1,95388	0,167151
CT ²	1	0,043050	0,043050	18,34796	<0,0001
C ² T	1	0,002035	0,002035	0,86711	0,355370
C ² T ²	1	0,002197	0,002197	0,93647	0,336946
QT	1	0,027778	0,027778	11,83889	0,001043
QT ²	1	0,034758	0,034758	14,81402	0,000283
Q ² T	1	0,005208	0,005208	2,21979	0,141321
Q ² T ²	1	0,005317	0,005317	2,26604	0,137316
Erro	62	0,145472	0,002346		
Total	80	0,621962			

GL: graus de liberdade; SQ: soma quadrática; MQ: média quadrática; F: valor de teste F (95%);
P: valor de significância.

As variáveis (C, C², Q, Q² e T) e interações (CQ, CQ², C²Q, C²Q², CT², QT e QT²) foram significantes segundo a ANOVA (Tabela 4) construída para os resultados de *K. pneumoniae*, sendo C, Q, CQ e CT² altamente significativas.

Figura 3 – Gráfico de Pareto do perfil antimicrobiano de *A. pyrifolium* frente a *K. pneumoniae*.



A partir do Gráfico de Pareto (Figura 3) verifica-se que influência da variável concentração ficou disposta entre ambos os níveis (+ e -), já as demais variáveis e interações tenderam ao nível (-), sendo a interação CQ a mais significativa. As variáveis concentração e quantidade de planta e suas interações foram mais eficazes resultando na produção de extratos com as melhores atividades antimicrobianas frente a *K. pneumoniae*.

A análise estatística do perfil antimicrobiano dos extratos de *A. pyrifolium* frente a *P. aeruginosa* é apresentada na ANOVA (Tabela 5) e no Gráfico de Pareto (Figura 4).

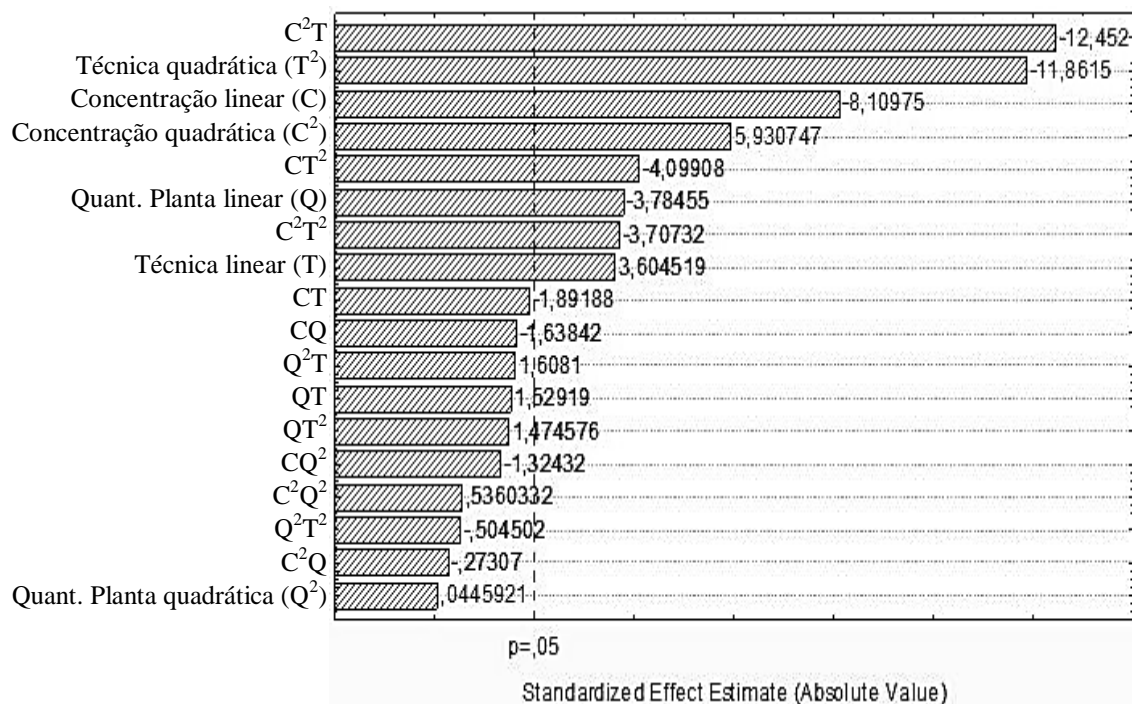
Tabela 5 – ANOVA do perfil antimicrobiano de *A. pyrifolium* frente a *P. aeruginosa*.

Fontes de variação	GL	SQ	MQ	F	p-valor
Concentração linear (C)	1	0,199382	0,199382	65,7681	<0,0001
Concentração quadrática (C ²)	1	0,106632	0,106632	35,1738	<0,0001
Quant. Planta linear (Q)	1	0,043421	0,043421	14,3228	0,000350
Quant. Planta Técnica (Q ²)	1	0,000006	0,000006	0,0020	0,964576
Técnica linear (T)	1	0,041667	0,041667	13,7442	0,000449
Técnica quadrática (T ²)	1	0,426529	0,426529	140,6951	<0,0001
CQ	1	0,007840	0,007840	2,5860	0,112894
CQ ²	1	0,006592	0,006592	2,1744	0,145387
C ² Q	1	0,000226	0,000226	0,0746	0,785707
C ² Q ²	1	0,000871	0,000871	0,2873	0,593854
CT	1	0,010851	0,010851	3,5792	0,063179
CT ²	1	0,039388	0,039388	12,9926	0,000624
C ² T	1	0,470052	0,470052	155,0517	<0,0001
C ² T ²	1	0,050938	0,050938	16,8024	0,000123
QT	1	0,005317	0,005317	1,7538	0,190259
QT ²	1	0,007089	0,007089	2,3384	0,131304
Q ² T	1	0,008138	0,008138	2,6844	0,106400
Q ² T ²	1	0,000772	0,000772	0,2545	0,615697
Erro	62	0,187958	0,003032		
Total	80	1,613667			

GL: graus de liberdade; SQ: soma quadrática; MQ: média quadrática; F: valor de teste F (95%);
P: valor de significância.

Para *P. aeruginosa* a ANOVA (Tabela 5) permitiu identificar que as variáveis C, C², Q, T e T²; bem como as interações CT², C²T e C²T² são estatisticamente significativas, sendo C, C², T² e C²T, altamente significativas.

Figura 4 – Gráfico de Pareto do perfil antimicrobiano de *A. pyrifolium* frente *P. aeruginosa*.



A observação do Gráfico de Pareto (Figura 4) permite identificar que a interação C²T é a mais significativa e que também houve tendência ao nível (-). Portanto, ações sobre as variáveis técnica extrativa e concentração e, suas interações, influenciam na obtenção de extratos com melhor atividade perante *P. aeruginosa*.

A análise estatística do perfil antimicrobiano dos extratos de *A. pyrifolium* frente a *S. aureus* é apresentada na ANOVA (Tabela 6) e no Gráfico de Pareto (Figura 5).

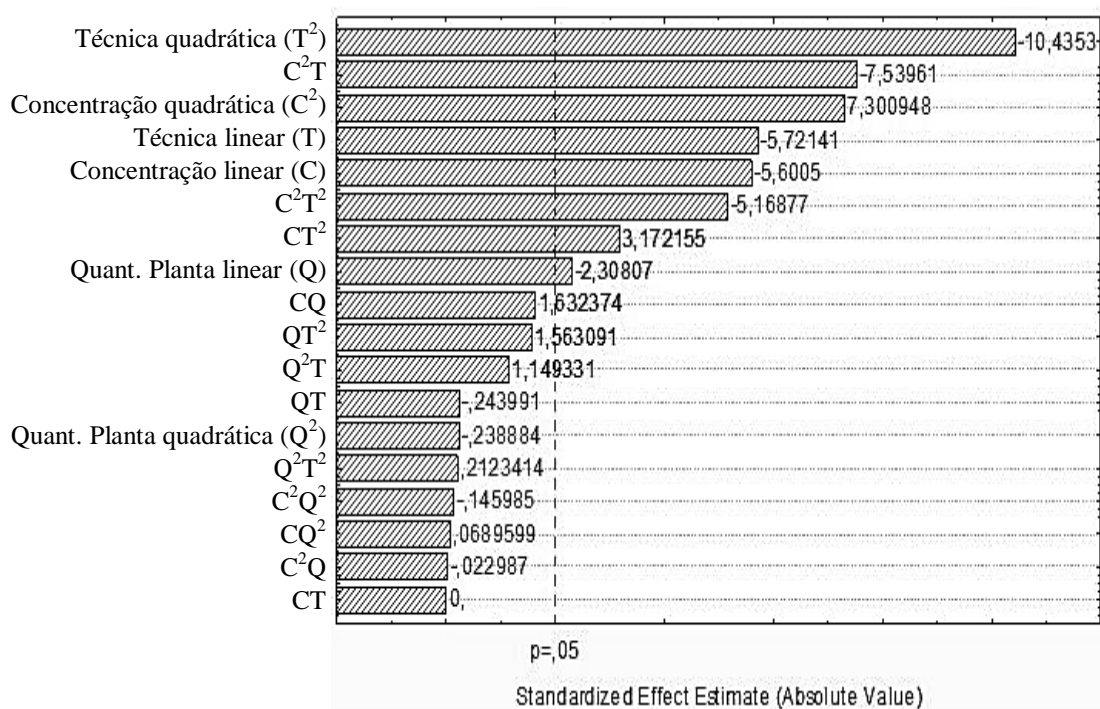
Tabela 6 – ANOVA do perfil antimicrobiano de *A. pyrifolium* frente *S. aureus*.

Fontes de variação	GL	SQ	MQ	F	p-valor
Concentração linear (C)	1	0,114299	0,114299	26,7162	<0,0001
Concentração quadrática (C ²)	1	0,228047	0,228047	53,3038	<0,0001
Quant. Planta linear (Q)	1	0,022791	0,022791	5,3272	0,024345
Quant. Planta Técnica (Q ²)	1	0,000255	0,000255	0,0595	0,808044
Técnica linear (T)	1	0,140046	0,140046	32,7345	<0,0001
Técnica quadrática (T ²)	1	0,465881	0,465881	108,8952	<0,0001
CQ	1	0,011400	0,011400	2,6646	0,107670
CQ ²	1	0,000020	0,000020	0,0048	0,945243
C ² Q	1	0,000002	0,000002	0,0005	0,981735
C ² Q ²	1	0,000091	0,000091	0,0213	0,884407
CT	1	0,000000	0,000000	0,0000	1,000000
CT ²	1	0,043050	0,043050	10,0626	0,002354
C ² T	1	0,243200	0,243200	56,8458	<0,0001
C ² T ²	1	0,134190	0,134190	31,3656	<0,0001
QT	1	0,000244	0,000244	0,0571	0,811983
QT ²	1	0,010453	0,010453	2,4433	0,123122
Q ² T	1	0,005651	0,005651	1,3210	0,254834
Q ² T ²	1	0,000193	0,000193	0,0451	0,832537
Erro	62	0,265251	0,004278		
Total	80	1,685065			

GL: graus de liberdade; SQ: soma quadrática; MQ: média quadrática; F: valor de teste F (95%);

P: valor de significância.

