

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”  
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE ARARAQUARA

**BEATRIZ FERREIRA MENES**

**Estudo farmacognóstico e avaliação da atividade farmacológica do extrato  
hidroalcoólico de *Polygonum acre* (erva-de-bicho).**



ARARAQUARA – SP

2012

BEATRIZ FERREIRA MENES

**Estudo farmacognóstico e avaliação da atividade farmacológica do extrato hidroalcoólico de *Polygonum acre* (erva-de-bicho).**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Graduação em Farmácia-Bioquímica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara, da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” para obtenção do grau de Farmacêutica-Bioquímica.

**Orientadora:** Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Raquel Regina Duarte Moreira

**Co-orientador:** Prof<sup>o</sup>. Dr<sup>o</sup>. José Francisco Fracasso

ARARAQUARA – SP

2012

## DEDICATÓRIA

*Dedico este trabalho especialmente aos meus queridos pais, Paulo e Fernanda, que estiveram do meu lado, me apoiaram e confiaram no meu potencial em todos os momentos desta caminhada e que não mediram esforços para que ela se tornasse possível. A vocês que me ensinaram conceitos e valores tão importantes como o amor, a família, a compreensão, o respeito ao próximo, a dignidade e a reponsabilidade. A vocês que me ensinaram a ser o que sou hoje e que me mostraram o verdadeiro sentido da vida é que dedico a realização de todo esse trabalho. “Hoje eu sou o que vocês me criaram para ser” (Greys Anatomy).*

*E a você Bruno, meu amor e meu amigo, à você que esteve do meu lado esse tempo todo, me apoiando, me dando carinho, amor, atenção, compreensão e segurança. Sem o seu apoio, com toda certeza essa caminhada teria sido muito mais difícil. A você dedico este pequeno trecho de Caio Fernando de Abreu e espero que assim seja: "Que seja doce a espera pelas mensagens, ligações e recadinhos bonitinhos. Que seja (mais do que) doce a voz ao falar no telefone. Que seja doce o seu cheiro. Que seja doce o seu jeito, seus olhares, seu receio. Que seja doce o seu modo de andar, de sentir, de demonstrar afeto. Que sejam doce suas expressões faciais, até o levantar de sobancelha. Que seja doce a leveza que eu sentirei ao seu lado. Que seja doce a ausência do meu medo. Que seja doce o seu abraço. Que seja doce o modo como você irá segurar na minha mão. Que seja doce. Que sejamos doce”.*

## **AGRADECIMENTOS**

*Em primeiro lugar agradeço a Deus e Nossa senhora Aparecida pelo dom da vida e proteção diária. Agradeço por iluminarem meus estudos durante esses cinco anos, por não terem me deixado abater e nem desanimar. Agradeço ainda por todos os momentos felizes vivenciados nesse período e também por todas as pessoas maravilhosas sabiamente colocadas em meu caminho.*

*Aos meus pais, irmãos, avós e todos os familiares que contribuíram para a realização deste sonho, e que não me deixaram desanimar em nenhum momento.*

*À todos os amigos que estiveram presentes, mesmo que em pensamento, nos meus dias durante esses anos e principalmente às minhas fiéis companheiras, Carolina Pavan, Laís Zuzzi e Mariana Penasso, agradeço pela amizade, carinho e companheirismo. Vocês que me alegraram nos momentos de tristeza, me fizeram rir e perder noites e noites de sono e que tornaram esses anos mais leves. Muito obrigada por todos os momentos felizes que vocês me proporcionaram.*

*À minha orientadora Raquel Regina Duarte Moreira por ser tão amiga, atenciosa e paciente comigo, e por ter confiado no meu potencial durante os dois anos da minha iniciação científica.*

*Ao técnico Luiz Eduardo dos Santos, agradeço pela amizade e principalmente pela colaboração no desenvolvimento deste trabalho.*

*Aos Profs. Drs. José Francisco Fracasso, André Gonzaga dos Santos e José Ricardo Soares de Oliveira pela colaboração e orientação no desenvolvimento deste trabalho.*

*E a todos que contribuíram direta e indiretamente na conquista dos resultados aqui apresentados, meus sinceros agradecimentos!!*

## SUMÁRIO

1. RESUMO .....	10
2. LISTA DE ILUSTRAÇÕES .....	12
3. LISTA DE TABELAS .....	15
4. LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS .....	16
5. INTRODUÇÃO.....	20
5.1 Aspectos históricos: o uso de plantas medicinais no Brasil e no Mundo .....	20
5.2 Família Polygonaceae .....	24
5.2.1 Gênero <i>Polygonum</i> .....	25
5.2.1.1 Aspectos químicos .....	27
5.2.1.2 Aspectos biológicos.....	29
5.2.1.3 <i>Polygonum acre</i> H.B.K syn <i>Polygonum punctatum</i> Elliott .....	31
6 OBJETIVOS.....	39
7 MATERIAL E MÉTODOS .....	41
Equipamentos diversos .....	41
Fármacos, reagentes, solventes e meios de cultura .....	42
7.1 Obtenção do material vegetal .....	45
7.2 Triagem fitoquímica preliminar .....	46
7.2.1 Pesquisa de alcaloides .....	47
7.2.2 Pesquisa de antraquinonas .....	47
7.2.3 Pesquisa de Flavonóides .....	48
7.2.4 Pesquisa de glicosídeos cardiotônicos .....	50
7.2.5 Pesquisa de Saponinas .....	52

7.2.6	Pesquisa de Taninos .....	53
7.3	Obtenção dos extratos vegetais .....	54
7.3.1	Material vegetal adquirido comercialmente.....	54
7.3.1.1	Percolação .....	55
7.3.2	Material vegetal coletado no Horto de Plantas Medicinais e Tóxicas da FCF-UNESP-Araraquara.....	55
7.3.2.1	Percolação .....	55
7.3.2.2	Maceração .....	56
7.3.2.3	Turbólise .....	56
7.4	Obtenção do óleo essencial.....	56
7.5	Perfil cromatográfico.....	57
7.5.1	Perfil cromatográfico dos extratos .....	57
7.5.1.1	Cromatografia em camada delgada comparativa (CCDC) .....	57
7.5.1.1.1	Pesquisa de flavonóides .....	58
7.5.1.1.2	Pesquisa de taninos.....	58
7.5.1.1.3	Preparo das amostras e marcadores .....	58
7.5.2	Perfil cromatográfico do óleo essencial .....	59
7.5.2.1	Cromatografia em camada delgada comparativa (CCDC) .....	59
7.5.2.1.1	Preparo das amostras.....	59
7.5.2.1.2	Condições de análise .....	60
7.5.2.2	Cromatografia Gasosa (CG) e Cromatografia Gasosa associada a Espectrometria de Massas (CG-EM) .....	60
7.6	Determinação do teor de flavonóides totais.....	62
7.6.1	Preparo das soluções e amostras para leitura.....	63

7.6.2	Procedimento.....	63
7.7	Determinação da atividade antioxidante utilizando radical livre DPPH• .....	64
7.7.1	Cromatografia em Camada Delgada Comparativa (CCDC) .....	64
7.7.1.1	Preparo das amostras .....	64
7.7.1.2	Procedimento .....	65
7.7.2	Determinação da atividade antioxidante utilizando radical livre DPPH• (Avaliação in vitro) .....	65
7.7.2.1	Preparo das amostras e reagentes .....	66
7.7.2.2	Procedimento .....	66
7.8	Avaliação da atividade antifúngica .....	68
7.8.1	Preparo do antimicrobiano.....	68
7.8.2	Preparo das amostras testadas.....	68
7.8.3	Preparo das suspensões de fungos .....	69
7.8.4	Procedimento .....	69
7.9	Avaliação da citotoxicidade .....	71
7.9.1	Preparo das amostras .....	71
7.9.2	Procedimento .....	71
7.10	Ensaio farmacológico.....	72
7.10.1	Animais.....	72
7.10.2	Edema de pata induzido por carragenina.....	73
7.10.3	Contorções abdominais induzidas por ácido acético .....	74
7.10.4	Análise Estatística .....	75
8	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	76
8.1	Triagem fitoquímica preliminar .....	76

8.2	Perfil cromatográfico .....	81
8.2.1	Perfil cromatográfico dos extratos .....	81
8.2.1.1	Cromatografia em camada delgada comparativa (CCDC) .....	81
8.2.1.1.1	CCDC para pesquisa de flavonóides.....	81
8.2.1.1.2	CCDC para pesquisa de taninos .....	84
8.2.2	Perfil cromatográfico do óleo essencial .....	86
8.2.2.1	Cromatografia em camada delgada comparativa (CCDC) .....	87
8.2.2.2	Cromatografia gasosa (CG) e cromatografia gasosa associada a espectrometria de massas (CG-EM) .....	91
8.3	Determinação do teor de flavonóides totais .....	95
8.4	Avaliação da atividade antioxidante utilizando radical livre DPPH•.....	98
8.4.1	Avaliação qualitativa - Cromatografia em Camada Delgada Comparativa (CCDC) .....	100
8.4.2	Avaliação da atividade antioxidante pela captura do radical livre DPPH• (Avaliação in vitro) .....	101
8.4.2.1	Avaliação da atividade antioxidante do extrato PC20 .....	102
8.4.2.2	Avaliação da atividade antioxidante do óleo essencial .....	104
8.5	Avaliação da atividade antifúngica .....	105
8.5.1	Teste para determinação da concentração inibitória mínima (CIM) .....	105
8.6	Avaliação da citotoxicidade .....	107
8.7	Ensaio Farmacológicos .....	109
8.7.1	Edema de pata induzido por carragenina.....	109
8.7.2	Contorção abdominal induzida por ácido acético .....	112
9.	CONCLUSÕES .....	115

10 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	117
10.1 Referências Digitais .....	124
11 ANEXOS.....	126

## 1. RESUMO

O Brasil possui um enorme potencial de plantas medicinais usadas popularmente e ainda pouco estudadas pela comunidade científica. Dentro da família *Polygonaceae*, destaca-se a espécie *Polygonum punctatum* Ell., conhecida popularmente como erva-de-bicho, acataia, cataia, capiçoba, pimenta-do-brejo ou pimenta-da-água. Essa espécie é perene e encontrada em lugares úmidos ou inundados, desenvolvendo-se preferencialmente em solo de boa fertilidade, areno-argiloso ou argiloso e com bom teor de matéria orgânica. É originária da Ásia e encontra-se aclimatada no Brasil em todos os Estados, particularmente no Rio Grande do Sul, Sul e Sudeste (LOPES et al., 2003).

Há relatos de que na medicina popular faz-se o uso de todas as partes da planta para as mais diversas finalidades, tais como: antidisentérica, antisséptica, deterativa, diurética, antitérmica, anti-reumática, vermífuga e excelente cicatrizante de feridas e úlceras. E que por ser fortemente emenagoga e abortiva, seu uso não é recomendado para gestantes (MORGAN, 1984). Dentre as propriedades terapêuticas relatadas, destaca-se também o uso no tratamento de problemas circulatórios, visto que ela estimula a circulação e diminui a fragilidade capilar, e que por isso, apresenta um efeito hemostático bastante útil no tratamento de hemorróidas (TESKE e TRENTINI, 1995).

No entanto, plantas medicinais utilizadas popularmente necessitam de estudos científicos que comprovem sua eficácia, segurança e qualidade. A espécie *Polygonum acre* H.B.K. (sinonímia de *Polygonum punctatum* Ell) possui poucos estudos científicos comprovando essa vasta utilização na medicina popular, sendo assim, se faz necessário estudar atentamente seus extratos e óleos essenciais, bem como associar a

estes, estudos fitoquímicos e de identificação anatômica e morfológica para que não haja problemas que comprometam a qualidade e a eficácia dos medicamentos formulados e comercializados a base de *P. acre*, assim como a segurança dos consumidores.

Neste contexto, o presente trabalho visa traçar o perfil fitoquímico e cromatográfico do extrato hidroalcoólico e do óleo essencial de *P. acre*. Assim como avaliar as atividades antioxidante, antifúngica e citotóxica dos mesmos. E estabelecer parâmetros farmacológicos através do estudo de edema de pata e contorções abdominais com a finalidade de avaliar as atividades antiinflamatória e analgésica respectivamente.

## 2. LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1:</b> Distribuição geográfica da família Polygonaceae. (Fonte: Guia de Consultas Botânica - UNNE) .....	25
<b>Figura 2:</b> <i>Polygonum acre</i> H.B.K syn <i>Polygonum punctatum</i> Elliott .....	32
<b>Figura 3:</b> Estrutura química do polygodial (Fonte: ALVES, et al., 2001) .....	34
<b>Figura 4:</b> Placa para cultura de células de 96 poços para avaliação da atividade antifúngica. ....	70
<b>Figura 5:</b> Cromatograma para pesquisa de flavonóides nos extratos de partes aéreas de <i>Polygonum acre</i> . Onde: R: rutina; Q: quercetina; PC20 (extrato obtido com material vegetal comercial por percolação a 20% com EtOH 70° GL); PH10 (Extrato obtido com material vegetal do horto por percolação a 10% com EtOH 70° GL); MH10 (Extrato obtido com material vegetal do horto por maceração a 10% com EtOH 70° GL); TH10 (Extrato obtido com material vegetal do horto por turbólise a 10% com EtOH 70° GL) .....	82
<b>Figura 6:</b> Cromatograma para pesquisa de taninos nos extratos de partes aéreas de <i>Polygonum acre</i> . Onde: AG: ácido gálico; PC20 (extrato obtido com material vegetal comercial por percolação a 20% com EtOH 70° GL); PH10 (Extrato obtido com material vegetal do horto por percolação a 10% com EtOH 70° GL); MH10 (Extrato obtido com material vegetal do horto por maceração a 10% com EtOH 70° GL); TH10 (Extrato obtido com material vegetal do horto por turbólise a 10% com EtOH 70° GL).....	85
<b>Figura 7:</b> Cromatograma do óleo essencial obtido a partir das partes aéreas de <i>Polygonum acre</i> . Onde: OE <sub>C</sub> (óleo essencial extraído do material vegetal comercial); OE <sub>H1C</sub> (óleo essencial extraído do material vegetal horto 1ª coleta); OE <sub>H2C</sub> (óleo	

essencial extraído do material vegetal horto 2ª coleta) e OE<sub>H3C</sub> (óleo essencial extraído do material vegetal horto 3ª coleta).....87

**Figure 8:** Compostos majoritários ( $\geq 2.0\%$ ) no óleo essencial de *Polygonum acre*.  
.....94

**Figura 9:** Determinação espectrofotométrica do teor de flavonoides totais nos extratos de *P. acre*. Onde: PC20 (extrato obtido com material vegetal comercial por percolação a 20% com EtOH 70° GL); PH10 (Extrato obtido com material vegetal do horto por percolação a 10% com EtOH 70° GL); MH10 (Extrato obtido com material vegetal do horto por maceração a 10% com EtOH 70° GL); TH10 (Extrato obtido com material vegetal do horto por turbólise a 10% com EtOH 70° GL) .....96