Com a análise da ANOVA (Tabela 6), desenvolvida como as respostas obtidas para *S. aureus*, admitiu-se que as variáveis C, C², Q, T e T²; bem como as interações CT², C²T e C²T² são estatisticamente significantes, sendo C, C², T, T², CT² e C²T² altamente significativas.

Figura 5 – Gráfico de Pareto do perfil antimicrobiano de *A. pyrifolium* frente *S. aureus*.

Ainda, de acordo como o Gráfico de Pareto (Figura 5), a variável T^2 foi a mais significativa e a tendência do nível, em geral, permaneceu negativa. Novamente, as variáveis concentração e técnica extrativa, assim com suas interações influenciaram mais que a variável quantidade de planta na obtenção de extratos com melhor perfil antimicrobiano.

Portanto, considerando os resultados das quatro cepas bacterianas percebe-se que as variáveis concentração e técnica extrativa, bem como suas interações, influenciam na potência dos extratos mais que a variável quantidade de planta; e avaliando apenas concentração e técnica extrativa observa-se que a primeira detém uma maior influência, do ponto estatístico, na produção de extratos com potencial antimicrobiano.

Não obstante a maioria das avaliações estatísticas tenha demonstrado tendência ao nível (-), o que resultaria na maximização dos efeitos, escolheu-se os níveis (+), visto que para uma maior atividade antimicrobiana necessita-se da minimização dos efeitos, a qual corresponderia a um menor volume capaz de inibir o crescimento dos microrganismos testados. Deste modo, com base na análise da tendência do sinal das variáveis e das interações, percebe-se que o extrato obtido por turbólise a 90% de solução hidroalcoólica e 30 g de material vegetal foi o de melhor ação, por ser o mais ativo contra três (*P. aeruginosa*, *S. aureus* e *E. coli*) das quatro cepas testadas, sendo o extrato obtido por turbólise a 70% de

solução hidroalcoólica e 30 g de material vegetal, o melhor quanto à inibição de *K. pneumoniae*.

Além disso, avaliando as variáveis pelo seu coeficiente (linear ou quadrático) verificou-se que, apesar de geralmente serem associadas com um único dado, as variáveis quadráticas apresentaram, em geral, uma maior significância estatística, para este experimento. Esse dado é importante, pois enquanto que a otimização da resposta por alterações nas variáveis lineares ocorrem indefinidamente, seguindo o eixo (sinal) escolhido, no caso das quadráticas, existe uma região ótima (limitada em ambos os lados) que quando ultrapassada reduz a significância dos resultados.

3.3. Seleção da partição de maior potencial antimicrobiano

Os resultados da determinação da CIM do extrato etanólico por turbólise de *A. pyrifolium* (EET-Ap) e das suas partições estão expostos na tabela 7.

Tabela 7 – Média da CIM do extrato etanólico por turbólise de *A. pyrifolium* (EET-Ap) e das partições deste extrato frente as cepas bacterianas.

Partições	CIM ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$)			
	Microrganismos			
	<i>S. aureus</i>	<i>K. pneumoniae</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>E. coli</i>
EET-Ap	0,208	0,250	0,125	0,125
Acetato de Etila	0,208	0,250	0,125	0,125
Clorofórmio	0,125	0,208	0,104	0,125
Hexano	0,208	0,250	0,125	0,125
Metanol/Água	0,333	0,250	0,062	0,104
Pastosa	0,250	0,250	0,104	0,125

A partir da análise da tabela 7, observa-se que as partições apresentaram desempenhos estatisticamente semelhantes (comparando-se as médias), sendo a partição clorofórmica a mais efetiva frente *S. aureus* e *K. pneumoniae*, e a metanol/água, a de melhor ação sobre *P. aeruginosa* e *E. coli*.

Comparando os resultados do EET-Ap com os obtidos por suas partições (TABELA 7), observa-se um aumento do potencial antimicrobiano, pois enquanto a CIM do extrato

variou entre 0,208 a 0,125 $\mu\text{L}/\mu\text{L}$, a CIM das partições variou entre 0,333 a 0,0625 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, sendo a maior inibição sobre *P. aeruginosa*, em ambos os casos. Essa maior atividade sobre uma cepa Gram-negativa contradiz o evidenciado por Migliato *et al.* (2011) e Proestos *et al.* (2013), ao afirmarem que as cepas Gram-positivas são mais susceptíveis, aos compostos naturais, que as Gram-negativas, devido a facilidade que essas substâncias têm de se ligar a essas bactérias, por causa da polaridade de suas estruturas. Todavia, esse perfil antimicrobiano pode ter ocorrido devido à seleção de compostos com perfil inibitório à *P. aeruginosa*.

3.4. Caracterização fitoquímica semiquantitativa

Para a análise fitoquímica (Tabela 8) foram escolhidos os extratos obtidos com a concentração alcoólica de 90% e com 30g de material vegetal, sendo um representante de cada técnica extrativa: por maceração (EEM-Ap), por turbólise (EET-Ap) e por ultrassom (EEU-Ap), ambos previamente rotaevaporados, objetivando verificar se haveria alguma relação entre a presença e/ou quantidade de compostos obtidos e a atividade biológica observada.

Tabela 8 – Teor de polifenóis, flavonoides, taninos e saponinas presentes na espécie *A. pyriformis* Mart.

Extrato	Polifenóis (mg EAG.g ⁻¹)	Flavonoides (mg EQC.g ⁻¹)	Taninos (mg ECAT.g ⁻¹)	Saponinas (mg EDI.g ⁻¹)
EEM-Ap	105,59 ± 1,12	3,27 ± 0,03	n.d.	484,16 ± 141,48
EET-Ap	87,25 ± 10,11	3,14 ± 0,02	n.d.	426,86 ± 56,03
EEU-Ap	101,78 ± 0,01	3,31 ± 0,39	n.d.	512,57 ± 57,38

Valores expressos como média ± desvio padrão; n.d. = não determinado. EAG = equivalente de ácido gálico; EQC = equivalente de quercetina; ECA = equivalente de catequina; EDI = equivalente de diosgenina.

A análise demonstrou que o EEM-Ap apresentou um maior conteúdo de polifenóis. Quanto as saponinas e os flavonoides, o EEU-Ap, foi o detentor da maior quantidade. Não foi possível quantificar os taninos através do teste realizado, pois a quantidade detectada ficou fora da faixa do limite de quantificação, utilizada na garantia da confiabilidade desse tipo de dado. Ainda que Santos (2011) tenha determinado sua presença (ensaio de complexação com gelatina) nessa espécie. Além disso, a *A. pyriformis* Mart. possui grande quantidade de

alcaloides indólicos característicos da família Apocynaceae e do gênero *Aspidosperma* (PEREIRA *et al.* 2007; SANTOS *et al.* 2013).

Neste contexto, a ação antibacteriana dos extratos de *A. pyrifolium* Mart. pode ser atribuída aos polifenóis, aos flavonoides, às saponinas (evidenciados pelo ensaio fitoquímico), aos taninos e/ou aos alcaloides (Santos, 2010; Alves, 2007; Pereira *et al.* 2007) presentes nessa espécie.

A ação antimicrobiana dos flavonoides, segundo Grindi *et al.* (2011) pode derivar da sua capacidade de inibição da síntese de ácido nucléico, da promoção do rompimento de membranas bacterianas e/ou inibição do metabolismo energético. Já para Dzoyem *et al.* (2013), em seu estudo com espécies do gênero *Dorstenia*, interferências na despolarização de membranas, inibição do DNA, RNA e da síntese de proteínas seriam os responsáveis por essa atividade.

Para Oliveira *et al.* (2012), o caráter adstringente, que confere aos taninos a habilidade de precipitar proteínas, seria o principal meio de inibição bacteriana, atuando especialmente na inativação de suas enzimas. Além disso, pode ser responsável também pela inibição de síntese proteica (MISHRA, 2013).

Saponinas, por característica, são anfifílicas podendo atuar como verdadeiros tensoativos, desestabilizando a superfície e interferindo na permeabilidade das membranas celulares, provocando perda de proteínas, e podendo ocasionar a lise celular (BÖTTGER *et al.* 2013; CIESLAK *et al.* 2013; MISHRA, 2013).

Mayer *et al.* (2013), em seu artigo de revisão sobre produtos marinhos naturais, apontam o ataque covalente a proteínas da parede celular bacteriana, efetuado pelo alcaloide (-) discorhabdin Z, como um provável mecanismo antimicrobiano dos alcaloides.

Assim, embora a observação dos resultados (Tabela 8) possa levar a uma dedução de que os extratos EEM-Ap e EEU-Ap possuam maior atividade antibacteriana que o EET-Ap, posto que apresentaram maior quantidade de compostos naturais, o inverso aconteceu, no qual o extrato de maior atividade foi EET-Ap, seguido pelo EEU-Ap e por fim o EEM-Ap. Isso pode ser explicado pela seleção de compostos extraídos, pois o valor da quantificação fitoquímica realizada é dado de forma total (a soma de todos os flavonoides, de todos os polifenóis e de todas as saponinas), ou seja, não especificando a classe (flavonoide, saponina e/ou polifenol) que foi extraída e que pode ser determinante para uma ou para outra atividade biológica, além de uma ação sinérgica.

Deste modo, os polifenóis, flavonoides e saponinas, presentes no EEM-Ap e no EEU-Ap, não possuem ação antimicrobiana tão eficaz quanto os presentes no EET-Ap, mesmo estando em maior quantidade. A mesma circunstância ocorreu no primeiro *screening* realizado, pois, ainda que os extratos obtidos por maceração e a 50% de álcool possuíam um maior resíduo seco (maior quantidade de compostos), os de melhor atividade foram os obtidos por turbólise a 90% de álcool. Migliato *et al.* (2011), ao trabalhar com os frutos de *Syzygium cumini* (L.) também observou essa mesma divergência, pois enquanto o melhor processo, para resíduo seco, foi composto pela técnica percolação associada a concentração alcoólica de 50%; o melhor perfil antimicrobiano variou entre percolação e turbólise, 50% e 70%, a depender do microrganismo testado.

4. CONCLUSÃO

O planejamento fatorial é uma importante ferramenta à redução de custos e de tempo, especialmente quando utilizada antes de estudos em que se desejam otimizar atividades biológicas, rendimentos ou qualquer outro dado que envolva um número significativamente alto de análises.

A otimização do processo extrativo de *A. pyriforme* Mart., apontou a metodologia composta por maceração a 50% de solução hidroalcoólica e 30 g de material vegetal, como a mais eficiente ao teor de resíduo seco (rendimento) do extrato. Todavia, a otimização da atividade antimicrobiana demonstrou que o extrato produzido com turbólise, 90% e 30 g compõem o processo extrativo mais rentável à obtenção de extratos com alto perfil antibacteriano. Percebe-se então, que nem sempre um rendimento alto culmina com elevada resposta biológica, sendo mais importante selecionar o tipo de substância extraída a uma quantidade elevada de compostos com pouca atividade.

A prospecção fitoquímica determinou a presença de compostos fenólicos (dentre eles os flavonoides) e de saponinas que juntamente a outras substâncias (taninos e alcaloides indólicos), apontados por outros autores, são responsáveis pela ação antimicrobiana da *A. pyriforme* Mart.

Assim, as pesquisas com plantas ainda podem oferecer subsídios para a elaboração de novos medicamentos. No entanto, ainda que todos extratos testados tenham obtido resultados favoráveis, deve-se promover análises que visem a elucidação dos compostos envolvidos na ação antimicrobiana, bem como ensaios que demostrem o comportamento toxicológicos.

5. REFERÊNCIAS

ALVARENGA, F.C.R.; GARCIA, E.F.; BASTOS, E.M.A.F.; GRANDI, T.S.M.; DUARTE, M.G.R. Avaliação da qualidade de amostras comerciais de folhas e tinturas de guaco. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.19, n.2^a, p.442-448, 2009.

ALVES, N. M. **Estudo farmacognóstico e da toxicidade experimental (aguda e subaguda) do extrato etanólico da casca do guatambu (*Aspidosperma subincanum* Mart.)**. 2007. 73f. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) – Universidade de Brasília, Brasília, Distrito Federal.

BÖTTGER, S.; WESTHOF, E.; SIEMS, K.; MELZIG, M.F. Structure-activity relationships of saponins enhancing the cytotoxicity of ribosome-inactivating proteins type I (RIP-I). **Toxicon**. V.73, p.144-150, 2013.

BRASIL. **Farmacopéia Brasileira**. 5^a ed. Brasília: Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2010.

BRITO, M.A.; CORDEIRO, B.C. Necessidade de novos antibióticos. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v.48, n.4, p.247-249, 2012.

CAMPOS, L.F.A.; AMORIM, L.V.; FERREIRA, H.C. Utilização do planejamento experimental no estudo do efeito da composição de misturas de bentonitas na reologia de fluidos de perfuração. Parte I: composições binárias. **Cerâmica**, v.52, p.69-75, 2006.

CIESLAK, A.; SZUMACHER-STRABEL, M.; STOCHMAL, A.; OLESZEK, W. Plant components with specific activities against rumen methanogens. **Animal**, v.7, n.2, p.253–265, 2013.

CHANDRA, S.; MEJÍA, E.G. Polyphenolic Compounds, Antioxidant Capacity, and Quinone Reductase Activity of an Aqueous Extract of *Ardisia compressa* in Comparison to Mate (*Ilex paraguariensis*) and Green (*Camellia sinensis*) Teas. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.52, p.3583-3589, 2004.

CLINICAL LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). Methods for dilution antimicrobial susceptibility test for bacteria that grow aerobically, seventh edition. Approved standard M7-A8. CLSI, Wayne, PA, 2009.

DZOYEM, J.P. HAMAMOTO, H.; NGAMENI, B.; NGADJUI, B.T.; SEKIMIZU, K. Antimicrobial action mechanism of flavonoids from *Dorstenia* species. **Drug Discoveries & Therapeutics**, v.7, n.2, p.66-72, 2013.

GINDRI, A.L.; BOLIGON, A.A.; MARIO, D.N.; FROHLICH, J.K.; BRUM, T.F.; ALVES, S.H.; ATHAYDE, M.L. Potencial antimicrobiano do extrato bruto e frações das folhas de *Tabernaemontana catharinensis* A. DC. **Revista Contexto & Saúde**, v.10, n.20, p.1213-1216, 2011.

LOPATA, V.J.; GARDONI, B.L.K.; NOWACKI, L.; RIBEIRO, C.N.M.; SOUZA, W.M. Triagem fitoquímica e atividade antimicrobiana da *Stachytarpheta cayennensis* – Gervão (L.C. Ich) Vahl. **Revista Eletrônica de Biociências, Biotecnologia e Saúde**, n.2, 2011.

MAKKAR, H.P.S.; BECKER, K. Vanillin-HCl method for condensed tannins: Effect of organic solvents used for extraction of tannins. **Journal of Chemical Ecology**, v.19, n.4, 1993.

MAKKAR, H.P.S.; SIDDHURAJU, P.; BECKER, K. **Plant Secondary Metabolites**. Totowa, New Jersey: Humana Press, 2007.

MAYER, A.M.; RODRÍGUEZ, A.D.; TAGLIALATELA-SCAFATI, O.; FUSETANI, N. Marine Pharmacology in 2009–2011: Marine Compounds with Antibacterial, Antidiabetic, Antifungal, Anti-Inflammatory, Antiprotozoal, Antituberculosis, and Antiviral Activities; Affecting the Immune and Nervous Systems, and other Miscellaneous Mechanisms of Action. **Marine Drugs**, n.11, p.2510-2573, 2013.

MEDA, A.; LAMIEN, C.E.; ROMITO, M.; MILLOGO, J.; NACOULMA, O.G. Determination of the total phenolic, flavonoid and proline contents in Burkina Fasan honey, as well as their radical scavenging activity. **Food Chemistry**, v.91, p.571-577, 2005.

MIGLIATO, K.F.; CORRÊA, M.A.; SALGADO, H.R.N. Planejamento experimental na otimização da extração dos frutos de *Syzygium cumini* (L.) Skeels. **Química Nova**, v.34, n.4, p.695-699, 2011.

MISHRA, P.C. Harmacological efficacy of some medicinal plants used for treatment of gastrointestinal diseases. **The National Environmentalists Association**, v.3, p. 111-116, 2013.

MORAES, G.M.; COHRS, F.M.; BATISTA, R.E.A.; GRINBAUM, R.S. Infecção ou colonização por micro-organismos resistentes: identificação de preditores. **Acta Paulista de Enfermagem**, v.26, n.2, p.185-191, 2013.

OLIVEIRA, K.A.M.; OLIVEIRA, G.V.; BATALINI, C.; ROSALEM, J.A.; RIBEIRO, L.S. Atividade antimicrobiana e quantificação de Flavonoides e Fenóis totais em diferentes extratos de Própolis. **Semina: Ciências Biológicas e da Saúde**, v.33, n.2, p.211-222, 2012.

PATIL, A.A.; BHUSARI, S.S.; SHINDE, D.B.; WAKTE, P.S. Optimization of process variables for phyllanthin extraction from *Phyllanthus amarus* leaves by supercritical fluid using a Box-Behnken experimental design followed by HPLC identification. **Acta Pharmaceutica**, v.63, p.193-207, 2013.

PEREIRA, M.M.; JÁCOME, R.L.R.P.; ALCÂNTARA, A.F.C.; ALVES, R.B.; RASLAN, D.S. Alcaloides indólicos isolados de espécies do gênero *aspidosperma* (Apocynaceae). **Química Nova**, v. 30, n.4, p.970-983, 2007.

PROESTOS, C.; ZOUMPOULAKIS, P.; SINANOGLU, V.J. Determination of Plant Bioactive Compounds. Antioxidant Capacity and Antimicrobial Screening. **Focusing on Modern Food Industry**, v,12, p.26-35, 2013

SANTOS, A.C.B.; SILVA, M.A.P.; SANTOS, M.A.F.; LEITE, T.R.; Levantamento etnobotânico, químico e farmacológico de espécies de Apocynaceae Juss. ocorrentes no Brasil. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.15, n.3, p.442-458, 2013.

SANTOS, P. B. **Contribuição ao estudo químico, bromatológico e atividade biológica de Angico *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan. Var. *cebil* (Gris.) Alts e Pereiro *Aspidosperma pyrifolium* Mart.** 2010. 46f. Dissertação (Zootecnia) – Universidade Federal de Campina Grande, Campina Grande, Paraíba.

SILVA, B.T.; ANJOS, C.; NOVO, S.M.F.; MATSUMOTO, L.S.; PEIXOTO, E.C.T.M.; SILVA, L.P.; SILVA, R.M.G. Antimicrobial activity in vitro of extracts of *Punica granatum* L. over *staphylococcus aureus* isolated in bovine milk, **Bioscience Journal**. v.29, n.4, p.974-984, 2013.

CAPÍTULO 3

MESSIADES, Davy Macgyver da Silva. **Avaliação da atividade farmacológica e toxicológica de *Aspidosperma pyrifolium* Mart.** Campina Grande, PB: UEPB, 2014. (Dissertação – Mestrado em Ciências Farmacêuticas).

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi avaliar o perfil toxicológico e a atividade farmacológica do extrato etanólico, obtido por turbólise, de *A. pyrifolium* Mart. (EET-Ap) em modelos animais. A toxicidade aguda foi analisada tomando como base as doses de 50, 150, 250 e 1000 mg/kg administradas por gavagem, sendo os animais observados por 14 dias, quanto ao consumo de água e ração, e quanto aos parâmetros comportamentais, ao fim, foi verificada a presença de alterações bioquímicas, hematológicas e morfológicas nos órgãos. Os resultados obtidos na avaliação da toxicidade aguda serviram de base à determinação de doses seguras ao estudo farmacológico. A atividade anti-inflamatória foi avaliada pelo teste de edema de pata e de peritonite, ambos induzidos por carragenina, utilizando o extrato em doses de 62,5; 125, e 250 mg/kg (v.o) nos grupos experimentais; indometacina 10 mg/kg como controle positivo e solução salina/Cremophor, como controle negativo. A atividade antinociceptiva foi determinada através do método de contorções induzidas por ácido acético e pelo teste da formalina, ambos utilizaram o extrato em concentrações de 62,5; 125, e 250 mg/kg (v.o) nos grupos experimentais e solução salina/Cremophor, no controle negativo. O teste de contorções utilizou dipirona 500 mg/kg como controle positivo e o teste de formalina indometacina 10 mg/kg. Os resultados mostraram efeito anti-inflamatório e antinociceptivo, estatisticamente significativo, nas doses testadas. Tais resultados sugerem potencial aplicação terapêutica no tratamento da inflamação e principalmente da nocicepção. Contudo, ressalva-se o cuidado quanto à escolha da dose a ser administrada. O EET-Ap apresentou indícios de baixa toxicidade na dose de 1000 mg/kg e quantos as demais doses, a presença toxicidade mostraram-se mais ligados a susceptibilidade individual, do grupo animal, do que a toxicidade do extrato vegetal.

Palavras-chave: Peritonite, Edema de pata, Formalina, Contorções, *A. pyrifolium*.