**Figura 10:** Cromatograma dos extratos e óleo essencial obtido a partir das partes aéreas de *Polygonum acre* e alguns marcadores revelado com solução de DPPH•. Onde: AC: ácido caféico; Acl: ácido clorogênico; AG: ácido gálico; R: rutina; Q: quercetina; OE: óleo essencial; PC20 (extrato obtido com material vegetal comercial por percolação a 20% com EtOH 70° GL); PH10 (Extrato obtido com material vegetal do horto por percolação a 10% com EtOH 70° GL); MH10 (Extrato obtido com material vegetal do horto por maceração a 10% com EtOH 70° GL); TH10 (Extrato obtido com material vegetal do horto por turbólise a 10% com EtOH 70° GL) ..... 100

**Figura 11:** % de inibição do radical DPPH• pelo extrato PC20. Onde: IC<sub>50</sub> = concentração capaz de inibir o radical DPPH• em 50% (concentração inibitória);  
C<sub>sm</sub> = concentração na solução de partida ..... 102

**Figura 12:** % de inibição do radical DPPH• pelo óleo essencial de *Polygonum acre* obtida comercialmente. .... 105

**Figura 13:** Citotoxicidade do extrato PC20 de *Polygonum acre*. .... 108

**Figura 14:** Efeito anti-inflamatório do extrato hidroalcoólico de *Polygonum acre* sobre o edema de pata induzido por carragenina (n = 6). Indometacina (30 mg/Kg) foi o fármaco de referência. ....110

**Figura 15:** Efeito analgésico do extrato de *Polygonum acre* sobre o número de contorções abdominais induzidas por ácido acético (0,6%) em camundongos (n = 6). \* P < 0,05 em relação ao controle. .... 113

### 3. LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b> Distribuição do decocto nos tubos de ensaio para determinação do índice de espuma. ....	53
<b>Tabela 2:</b> Construção da curva analítica da quercetina. Concentrações e absorvâncias. ....	62
<b>Tabela 3:</b> Análise fitoquímica preliminar das partes aéreas de <i>Polygonum acre</i> . ....	76
<b>Tabela 4:</b> Fatores de retenção e cores das bandas correspondentes a cada amostra aplicada na cromatografia do óleo essencial de <i>Polygonum acre</i> . ....	89
<b>Tabela 5:</b> Composição do óleo essencial de <i>Polygonum acre</i> obtida comercialmente. ....	92
<b>Tabela 6:</b> Teor de flavonoides totais expressos em quercetina nos extratos de <i>Polygonum acre</i> . ....	97
<b>Tabela 7:</b> Avaliação da atividade antifúngica do extrato PC20 e do óleo essencial de <i>Polygonum acre</i> obtida comercialmente. ....	106
<b>Tabela 8:</b> Efeito anti-inflamatório do extrato hidroalcoólico de <i>Polygonum acre</i> sobre o edema de pata induzido por carragenina (n = 6). Indometacina (30 mg/Kg) foi o fármaco de referência. ....	110
<b>Tabela 9:</b> Atividade analgésica do extrato hidroalcoólico de <i>Polygonum acre</i> sobre o número de contorções abdominais induzido por ácido acético 0,6% (n = 6). Indometacina (30 mg/Kg) foi o fármaco de referência. ....	112

#### 4. LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AC	Ácido caféico
AcI:	Ácido clorogênico
AG	Ácido gálico
AlCl <sub>3</sub>	Cloreto de Alumínio
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ANOVA	Análise de Variância
C+	Controle positivo
C-	Controle negativo
°C:	graus Celsius
CCDC	Cromatografia em camada delgada comparativa
GC	Cromatografia gasosa
GC-EM	Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa
CIM	Concentração inibitória mínima
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
DMSO	Dimetilsulfóxido
DP	Desvio Padrão
DPPH•	2,2-difenil-2-picrilhidrazida
EtOH 70	Etanol 70° GL
EUCAST	European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing

EM	Espectrometria de massas
eV	Eletronsvolt
FeCl <sub>3</sub>	Cloreto férrico
FID/DIC	Detector por ionização em chama
g	Grama
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peróxido de hidrogênio
HCl	Ácido clorídrico
HRCB	Herbário Rioclarense
IA	Índice afrosimétrico
IC <sub>50</sub>	Concentração inibitória em 50%
%INIBIÇÃO	Porcentagem de inibição
i.pl.	intra-plantar
IR	Índice de Retenção
MeOH	Metanol
MH10	Extrato obtido com material vegetal do horto por maceração a 10% com EtOH 70° GL
MOPS	ácido 3-[N-morfino] propanosulfônico
mg	Miligrama
ml	Mililitro
m/v	Massa/volume
μA	Microampère
μg	Micrograma
NaOH	Hidróxido de sódio

NP/PEG	Natural product/polyethylenoglicol
nm	Nanômetro
OE	Óleo essencial
OMS	Organização Mundial da Saúde
PANT	Departamento de Princípios Ativos Naturais e Toxicologia
PBS	Tampão fosfato alcalino
OE <sub>C</sub>	Óleo essencial extraído do material vegetal comercial
OE <sub>H1C</sub>	Óleo essencial extraído do material vegetal horto 1 <sup>a</sup> coleta
OE <sub>H2C</sub>	Óleo essencial extraído do material vegetal horto 2 <sup>a</sup> coleta
OE <sub>H3C</sub>	Óleo essencial extraído do material vegetal horto 3 <sup>a</sup> coleta
PH10	Extrato obtido com material vegetal do horto por percolação a 10% com EtOH 70° GL
PC20	Extrato obtido com material vegetal comercial por percolação a 20% com EtOH 70° GL
Q	Quercetina
R	Rutina
Rf	Fator de retenção
RPMI	Meio de Cultura de Tecido Animal Desidratado
rpm	Rotações por minuto
TIC	cromatograma de íons totais
TH10	Extrato obtido com material vegetal do horto por turbólise a 10% com etanol 70° GL
UV	Ultravioleta

Unesp	Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho"
v/v	Volume/Volume
+	Positivo
-	Negativo
%	Porcentagem

## 5. INTRODUÇÃO

### 5.1 Aspectos históricos: o uso de plantas medicinais no Brasil e no Mundo

A utilização de produtos naturais como recurso terapêutico é tão antiga quanto à civilização humana e, por muito tempo, produtos minerais, vegetais e animais constituíram o arsenal terapêutico (RATES, 2001).

Três períodos merecem destaque especial no desenvolvimento de fármacos a partir de matérias primas vegetais. O primeiro deles, entre 1800 e 1900, se destaca pela descoberta de diversos fármacos entre eles, a morfina isolada da *Papaver somniferum*, a efedrina da *Ephedra sinica*, a quinina da *Cinchona calisaya*, emetina e a cephaelina da *Cephalis ipeccacuanha*, e a salicina de *Salix alba* (que anos depois deu origem ao conhecido ácido acetilsalicílico). No segundo período, entre 1901 e 1970/80 apareceram apenas os antibióticos obtidos a partir de fungos como produtos naturais de importância. No terceiro e último período, que compreende de 1970/80 até os dias atuais, retorna o interesse pela busca de drogas vegetais com a descoberta de inúmeros fármacos, tais como a artemisinina (presente na *Artemisia annua*) e o paclitaxel (taxol) isolado de *Taxus brevifolia* como exemplos (PELISSARI, 2008).

Apesar da grande evolução da medicina e dos medicamentos alopáticos a partir da segunda metade do século XX, o uso de plantas medicinais em procedimentos clínicos tradicionais ainda tem sido muito relatado, isso porque, segundo dados divulgados pela Organização Mundial da Saúde em 1990, cerca de 80% da população de países em desenvolvimento dependem do uso de plantas medicinais e isso se deve ao fácil acesso e a grande tradição do uso de plantas medicinais para o tratamento de

diversas enfermidades, em contra partida inúmeros obstáculos são enfrentados pelas populações carentes para se ter acesso aos medicamentos alopáticos, esses obstáculos vão desde o acesso aos centros de atendimento hospitalares à obtenção de exames e medicamentos (VEIGA-JR. et al., 2005).

Ao longo dos tempos observou-se uma evolução no emprego de plantas medicinais na recuperação da saúde, as formas de usos vão das mais simples de tratamento tópico até as formas tecnologicamente mais sofisticadas da fabricação industrial (LORENZI e MATOS, 2002).

Atualmente, o uso de plantas medicinais na terapêutica tem despertado um crescente interesse por diversos motivos dentre eles as contraindicações, efeitos colaterais e prejuízos causados pelo uso abusivo e/ou incorreto de medicamentos sintéticos, o fato de que amplas camadas da população mundial não têm acesso aos medicamentos e a crença popular de que o natural é inofensivo (RATES, 2001).

No Brasil aproximadamente 80.000 espécies de plantas são descritas, oferecendo enorme propulsão para o descobrimento de novas drogas a partir de indicação de uso popular. Entretanto, considerando esta enorme variedade, o potencial como fonte de novas drogas não tem sido completamente explorado: somente 17% deste grupo de plantas tem sido foco de estudos sistemáticos na busca de compostos biologicamente ativos (HOLETZ et al, 2002; PINTO et al., 2002).

Embora o nosso país possua a maior diversidade vegetal do mundo, com cerca de 60.000 espécies vegetais superiores catalogadas (PRANCE, 1977), apenas 8% foram estudadas para pesquisas de compostos bioativos e 1.100 espécies foram avaliadas em suas propriedades medicinais (GUERRA et al., 2001). Além desse acervo genético, o Brasil é detentor de rica diversidade cultural e

étnica que resultou em um acúmulo considerável de conhecimentos e tecnologias tradicionais, passados de geração a geração, entre os quais se destaca o vasto acervo de conhecimentos sobre manejo e uso de plantas medicinais (BRASIL, 2006).

Apesar do número crescente de publicações relatando a análise fitoquímica e a avaliação da atividade farmacológica de espécies vegetais, até o presente não existem estudos suficientes para a utilização racional da maioria das plantas medicinais brasileiras e aqui perfeitamente adaptadas. O consumo indiscriminado e desprovido de embasamento científico das drogas vegetais pode representar um risco à saúde daqueles que as utilizam, ou simplesmente não produzir os efeitos que delas são esperados (RATES, 2001).

A grande diversidade de espécies vegetais disponíveis no Brasil desperta grande interesse das indústrias farmacêuticas e de grupos de pesquisa direcionados ao desenvolvimento de novos produtos, sejam eles medicamentos, produtos dermatológicos, cosméticos ou produtos para a indústria química em geral (CALIXTO, 2001).

Na área farmacêutica, as plantas e os extratos vegetais foram, e continuam sendo, de grande relevância, tendo em vista a utilização das substâncias ativas como protótipos para o desenvolvimento de fármacos e a utilização como matéria-prima farmacêutica, adjuvantes, ou ainda de medicamentos elaborados exclusivamente à base de extratos vegetais: os medicamentos fitoterápicos (SCHENKEL et al., 2004a).

O mercado mundial de fitoterápicos movimentava cerca de US\$ 22 bilhões por ano. Na década de 2000 o setor faturou cerca de US\$ 6,6 bilhões nos EUA e US\$ 8,5 bilhões na Europa. No Brasil estima-se que o comércio de fitoterápicos seja da ordem de 5% do mercado total de medicamentos, avaliado em

mais de US\$ 400 milhões. De acordo com os dados do Departamento de Comércio Exterior, no Brasil, em 1998 foram exportadas oficialmente cerca de 2842 toneladas de plantas medicinais. De 1999 para 2000, as vendas de fitoterápicos aumentaram cerca de 15%, enquanto que os medicamentos sintéticos 4%, representando cerca de US\$ 260 milhões/ano. Os estados do Paraná, São Paulo, Bahia, Maranhão, Amazonas, Pará e Mato Grosso são os maiores exportadores de plantas medicinais, principalmente para países como os Estados Unidos, Alemanha, Países Baixos, França, Japão, Portugal, Itália, Coreia do Sul, Reino Unido, Espanha, Suíça e Austrália (CAMARGO, 2010).

O estudo de plantas medicinais requer, em primeiro plano, a garantia de qualidade de seus extratos e posteriormente o exame de suas ações através de testes farmacológicos e toxicológicos em animais e, finalmente, a análise da eficácia e segurança no homem, sendo o controle de qualidade das plantas medicinais fundamental para o tripé eficácia-segurança-qualidade do medicamento (CALIXTO, 2000; MELLO e PETROVICK, 2000; WHO, 1998).

Estes princípios são necessários ao desenvolvimento científico e tecnológico dos fitoterápicos e a entrada ou permanência desses produtos no mercado estão relacionadas ao desenvolvimento de estudos científicos que objetivem a obtenção de matérias-primas controladas, o desenvolvimento de tecnologias apropriadas para a obtenção de extratos vegetais e, especialmente, a realização de ensaios clínicos (CALIXTO, 2000; MELLO e PETROVICK, 2000).

Em 2006, foi aprovada, pelo Ministério da Saúde, a Política Nacional de Plantas Medicinais e Medicamentos Fitoterápicos no SUS que visa garantir à população brasileira o acesso seguro e o uso racional de plantas medicinais e fitoterápicos,

promovendo o uso sustentável da biodiversidade, o desenvolvimento da cadeia produtiva e da indústria nacional (Brasil, 2006).

Em 2009 foi publicada a Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS – RENISUS, na qual consta a espécie (*Polygonum* spp) a ser avaliada neste trabalho. A RENISUS é constituída por plantas medicinais que interessam ao SUS por serem nativas ou exóticas adaptadas, amplamente utilizadas pela população brasileira, e já terem algumas evidências para indicação de uso na atenção básica de saúde. No entanto, precisam de estudos para confirmar segurança e eficácia, definição da indicação de uso e da forma farmacêutica mais adequada, a possibilidade de cultivo e produção. Os estudos irão confirmar para quais indicações há segurança e eficácia. O Ministério da Saúde espera que pesquisadores estudem as espécies relacionadas e gerem produtos de interesse ao SUS, pois somente dessa forma será garantida à população plantas medicinais e fitoterápicos com qualidade, segurança e eficácia, como também a promoção do uso sustentável da biodiversidade, o desenvolvimento da cadeia produtiva e da indústria nacional (RENISUS, 2009).

## **5.2 Família Polygonaceae**

É sabido que a família Polygonaceae encontra-se distribuída em regiões tropicais, subtropicais e temperadas, sendo representada por aproximadamente 40 gêneros e cerca de 800 espécies. Sua distribuição é cosmopolita (figura 1), mas ocorre principalmente no norte de regiões temperadas, frequentemente são observadas em ambientes úmidos e alagados, ao longo de rios e margens de lagos (BARROSO, 1978; ENGLER, 1964; SILVA-BRAMBILLA e MOSCHETA, 2001).