ABSTRACT

The objective of this study was to evaluate the toxicological profile and pharmacological activity of the ethanolic extract, obtained by turbo extraction, of *A. pyrifolium* Mart. (EET-Ap) in animal models. Acute toxicity was analyzed on the doses 50, 150, 250 and 1000 mg/kg administered by gavage, the animals were observed for 14 days, as the consumption of water and food, and as the behavioral parameter settings, at end, was verified the presence of biochemical, hematological and morphological changes in the organs. The results obtained in the evaluation of acute toxicity were the basis for determining safe doses pharmacological study. The anti-inflammatory activity was assessed by paw edema and peritonitis test, both induced by carrageenan, using the extract at doses of 62.5, 125 and 250 mg/kg (v.o) in the experimental groups; indomethacin 10 mg/kg, as positive control, and saline/Cremophor saline, as negative control. The antinociceptive activity was determined by the method of acetic acid-induced writhing and formalin test, both the extract used in concentrations of 62.5; 125 and 250 mg/kg (v.o) in the experimental group and saline/Cremophor in the negative control. The writhing test used dipyron 500 mg/kg as positive control and the formalin test indomethacin 10 mg/kg. The results showed anti-inflammatory and antinociceptive effects statistically significant at the dosages tested. These results suggest potential therapeutic application in the treatment of inflammation and especially nociception. However, it is emphasized careful in the choice of the dose to be administered. The EET-Ap showed evidence of toxicity at dose 1000 mg/kg and the other doses, the presence toxicity were more related to the individual susceptibility, of the animal group, that with the toxicity of the plant extract.

Keywords: Peritonitis, Paw edema, Formalin, Contortions, *A. pyrifolium*.

1. INTRODUÇÃO

Os processos inflamatórios consistem em uma reação de defesa do organismo frente a uma agressão que pode vir de agentes físicos, químicos e/ou biológicos (infecções em geral); sendo caracterizados inicialmente por sintomas como calor, eritema, edema, hipersensibilidade e dor, podendo evoluir para a perda da função da região afetada (SILVA *et al.* 2011).

A dor é caracterizada por experiências sensoriais e emocionais, podendo ser crônica ou aguda. Por vezes, a percepção de dor é entendida como um mecanismo de proteção, no qual o corpo inibe comportamentos que levem a uma injúria maior (KLAUMANN *et al.* 2008; CORTES *et al.* 2013).

Entretanto, em muitos casos, tanto a inflamação quanto a dor podem se tornar exacerbadas e prejudiciais, necessitando da utilização de substâncias anti-inflamatórias, que podem ser do tipo esteroidais (glicocorticoides) ou não-esteroidais (AINEs), ou analgésicas, para que não resultem em complicações que alterem a qualidade de vida dos acometidos.

Os AINEs caracterizam-se por inibir a atividade de subtipos da ciclooxigenase (COX 1 e 2), impedindo a síntese de prostaglandinas pela via metabólica da cascata do ácido araquidônico, já os glicocorticoides promovem supressão sobre a ciclooxigenase 2, além de induzirem a produção de anexinas que atuam modulando a função fosfolipase A2. Por outro lado, os analgésicos podem atuar inibindo processos inflamatórios e consequentemente, a dor advinda destes, agindo diretamente em receptores do sistema nervoso central ou mesmo inibindo a liberação de neurotransmissores, todos esses processos resultando na redução ou eliminação da dor (BRUNTON, 2012; IWALEWA *et al.* 2007; SAHA *et al.* 2013).

Todavia, esses medicamentos possuem diversos efeitos colaterais que comprometem seu uso ocasionando uma relação custo benefício nem sempre válida, além de, em alguns casos, ocasionarem dependência ou mesmo não serem eficazes, especialmente quando se desenvolvem quadros de tolerância devido principalmente ao uso indiscriminado muitas vezes ligado a automedicação (BRUNTON, 2012).

Na tentativa de burlar esses problemas a indústria farmacêutica investe em novas drogas, ou mesmo em modificação das atuais, para que possam substituir as disponibilizadas, aumentando os efeitos benéficos e reduzido os adversos. Neste contexto, os medicamentos fitoterápicos encontram cada vez mais espaço, baseando-se no *slogan* de que “o que é natural

não faz mal”, esse mercado cresce especialmente em comércios como o europeu, onde a comercialização gera cifras na casa dos bilhões todo ano (KLEIN *et al.* 2010).

Assim, diversos compostos são descobertos a partir da avaliação do potencial terapêutico de plantas medicinais e de alguns de seus constituintes, tais como flavonoides, alcaloides, triterpenos, sesquiterpenos, taninos, lignanas, possuindo ação analgésica, as vezes, superior à fornecida por medicamentos convencionais (CECHINEL FILHO *et al.* 1997). Dentre os fitocompostos, os flavonoides talvez sejam os que detêm o maior número de integrantes com atividade anti-inflamatória, todavia, terpenos e esteroides também possuem notável aplicação nessa área (IWALEWA *et al.* 2007). Deste modo, novos compostos ainda podem ser descobertos especialmente partindo de estudos que abranjam espécies já utilizadas popularmente na medicina tradicional.

Contudo, mesmo o Brasil possuindo uma das maiores biodiversidades do mundo, ainda se encontra atrasado quanto às pesquisas de plantas com potencialidade medicinal, não aproveitando a flora que possui e muito menos a conhecimento medicinal de sua população. Esse quadro é agravado quando se trata de plantas do semiárido, como por exemplo, *Aspidosperma pyrifolium* Mart., conhecida popularmente como pereiro, que embora possua estudos que apontem atividades hipotensora, antimicrobiana, citotóxica em células cancerosas, é geralmente aproveitada como planta ornamental e forrageira (PEREIRA *et al.* 2007).

Além disso, devido ao uso de plantas, baseado somente no conhecimento popular e sem qualquer estudo que garanta a segurança, diversos casos de intoxicações ocorrem todo ano – quase sempre em razão de quantidades ou de concentrações excessivas de determinadas plantas e extratos vegetais, do preparo e do uso inadequados e, principalmente, em virtude do uso de plantas que possuem propriedades tóxicas ainda desconhecidas e/ou cumulativas – ocasionando toxicidade aguda ou crônica (MARTINS *et al.* 2000).

Diversos ensaios podem ser utilizados com a finalidade de se estabelecer a bioatividade e perfis de toxicidade de extratos, frações e compostos isolados de plantas. Os testes com base na dose por unidade de superfície corporal executado em animal são válidos, pois os efeitos observados, para um determinado composto, podem ser aplicáveis ao homem (até determinada proporção), sendo possível descobrir possíveis riscos aos humanos (KLASSEN, 2001).

Deste modo, esse trabalho teve como objetivo avaliar a toxicidade aguda, a atividade anti-inflamatória e antinociceptiva de *Aspidosperma pyrifolium* Mart. em modelos animais.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Material botânico

As cascas de *A. pyriforme* Mart. foram coletadas no sítio Capim Grande, nas proximidades do Distrito de São José da Mata, Campina Grande, Paraíba, no mês de dezembro de 2012 (coordenadas: S7°13'27,56" – W36°00'53,37"). O material foi identificado pelo Prof. Dr. Leonardo Pessoa Félix e a exsicata depositada no herbário Jayme Coelho de Moraes, Universidade Federal da Paraíba, sob o número 20104.

2.2. Obtenção do extrato

As cascas de *A. pyriforme* Mart. foram secas em estufa de circulação de ar ($40\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$) e pulverizadas em moinho de facas com granulometria de 10 mesh. Foram então submetidas à extração pela técnica de turbólise (com a utilização aparelho IKA[®] T-25 Ultra-Turrax[®]), usando álcool a 96% como solvente (planta: solvente 1:5, m/v), por 15 minutos a 6000 rpm (BADOKI *et al.* 2005). O extrato obtido foi filtrado e rotaevaporado (Evaporador Rotativo Microprocessado - Q344M), com rendimento final de 15%, sendo denominado de extrato etanólico obtido por turbólise de *Aspidosperma pyriforme* Mart. (EET-Ap).

2.3. Animais

Foram utilizados animais adultos, camundongos *Swiss (Mus musculus)* e ratos *Wistar (Rattus norvegicus)*, entre 25 a 35g e 150 a 220 g, respectivamente, de ambos os sexos. Foram mantidos em gaiolas plásticas em ambiente com temperatura e umidade ambiente, ciclo claro-escuro de 12 horas e comida e água *ad libitum*. Os protocolos experimentais foram submetidos ao Comitê de Ética e Pesquisa em Animais da Universidade Federal de Campina Grande, e conduzidos de acordo com as diretrizes éticas proposto pela *International Association for Study of Pain (IASP)* (ZIMMEMANN, 1983).

2.4. Avaliação da toxicidade

2.4.1 Teste de toxicidade aguda

O ensaio de toxicidade aguda foi baseado na RE N° 90/2004 da ANVISA e no protocolo experimental de Almeida *et al.* (1999), sendo realizado objetivando a avaliação das alterações comportamentais frente ao sistema nervoso central, autônomo e ocorrência de morte – informação utilizada para determinação da dose letal média (DL₅₀).

Deste modo, 40 ratos correspondendo a 4 grupos (n=10/grupo) de ambos os sexos foram tratados, por via oral (gavagem), com extrato EET-Ap nas doses de 1000, 250, 150 e 50 mg/kg, os quais foram emulsionados em Cremophor EL 0,05% e dissolvido em solução salina 0,9%. Enquanto que o grupo controle recebeu o veículo também por via oral. A escolha das doses levou em consideração a toxicidade do espécime vegetal (LIMA *et al.* 2010) e objetivou a determinação de doses seguras para a realização de ensaios farmacológicos.

Após a administração, parâmetros como massa corporal, consumo de água e de ração, e produção de excretas foram avaliados durante 30 min, 1, 2, 4, e a cada 24 horas por 14 dias. Assim como o estado de consciência e a disposição geral, a coordenação motora, o tônus muscular, os reflexos e a atividade do sistema nervoso autônomo. Ao final, no 15° dia, os animais foram pesados e anestesiados com quetamina 5% e cloridrato de xilazina 2%, sendo o sangue, coletado através de punção cardíaca, acondicionado em dois tipos de tubo, um com anticoagulante (EDTA) para determinação dos parâmetros hematológicos e o outro, gel separador, para obtenção do soro para avaliação dos parâmetros bioquímicos. Em seguida os animais foram eutanasiados por deslocamento cervical (ZIMMENANN, 1983), sendo os órgãos (fígado, baço, coração e rins) retirados, pesados e avaliados macroscopicamente (CUNHA *et al.* 2013).

2.4.2. Avaliação de parâmetros hematológicos e bioquímicos

Os parâmetros bioquímicos foram determinados utilizando-se kits específicos (Labtest) para o analisador automático (Metrolab 2300 Wiener). As amostras de sangue coletadas com o gel separador foram centrifugadas por 10 minutos a 3500 rpm, para obtenção do soro, destinado às dosagens dos seguintes parâmetros: glicose, triglicerídeos, colesterol,

HDL-colesterol, aspartatoaminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT), creatinina, ácido úrico e ureia.

Os parâmetros hematológicos foram obtidos em um analisador automático (Advia 60), bem como a contagem diferencial de leucócitos, realizada em extensões coradas com coloração Panótica. Com as amostras de sangue dos tubos contendo anticoagulante (EDTA) foram determinados os valores para eritrócitos, leucócitos, plaquetas, hemoglobina, hematócrito, e índices hematimétricos de volume corpuscular médio (VCM), hemoglobina corpuscular média (HCM) e hemoglobina corpuscular média (CHCM).

2.5. Ensaio farmacológicos

2.5.1. Avaliação da resposta anti-inflamatória

2.5.1.1. Edema de pata induzida por carragenina

Ratos adultos (grupo n=5) de ambos os sexos, em jejum prévio de 12 horas, foram tratados por via oral com 10 mL/kg do veículo, indometacina (10 mg/kg) e EET-Ap (62,5; 125 e 250 mg/kg). Após 30 minutos, foi injetada na região subplantar da pata traseira direita, 0,1 mL da solução de carragenina a 1%, e igual volume de solução salina 0,9% na região subplantar da pata traseira esquerda (controle). A mensuração do volume das patas foi realizada utilizando-se um paquímetro digital antes e na 2ª e 4ª hora após a indução do edema. O cálculo da área do edema foi feito por meio da multiplicação das medidas da largura e altura da pata pelo valor de π (3,14). O efeito antiedematogênico dos grupos tratados foi obtido pela diferença do volume da pata que recebeu o agente flogístico, e pelo volume da pata controle. O percentual de inibição foi calculado usando a fórmula: $\text{Inibição} = (V - X)/V \times 100\%$, onde V é o edema do grupo veículo e X os testes ou controle positivo (SANTOS, 2011; WINTER *et al.* 1962).

2.5.1.2. Peritonite induzida por carragenina

Camundongos adultos (grupo n=5) de ambos os sexos, em jejum prévio de 6 horas, foram tratados por via oral com veículo, indometacina (10 mg/kg) e EET-Ap (62,5; 125 e 250 mg/kg). Após 30 min, foi injetada uma solução de carragenina a 1% (0,1 mL/10 g) na

cavidade intraperitoneal do animal. Quatro horas após a indução da inflamação, os animais foram sacrificados e a cavidade intraperitoneal foi lavada com 2 mL do tampão fosfato (PBS), sendo este, posteriormente coletado. A contagem de leucócitos foi realizada no contador de células hematológico Advia 60. O percentual de inibição foi calculado usando a fórmula: $\text{Inibição} = (V-X)/V \times 100\%$, onde V é o número de leucócitos do grupo veículo e X os testes ou controle positivo (FERRÁNDIZ *et al.* 1991).

2.5.2. Avaliação de atividade antinociceptiva

2.5.2.1. Nociceção induzida por formalina

Ratos adultos (grupo n=5) de ambos os sexos, em jejum prévio de 12 horas, foram tratados por via oral com veículo (10 mL/kg), indometacina (10mg/kg) e EET-Ap (62,5; 125 e 250 mg/kg). Após 30 minutos foi injetada formalina a 1% (20 µL) na região subplantar da pata direita. Em seguida, os ratos foram transferidos para funis de vidro transparentes e foi medida a reatividade animal, considerando a verificação da ocorrência e contabilização de lambeduras, mordidas e/ou sacudidas na pata que recebeu o agente flogístico pelos 5 minutos iniciais (Fase I - neurogênica) e entre 15 e 30 minutos (Fase II - inflamatória). O percentual de inibição foi calculado usando a fórmula: $\text{Inibição} = (V-T)/V \times 100\%$, onde V é o grupo veículo e T os testes (HUNSKAAR *et al.* 1987).

2.5.2.2. Contorções abdominais induzidas por ácido acético

Camundongos adultos (grupo n=5) de ambos os sexos, em jejum prévio de 12 horas, foram tratados por via oral com veículo (10 mL/kg), dipirona (500mg/kg) e EET-Ap (62,5; 125 e 250 mg/kg). Após 40 minutos, foi injetada uma solução de ácido acético a 1% (0,1 mL/10g) via intraperitoneal. Posteriormente, os animais foram transferidos para funis de vidro transparentes e observados por 20 minutos para se contabilizar o número e o tempo de início das contorções abdominais seguido do estiramento dos membros inferiores. O percentual de inibição foi calculado usando a fórmula: $\text{Inibição} = (V-T)/V \times 100\%$, onde V é o número de contorções do grupo veículo e T os testes (KOSTER *et al.* 1959).

2.6. Análise estatística

Os resultados de toxicidade aguda foram tratados segundo o teste “t” de Student e Mann-Whitney, e os resultados das atividades anti-inflamatória e antinociceptiva foram avaliados utilizando a análise de variância de uma via (ANOVA) seguido do pós-teste de Dunnett. Todos os resultados foram expressos como média±desvio padrão (d.p.) e o nível de significância mínimo foi de $p < 0,05$ analisados pelo software *GraphPad Prisma 5.0*.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Toxicidade

O uso milenar de plantas medicinais mostrou que determinadas espécies vegetais apresentam substâncias potencialmente perigosas. Do ponto de vista científico, pesquisas mostraram que muitas delas possuem agentes químicos agressivos e, por esta razão, devem ser utilizadas com cuidado, respeitando seus riscos toxicológicos (VEIGA-JÚNIOR *et al.* 2005; MACIEL *et al.* 2005).

Esses riscos podem ser avaliados por meio de estudos toxicológicos pré-clínicos, sejam eles *in vitro* ou *in vivo* e estudos clínicos, subdivididos em fases (1 a 4). Em se tratando dos estudos pré-clínicos *in vivo*, a toxicidade aguda é um dos principais testes com o qual é possível observar sinais de intoxicação, determinar a DL_{50} conforme preconizado pela RE Nº 90/2004 e definir doses a serem usadas em estudos posteriores (MONTENEGRO, 2011).

Deste modo, considerando a ocorrência de morte de dois animais na dose de 1000 mg/kg e um na dose de 250 mg/kg via oral e, conseqüentemente, a impossibilidade de determinação da DL_{50} , (mesmo na dosagem mais alta, 1000 mg/kg) foi possível estabelecer as doses de 250, 125 e 62,5 mg/kg para o EET-Ap, a fim de prosseguir com a pesquisa das atividades anti-inflamatória e antinociceptiva.

A triagem toxicológica comportamental foi realizada com o objetivo de identificar alterações no sistema nervoso central e autônomo, pelo registro de sinais ou modificações de condutas, incluindo tempo de aparecimento, progressão e reversibilidade destes sintomas; bem como a variação de peso e o consumo de alimentos, e o número de animais mortos com possível causa de morte e respectivos exames histopatológicos (ALMEIDA *et al.* 1999; CRAVEIRO *et al.* 2008).

Logo, os animais tratados com EET-Ap nas dosagens de 1000 e 250 mg/kg, apresentaram analgesia caudal, redução da atividade geral, redução à resposta ao toque e anestesia na pata perdurando pelos dois primeiros dias. Além disso, o tratamento também resultou na morte de duas fêmeas (dose de 1000 mg/kg) e um macho (dose de 250 mg/kg), nas 24 e 48 horas, respectivamente. As dosagens de 150 e 50 mg/kg apresentaram os mesmos sinais, no entanto a duração foi apenas nas 4 primeiras horas, demonstrando que a duração desses sinais são dose dependentes e reversíveis.

As alterações no peso corporal e no peso dos órgãos também podem ser considerados como um indicador de efeitos adversos promovidos pela droga. É aceito como um sinal de toxicidade quando o animal perde mais que 10% do peso corpóreo inicial (RAZA *et al.* 2002; TEO *et al.* 2002). Assim, na evolução ponderal (Tabela 1), foi observado que não houve alterações significativas de peso dos testes em relação aos controles.

Tabela 1 – Efeito da administração via oral do controle (solução salina 0,9%) e diferentes doses do EET-Ap na evolução ponderal (alteração na massa corpórea) e, no consumo de ração e de água em ratos *Wistar* albinos adultos.

Parâmetro	Sexo	Tratamentos				
		Controle (10 mL/kg)	EET-Ap (1000 mg/kg)	EET-Ap (250 mg/kg)	EET-Ap (150 mg/kg)	EET-Ap (50 mg/kg)
P. inicial (g)	M	190±17	192±27	218±16	174±18	182±11
P. final (g)		248±13	240±39	266±23	224±18	223±18
Ganho (%)		29±12	28±9	22±7,1	29±4,9	23±7,2
P. início (g)	F	177±12	154±8,2	183±34	163±18	166±18
P. final (g)		189±11	177±2,5	196±36	183±20	177±18
Ganho (%)		6,9±2,7	15±7,2	7,1±1,1	13±10	7,6±1
Consumo de ração (g)	M	127±11	125±11	99±8,3***	114±12**	111±13**
	F	75±10	45±6,1***	7,8±4,8	82±9,9	77±6,8
Consumo hídrico(mL)	M	260±30,88	240±34,64	194,3±31,8***	221,4±33,48**	212,1±34,23***
	F	151,4±30,85	109,3±27,86***	147,1±24,94	165±39,76	138,9±22,03

M=machos; F=fêmeas; P. inicial=peso inicial; P. final=peso final. Os resultados expressos como média±d.p (n=5). Teste t-Student e Mann-Whitney, *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001, comparados ao grupo controle.

Quanto ao consumo de ração e de água (Tabela 1) foi observado redução significativa nos machos nas doses de 250, 150 e 50 mg/kg e nas fêmeas na dose de 1000 mg/kg. Apesar

de serem parâmetros importantes no estudo da segurança de um produto com finalidade terapêutica (IVERSEN *et al.* 2003), não se pode inferir toxicidade ao extrato, apenas baseando-se nesse critério.

Outro ponto a ser analisado, em estudos de toxicidade aguda, é a alteração na massa relativa dos órgãos. Essa, segundo Dallegrave (2003), possui uma estreita relação com sinais de toxicidade. Na perspectiva de se comprovar essa teoria, o peso dos órgãos foi avaliado ao término do ensaio de toxicidade aguda e foi observado que o EET-Ap alterou positivamente o peso relativo (Tabela 2) dos mesmos nas ratas fêmeas, havendo significância estatística da análise da massa do fígado na dose de 250 e 50 mg/kg e do baço das fêmeas nas doses de 150 e 50 mg/kg em relação ao controle.

Tabela 2 – Efeito da administração via oral do controle (solução salina 0,9%) e diferentes doses do EET-Ap no peso dos órgãos em ratos *Wistar* albinos adultos.