As espécies que compõem a família Polygonaceae são utilizadas para diversas finalidades, tais como: propriedades medicinais e tóxicas apresentadas pelas espécies do gênero *Polygonum*, algumas espécies são caracterizadas por serem plantas invasoras de culturas, e outras se destacam pela importância madeireira, ornamental e paisagística (SILVA-BRAMBILLA e MOSCHETA, 2001).

**Figura 1:** Distribuição geográfica da família Polygonaceae (Fonte: Guia de Consultas Botânica - UNNE).



### 5.2.1 Gênero *Polygonum*

O gênero *Polygonum* consta de aproximadamente 200 espécies que se encontram majoritariamente distribuídas pela América do Norte, América Central, Ásia e América do Sul (CIALDELLA e BRANDBYGE, 2001). A maioria das espécies é

aquática, ocorrendo nas bordas de lagoas, margem de rios e locais inundáveis (MELO, 1996 e 2008).

Vários autores descreveram as características anatômicas das folhas do gênero *Polygonum* tais como: ocorrência de estômatos do tipo anisocítico, diacítico ou paracítico; tricomas unicelulares ou pluricelulares; tricomas glandulares variando o número de células que formam a porção distal de duas a vinte células; glândulas amplamente distribuídas; parênquima paliçádico variando de uma a quatro camadas e presença de drusas e grãos de amido (LOPES, et al., 2009).

Os relatos mostram que estas espécies são perenes e tipicamente encontradas em ambientes pantanosos, úmidos, águas pouco profundas, beiras de rios e de transição entre brejos e campos. E por consequência do ambiente em que ocupam, são capazes de se desenvolver em solo de boa fertilidade, areno-argiloso ou argiloso e com alto teor de matéria orgânica (LIMA et al., 2001; BIESKI, 2005; LOPES et al., 2003).

Dados de 1996 mostraram que cerca de 18 espécies foram registradas no Brasil, sendo 13 no estado do Paraná e 13 no estado do Mato Grosso do Sul (MELO, 1996).

Dentre as várias espécies gênero *Polygonum* encontradas no Brasil estão: *Polygonum acuminatum*, *P. ferrugineum*, *P. hydropiperoides*, *P. meisnerianum*, *P. punctatum*, *P. stelligerum* (SILVA-BRAMBILLA e MOSCHETA, 2001).

Muitas espécies de *Polygonum* são conhecidas como “erva-de-bicho”, e são comumente utilizadas para o tratamento de hemorroidas, a exemplo de *P. punctatum*, *P. spectabile*, *P. acuminatum*, *P. hydropiper* e *P. hydropiperoides* (CORREA, 1969; JACOME et al., 2004).

Apesar de serem encontradas diversas espécies do gênero no Brasil, somente a espécie *Polygonum bistorta* possui monografia registrada na Farmacopéia Brasileira de 1926, não fazendo parte das outras edições subsequentes. Tal fato chama atenção para a necessidade de monografias que estabeleçam parâmetros para o controle de qualidade das espécies utilizadas na fabricação de medicamentos fitoterápicos (JACOME et al., 2004).

#### **5.2.1.1 Aspectos químicos**

O amplo espectro terapêutico das espécies de *Polygonum* pode ser atribuído à sua grande diversidade de metabólitos secundários, sendo abundantes em algumas espécies os taninos (condensados e hidrolisáveis), as saponinas, os flavonóides (rutina, quercetina e luteolina), e em outras, os terpenos. Também foram isoladas cumarinas e uma isocumarina, identificada como poligonólídeo, para a qual foi atribuída atividade antiinflamatória (SOFIATI, 2009; JACOME et al., 2004).

Jacome e colaboradores, por meio da técnica de cromatografia em camada delgada, detectaram triterpenos e/ou esteróides, cumarinas, flavonóides, polifenóis, taninos e saponinas em amostras de *Polygonum hydropiperoides* e *P. spectabile*, espécies conhecidas como “erva-de-bicho” e utilizadas como antiinflamatórias, anti-hemorroidais e antidiarréicas. O estudo também mostrou variações nos teores de polifenóis totais, taninos e flavonóides entre as espécies analisada, que são morfológicamente muito semelhantes e empregadas indiscriminadamente na produção de medicamentos fitoterápicos (JACOME et al., 2004).

Nas folhas e sementes de *P. hydropiper* foram relatadas a presença de um sesquiterpeno dialdeídico do tipo drimano, chamado de warburganal, um norsesquiterpeno monoalfeídico, chamado polygonal, bem como os sesquiterpenos isodrimeninol, polygodial, isopolygodial, drimenol e confertifolin (FUKUYAMA, et al., 1982).

Flavonóides sulfatados presentes em *P. hydropiper* mostraram potente inibição contra a enzima aldose lens redutase, uma enzima da família aldo-ceto redutase dependente de NADPH (HARAGUCHI, et al., 1996), além disso, apresentaram potente atividade antioxidante quando avaliadas contra o radical ânion superóxido (YAGI, et al., 1994).

O estudo conduzido por Xiao e colaboradores demonstrou a presença de 10 sulfatos de estilbenos de ocorrência natural no extrato aquoso de raízes de *P. cuspidatum*. Os estilbenos têm despertado considerável interesse por suas bioatividades, o resveratrol, por exemplo, foi relatado por ter atividade hipolipemiante e por inibir a peroxidação lipídica, o metabolismo do araquidonato e da proteína tirosino-kinase, além disso, o resveratrol também possui efeitos antibacterianos e antifúngicos, bem como atividade quimiopreventiva (XIAO, et al., 2000).

Das folhas de *P. ferrugineum* foram isolados 2 novos compostos, denominados homoisflavononas, juntamente com três chalconas já conhecidas como pashanone, flavokawin B e cardamoin e duas flavononas, sendo uma delas a pinostrobin (LOPEZ, et al., 2006).

### 5.2.1.2 Aspectos biológicos

Dentre as várias espécies pertencentes ao gênero *Polygonum*, muitas delas apresentam propriedades medicinais. Há relatos de que os extratos de *P. acre* exercem ação hemostática tópica, sendo largamente empregados na medicina popular, no tratamento das hemorragias internas, tais como as do útero e hemorróidas. Os extratos das partes aéreas da planta *P. hidropiper* L. possuem ação hemostática semelhante à do *P. acre* H.B.K., porém com menor eficiência (JOACHIMOVITS, 1959; SILVA-BRAMBILLA e MOSCHETA, 2001).

São também relatados na literatura outros usos populares de espécies de *Polygonum*, incluindo erva-de-bicho, tais como no tratamento de artrite, erisipela, inflamações, úlcera, diarreias, histeria, reumatismos, doenças infecciosas e também como cicatrizante. Além do banho de assento, as formas de uso habituais pela população se dão na forma de infusões, compressas, dentre outras (BIESKI, 2005).

As raízes secas de *Polygonum cuspidatum* têm sido amplamente utilizada na medicina popular chinesa para o tratamento da dermatite supurativa, gonorréia, pé-de-atleta, hiperlipemia. Muitos componentes químicos têm sido relatados a partir da fração hidrofóbica da planta, incluindo antraquinonas, estilbenos e flavonóides e outros fenóis (XIAO, et al., 2000).

*Polygonum hydropiperoides* é utilizada na medicina popular como antiinflamatória, anti-hemorroidal e antidiarreica. Investigações farmacológicas de *P. hydropiperoides* mostraram atividade antiedematogênica muito acentuada e ausência de toxicidade aguda e sub aguda na dose de 250 mg kg<sup>-1</sup> (LOPES, et al., 2009).

*Polygonum minus*, chamado 'kesum' na Malásia, é uma planta que tem um aroma doce e agradável. Ela vem da família Polygonaceae e tradicionalmente é utilizada para tratar problemas de estômago (QADER, et al., 2011).

*Polygonum avicular*, membro da Polygonaceae, se espalhou na Austrália, Europa, África do Sul, Mediterrâneo, Norte da África, Oriente Médio e na Índia. Esta planta tem propriedades adstringentes e é utilizado para o tratamento de diarreia e sangramentos, apresenta propriedades diuréticas e também é utilizada para o tratamento de retenção urinária e excreção de pedras nos rins (MOHAMMAD, et al., 2011).

*Polygonum ferrugineum* Wedd popularmente é utilizada para curar feridas infectadas, como anti-séptico, como antibiótico ou antifúngico na medicina tradicional argentina. Lopez et al., realizaram um trabalho para observar as propriedades antifúngicas de diferentes extratos das partes aéreas de *P. ferrugineum* com a finalidade de isolar os compostos responsáveis pelas propriedades antifúngicas. Foram testados os extratos: metanólico e seus sub-extratos, hexânico, diclorometânico, 5 compostos isolados do sub-extrato diclorometânico e 2 compostos isolados do sub-extrato hexânico: pinostrobin e flavokawin B. No método de diluição em ágar, foram considerados ativos os extratos com CIM < 1000 µg/mL e CIM < 250 µg/mL para substâncias isoladas (compostos puros). Dos 5 compostos isolados do sub-extrato diclorometânico, o composto conhecido como cardamonin foi o composto de maior atividade antifúngica com seletividade para o fungo *Epidermophyton floccosum* com CIM = 6,2 µg/mL, uma chalcona apresentou moderada atividade (CIM 25 – 50 µg/mL), no entanto contra todo o painel de microorganismos. O cardamoin, assim como o extrato bruto diclorometânico apresentaram a propriedade de induzir a malformação

nas hifas do fungo *Nerospora crassa*, sugerindo que o mecanismo de ação dessas substâncias se dá na parede celular do microrganismo, uma propriedade importante, visto que células humanas não possuem parede celular (LOPEZ, et al., 2011).

O conhecimento das ações relatadas para outras espécies do gênero *Polygonum* são importantes pela proximidade genética com *P. acre*, visto que pode haver semelhanças em diversos aspectos, tais como na produção de princípios ativos, o que pode direcionar os estudos desta espécie (SOFIATI, 2009).

#### **5.2.1.2 *Polygonum acre* H.B.K syn *Polygonum punctatum* Elliott**

A espécie *Polygonum punctatum* Ell. (figura 2), se apresenta com uma erva perene, que pode alcançar até 1 m de altura. Suas folhas são lanceoladas de ápice atenuado, base aguda, glândulas puntiformes reluzentes em ambas as faces. As flores são bissexuadas, pentâmeras, monoclamídeas, actinomorfas, brancas ou róseas e ficam reunidas em inflorescência do tipo espiga. O fruto possui 1,5-2,0 mm, trígono, liso e brilhante, perianto frutífero punctato-glanduloso, não acrescente. O caule é formado por nós e entrenós bem nítidos e avermelhados, o perigônio é coberto por glândulas escuras visíveis a olho nu, a ócrea é cilíndrica e bastante ciliada na margem (MEISNER, 1855; MELO, 1996; LIMA, et al., 2009).

Espécie originária da Ásia que se encontra perfeitamente aclimatada no Brasil, sua distribuição e ocorrência mostra que é a espécie do gênero *Polygonum* mais difundida em todo território nacional (Rio Grande do Sul, Pará, Maranhão, Bahia, Distrito Federal, Goiás, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Rio de Janeiro, Minas Gerais, São Paulo, Paraná e Santa Catarina), isso porque habita todos os tipos de

água, bem como em beira de valetas e terrenos baldios (MELO, 1996; LOPES et al., 2003; BIESKI, 2005).

**Figura 2:** *Polygonum acre* H.B.K syn *Polygonum punctatum* Elliott.



A espécie *P. acre* sinônima de *P. punctatum* Elliott e *Persicaria punctata*, é conhecida popularmente pelos nomes de erva-de-bicho, capiçoba, pimentad'água, pimenta-do-brejo, cataia, potincoba, percicária-do-Brasil, petincobe, erva pulgueira, cataria, capetiçoba, acataia e catalã, demonstrando a importância da taxonomia e da sistemática vegetal na denominação do nome científico para a caracterização das espécies vegetais (ALVES et al., 2001, BIESKI, 2005; LOPES et al., 2003).

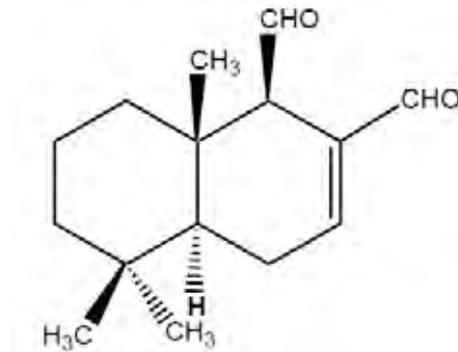
A denominação popular da espécie como erva-de-bicho é caracterizada por se acreditar que os mamilos hemorroidários eram ocasionados por um “bicho” a ser combatido com o decocto dessas plantas (CORREA, 1969).

Com relação à composição química, Simões e colaboradores identificaram nos extratos aquoso e hidroalcoólico de *P. acre* a presença de taninos, cumarinas, flavonóides, leucoantocianinas, saponinas, esteróis e triterpenos, sendo taninos e flavonoides os metabólitos que regiram mais fortemente (SIMOES, et al., 1989).

ECHEVERRI e colaboradores relataram a presença de um sesquiterpeno do tipo drimano chamado danilol no extrato aquoso das folhas de *P. punctatum* (ECHEVERRI, et al., 1997).

Polygodial (figura 3), um sesquiterpeno dialdeídico do tipo drimano foi identificado no extrato diclorometânico das partes aéreas de *P. punctatum*, esse extrato apresentou potente atividade antifúngica contra o fungo *Cladosporium sphaerospermum*, segundo os autores, o polygodial apresentou-se como o constituinte ativo do extrato. Entre outras propriedades, o polygodial apresenta propriedades antibióticas, anti-inflamatórias e antifúngicas. Atividade contra *C. albicans* foi relatada em 1982 e estudos recentes mostraram que para além da *C. albicans*, o polygodial é tão ativo *in vitro* contra outros fungos patogênicos quanto a anfotericina B. A presença de um composto fortemente antibiótico como o polygodial, que também possui propriedades analgésicas, suporta o uso relatado na medicina popular para o tratamento de infecções e dores intestinais (ALVES, et al., 2001).

**Figura 3:** Estrutura química do polygodial (Fonte: ALVES, et al., 2001).



Lima e colaboradores quantificaram os teores de taninos e compostos fenólicos nas partes aéreas de *P. acre*. Foram observadas variações sazonais no conteúdo de taninos condensados, com as maiores acumulações em agosto. O conteúdo de fenólicos totais não variou significativamente ao longo do ano. Como a atividade biológica de *P. acre* tem sido atribuída a alguns polifenóis tais como taninos, segundo os autores, a determinação das variações sazonais pode favorecer a colheita da matéria-prima farmacêutica de acordo com o composto desejado para uma determinada atividade biológica (LIMA, et al., 2010).