Peso relativo dos órgãos (g/100g)	Sexo	Tratamentos				
		Controle (10 mL/kg)	EET-Ap (1000 mg/kg)	EET-Ap (250 mg/kg)	EET-Ap (150 mg/kg)	EET-Ap (50 mg/kg)
	<i>M</i>					
Fígado		3,4±0,13	3,4±0,58	3,2±0,34	3,4±0,41	3,5±0,41
Baço		0,38±0,03	0,39±0,08	0,35±0,05	0,36±0,04	0,42±0,06
Coração		0,36±0,04	0,38±0,04	0,36±0,02	0,38±0,03	0,41±0,06
Rins		0,78±0,09	0,76±0,14	0,73±0,02	0,73±0,09	0,78±0,04
	<i>F</i>					
Fígado		3±0,23	3,2±0,19	3,7±0,55*	3,6±0,53	3,3±0,11*
Baço		0,36±0,03	0,4±0,05	0,46±0,13	0,47±0,05**	0,48±0,09**
Coração		0,38±0,07	0,39±0,01	0,41±0,08	0,39±0,05	0,39±0,04
Rins		0,73±0,11	0,80±0,03	0,92±0,16	0,81±0,05	0,8±0,09

M=machos; F=fêmeas. Os resultados expressos como média±d.p (n=5). Teste t-Student e Mann-Whitney, *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001, comparados ao grupo controle. Para a avaliação dos órgãos, os valores foram obtidos pelo peso relativo em gramas dos órgãos por 100 gramas de peso dos animais.

Entretanto, quanto às características macroscópicas dos órgãos dos animais, não foram visualizadas alterações. Além disso, considerando que a dosagem maior (1000 mg/kg) não promoveu modificações no peso dos órgãos e que as dosagens menores (150 e 50 mg/kg) foram responsáveis pela maioria dessas alterações, infere-se que tais alterações possuem um caráter mais ligado a susceptibilidade individual dos animais do que a um comportamento tóxico do extrato.

Em relação aos parâmetros hematológicos e bioquímicos apresentados nas tabelas 3 e 4, respectivamente, pode-se observar que não houve, em geral, diferença estatisticamente significativa, exceto para os triglicerídeos do grupo tratado com 1000 mg/Kg, que apresentaram uma redução estatisticamente significativa.

Tabela 3 – Efeito da administração via oral do controle (solução salina 0,9%) e diferentes doses do EET-Ap nos parâmetros hematológicos em ratos *Wistar* albinos adultos.

Parâmetros Hematológicos	Sexo	Tratamentos				
		Controle (10mL/kg)	EET-Ap (1000 mg/kg)	EET-Ap (250 mg/kg)	EET-Ap (150 mg/kg)	EET-Ap (50 mg/kg)
<i>M</i>						
HE (x10 ⁶ /mm ³)		7,6±0,18	7,8±0,75	7,4±0,19	7,5±0,11	7±0,12
HM (g/dL)		14±1,2	14±0,8	15±0,68	15±1	15±1,7
HT (%)		43±1,9	44±1	44±1,1	44±0,76	45±0,93
LC (x10 ³ /mm ³)		8,1±2,1	7,7±0,35	6,5±0,45	6,7±0,26	6,9±0,51
LF (%)		77±5	77±2,8	75±1	76±1,3	76±1
NE (%)		20±2,3	20±0,5	21±0,5	19±1,5	20±1
EO (%)		1±0,82	0,75±0,09	0,33±0,45	0,67±0,58	0,75±0,5
BS (%)		2,3±0,96	2,3±0,82	2±0,5	1,5±0,58	2±0,35
MN (%)		2,5±0,58	2,3±0,58	2,3±0,58	3,2±0,29	2,5±0,58
PL (x10 ³ /mm ³)		705±14	750±50	718±17	750±40	659±37
<i>F</i>						
HE (x10 ⁶ /mm ³)		6,4±0,57	7,8±0,75	7,4±0,27	6,7±0,52	7±0,2
HM (g/dL)		13±0,81	16±0,69	14±1,6	14±0,64	14±0,5
HT (%)		37±2,8	47±1,3	44±1	40±2	39±1,2
LC (x10 ³ /mm ³)		7,7±1,8	11±1,2	6,5±1,5	8,4±2,7	6±1,2
LF (%)		75±0,96	73±5	76±1,5	75±2,5	76±4
NE (%)		19±2	19±1,5	18±1	20±3,1	17±1
EO (%)		1±0,82	0,75±0,96	0,33±0,58	0,67±0,58	0,75±0,5
BS (%)		2±0,82	1,5±0,58	1,5±0,5	1,6±0,63	1,3±0,58
MN (%)		3±0,82	3,9±0,85	2,5±0,5	3,5±0,5	2,5±0,5
PL (x10 ³ /mm ³)		523±88	629±47	517±76	692±85	554±44

M=machos; F=fêmeas; HE=hemácia; HM=hemoglobina; HT=hematócrito; LC=leucócito; LF=linfócito; NE=neutrófilo; EO=eosinófilo; BS=basófilo; MN=monócito; PL=plaquetas. Os resultados estão expressos como média±d.p (n=5). Teste t-Student e Mann-Whitney comparados ao grupo controle. Nível de significância mínimo de p<0,05.

Tabela 4 – Efeito da administração via oral do controle (solução salina 0,9%) e diferentes doses do EET-Ap nos parâmetros bioquímico sem ratos *Wistar* albinos adultos.

Parâmetros Bioquímicos	Sexo	Tratamentos				
		Controle (10 mL/kg)	EET-Ap (1000 mg/kg)	EET-Ap (250 mg/kg)	EET-Ap (150 mg/kg)	EET-Ap (50 mg/kg)
<i>M</i>						
GLI (mg/dL)		90±23	98±2,4	103±23	81±27	90±23
TRIG (mg/dL)		97±25	31±8,3*	69±7,3	81±6,1	65±19
COL (mg/dL)		59±15	58±4,5	73±11	57±8,5	57±4,4
HDL (mg/dL)		15±4,4	18±1,5	21±3,5	18±3,8	17±0,82
AST (U/L)		213±18	156±28	261±32	262±11	255±4
ALT (U/L)		62±15	49±15	61±11	62±13	53±4,2
CRE (mg/dL)		0,31±0,08	0,34±0,07	0,24±0,06	0,39±0,16	0,26±0,11
AUR (mg/dL)		0,46±0,24	1,2±0,9	0,4±0,1	0,36±0,16	0,84±0,72
Uréia (mg/dL)		55±9,3	35±1	36±16	35±14	34±6,3
<i>F</i>						
GLI (mg/dL)		121±27	114±40	117±14	134±19	96±28
TRIG (mg/dL)		52±16	67±26	36±9,2	39±17	76±21
COL (mg/dL)		60±5,6	51±8	61±15	62±14	61±7,5
HDL (mg/dL)		17±2,5	17±0,58	19±2	18±3,8	16±2,6
AST (U/L)		185±16	206±38	192±2,5	156±27	181±49
ALT (U/L)		37±9	46±5,5	34±1	38±9	44±4,1
CRE (mg/dL)		0,32±0,05	0,29±0,09	0,3±0,01	0,37±0,04	0,44±0,11
AUR (mg/dL)		0,19±0,01	0,58±0,42	0,34±0,42	0,74±0,89	0,65±0,61
Uréia (mg/dL)		43±12	33±7,1	34±3	26±8,5	33±7,5

M=machos; F=fêmeas; GLI=glucose; TRI=triglicerídeos; COL=colesterol total; HDL=HDL colesterol; CRE=creatinina; AUR=ácido úrico. Os resultados estão expressos como média±d.p (n=5). Teste t-Student e Mann-Whitney comparados ao grupo controle. Nível de significância mínimo de p<0,05.

Estudos realizados por Lima *et al.* (2010) concluíram que a espécie *A. pyriformium* é tóxica, toxicidade esta característica do gênero e atribuída especialmente à presença de alcaloides indólicos. No entanto, as dosagens testadas do EET-Ap apresentaram indícios de baixa toxicidade, com alterações em parâmetros isolados e, por vezes, não dose-dependentes, o que confere segurança na continuidade do estudo em relação a ação farmacológica.

3.2. Ensaios farmacológicos

3.2.1. Atividade anti-inflamatória

Atividade inflamatória foi avaliada por meio dos ensaios de edema de pata (Tabela 5) e de peritonite (Tabela 6).

Tabela 5 – Efeito anti-inflamatório do EET-Ap sobre o volume (mm²) do edema de pata induzido por carragenina.

Tratamentos	Dose via oral	0 hora	2 horas	Inibição (%)	4 horas	Inibição (%)
Veículo	10 mL/kg	15±5	54±10	-	69±2,6	-
Indometacina	10 mg/kg	13±4	20±4,8***	62,96	12±8,4***	82,61
EET-Ap	62,5 mg/kg	11±3	40±3,8*	25,92	38±9**	44,93
	125 mg/kg	16±5	46±8,9	14,81	27±11***	60,59
	250 mg/kg	14±3	34±9,9**	37,04	31±14***	54,85

Os resultados estão expressos como média ± d.p (n=5). em mm² da diferença entre o volume da pata que recebeu o agente flogístico e a pata que recebeu o controle. Análise de variância de uma via (ANOVA) seguido do teste de Dunnett comparado ao grupo veículo, *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001.

Com base na tabela 5, observa-se efeito antiedematogênico do EET-Ap em todas as dose empregadas, exceto a de 125 mg no tempo de 2 horas, apresentando variação do volume de pata significativamente menor ($p < 0,05$) e por vezes altamente significativas ($p < 0,001$), quando comparadas ao controle. Além disso, percebe-se que as doses testes possuem um perfil anti-inflamatório semelhante ao controle positivo (indometacina), aumentando a eficácia com o decorrer do tempo (efeito tardio), embora o EET-Ap tenha apresentado um percentual de inibição inferior, quando comparado à indometacina.

Esse mesmo comportamento anti-inflamatório tardio foi observado por Lima *et al.* (2013), ao trabalhar com extrato aquoso das sementes de *Amburana cearensis*. Segundo o autor, no modelo de edema de pata pode-se identificar duas fases: a primeira, ocorrendo em torno de uma hora (fase rápida), marcada pela liberação de histamina, serotonina e bradicinina; e a segunda, chamada de tardia ocorrendo entre uma e seis horas, na qual mediadores como as cininas e prostaglandinas são liberados resultando da ativação da ciclo-oxigenase 2 (COX-2). Deste modo, o perfil anti-inflamatório do EET-Ap está provavelmente relacionado à modulação de ambas as fases (I e II), com consequente inibição da liberação mediadores inflamatórios e da ativação da COX-2.