Infusões de todas as partes de *P. punctatum* têm sido utilizadas na medicina tradicional de Índios Toba na região nordeste da Argentina com finalidade desinfetante no tratamento de espinhas, feridas, erupções cutâneas e hemorroidas (CROVETTO, 1965; PENNA, et al., 2001).

*P. punctatum* é uma das espécies da família Polygonaceae mais amplamente distribuídas na província de Entre Rios, na Argentina, sendo encontrada em diferentes habitats. É considerado tóxico para o homem e ocasionalmente fatal para o gado (LEWIS, 1977).

Há relatos de que a planta inteira é utilizada na preparação de infusos, tinturas ou banhos, que são aplicados externamente, sob a forma de compressas, a infusão da planta é utilizada sobre varizes inflamadas e sobre úlceras varicosas, os banhos são utilizados no tratamento contra sarna. Em preparações farmacêuticas, as pomadas e os comprimidos são indicados no tratamento de hemorroidas. Suas folhas, e caules são a matéria-prima para a fabricação de fitoterápicos, geralmente apresentados na forma de supositórios ou creme (LIMA, et al., 2009; TEIXEIRA, et al., 1989).

O suco acre pode causar tanto inflamação interna quanto externa. Deve ser usado apenas em preparações feitas profissionalmente e com supervisão médica. Tem poder adstringente, diurético e sudorífico. O extrato frio pode ser aplicado a problemas de pele, como sarna, hemorróidas e como gargarejos para um dor de dente e problemas na laringe (KOTT, et al., 1999).

Simões e colaboradores demonstraram os efeitos da *P. acre* sob uma série de aspectos, dentre eles, toxicidade, atividade analgésica, (estímulo térmico e químico), atividade anti-inflamatória, atividade diurética, efeito sobre a permeabilidade vascular, pressão arterial e transito intestinal (SIMOES, et al., 1989)

Estudos conduzidos por Teixeira et al., demonstram que o extrato aquoso bruto das folhas de *P. acre* foi avaliado em hemorragias pulmonares artificiais em roedores, obtendo como resultado um efeito protetor sobre as hemorragias produzidas, não sendo este efeito dose dependente (TEIXEIRA et al., 1989).

O extrato aquoso bruto possui o potencial de aumentar a absorção de água na porção ílíaca do intestino, mas não apresentou efeitos antidiarreicos significativos, no entanto, esse efeito tem a possibilidade de ser alcançado com extratos de diferentes polaridades, utilizando outros solventes extratores, pois sabe-se que as espécies do

gênero *Polygonum* apresentam em sua composição química grandes quantidades de taninos e flavonoides (ALMEIDA et al., 1995).

A atividade antiinflamatória de extratos de diferentes polaridades de *Polygonum punctatum* foi evidenciada por Gorzalczany et al., por meio dos estudos de edema de pata induzido por carragenina e edema de orelha induzido por TPA, ambas substâncias edematogênicas. No ensaio de edema de orelha induzido por TPA o extrato diclorometânico apresentou inibição no edema de 31,3 %, o extrato metanólico apresentou inibição de 30,1 %, segundo os autores, esta resposta frente à inflamação induzida foi classificada como moderada. No edema de pata induzido por carragenina, o extrato aquoso de *P. punctatum* exibiu uma consistente atividade antiinflamatória com inibição de 65,7; 69,9 e 60,2 % no edema 3, 4 e 5 horas respectivamente após a administração de carragenina (GORZALCZANY et al., 1996).

Zacchino et al., avaliaram a atividade antifúngica de 8 espécies de plantas medicinais da flora argentina, dentre elas 4 espécies do gênero *Polygonum*, sendo elas: *P. punctatum*, *P. acuminatum*, *P. stelligerum* e *P. ferrugineum*. O ensaio foi realizado segundo o método de diluição em ágar em microplacas de 96 poços. Foram considerados ativos os extratos que apresentaram CIM < 1000 µg/mL contra qualquer fungo testado. Foram encontrados diferentes resultados contra os fungos dermatofitos (*Microsporum canis*; *Microsporum gypseum*; *Trichophyton mentagrophytes*; *Trichophyton rubrum* e *Epidermophyton floccosum*). O extrato diclorometânico de *P. punctatum* apresentou atividade antifúngica contra todos os dermatofitos testados, estando os valores de CIMs variando de 50-250 µg/mL (ZACCHINO, et al., 1998).

Kott et al., em estudos realizados com 5 plantas medicinais argentinas, dentre elas *Polygonum punctatum*, observaram que o extrato aquoso das partes aéreas *P. punctatum* apresentou atividade antiviral in vitro (em placa de 96 poços) contra o vírus da herpes (Herpes Simples Vírus tipo 1 - HSV- 1). O estudo revelou que a máxima concentração não citotóxica (MNCC) foi > 450 µg/mL e a dose eficaz que matou 50% das células (ED 50) foi baixa, de 169,7 µg/mL. Também foi observada atividade antiviral in vitro contra o vírus RSV (Respiratory syncytial vírus) e o valor da máxima concentração não citotóxica (MNCC) observado foi > 300 µg/mL e o ED 50 de 120 µg/mL. Segundo os autores, a diferença entre o ED50 e valores MNCC, sugerem um futuro promissor para os extratos testados como produtos antivirais (KOTT, et al., 1999).

Penna, et al., em estudos realizados em 2001, observaram que o extrato diclorometânico das partes aéreas de *Polygonum punctatum* apresentou amplo espectro de atividade antimicrobiana, sendo testado contra *Bacillus subtilis*, *Micrococcus luteus*, *Staphylococcus aureus*, *Mucor* sp. e *Aspergillus niger* (PENNA, et al., 2001).

Lima et al., descreveram as seguintes características destacadas como úteis para identificação de *P. acre*: 1º) ausência de endoderme bem definida com estrias de Caspary; 2º) ócrea com numerosos tricomas pluricelulares e cavidades secretoras localizadas apenas na face abaxial da epiderme; 3º) fibras presentes internamente ao xilema do caule; 4º) feixe invertido na nervura principal; e 5º) presença de pêlos lignificados no bordo da folha. Para os autores, segundo os métodos adotados para quantificação espectrofotométrica dos taninos e fenóis totais, *P. acre* apresenta quantidades razoáveis de taninos condensados e fenóis totais, enquanto os taninos

gálicos podem estar completamente ausentes nesta planta ou em quantidades não detectáveis pelo método utilizado (LIMA, et al., 2009).

## 6. OBJETIVOS

### 6.1 Gerais

Traçar o perfil fitoquímico e cromatográfico dos extratos hidroalcoólico e do óleo essencial de *P. acre*. Assim como avaliar as atividades antioxidante, antifúngica e citotóxica dos mesmos. E estabelecer parâmetros farmacológicos através do estudo de edema de pata e contorções abdominais com a finalidade de avaliar as atividades antiinflamatória e analgésica respectivamente.

### 6.2 Específicos

- Triagem fitoquímica das principais classes de metabólitos secundários presentes nas partes aéreas de *Polygonum acre*;
- Extração e análise do perfil cromatográfico do óleo essencial e dos extratos vegetais hidroalcoólicos a 10 e 20% de *Polygonum acre*;
- Determinação do teor de flavonoides totais nos extratos vegetais hidroalcoólicos a 10 e 20% de *Polygonum acre*;
- Avaliação da atividade antioxidante do óleo essencial e do extrato vegetal hidroalcoólico a 20% de *Polygonum acre*;
- Avaliação da atividade citotóxica do extrato vegetal hidroalcoólico a 20% de *Polygonum acre*;

- Avaliação da atividade antifúngica do óleo essencial e do extrato vegetal hidroalcoólico a 20% de *Polygonum acre*;
- Avaliação da atividade analgésica e antiinflamatória do extrato vegetal hidroalcoólico a 20% de *Polygonum acre*.

## 7. MATERIAL E MÉTODOS

### Equipamentos e materiais diversos

Algodão hidrófilo - Nathalya

Agitador magnético - Marconi®

Balança analítica Shimadzu® - mod AY 220

Balança semi-analítica Gehaka® - mod B6 2000

Banho-Maria - Quimis®

Bomba de vácuo - Motores Elétricos Brasil

Câmara de luz ultravioleta - Prodicil®

Capela com fluxo laminar - Veco

Centrífuga Fanem®

Espectrofotômetro UV-VIS Hitachi® - mod UV U-2001

Estufa de ativação

Estufa de secagem e estabilização - Fanem®

Evaporador rotatório - Marconi TE120

Eppendorfs

Câmara de Neubauer - Boeco®

Cromatógrafo a gás Hewlett-Packard® modelo 6890

Cubeta de quartzo

Dessecador

Leitor de fluorescência Spectra Fluor Plus - Tecan®

Liofilizador - Solab®

Garrafas para meio de cultura

Manta de aquecimento

Microscópio óptico - Carl Zeiss Jena

Moinho de facas - Tecnal®

Papel de filtro

Paquímetro Mitutoyo® - modelo 2050-08

Placa de alumínio de sílica gel 60 F254 - Merck

Placas de 96 poços - modelo TPP 92096

Percolador

Pipetadores automáticos - Eppendorf®

Ponteiras

Scraper

Vidrarias em geral

Vortex -Biomixer Mult-Mixer MVS

### **Fármacos, Reagentes, Solventes e Meios de Cultura**

Acetona P.A. - Chemis

Acetato de chumbo P.A. - Reagen

Acetato de etila P.A. - Chemis

Ácido bórico P.A. - Synth

Ácido acético - Labsynth

Ácido acético glacial P.A. - ECIBRA

Ácido caféico

Ácido clorídrico P.A. - Synth

Ácido clorogênico P.A. - Sigma Aldrich

Ácido fómico - Synth

Ácido gálico P.A. - Vetec

Ácido oxálico P.A. - Synth

Ácido sulfúrico P.A. - Synth

Água destilada

Água oxigenada - Labsynth

Anfotericina B - Sigma-Aldrich

Anidrido acético - Labsynth

Carbonato de sódio - Vetec

Carvão ativo

Carragenina – Sigma Aldrich

Cloreto de alumínio - Reagen

Cloreto férrico - Reagen

Clorofórmio - Labsynth

Corante de Turk

2,2-difenil-1-picrilhidrazida P.A.(DPPH•) - Sigma Aldrich

Dimetilsulfóxido - Labsynth

Etanol - Labsynth

Éter etílico dietílico P.A. - Chemis

Éter de petróleo P.A. - Chemis

Estreptomicina - Sigma Aldrich

Fosfato ácido de sódio

Gelatina - Kraft Foods

Glicose - Sigma Aldrich

Glutamina

Hexano - Chemis

Hidróxido de amônia - Labsynth

Hidróxido de sódio - Labsynth

Indometacina - Sigma

Magnésio metálico - Reagen

Metanol P.A. - Synth

Meio ágar Sabouraud - Acumedia

Meio RPMI-1640 - Sigma Aldrich

NP/PEG (natural products polyethyleneglycol reagente)

Nitroprussiato de sódio

Piridina

Quercetina P.A. - Vetec

Reagentes de Dragendorff, Bouchardat, Mayer, Bertrand, Kedde e Pesez

Rezasurina - Sigma Aldrich

RutinaP.A. - Vetec

Soro bovino fetal - Gibco

Sulfato de sódio andro - Vetec

Tampão fosfato alcalino (PBS)

Tampão HEPES

Tampão MOPS [ácido 3- (N – morfolina)propanosulfônico]

Tolueno - Vetec

Vanilina Sulfúrica

Vermelho de fenol

Zinco metálico P.A. - Reagen

### 7.1 Obtenção do material vegetal

As partes aéreas de *Polygonum acre* foram obtidas comercialmente junto a *Santosflora*, uma das maiores empresas distribuidora, importadora e exportadora de ervas medicinais e aromáticas, especiarias e extratos secos do Brasil. O material vegetal veio acompanhado de um laudo técnico (Anexo 1) e identificativo de controle de qualidade o qual atestava sobre as seguintes características:

- Características organolépticas e identificação macroscópica e microscópica;
- Teste de pureza e integridade (umidade, cinzas totais, cinzas insolúveis, elementos estranhos, densidade aparente e pH);
- Análise de princípios ativos e/ou marcadores (taninos e flavonóides)
- Análises microbiológicas (contagem total, bolores e leveduras, enterobactérias, *E. coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas sp* e *Salmonella sp*).

Também foram utilizadas partes aéreas (caule e folhas) de *Polygonum acre* coletadas no Horto de Plantas Medicinais e Tóxicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP, Campus de Araraquara, SP, cuja exsicata está depositada no

Herbário Rioclarense (HRCB) do Instituto de Biociências, UNESP, Campus de Rio Claro, SP, sob responsabilidade do Prof. Dr. Marco A. Assis, cujo tombo é HRCB 50.288 (SOFIATI, 2009).

O material vegetal proveniente do horto foi coletado no mês de fevereiro em três datas distintas:

- 1ª coleta: 06/02/2012 às 07:30 da manhã;
- 2ª coleta: 13/02/2012 às 07:10 da manhã;
- 3ª coleta: 20/02/2012 às 07:00 da manhã.

Após a coleta, o material foi mantido por sete dias em estufa com circulação de ar e aquecimento a 40° C para secagem. Em seguida, parte do material vegetal foi pulverizado em moinho de facas e armazenado em abrigo protegido de luz e umidade.

## **7.2 Triagem fitoquímica preliminar das principais classes de metabólitos secundários**

A triagem fitoquímica preliminar teve como objetivo, identificar as principais classes de metabólitos secundários presentes nas partes aéreas de *P. acre* obtida comercialmente, sendo os procedimentos para extração selecionados em função da classe química de interesse, de acordo com as metodologias estabelecidas por Costa (1995) por meio de reações químicas de caracterização. A triagem fitoquímica se faz um importante meio de direcionar a obtenção dos extratos, bem como de avaliar as atividades biológicas na espécie em estudo.

As análises foram desenvolvidas por meio de avaliações qualitativas para alcalóides, antraquinonas, flavonóides, glicosídeos cardiotônicos, saponinas e taninos.

### **7.2.1 Pesquisa de Alcalóides**

A pesquisa de alcalóides é feita utilizando-se os reagentes de Dragendorff, Bouchardat, Mayer ou Bertrand.

Em um gral de porcelana pulverizou-se 5,00 g do pó das partes aéreas de *Polygonum acre* procedeu-se a alcalinização com carbonato de sódio a 10% em seguida adicionou-se 25 mL de clorofórmio. A mistura obtida foi filtrada diretamente para um funil de separação através de papel previamente embebido com clorofórmio e particionada. Ao filtrado foram adicionados 7 mL de ácido clorídrico 2% e homogeneizou-se. A fase ácida foi separada e utilizada nas reações de caracterização de alcalóides. Sobre uma lâmina de microscopia, foi aplicada uma gota da fase ácida obtida ao lado de uma gota dos reagentes de Dragendorff, Bouchardat, Mayer ou Bertrand, unindo-as posteriormente. O resultado positivo é observado pela precipitação da mistura sobre fundo escuro.

### **7.2.2 Pesquisa de Antraquinonas**

Para identificação de antraquinonas são realizados os seguintes testes: Antraquinonas livres e Reação de Bornträger.

- **Antraquinonas livres**

Agitou-se 1,00 g do material vegetal com 10 mL de éter etílico, filtrando-se posteriormente em papel de filtro para um béquer, adicionou-se à solução etérea 1 mL

de amônia diluída, agitando-se em seguida. Em caso positivo, a camada aquosa deve tornar-se rósea.

- **Glicosídeos antraquinônicos (reação de Bornträger)**

Foram adicionados 20 mL de água destilada ao material vegetal seco obtido anteriormente e ferveu-se posteriormente por 5 min e após o resfriamento procedeu-se a filtração. Ao filtrado foram adicionados 10 mL de ácido clorídrico e 3 mL de água oxigenada 30%. A solução foi submetida à ebulição por 5 min, resfriada e filtrada. Em seguida foram realizadas duas extrações com 5 mL de éter etílico em um funil de separação (extração líquido-líquido). As fases etéreas obtidas foram reunidas e agitadas com 3 mL de amônia diluída. O surgimento de coloração rósea na camada aquosa indica a presença de glicosídeos antraquinônicos.

### **7.2.3 Pesquisa de Flavonóides**

Para identificação de flavonóides foram feitas cinco reações principais, conhecidas por Shinoda, Taubock, Pew, Cloreto férrico e Cloreto de alumínio.

Adicionou-se em um béquer 3 g de droga os quais foram em seguida tratados com 20 mL de éter de petróleo. Agitou-se durante 10 minutos, com aquecimento em banho maria e filtrou-se a quente. O pó seco foi colocado em outro béquer e a ele foram adicionados 20 mL de metanol, sendo aquecido em seguida em banho-maria por 10 minutos. A solução foi filtrada ainda a quente e evaporou-se o filtrado até secura. Em seguida, ressuspendeu-se em 10 mL de etanol obtendo-se o chamado extrato final.

- **Reações de Shinoda**

Em um tubo de ensaio foi adicionado 1 mL do extrato final, adicionou-se um fragmento de magnésio metálico e gotas ácido clorídrico concentrado gota a gota. O

resultado positivo é observado pelo desprendimento de hidrogênio nascente seguido pelo aparecimento de coloração rósea ou vermelha.

- **Reação de Taubock**

Evaporou-se em tubo de ensaio 3 mL do extrato final até a secura, umedeceu-se o resíduo, após resfriamento, com gotas de acetona (5 gotas). Adicionaram-se alguns cristais de ácido bórico e ácido oxálico. Evaporando-se novamente em banho maria até a secura, evitando-se um aquecimento prolongado. O resíduo obtido foi dissolvido em 5 mL de éter etílico e a solução obtida foi observada em luz U.V. (254 nm). O aparecimento de fluorescência amarelo-esverdeada na solução etérea indica a presença de flavonóides.

- **Reação de Pew**

Em um tubo de ensaio 3mL do extrato final foram evaporados até a secura em banho-maria; ao resíduo adicionaram-se 3 mL de metanol e uma pequena porção de zinco metálico, em seguida foram adicionadas aproximadamente 3 gotas de ácido clorídrico concentrado. O aparecimento de coloração vermelha indica positividade.

- **Reação do cloreto férrico**

Adicionou-se em 1 mL do extrato final algumas gotas de cloreto férrico a 2%. O aparecimento de coloração verde, amarela ou ainda violácea, dependendo do flavonóide presente, indica positividade.

- **Reação do Cloreto de Alumínio**

Foram umedecidas diferentes áreas de papel de filtro com o extrato e sobre uma das manchas foi adicionado uma gota de cloreto de alumínio 5% em etanol. Em

seguida observou-se sob luz U.V. e o resultado se apresenta positivo com intensificação da fluorescência verde amarelado.

#### **7.2.4 Pesquisa de glicosídeos cardiotônicos**

As reações de caracterização de glicosídeos cardiotônicos são chamadas de: Reação de LEGAL, Reação de Kedde, Reação de Pesez, Reação de Keller-Kiliani e Reação de Liebermann Burchard.

Em um béquer foram adicionados 5 g do material vegetal moído e 50 mL de etanol 70% (v/v), aqueceu-se em banho maria por 10 min. Após o resfriamento, o extrato foi filtrado para um balão volumétrico de 30 mL e lavou-se o resíduo e o filtro com a mistura etanol/água e acertou-se o menisco. Adicionou-se ao filtrado 30 mL de água e 15 mL de acetato de chumbo a 10% e após agitação a mistura foi filtrada e adicionou-se 10 mL de fosfato ácido de sódio a 10%. Em seguida, a solução foi transferida para um funil de separação onde foram realizadas duas extrações com 15 mL de clorofórmio cada e obteve-se as fases orgânicas. À ela foi adicionado sulfato de sódio anidro para eliminação de possíveis resíduos de água.

#### **Reações com o anel lactônico insaturado**

##### **a- Reação de LEGAL**

Foram evaporados 2 mL do extrato clorofórmico em um tubo de ensaio e o resíduo obtido foi dissolvido em 1 mL de piridina e posteriormente adicionou-se 0,5 mL de hidróxido de sódio a 10% e 0,5 mL de nitroprussiato de sódio 10%. O surgimento de coloração vermelha intensa indica a presença de anel lactônico insaturado.

##### **b- Reação de Kedde**

Em tudo de ensaio, foram evaporados 2 mL de extrato clorofórmico; ao resíduo obtido foram adicionados 0,5 mL de reagente de Kedde (ácido 3-5 dinitrobenzóico 1% em MeOH) e 1 mL de uma mistura de hidróxido de sódio 10% em metanol preparada pouco antes do uso. O resultado positivo é caracterizado pelo surgimento de coloração vermelho violácea até castanha.

### **Reações com os desoxi-açúcares**

#### **a- Reação de Pesez**

Foram evaporados 2 mL do extrato clorofórmico em um tubo de ensaio. Ao resíduo obtido adicionou-se 1 mL do reagente de Pesez A (Xantidrol 0,5% em metanol) e aqueceu-se por 3 minutos a aproximadamente 100°C. Após o resfriamento foi adicionado o reagente de Pesez B (HCl a 2% em ácido acético). Coloração vermelha caracteriza resultado positivo do teste.

#### **b- Reação de Keller-Kiliani**

Foram evaporados 2 mL do extrato clorofórmico em um tubo de ensaio e o resíduo obtido foi tratado com 1 mL de ácido acético e 2 gotas de FeCl<sub>3</sub> 2% (m/m) e o conteúdo desse tubo foi cuidadosamente transferido para outro contendo 2 mL de ácido sulfúrico concentrado. A presença de desoxi-açúcares é caracterizada pela presença de anel castanho-avermelhado na zona de contato entre os líquidos, e a camada acética deve tomar coloração verde-azulada

### **Reação do anel esteroideal**

#### **a- Reação de Liebermann Burchard**

Foram evaporados 2 mL do extrato clorofórmico em um tubo de ensaio e ao resíduo foram adicionados 1 mL de anidrido acético e 10 gotas de ácido sulfúrico

concentrado. A presença do núcleo esteroidal é caracterizada pelo surgimento de coloração castanha.

### **7.2.5 Pesquisa de Saponinas**

- **Teste de formação de espuma**

Para pesquisa de saponinas, foi pesado em um béquer 2 g de droga vegetal pulverizada e adicionou-se 10 mL de água destilada; essa mistura foi levada ao aquecimento por 5 minutos (tampada por vidro de relógio), sendo posteriormente resfriada e filtrada com auxílio de algodão para um tubo de ensaio. Em seguida, agitou-se verticalmente e vigorosamente o tubo de ensaio, vedado com uma rolha, durante 15 segundos. Deixou-se em repouso por 15 minutos e observou-se a formação de espuma. Na presença de saponinas observa-se o surgimento de espuma persistente e abundante, de aproximadamente 1 cm de altura, e resistente à adição de 1 mL de ácido clorídrico diluído (HCl 2N a 20%).

- **Determinação do índice de espuma ou afrosimétrico - análise semiquantitativa de saponinas**

O índice de espuma é a determinação da maior diluição em que 1 g de droga é capaz de formar 1 cm de espuma em determinadas condições. Através deste índice pode-se estimar a quantidade de saponinas que se tem na droga vegetal.

Foi pesado 1,0 g do material vegetal reduzido a pó fino e transferiu-se para um erlenmeyer (250 mL) contendo 50 mL de água fervente. A mistura foi mantida sob fervura durante 30 minutos e posteriormente foi resfriada e filtrada para um balão volumétrico de 100 mL com um funil comum e algodão e o volume foi completado com água através do algodão.

O decocto obtido foi distribuído em 10 tubos de ensaio com tampas (16 mm de diâmetro por 16 cm de altura), em série sucessiva de 1, 2, 3, até 10 mL, e ajustou-se o volume do líquido em cada tubo para 10 mL com água (tabela 1).

**Tabela 1:** Distribuição do decocto nos tubos de ensaio para determinação do índice de

Número do tubo	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X
Volume do decocto (mL)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Volume de água (mL)	9	8	7	6	5	4	3	2	1	0

espuma.

Em seguida, os tubos foram tampados e agitados em movimentos verticais por 15 segundos e deixados em repouso por 15 minutos. Após o repouso, mediu-se a altura da espuma.

O índice de espuma ou índice afrosimétrico (IA) é calculado segundo a equação  $1000/A$ , sendo A o volume em ml do decocto usado para preparação da diluição no tubo onde a espuma com 1 cm de altura foi observada.

$$IA = 1000/A$$

#### 7.2.6. Pesquisa de Taninos

Os testes para identificação de taninos são: Reação de gelatina, Reação com sais de ferro e Reação com acetato de chumbo.

Para identificação, inicialmente partiu-se de uma solução extrativa preparada por decocção (15 minutos) com 5,00 g do material vegetal em 100 mL de água destilada. Filtrou-se e deixou-se resfriar.

- **Reação da gelatina**

Tomaram-se 2 mL da solução extrativa aquosa a 5%, 2 gotas de ácido clorídrico e posteriormente solução de gelatina 2,5% gota a gota. A formação de precipitado indica a presença de taninos.

- **Reação com sais de ferro**

Foram adicionados 10 mL de água destilada em 2 mL da solução extrativa e 4 gotas de solução de cloreto férrico a 1% em metanol. Em caso positivo, o desenvolvimento de coloração azul indica a presença de taninos hidrolisáveis, enquanto a coloração verde indica a presença de taninos condensados.

- **Reação com acetato de chumbo**

Foram adicionados à 5 mL da solução extrativa 10 mL de solução de ácido acético 10% e 5 mL de solução de acetato de chumbo 10%. O resultado positivo constitui formação de precipitado esbranquiçado para taninos hidrolisáveis.

### **7.3 Obtenção dos extratos vegetais**

#### **7.3.1 Material vegetal adquirido comercialmente**

### **7.3.1.1 Percolação**

O processo de obtenção do extrato hidroalcolólico foi o de percolação, segundo o Processo Geral A, descrito na Farmacopéia dos Estados Unidos do Brasil, 2ª edição. Foi utilizado como solvente extrator EtOH 70°GL. A proporção empregada entre a droga vegetal pulverizada e o líquido extrator foi de 20% (m/V), a percolação foi realizada com 600,0 g de folhas e caules de *P. acre* e o fluxo de gotejamento médio foi de 4 gotas por minuto. A solução extrativa obtida foi concentrada em evaporador rotatório sob pressão reduzida com temperatura máxima de 40 °C até a obtenção de um extrato pastoso, na consistência de um melado, em seguida, o extrato foi liofilizado pra obtenção do extrato em pó (seco). Ao final do processo, foi obtido o extrato chamado PC20.

### **7.3.2 Material vegetal coletado no Horto de Plantas Medicinais e Tóxicas da FCF-UNESP-Araraquara**

Os extratos provenientes deste material vegetal foram todos obtidos na proporção de 10%, o solvente extrator em todos os processos foi EtOH 70°GL. Após as extrações, a solução extrativa foram devidamente filtradas em papel de filtro e em seguida acondicionadas em capela sob abrigo da luz para completa remoção do solvente.

#### **7.3.2.1 Percolação**

Foi usado o Processo Geral A, descrito na Farmacopéia dos Estados Unidos do Brasil, 2ª edição. O material vegetal pulverizado foi previamente umedecido e empacotado no percolador que em seguida recebeu o volume de solvente pré-determinado. A percolação foi realizada em fluxo de 4 gotas por minuto até recuperação

do solvente adicionado, sem exaustão do material vegetal. Ao final do processo, foi obtido o extrato PH10.

#### **7.3.2.2 Maceração**

O material vegetal acondicionado em frasco âmbar e sob abrigo da luz ficou em contato com o solvente extrator durante sete dias, sendo submetido à agitação diariamente, no entanto, sem renovação do solvente (re-maceração). Ao final do processo, foi obtido o extrato MH10.

#### **7.3.2.3 Turbólise**

No preparo da solução extrativa, foram acondicionados em um turbo extrator 20 g do material vegetal pulverizado juntamente com 180 mL de solvente extrator EtOH 70. A solução resultante foi três vezes submetida a agitação durante 5 minutos com intervalo de 10 minutos entre cada uma delas. Ao final do processo, foi obtido o extrato TN10.

### **7.4 Obtenção do óleo essencial**

O óleo essencial do foi obtido por meio da técnica de hidrodestilação utilizando o aparelho de Clevenger modificado por 4 horas (WASICKY, 1963). O material vegetal rasurado em pedaços de aproximadamente 2,5 cm foi previamente selecionado e cerca de 50 g do material vegetal foi acondicionada no balão extrator com capacidade de 5000 mL com volume de água correspondente a cerca de metade do volume do balão (esse procedimento foi realizado repetidas vezes até obtenção da quantidade necessária para as análises).

Foi extraído óleo das partes aéreas do material vegetal adquirido comercialmente, no qual o laudo de controle de qualidade se apresenta em anexo (Anexo 2). E também foi realizada a extração do óleo essencial da planta coletada no horto no mês de fevereiro de 2012. Foi feita a extração do óleo essencial proveniente de cada uma das coletas separadamente e o material extraído foi armazenado em frascos distintos sob baixas temperaturas e ao abrigo da luz até o momento do uso.