Segundo Barros *et al.* (2004) com o teste de indução de peritonite por ação de carragenina obtém-se dois parâmetros, ligados a resposta anti-inflamatória: ação anti-edematogênica, pela quantificação do volume de exsudato da cavidade peritoneal; e o efeito anti-quimiotático, pela determinação do número de leucócitos no exsudato coletado. Entretanto, como o efeito anti-edematogênico foi verificado no ensaio do edema de pata, apenas a ação inibidora da migração leucocitária (quimiotaxia) foi avaliada nesse teste.

Tabela 6 – Efeito anti-inflamatório do EET-Ap sobre o número de leucócitos totais no exsudato da peritonite induzida pela carragenina.

Tratamentos	Dose via oral	Número de leucócitos ($\times 10^3/\text{mm}^3$)	Inibição (%)
Veículo	10 mL/kg	9,3 \pm 0,7	-
Indometacina	10 mg/kg	2,3 \pm 0,39***	75,27
EET-Ap	62,5 mg/kg	6,5 \pm 1,7**	29,03
	125 mg/kg	4,7 \pm 0,57***	49,46
	250 mg/kg	3,8 \pm 1,1***	59,14

Os resultados estão expressos como média \pm d.p (n=5). Análise de variância de uma via (ANOVA) seguido do teste de Dunnett comparado ao grupo veículo, ** = p<0,01, *** = p<0,001.

Os resultados obtidos (Tabela 6) novamente apontam potencial anti-inflamatório em todas as dosagens, corroborando com os dados obtidos no edema de pata. Os percentuais de inibição apresentados pelas doses testes ficaram abaixo daquele observado para o controle positivo (indometacina), no entanto, quando comparados aos resultados do grupo controle,

apresentaram-se, em sua maioria, como altamente significantes ($p < 0,001$); evidenciando, estatisticamente, que todas as doses possuem caráter anti-inflamatório.

Todavia, o efeito antiquimiotático aumentou progressivamente com a elevação da dose, possuindo um caráter dose-dependente, ao contrário do que ocorreu com a ação anti-edematogênica, avaliada pelo edema de pata, na qual dose de 62,5 mg/kg apresentou maior ação que a 125 mg/kg (após 2 horas), e a de 125 mg/kg maior ação que a 250 mg/kg, após 4 horas. Esta última circunstância foi observada por Motta *et al.* (2013), no qual a dose de 300 mg/kg (maior dose) do extrato de *Mucuna pruriens* apresentou um potencial anti-inflamatório menor que a dose de 100 mg/kg. Segundo o mesmo autor, isso teria acontecido pelo fato da ação não ser dose-dependente, na qual doses mais altas teriam efeito menor ou até prejudicial.

Segundo Bessa *et al.* (2013) e Saha *et al.* (2013), dentre os compostos naturais com ação anti-inflamatória, os polifénóis (taninos, flavonoides etc.) são os que apresentam uma maior atividade e, dentre estes, os flavonoides se destacam, sendo apontados na maioria dos trabalhos como detentores de notável ação anti-inflamatória e antioxidante.

De acordo como Sousa *et al.* (2009), o mecanismo de ação anti-inflamatória e antinociceptiva dos flavonoides baseia-se na inibição da síntese do óxido nítrico que indiretamente bloquearia as vias da ciclooxigenase e/ou lipoxigenase, e da proteína quinase C e L-arginina/óxido nítrico, e conseqüentemente o processo inflamatório decorrente destas vias.

Entretanto, saponinas como a escina (saponina extraída da espécie *Aesculus hippocastanum*), bem como alcaloides indólicos como a evodiamina (extraída de plantas do gênero *Tetradium*) também possuem ação anti-inflamatória e anti-edematogênica (BARBOSA-FILHO *et al.* 2006; SANTOS *et al.* 1995).

No trabalho de Hikino *et al.* (1982), a mesoconitina, alcaloide característico das espécies do gênero *Aconitum*, apresentou ação apenas sobre a primeira fase do teste de edema de pata, o que somados a outras análises representou, para o autor, que um dos mecanismos de ação dos alcaloides seria a inibição da liberação de histamina, serotonina e bradicinina.

Deste modo, acredita-se que a ação anti-inflamatória apresentada pela *A. pyrifolium* deriva não só da ação dos flavonoides presentes, como também, da atuação de compostos como taninos, saponinas, alcaloides e outros compostos fenólicos, presentes nesta espécie (SANTOS, 2010).

3.2.2. Atividade antinociceptiva

Atividade antinociceptiva foi avaliada através dos ensaios de contorções abdominais (Tabela 7) e teste da fomalina (Tabela 8).

Segundo Adedapo *et al.* (2013), o teste contorções utiliza da estimulação (pelo ácido acético) de receptores peritoneais locais para promover a constrição abdominal e com isso estabelecer (periféricamente) a ação de analgésicos. Além disso, o estímulo produzido pelo ácido acético pode ainda causar um aumento nos níveis de prostaglandinas (PGE2 e PGF2) no fluido peritoneal e, com isso, ocasionar dor inflamatória pelo aumento da permeabilidade capilar. Deste modo, a inibição da resposta às contorções pode ser devido ao impedimento da estimulação dos receptores abdominais, à inibição da liberação das prostaglandinas, ou por ambos os mecanismos.

Tabela 7 – Efeito antinociceptivo do EET-Ap sobre o número de contorções abdominais induzidas pelo ácido acético.

Tratamentos	Dose via oral	Nº de contorções	Inibição (%)	Tempo para início (min)
Veículo	10 mL/kg	54±11	-	4,7±0,52
Dipirona	500 mg/kg	18±2,3***	66,66	6,8±0,64
EET-Ap	62,5 mg/kg	0***	100	-
	125 mg/kg	0***	100	-
	250 mg/kg	0***	100	-

Os resultados estão expressos como média ± d.p (n=5). Análise de variância de uma via (ANOVA) seguido do teste de Dunnett comparado ao grupo veículo, *** = p<0,001.

Observando a tabela 7, verifica-se que todas as doses testadas do EET-Ap inibiram em 100% o aparecimento das contorções abdominais nos camundongos, sugerindo um alto potencial analgésico. Além disso, quando confrontado com o resustado apresentado pelo controle positivo (dipirona 500 mg) percebe-se que o EET-Ap foi muito superior, pois o perfil de inibição da dipirona foi de apenas 66,66%.

O teste da formalina é comumente realizado na avaliação de fármacos analgésicos, sendo considerado um modelo confiável de dor tônica do tipo inflamatória. A resposta nociceptiva à formalina ocorre em duas fases: a fase I ou fase neurogênica (entre 5 a 10 minutos) é atribuída à ativação direta de nociceptores; enquanto que a fase II ou inflamatória

(entre 15 a 40 minutos) está associada à liberação de mediadores endógenos locais, ocasionando resposta inflamatória local, sensibilização de aferentes primários e de neurônios medulares subsequente a ativação de nociceptores (SOUSA *et al.* 2008; ASSINI *et al.* 2013).

Tabela 8 – Efeito do EET-Ap sobre a nocicepção induzida por formalina (fase I e II).

Tratamentos	Dose via oral	Fase I	Inibição (%)	Fase II	Inibição (%)
Veículo	10 mL/kg	71±19	-	144±30	-
Indometacina	10 mg/kg	59±6,2	16,90	64±6,1***	55,55
EET-Ap	62,5 mg/kg	43±14*	38,80	21±17***	83,33
	125 mg/kg	25±10***	64,51	2,5±0,58***	97,22
	250 mg/kg	23±4,5***	68,02	49±20***	65,97

Os resultados estão expressos como média ± d.p. Análise de variância de uma via (ANOVA) seguido do teste de Dunnett comparado ao grupo veículo, *p<0,05, ***p<0,001.

Analisando a tabela 8, percebe-se que todas as doses testadas apresentaram inibição da nocicepção induzida por formalina em relação ao grupo controle, verificando-se ação (altamente significativamente) tanto na fase I (neurogênica), como na fase II (inflamatória), embora a resposta na fase II tenha sido levemente maior, sendo a atividade superior à atuação do controle positivo (indometacina), em ambas as fases.

A ação sobre a fase II corroboram os resultados obtidos com a avaliação do edema de pata e peritonite, fornecendo mais um dado que comprova a ação anti-inflamatória do EET-Ap. Embora, a partir da análise dos resultados, perceba-se que a ação analgésica deste extrato é mais expressiva que a ação anti-inflamatória.

Esse alto potencial analgésico se deve provavelmente a ação dos numerosos alcaloides indólicos característicos tanto do gênero *Aspidosperma*, quanto da espécie *A. pyrifolium*. Segundo Pereira *et al.* (2007), essa classe de alcalóides pode atuar em sistemas neurotransmissores opiáceos, GABAérgicos, colinérgicos, muscarínicos, serotoninérgicos e dopaminérgicos. Deste modo, podem ser utilizados como hipotensor arterial, simpatolítico, diurético, vasoconstrictor periférico, estimulante respiratório, anestésico, analgésico, agente bloqueador adrenérgico, espasmogênico intestinal, sedativo e relaxante do músculo esquelético. Contudo, esse mesmo grupo de substâncias é apontado como responsável pelos efeitos tóxicos de inúmeras espécies do gênero *Aspidosperma*, não sendo *A. pyrifolium*, uma exceção (LIMA *et al.* 2010).

4. CONCLUSÃO

Os resultados descritos neste estudo demonstraram que a espécie *A. pyrifolium* apresentou um alto potencial analgésico evidenciado principalmente pelo ensaio de corntorções abdominais. Nos testes de atividade anti-inflamatória observou-se que as doses do extrato testadas apresentaram perfil anti-inflamatório semelhante ao fármaco utilizado como padrão. Deste modo, a planta *A. pyrifolium* Mart. apresenta-se como uma fonte promissora de substâncias com atividades anti-inflamatória e antinociceptiva. Todavia, ressalva-se que a espécie apresentou indícios de toxicidade, sendo seu uso condicionado à determinação de doses seguras.

5. REFERÊNCIAS

ADEDAPO, A.; ADEWUYI, T.; SOFIDIYA, M. Phytochemistry, anti-inflammatory and analgesic activities of the aqueous leaf extract of *Lagenaria breviflora* (Cucurbitaceae) in laboratory animals. **Revista de Biología Tropical**, v.61, n.1, p.281-290, 2013.

ALMEIDA, R.N.; FALCÃO, A.C.G.M.; DINIZ, R.S.T.; QUINTANS-JÚNIOR, L.J.; POLARI, R.N.; BARBOSA-FILHO, J.M.; AGRA, M.F.; DUARTE, J.C.; FERREIRA, C.D.; ANTONIOLLI, A.R.; ARAÚJO, C.C. Metodologia para avaliação de plantas com atividade no Sistema Nervoso Central e alguns dados experimentais. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 80, p. 72-76, 1999.

ASSINI, F.L. FABRÍCIO, E.J.; LANG, K.L. Efeitos farmacológicos do extrato aquoso de *Solidago chilensis* Meyen em camundongos. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.15, n.1, p.130-134, 2013.