## **7.5 Perfil cromatográfico**

### **7.5.1 Perfil cromatográfico dos extratos**

O perfil cromatográfico dos extratos hidroalcoólicos a 10 e 20 % de *P. acre* foi realizado utilizando as técnicas de Cromatografia em Camada Delgada Comparativa (CCDC). Nessas análises, foram utilizados marcadores químicos da espécie vegetal em estudo (WAGNER et al., 1984).

#### **7.5.1.1 Cromatografia em camada delgada comparativa (CCDC)**

Para a cromatografia em camada delgada comparativa, a fase estacionária utilizada foi placa de alumínio de sílica gel 60 F254 (MERCK), a fase móvel e os reveladores adequados para cada classe de metabólito. Foram aplicados 4 capilares das amostras e 2 dos marcadores, os quais foram, ácido gálico, rutina e quercetina.

#### **7.5.1.1.1 Pesquisa de flavonóides**

Para análise cromatográfica de flavonóides foi utilizado como fase móvel uma mistura de acetato de etila: ácido fórmico: água, na proporção de 80:10:10 (v/v/v), como revelador químico NP/PEG (Natural products polyethyleneglycol reagent), visualização no ultravioleta a 365 nm e os marcadores utilizados foram rutina e quercetina (WAGNER et al., 1984).

#### **7.5.1.1.2 Pesquisa de taninos**

Na análise cromatográfica de taninos foi empregada como fase móvel uma mistura de acetato de etila: ácido fórmico: água, na proporção de 90:5:5 (v/v/v), como revelador uma solução metanólica de cloreto férrico 1% e ácido gálico como marcador químico (WAGNER et al., 1984).

#### **7.5.1.1.3 Preparo das amostras e marcadores**

Os marcadores utilizados foram previamente solubilizados em 1 mL de metanol para obtenção de uma solução de concentração de 3 mg/mL.

Na preparação dos extratos a serem analisados, foram pesados 15 mg e estas foram solubilizadas em 1 mL de solvente, sendo 0,8 mL MeOH e 0,2 mL de água destilada.

## **7.5.2 Perfil cromatográfico do óleo essencial**

Foi determinado o perfil cromatográfico do óleo essencial, utilizando-se técnicas de cromatografia em camada delgada comparativa (CCDC) e cromatografia gasosa associada a espectro de massa (CG-EM).

### **7.5.2.1 Cromatografia em Camada Delgada Comparativa do óleo essencial (CCDC)**

O perfil cromatográfico do óleo essencial de *P. acre* obtido de diferentes amostras - material vegetal comprado e do horto - bem como de diferentes dias de coleta (material vegetal do horto coletado em 3 dias diferentes dentro de um mesmo mês), foram avaliados através de Cromatografia em Camada Delgada Comparativa (CCDC) com o intuito de se detectar possíveis alterações no perfil fitoquímico dos mesmos.

#### **7.5.2.1.1 Preparo das amostras**

No preparo das amostras a serem analisadas, foram solubilizadas 5 mg de óleo essencial em 1 mL de hexano para obtenção de uma solução de concentração 5 mg/mL.

#### **7.5.2.1.2 Condições de análise**

Para a cromatografia em camada delgada comparativa, a fase estacionária utilizada foi placa de alumínio de sílica gel 60 F254 (MERCK), a fase móvel foi uma mistura de tolueno/acetato de etila nas proporções de 93:7 (v/v) e o revelador empregado foi vanilina sulfúrica ácida seguida de aquecimento a 110 °C por 5-10 min. Foram aplicados dois capilares de cada amostra (WAGNER et al., 1984).

#### **7.5.2.2 Cromatografia Gasosa (CG) e Cromatografia Gasosa associada a Espectrometria de Massas (CG-EM)**

As cromatografias gasosas do óleo essencial foram realizadas em parceria com o Centro de Estudos Farmacêuticos da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, sob supervisão do Prof<sup>o</sup> Dr<sup>o</sup> Carlos Cavaleiro e Livia Salgueiro.

As análises foram realizadas por cromatografia gasosa (GC) e por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (GC-EM).

A cromatografia gasosa foi realizada em um cromatógrafo a gás Hewlett-Packard 6890 (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, EUA) acoplado com sistema de manejo de dados A.05.04 (HP GC ChemStation) equipado com um injetor único e dois sistemas de detecção de ionização de chama (FID). Um divisor graphpak (Agilent Technologies, nº 5021-7148) foi usado para amostragem simultânea em dois Supelco (Supelco, Bellefonte, PA, EUA) com colunas capilares de sílica fundida com diferentes fases estacionárias: SPB-1 (polidimetilsiloxano 30 × 0,20 mm, espessura de filme 0,20 µm), e Supelcowax-10 (polietilenoglicol 30 × 0,20 mm, espessura de filme 0,20 µm). Programa

de temperatura do forno: 70-220 ° C (3°C. min<sup>-1</sup>), 220°C (15 min); temperatura do injetor: 250°C; gás de arraste: hélio, ajustado a uma velocidade linear de 30 cm.s<sup>-1</sup>, com relação de separação de 1:40; detectores de temperatura: 250 ° C.

A análise de GC-EM foi realizada em um cromatógrafo a gás Hewlett-Packard 6890 equipado com uma coluna de sílica fundida HP1 (polidimetilsiloxano 30 × 0,25 mm, espessura de filme 0,25 µm), interligado com um detector seletivo de massa Hewlett-Packard 5973 (Agilent Technologies) operado por um aprimorado software HP ChemStation Enhanced, versão A.03.00. Os parâmetros da GC foram como descrito acima; a temperatura da interface: 250°C; temperatura da fonte do espectro de massas 230°C; temperatura quadrupolo do espectro de massas: 150°C; energia de ionização: 70 eV; corrente de ionização: 60 µA; faixa de varredura: 35-350 unidades; scans.s<sup>-1</sup>: 4,51.

Os componentes de óleo essencial foram identificados através de índices de retenção em ambas as colunas SPB-1 e Supelcowax -10 e através de seus espectros de massa. Os índices de retenção foram calculados por interpolação linear relativos aos tempos de retenção de C8-C23 de n-alcenos e foram comparados com os de amostras de referência incluídos no banco de dados do laboratório CEF/Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra. Os espectros de massa adquiridos foram comparados com espectros de referência do banco de dados de laboratório da Faculdade de Coimbra, com os dados das bibliotecas Wiley e NIST e com dados da literatura (ADAMS, 1995; JOULAIN *et al.*, 19888). Quantidades relativas dos componentes individuais foram calculadas com base nas áreas de dados brutos da CG, sem fator de correção de resposta FID.

## 7.6 Determinação do teor de flavonóides totais

Na determinação do teor de flavonóides totais foram analisadas os seguintes extratos PC20, PH10 TH10 e MH10. A leitura foi realizada em espectrofotômetro Hitachi® U-2001 no comprimento de onda de 420 nm, utilizando cubetas de quartzo de 1 cm de caminho óptico. A metodologia científica utilizada foi segundo OLIVEIRA, 2011 e MARQUES et al., 2011.

O flavonóide quercetina foi utilizado como padrão na construção da curva analítica. Na construção da curva, foi preparada uma solução de quercetina na concentração de 0,5 mg/mL em metanol. A partir dessa solução foram feitas as diluições seriadas e a leitura das respectivas absorvâncias, representadas a seguir na tabela 2.

**Tabela 2:** Construção da curva analítica da quercetina. Concentrações e absorvâncias.

Concentração em µg/mL	Abs em 420 nm
12,00	0,067
6,25	0,158
3,125	0,307
1,563	0,569
0,781	1,114

O teor de flavonóides totais foi expresso em µg/mL equivalente à quercetina em cada 2 mg de extrato (OLIVEIRA, 2011; MARQUES et al., 2011).

### 7.6.1 Preparo das soluções e amostras para leitura

As soluções foram preparadas em balão volumétrico de 100 mL. Para a solução metanólica de  $\text{AlCl}_3$  2% (m/v) foram pesados 2 gramas de cloreto de alumínio anidro e completou-se o volume para 100 mL, para a solução metanólica de ácido acético (2,5% v/v) foram adicionados 2,5 mL de ácido acético glacial no balão e em seguida completou-se o volume para 100 mL.

As amostras foram preparadas em balão volumétrico de 10 mL, e para tanto, foram pesados 20 mg de extrato e em seguida completado o volume para 10 mL com metanol.

### 7.6.2. Procedimento

Em um tubo de ensaio foram adicionados: 1 mL da amostra, 1 mL de solução metanólica de  $\text{AlCl}_3$  (2%, m/v) e 8 mL de solução metanólica de ácido acético (2,5% v/v). Como branco foi preparada uma solução do mesmo modo que a amostra, com e sem adição da solução metanólica de  $\text{AlCl}_3$  (5%, m/v). Depois de 30 minutos de incubação foi realizada a leitura espectrofotométrica em 420 nm. O experimento foi realizado em triplicata para todas as amostras analisadas.

## **7.7 Determinação da atividade antioxidante utilizando radical livre DPPH•**

A metodologia científica utilizada para avaliação da capacidade antioxidante dos extratos e do óleo essencial de *P. acre* foi baseada em dados da literatura (GIORDANI *et al.*, 2008; SOUZA *et al.*, 2007; OLIVEIRA, 2011).

### **7.7.1 Cromatografia em Camada Delgada Comparativa (Avaliação qualitativa)**

Na avaliação da capacidade sequestradora de radicais livres foram analisados os extratos PC20, PH10, MH10, TH10 e o óleo essencial de *P. acre*, bem como alguns marcadores, utilizando solução recém preparada de 2,2-difenil-1-picrilhidrazida (DPPH•) em MeOH a 0,2% como revelador.

#### **7.7.1.1 Preparo das amostras**

- Óleo essencial

No preparo da amostra (material vegetal comprado) a ser analisada, foram solubilizadas 60 mg de óleo essencial em 1 mL de etanol para obtenção de uma solução de concentração 60 mg/mL.

- Extratos

Na preparação das amostras a serem analisadas foram pesados 15 mg e estas foram solubilizadas em 1 mL de solvente, sendo 0,8 mL MeOH e 0,2 mL de água destilada.

- Marcadores

Os marcadores (rutina, quercetina, ácido gálico, ácido clorogênico e ácido cafeico) utilizados foram previamente solubilizados em metanol para obtenção de soluções nas seguintes concentrações: rutina, quercetina e ácido gálico de 3 mg/mL, cafeico 1 mg/mL e ácido clorogênico 0,5mg/mL.

#### **7.7.1.2. Procedimento**

Para a cromatografia em camada delgada comparativa, a fase estacionária utilizada foi placa de alumínio de sílica gel 60 F254 (MERCK), a fase móvel foi uma mistura de acetato de etila: ácido fórmico: água, na proporção de 90:5:5 (v/v/v). E como revelador utilizou-se uma solução recém preparada de 2,2-difenil-1-picrilhidrazida (DPPH•) em MeOH a 0,2%. Foram aplicados 4 capilares das amostras e 2 dos marcadores.

Após eluído, o cromatograma foi nebulizado com solução de DPPH• recém preparada. A placa foi analisada a olho nu e em câmara escura sob lâmpada fluorescente de comprimento de onda 254 nm. As substâncias com atividade anti-radicalares aparecem na forma de manchas amarelas sobre o fundo de coloração violeta do DPPH•.

#### **7.7.2 Determinação da atividade antioxidante utilizando radical livre DPPH• (Avaliação *in vitro*)**

No ensaio *in vitro* foram analisados o extrato PC20 bem como o óleo essencial provenientes do material vegetal comercial.

### 7.7.2.1 Preparo das amostras e reagentes

- Solução de DPPH•

Foi preparada solubilizando-se 2,4 mg de 2,2-difenil-1-picrilhidrazida em 100 mL de etanol e em seguida, essa solução foi transferida para um balão volumétrico encapado com papel alumínio para proteger da luz.

- Extrato PC20

Foi preparada uma solução mãe na concentração de 1000 µg/mL, em solução solvente etanol:água 1:1 (v/v). A partir dessa solução foram feitas diluições, em duplicata utilizando eppendorf, para obtenção das seguintes concentrações: 240; 300; 360; 420; 480; 540; 600; 650; 700; 750; 800; 900 e 1000 µg/mL.

- Óleo Essencial

Para análise do óleo essencial do material vegetal comercial foi preparada uma solução mãe pesando-se 200 mg de óleo essencial e solubilizando-se em 2 mL de etanol com algumas gotas de éter etílico mais agitação, para obtenção de uma solução de concentração 100 mg/mL. A partir dessa solução foram feitas diluições, em duplicata utilizando eppendorf (exceção para a maior concentração que foi feita apenas uma leitura), para obtenção das seguintes concentrações: 20; 30; 40; 50; 60 e 100 mg/mL.

### 7.7.2.2 Procedimento

Uma alíquota de 0,1 mL de cada diluição dos extratos e dos óleos essenciais foi transferida para tubos de ensaio, em seguida, em ambiente escuro, foram transferidos para cada tubo 3,9 mL da solução do radical DPPH•. Após homogeneização, os tubos

foram mantidos ao abrigo da luz por aproximadamente 1 hora. O ensaio foi realizado em duplicata e as absorvâncias foram medidas em 515 nm (OLIVEIRA, 2011).

Para solução controle dos óleos essenciais foram utilizados 0,1 mL de etanol e 3,9 mL do radical DPPH•, e para solução controle dos extratos foram utilizados 0,1 mL de etanol:água (1:1) 3,9 mL do radical, tratados nas mesmas condições das amostras.

Sendo assim, após a adição do DPPH• a real concentração do extrato e do óleo no ensaio foi de:

- Extrato PC20: 6,0; 7,5; 9,0; 10,5; 12,0; 13,5; 15,0; 16,25; 17,5; 18,75; 20,0; 22,5 e 25 µg/mL
- Óleo essencial: 0,5; 0,75; 1,0; 1,25; 1,5; 2,5 mg/mL

Na presença de seqüestradores deste radical, a intensidade da absorvância diminui e a porcentagem de inibição (%Inibição) pode ser calculada como (CUENDET et al., 1997; OLIVEIRA, 2011):

$$\% \text{ Inibição DPPH } \bullet\bullet = \left( 1 - \frac{A_{AMOSTRA}}{A_{CONTROLE}} \right) \times 100$$

sendo que,

$A_{AMOSTRA}$  é a absorvância do DPPH• em 515 nm na presença de amostra;

$A_{CONTROLE}$  é a absorvância do DPPH• em 515 nm na ausência de amostra.

## **7.8 Avaliação da atividade antifúngica**

Os ensaios de sensibilidade foram realizados frente ao extrato PC20 e frente ao óleo essencial de *Polygonum acre* (material vegetal comercial) tendo como controle positivo anfotericina B.

Este ensaio foi realizado segundo o documento EDef7,1 (EUCAST), 2008 com algumas adaptações. Para o desenvolvimento da metodologia, foi utilizado o meio RPMI 1640 com glutamina, sem bicarbonato e com indicador vermelho de fenol, tamponado com MOPS [ácido 3-(*N*-morfolina) propanosulfônico] pH 7,0 acrescido com 2 % de glicose, esterilizado por filtração 0,22 micrometro e conservado a 4 °C.

### **7.8.1 Preparo do antimicrobiano**

Como substância controle com atividade antifúngica já comprovada, foi utilizado o antibiótico anfotericina B. O antifúngico utilizado previamente preparado nas concentrações de 0,030 a 16,0 mg/L. A leitura dos resultados na placa, foram feitas nas diluições de 0,015 a 8,0 mg/L, isso porque a adição do inóculo faz a concentração cair pela metade (GULLO, 2012).

### **7.8.2 Preparo das amostras testadas**

No teste de atividade antifúngica foi preparada uma solução mãe com o extrato PC20 na concentração de 5 mg/mL ressuspensos em (DMSO). E para o óleo

essencial, trabalhou-se em porcentagem, estando a primeira concentração avaliada na porcentagem máxima (100%).

### **7.8.3 Preparo das suspensões de fungos**

O ensaio foi realizado frente à cepa de *Candida albicans*. Para o ensaio, as leveduras foram mantidas em ágar Sabouraud, em temperatura ambiente por 24 horas, a partir dessas culturas foram preparados os inóculos em PBS estéril e procedeu-se a contagem em câmara de Neubauer para ajustar a concentração de células na faixa 2,5 a  $5 \times 10^6$  UFC/mL. Em seguida, o inóculo foi diluído em meio RPMI para a obtenção de uma concentração  $4 \times 10^6$  UFC/mL.

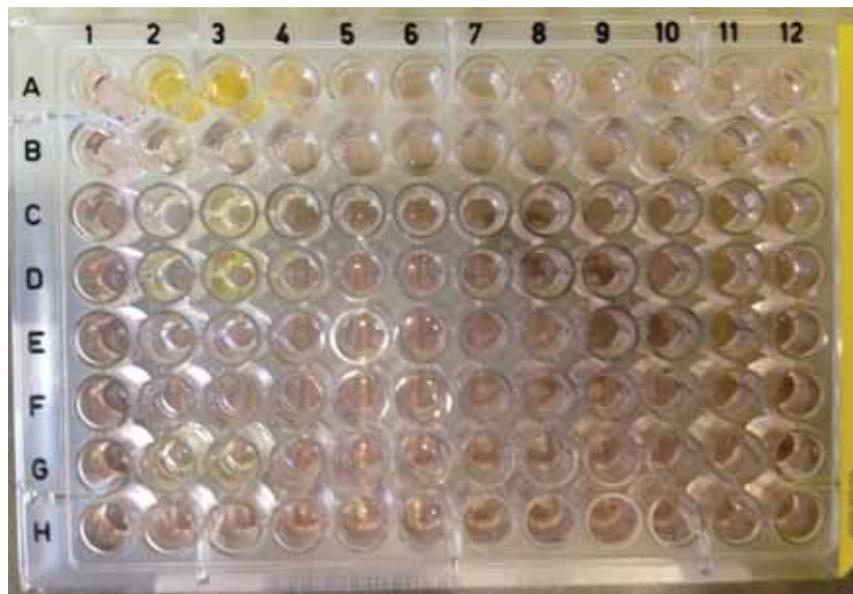
### **7.8.4 Procedimento**

O ensaio foi realizado em placas para cultura de células de 96 poços (figura 2), marca TPP, modelo 92096, montada da seguinte maneira:

- Coluna 1 - controle negativo: 200  $\mu$ L de meio RPMI;
- Coluna 12 - controle positivo: 100  $\mu$ L de meio RPMI e 100  $\mu$ L de inóculo (suspensão de levedura);
- Coluna 2 maiores concentrações: óleo essencial 100% e extrato 250  $\mu$ g/mL;
- Colunas 3 a 11 - diluições seriadas 1:1 (100  $\mu$ L de meio RPMI e 100  $\mu$ L de amostra) deixando como volume final em cada poço 100  $\mu$ L;

- Linha H - controle de anfotericina B: concentrações variando de 16  $\mu\text{g/mL}$  a 0,03  $\mu\text{g/mL}$ .

**Figura 4:** Placa para cultura de células de 96 poços para avaliação da atividade antifúngica.



Com exceção da primeira coluna, foi adicionado 100  $\mu\text{L}$  do inóculo em todos os poços.

As placas foram incubadas a uma temperatura entre 35 e 37  $^{\circ}\text{C}$  sob agitação constante de 150 rpm e a leitura ocorreu após um período de 24 horas, por meio de leitura visual.

## **7.9 Avaliação da Citotoxicidade**

A avaliação da citotoxicidade foi conduzida para o extrato PC20 de *P. acre* e para tanto foram utilizadas células de macrófagos murinos de linhagem J774. As células foram mantidas em garrafas de cultura em meio RPMI-1640 (pH 7,0), preparado com 10% de soro bovino fetal, 0,2% de bicarbonato de sódio e 10 mM de HEPES, no momento do acondicionamento das garrafas foram adicionados 0,1% de solução de estreptomicina e 0,1% de anfotericina B e a incubação foi feita em estufa a 37°C sob atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>.

### **7.9.1 Preparo das amostras**

No preparo da amostra, foram pesados 20 mg do extrato PC20 e dissolvidos em 200 µL de DMSO, em seguida essa solução foi diluída 1:5 com meio de cultura e 20 µL foram aplicados em 180 µL de meio e diluídos de forma seriada na proporção 1:1. A faixa de concentração do teste variou de 2000 µg/mL a 15,65 µg/mL e os testes foram realizados em triplicata.

### **7.9.2 Procedimento**

As células de macrófagos foram coletadas com auxílio de “scraper” e centrifugadas a 1500 rpm por 10 minutos, em seguida procedeu-se a contagem com auxílio do corante Turk, em câmara de Neubauer, para se ajustar a concentração para 1.10<sup>5</sup> células/mL em meio de cultura. As células foram incubadas em microplacas de 96

poços, a 37 °C e 5% de CO<sub>2</sub> por 24 horas.

Após o período de incubação, foi observada a formação do tapete celular e foi retirado o meio existente, já inadequado para a manutenção das células. Em outra microplaca de 96 poços foi feita a diluição das amostras e estas foram transferidas para a microplaca contendo tapete celular (OHNO et al., 1998; TAKAHASHI et al., 2008).

Posteriormente, foram adicionados 15 µL de solução aquosa de resazurina a 0,1 mg/mL e incubou-se a microplaca por 3 h na mesma estufa. Quatro poços da coluna 12 foram utilizados para controle positivo do crescimento celular e quatro como controle negativo de ausência de crescimento. A leitura dos resultados foi feita visualmente pela diferenciação entre a cor azul (ausência de células vivas) e cor rosa (presença de células vivas) e por meio do leitor de fluorescência Spectra Fluor Plus – Tecan, com filtros de luz de 530 e 590 nm e programa de análise Magellin e foram aplicadas análises estatísticas (O'BRIEN et al., 2000).

## **7.10 Ensaios farmacológicos**

### **7.10.1 Animais**

No presente estudo, foram utilizados animais provenientes do Biotério Central da Unesp – Botucatu, sendo ratos machos da raça Wistar (n = 6) pesando entre 200 – 250 g para o estudo de edema de pata induzido por carregenina e camundongos machos da raça Swiss (n = 6) pesando 25 - 35 g para o estudo da contorção abdominal induzida por ácido acético. Os animais foram mantidos no Biotério do laboratório de Farmacologia – PANT – da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Unesp -

Araraquara em gaiolas plásticas forradas com maravalha, alimentados com ração Purina® e água *ad libitum*, ciclo de claro e escuro, umidade e temperatura controlados. O protocolo utilizado foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Unesp - Araraquara (processo nº. 33/2009 - Anexo 3) e os resultados obtidos foram aprovados pelo mesmo (parecer nº 44/2012 - Anexo4).

### **7.10.2 Edema de pata induzido por carragenina**

Para realização de edema de pata, foram utilizados quatro grupos de seis animais tratados com carragenina para produção do edema. O fármaco inflamatório/edematogênico, carragenina foi administrado aos animais por via intraplantar (i.pl.) na dose de 200 µg/pata em um volume de 0,1 mL por pata. A administração da carragenina foi feita 60 minutos após os tratamentos, de acordo com os grupos:

- 1) Controle - salina (0,1mL/100g), via oral.
- 2) Padrão: indometacina, (30 mg/kg), via oral;
- 3) Droga teste: extrato vegetal (200 mg/Kg), via oral;
- 4) Droga teste: extrato vegetal (400 mg/Kg), via oral.

Os volumes das patas foram determinados com o auxílio de um paquímetro (Mitutoyo 2050-08) imediatamente antes da injeção da carragenina (leitura basal). Registros subseqüentes dos volumes das mesmas patas foram realizados nos intervalos de 2, 3 e 4 horas após administração da carragenina e comparados com as leituras iniciais; sendo que: G1: controle (salina 0,9% + carragenina); G2: indometacina

+ carragenina; G3: extrato vegetal 200 mg/kg + carragenina e G4: extrato vegetal 400 mg/kg + carragenina (FRACASSO, et al., 1996).

Para determinação do volume das patas os animais foram momentaneamente sedados com éter antes de cada medição.

### **7.10.3 Contorções abdominais induzidas por ácido acético**

Para realização do teste de contorções abdominais, foram utilizados quatro grupos de seis animais tratados com ácido acético 0,6% por via intraperitoneal, sendo os tratamentos administrados 60 minutos antes, de acordo com os grupos:

- 1) Controle - salina (0,1mL/10g), via oral.
- 2) Padrão: indometacina, (30 mg/kg), via oral;
- 3) Droga teste: extrato vegetal (200 mg/Kg), via oral;
- 4) Droga teste: extrato vegetal (400 mg/Kg), via oral.

Em seguida, os animais, um a um foram mantidos sob um funil de vidro para observação do número de contorções abdominais. As contorções abdominais foram observadas por 20 minutos, considerando um intervalo de 5 minutos para o início da contagem.

O procedimento foi realizado com os seguintes grupos de animais: G1: controle (salina 0,9% + ácido acético); G2: indometacina + ácido acético; G3: extrato vegetal 200 mg/kg + ácido acético e G4: extrato vegetal 400 mg/kg + ácido acético.

A atividade analgésica será expressa pela redução do número de contorções observadas (KOSTER et al., 1959; RODRIGUES, et al., 2007; NAKAEMA, et al., 2005).

#### **7.10.4 Análise Estatística**

Os resultados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA), considerando significância de 5%.

## 8. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 8.1 Triagem fitoquímica preliminar

A triagem fitoquímica preliminar caracterizou a presença de flavonoides, taninos e saponinas corroborando com os dados existentes na literatura (SIMOES, et al., 1989). Essas classes de metabólitos secundários podem estar relacionadas às atividades biológicas que serão posteriormente relatadas no presente estudo.

A tabela 3 apresenta os resultados obtidos na triagem fitoquímica dos principais metabólitos secundários presentes nas partes aéreas de *P. acre*.

**Tabela 3.** Análise fitoquímica preliminar das partes aéreas de *Polygomun acre*.

<b>Classes de Metabólitos Secundários</b>	<b>Reações de caracterização</b>	<b>Resultados</b>
<b>Flavonóides</b>	Shinoda	-
	Taubock	+
	Pew	-
	Cloreto Férrico	+
	Cloreto de alumínio	+
<b>Alcalóides</b>	Dragendorff	-
	Bouchardat	-
	Mayer	-
	Bertrand	-

<b>Antraquinonas</b>	Livres	-
	Glicosiladas	-
<b>Glicosídeos cardiotônicos</b>	Liebermann Burchard	+
	Legal	-
	Kedde	+
	Pesez	-
	Keller-Killiani	-
<b>Taninos</b>	Gelatina	+
	Sais de ferro	+
	Acetato de chumbo	+
<b>Saponinas</b>	Formação e permanência de espuma	+

(+): positivo; (-): negativo

A caracterização fitoquímica das partes de *P. acre* demonstrou presença de flavonóides, referente às reações de Taubock, cloreto férrico e cloreto de alumínio. A reação de Taubock é determinada pelo aparecimento de fluorescência amarelo-esverdeada encontrada na avaliação da espécie *P. acre*, característico de flavonóis. Na reação de cloreto férrico, as soluções contendo flavonas coram-se de verde-claro, flavonóis e flavanonas de verde-escuro e chalconas de amarelo, e esta espécie analisada apresentou características de flavonóis e flavanonas. Na reação de cloreto de alumínio, obtiveram-se resultados característicos de flavonóis, chalconas e flavonas,

apresentando fluorescência amarelada. Shinoda e Pew não apresentaram resultados positivos (SOFIATI, 2009).

Os flavonóides compõem uma ampla classe de substâncias de origem natural, cuja síntese não ocorre na espécie humana. Entretanto, tais compostos possuem uma série de propriedades farmacológicas que os fazem atuar sobre sistemas biológicos. Conseqüentemente, muitas dessas propriedades atuam de forma benéfica para a saúde humana. Atualmente, já foram identificadas mais de quatro mil substâncias pertencentes ao grupo dos flavonóides (PETERSON e DWYER, 1998).

Os flavonóides são amplamente conhecidos pelos seus efeitos antiinflamatórios, antialérgicos e vasoprotetores. Rutina e hesperidina são importantes flavonóides empregados em tratamentos de fragilidade capilar. As plantas que possuem este metabólito apresentam possível potencial contra raios ultravioleta, insetos, fungos, vírus e bactérias; atraentes de animais com a finalidade de polinização, antioxidante, no controle de hormônios vegetais e como agentes alelopáticos. Comercialmente plantas contendo estas classes de polifenóis são usadas como pigmentadores de couro, na fermentação de chás e ainda possuem importância como anticarcinogênico, antiinflamatório, antialérgico, antiulcerogênico e antiviral (ZUANAZZI et al., 2004).

As reações de caracterização para taninos apresentaram resultados positivos nas reações de gelatina, onde ocorreu a formação de precipitado. Na reação com sais de ferro, observou-se desenvolvimento de coloração verde, característica de taninos condensados e na reação com acetato de chumbo, caracterizada pela formação de precipitado.