BARBOSA-FILHO, J.M.; PIUVEZAM, M.R.; MOURA, M.D.; SILVA, M.S.; LIMA, K.B.; CUNHA, E.V.L.; FECHINE, I.M.; TAKEMURA, O.S. Anti-inflammatory activity of alkaloids: A twenty-century review. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.16, n.1, p.109-139, 2006.

BARROS, F.E.V.; SOUSA, M.G.T.; COSTA, J.L.; OLEA, R.S.G.; FREIRE, S.M.F.; BORGES, A.C.R.; BORGES, M.O.R. Avaliação das atividades analgésica e antinflamatória do extrato metanólico de *Calotropis procera*, R. Br. (cíume). **Infarma**, v.16, n.9-10, p.60-64, 2004.

BESSA, N.G.F. BORGES, J.C.M.; BESERRA, F.P.; CARVALHO, R.H.A.; PEREIRA, M.A.B.; FAGUNDES, R.; CAMPOS, S.L.; RIBEIRO, L.U.; QUIRINO, M.S.; CHAGAS JUNIOR, A.F.; ALVES, A. Prospecção fitoquímica preliminar de plantas nativas do cerrado de uso popular medicinal pela comunidade rural do assentamento vale verde – Tocantins. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.15, n.4, supl.I, p.692-707, 2013.

BODOKI, E.; OPREAN, R.; VLASE, L.; TAMAS, M.; SANDULESCU, R. Fast determination of colchicine by TLC-densitometry from pharmaceuticals and vegetal extracts. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.37, p.971-977, 2005.

BRASIL. ANVISA. **Resolução RDC nº. 14, de 31 de abril de 2010**. Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Poder Executivo, Brasília, DF, 31 abr. 2010

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa). **Resolução – RE nº90/2004. Normas para estudos toxicológicos de produtos fitoterápicos**. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Poder Executivo, Brasília, DF, 16 de março de 2004.

BRUNTON L.L. **Goodman & Gilman - As Bases Farmacológicas da Terapêutica**. 12. ed. Rio de Janeiro: McGraw Hill, 2012.

CECHINEL FILHO, V.; YUNES, R.A. Estratégias para a obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais. Conceitos sobre modificação estrutural para otimização da atividade. **Química Nova**, v.21, n.1, p. 99-105, 1997.

CORTES, M.L.; CASTRO, M.M.C.; JESUS, R.P.; NETO, J.A.B.; KRAYCHETE, D.C. Uso de terapêutica com ácidos graxos ômega-3 em pacientes com dor crônica e sintomas ansiosos e depressivos. **Revista Dor**, v.14, n.1, p.48-51, 2013.

CUNHA, L.C.; MELO, D.F.A.; PEREIRA, M.E.; MELO, D.S.; PARENTE, L.L.; SILVA, M.A.C.; CONCEIÇÃO, E.D.; GONZAGA, L.Q.S. Avaliação da toxicidade aguda do extrato aquoso de *Apeiba tibourbou* Aubl (Tiliaceae), em camundongos e ratos. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v.34, n.3, p.357-352, 2013.

CRAVEIRO, A.C.S.; CARVALHO, D.M.M.; NUNES, R.S.; FAKHOURI, R.; RODRIGUES, S.A.; TEIXEIRA-SILVA, F. Toxicidade aguda do extrato aquoso de folhas de *Erythrina velutina* em animais experimentais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.18, p.739-743, 2008.

DALLEGRAVE, E. **Toxicidade reprodutiva do herbicida glifosato – Roundup em ratos Wistar**. 225 f. Tese (Doutorado) – Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2003.

FERRÁNDIZ, M.L.; ALCARAZ M.J. Anti-inflammatory activity and inhibition of arachidonic acid metabolism by flavonoids. **Agents and Actions**, v.32, p.283-288, 1991.

HIKINO, H. TAKATA, H.; FUJIWARA, M.; KONNO, C.; OHUCHI, K. Mechanism of inhibitory action of mesaconitine in acute inflammations. **European Journal of Pharmacology**, v.82 n.1-2, p.65-71, 1982.

HUNSKAAR, S.; HOLE, K. The formalin test in mice: dissociation between inflammatory and non-inflammatory pain. **Pain**, v.30, p.103-114, 1987.

IWALEWA, E.O.; MCGAW, L.J.; NAIDOO, V.; ELOFF, J.N. Inflammation: the foundation of diseases and disorders. A review of phytomedicines of South African origin used to treat pain and inflammatory conditions. **African Journal of Biotechnology**, v.6, n.25, p.2868-2885, 2007.

IVERSEN, P.O.; NICOLAYSEN, G. Water-for life. **Tidsskrift for den Norske Laegeforening**, v.123, p.3402-3405, 2003.

KLASSEN, C.O. **Toxicologia, a ciência básica dos tóxicos de Casarett e doulls's**. 5º ed. Editora McGraw-Hill de Portugal, Ltda. 2001.

KLAUMANN, P.R.; WOUK, A.F.P.F.; SILLAS, T. Patofisiologia da dor. **Archives of Veterinary Science**, v.13, n.1, p.1-12, 2008.

KLEIN, T.; LONGHINI, R.; BRUSCHI, M.L.; MELLO, J.C.P. Fitoterápicos: um mercado promissor. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica Aplicada**, v.30, n.3, p.241-248, 2009.

KOSTER, R.; ANDERSON, M.; EJ, D.B. Acetic acid for analgesic screening. **Fed. Proc.**, v.18, p. 412, 1959.

LIMA, L.R.; CAVALCANTE, R.R.L.; MARTINS, M.C.C.; PARENTE, D.M.; CAVALCANTE, A.A.M.C. Avaliação da atividade antiedematogênica, antimicrobiana e mutagênica das sementes de *Amburana cearensis* (A. C. Smith) (Imburana-de-cheiro). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.15, n.3, p.415-422, 2013.

LIMA, M.C.J.S.; SOTO-BLANCO, B. Poisoning in goats by *Aspidosperma pyrifolium* Mart.: Biological and cytotoxic effects. **Toxicon**, v. 55, n. 1, p. 320- 324, 2010.

LUCENA, R.B.; RISSI, D.R.; MAIA, L.A.; FLORES, M.M.; DANTAS, A.F.M.; NOBRE, V.M.T.; RIET-CORREA, F.; BARROS, C.S.L. Intoxicação por alcaloides pirrolizidínicos em ruminantes e equinos no Brasil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.30, n.5, p.447-452, 2010.

MARTINS, E. R.; CASTRO, D. M. de; CASTELLANI, D. C.; DIAS, J. E. **Plantas medicinais**. Viçosa: Editora UFV: Universidade Federal de Viçosa, 2000. 220p.

MONTENEGRO, C.A. **Atividade gastroprotetora de *Xylopiangsdorffiana* A. St.-Hil. & Tul. (Annonaceae) em modelos animais**. Dissertação (mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, Universidade Federal da Paraíba (UFPB), João Pessoa, 2011.

MOTTA, E.V.S.; PINTO, N.C.C.; DUQUE, A.P.N.; MENDES, R. F.; BELLOZI, P.M.Q.; SCIO, E. Atividades antioxidante, antinociceptiva e anti-inflamatória das folhas de *Mucuna pruriens* (L.) DC. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v.15, n.2, p.264-272, 2013.

NOLDIN, V. F., et al. Chemical composition and biological activities of the leaves of *Cynarascolymus* L. (artichoke) cultivated in Brazil. **Química Nova**, v.26, n.3, p.331-334, 2003.

PEREIRA, M. M. et al. Alcaloides indólicos isolados de espécies do gênero *aspidosperma* (Apocynaceae). **Química Nova**, v. 30, n.4, p.970-983, 2007.

RAZA, M. AL-SHABANAH O.A.; EL-HADIYAH T.M.; AL-MAJED A.A. Effect of prolonged vigabatrin treatment of hematological and biochemical parameters in plasm, liver and kidney of Swiss albino mice. **Scientia Phamraceutica**, v. 70, p. 135-145, 2002.

SAHA, S.; HOSSAIN, F.; ANISUZZMAN, M.; ISLAM, M.K. Pharmacological evaluation of *Musa seminifera* Lour. Fruit. **Journal of Integrative Medicine**, v.11, n.4, p.253-251, 2013.

SANTOS, D.S. **Avaliação do efeito anti-inflamatório do Toque Terapêutico no modelo experimental de edema de pata induzido por adjuvante Completo de Freund em camundongos**. 2011. 61 f. Tese (Doutorado em Enfermagem) – Escola de enfermagem da Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, São Paulo.

SANTOS, M.V.; CARVALHO, C.B.; FAN, L.C.B.; MAGALHÃES, H.M. Variação cincardiana dos leucócitos, fibrinogênio e plaquetas no sangue de cães submetidos a processo inflamatório, tratados com escina. **Ciência Rural**, v.25, n.1, p.67-70, 1995.

SANTOS, P. B. **Contribuição ao estudo químico, bromatológico e atividade biológica de *Angico Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan. Var. *cebil* (Gris.) Alts e Pereira**

Aspidosperma pyrifolium Mart. 2010. 46f. Dissertação (Zootecnia) – Universidade Federal de Campina Grande, Campina Grande, Paraíba.

SILVA, F.O.C.; MACEDO, D.V. Physical exercise, inflammatory process and adaptive condition: an overview. **Revista Brasileira de Cineantropometria & Desempenho Humano**, v.13, n.4, p.320–328, 2011.

SOUSA, A.M.; FRANCO, P.A.B.; ASHMAWI, H.A.; POSSO, I.P. Local Effect of Tramadol on Formalin Evoked Flinching Behavior in Rats. **Revista Brasileira de Anestesiologia**, v.58, n.4, p.371-379, 2008.

SOUSA, O.V.; FIORAVANTE, I.A.; DEL-VECHIO-VIEIRA, G.;CANESCHI, C.A. Investigação das atividades antinociceptiva e antiedematogênica do extrato etanólico das folhas de *Joannesia princeps* Vellozo. *Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada*, v.30, n.1, p.91-97, 2009.

TEO, S.; STIRLING, D.; THOMAS, S.; HOBERMAN, A.; KIORPES, A.; KHETANI, V. 90-day oral gavage toxicity study of d-methylphenidate and d,l-methylphenidate in Sprague Dawley rats. **Toxicology**, v.179, p. 183-196, 2002.

VEIGA-JÚNIOR, V. F.; PINTO, A.C. Plantas medicinais: cura segura? **Química nova**, v. 28, p. 519-528, 2005.

WINTER, C.A.; RISLEY E.A.; NUSS, G.W. Carrageenin-induced edema in hind paw of the rat as an assay for anti-inflammatory drugs. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, v.111, p.544-47, 1962.

ZIMMENANN, M. Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. **Pain**, v.16, p.109-110, 1983.