Tendo-se em vista que plantas ricas em taninos são empregadas na medicina tradicional para o tratamento de diversas enfermidades, tais como diarreia, hipertensão arterial, reumatismo, hemorragias, feridas, queimaduras, problemas estomacais, renais e do sistema urinário e processos inflamatórios em geral. Acredita-se que as atividades farmacológicas dos taninos são devidas, pelo menos em parte, a três características gerais comuns aos dois grupos de taninos: 1) complexação com íons metálicos (ferro, manganês, vanádio, cobre, alumínio, cálcio, entre outros); 2) atividade antioxidante e seqüestradora de radicais livres e 3) habilidade de se complexar com outras moléculas incluindo macromoléculas, tais como proteínas e polissacarídeos. Foi sugerido que os possíveis modos de ação dos taninos no tratamento de doenças estão intimamente ligados a essas três propriedades. Os taninos ajudam no processo de cura das feridas, queimaduras e inflamações através da formação de uma camada protetora (complexo tanino-proteína e/ou polissacarídeo) sobre a pele ou mucosa danificada. Debaxo dessa camada, o processo natural de cura pode, então ocorrer. Um processo similar ocorre provavelmente em caso de úlcera gátrica, em que uma camada de tanino-proteína complexados protege a mucosa do estômago (SANTOS, et al., 2004).

As aplicações de drogas que possuem taninos em sua composição estão relacionadas, principalmente, com suas propriedades adstringentes. Sabe-se que o uso por via interna exerce efeitos antimicrobianos e antidiarreicos e por via externa, devido ao poder anti-séptico são capazes de impermeabilizar as camadas mais expostas da pele e mucosas, protegendo assim as camadas inferiores (BRUNETON; 1991).

A formação de espuma estável e permanente em tubo de ensaio, por intermédio de agitação vigorosa, revelou a presença de saponinas nas partes aéreas de *P. acre*.

As saponinas são glicosídeos de esteróides ou de terpenos policíclicos. Esse tipo de estrutura, que possui uma parte com característica lipofílica (triterpeno ou esteróide) e outra parte hidrofílica (açúcares), determina a propriedade de redução da tensão superficial da água e suas ações detergentes e emulsificantes. As saponinas podem ser classificadas de acordo com o núcleo fundamental da aglicona ou, ainda, pelo seu caráter ácido, básico ou neutro. Assim, quanto a aglicona, denominam-se saponinas esteroidais e triterpênicas. O caráter ácido pode ser devido à presença de um grupamento carboxila na aglicona ou na cadeia de açúcares ou em ambos. O caráter básico decorre da presença de nitrogênio. Estudos comprovam a ação das saponinas como hipocolesteremiante, pela formação de complexo do colesterol com as saponinas ministradas via oral e pela eliminação fecal de ácidos biliares. Ainda há evidências das saponinas nas atividades antiinflamatórias, antihelmínticas e antivirais, além das atividades sobre membranas celulares, relacionando sua ação hemolítica, ictiotóxica e molusquicida (SCHENKEL, et al., 2004b).

Os resultados obtidos do índice de espuma revelaram a formação de espuma com menos de 1 cm de altura em todos os tubos, o que caracteriza um índice menor que 1000, portanto esse resultado nos levou a acreditar que nas partes aéreas da P. acre a quantidade de saponinas é pequena. Estudos mais aprofundados devem ser realizados acerca do conteúdo de saponinas nesta espécie.

Os resultados das reações de caracterização de alcalóides (Bouchardat, Mayer, Dragendorff e Bertrand) mostraram-se negativos.

Os resultados das reações de caracterização de antraquinonas (reação Borntrager) não indicou a presença de antraquinonas glicosiladas assim como também não foi evidenciado a presença de antraquinonas livres.

No que se diz respeito aos glicosídeos cardiotônicos, os resultados apresentaram-se positivos para as reações de Liebermann e Kedde, no entanto, não são indicativas de que os mesmos se fazem presente na espécie em estudo já que tais reações são inespecíficas, pois, detectam núcleos esteroidais e anéis lactônicos que podem estar presentes em outras classes de metabólitos secundários. As reações de Buchard, Legal, Pesez e Keller-Killiani, que são específicas para identificação de glicosídeos cardiotônicos apresentaram resultados negativos, caracterizando sua ausência nas partes aeras da *P. acre*.

## **8.2 Perfil cromatográfico**

### **8.2.1 Perfil cromatográfico dos extratos**

#### **8.2.1.1 Cromatografia em camada delgada comparativa (CCDC)**

##### **8.2.1.1.1 CCDC para pesquisa de flavonóides**

A figura 5, juntamente com os cálculos dos respectivos fatores de retenção ( $R_f$ ) nos revela o perfil fitoquímico das amostras analisadas, bem como dos marcadores empregados, os quais foram rutina e quercetina.

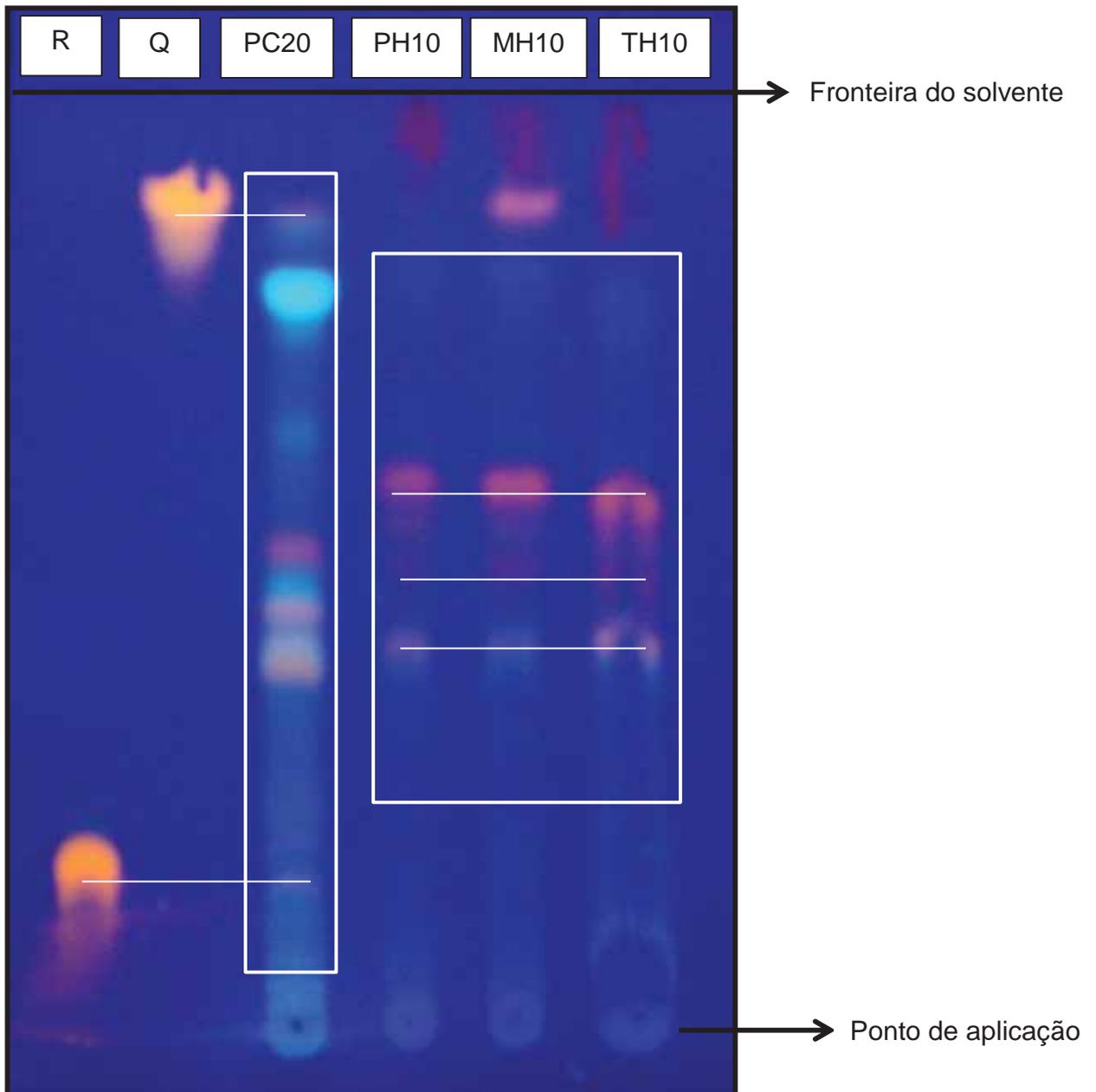
Na análise do cromatograma para detecção de flavonoides, as placas foram analisadas em câmara escura com luz ultravioleta (365 nm). Ambos os marcadores apresentaram mancha fluorescente de coloração alaranjada, a rutina apresentou um  $R_f$

de 0,2 e a quercetina um Rf de 0,9.

A amostra PC20 (extrato percolado do material vegetal comprado) apresentou maior número de manchas fluorescentes, sendo duas das manchas, na altura dos marcadores.

As três manchas superiores, rente a fronteira do solvente, observadas nas amostras PH20, MH20 e TH20 respectivamente, correspondem a clorofila, que ficam de coloração vermelha após revelação química e análise em câmara escura.

**Figura 5:** Cromatograma para pesquisa de flavonóides nos extratos de partes aéreas de *Polygonum acre*. Onde: R: rutina; Q: quercetina; PC20 (extrato obtido com material vegetal comercial por percolação a 20% com EtOH 70° GL); PH10 (Extrato obtido com material vegetal do horto por percolação a 10% com EtOH 70° GL); MH10 (Extrato obtido com material vegetal do horto por maceração a 10% com EtOH 70° GL); TH10 (Extrato obtido com material vegetal do horto por turbólise a 10% com EtOH 70° GL).



O cromatograma nos sugere a variação na composição química entre o extrato da planta comprada e os extratos da planta do horto obtidos por diferentes métodos extrativos.

Com relação aos extratos obtidos a partir das partes aéreas da planta do horto,

podemos dizer que o método extrativo não interferiu na composição das substâncias extraídas, visto a grande semelhança no perfil das três amostras, que tiveram os principais Rfs variando de 0,4 (primeiro grupo de manchas) a 0,6 (terceiro grupo de manchas).

O extrato da planta comercial apresentou maior número de manchas, onde foi possível observar Rfs variando de 0,2 (mancha mais retida) a 0,9 (mancha menos retida). Apesar das manchas da amostra PC20 apresentarem menor intensidade que as manchas referentes aos padrões rutina e quercetina, foi possível observar a presença de ambos os marcadores, caracterizando a presença de rutina e quercetina no extrato PC20 EtOH 70. A presença de quercetina também ficou bastante evidenciada no extrato obtido por maceração da planta do horto.

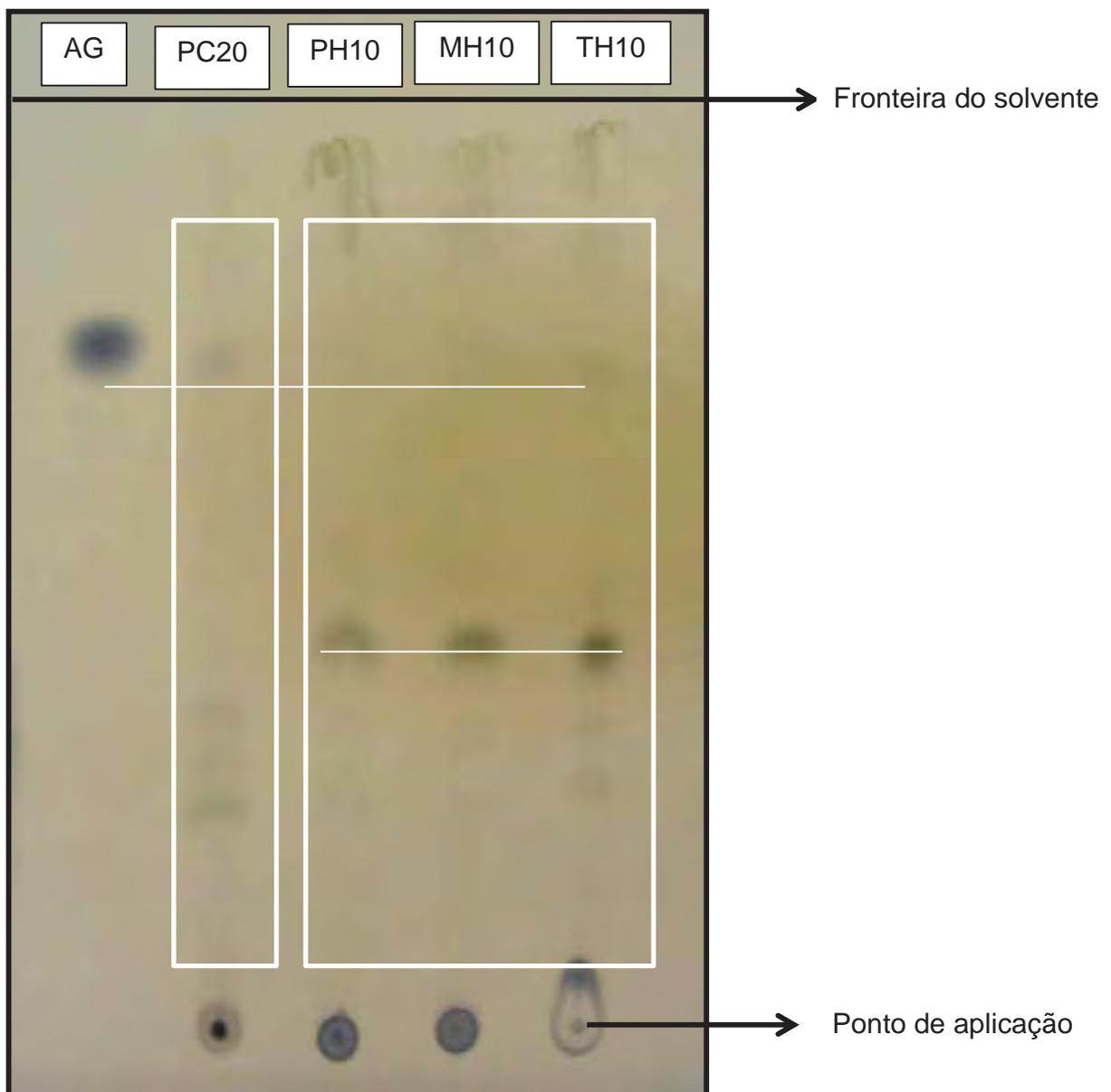
#### **8.2.1.1.2 CCDC para pesquisa de taninos**

A figura 6, nos revela o cromatograma para detecção de taninos, as placas foram analisadas a olho nú após revelação com cloreto férrico 1%. O marcador utilizado foi o ácido gálico, que apresentou mancha de coloração azul e  $R_f = 0,8$ .

Foi possível observar que a amostra PC20 apresentou mancha mais evidente na altura do marcador utilizado, do que as demais amostras analisadas (planta nativa).

As três manchas superiores, rente a fronteira do solvente, observadas nas amostras PH10, MH0 e TH10 respectivamente, correspondem a clorofila, que apresentam coloração esverdeada após revelação com cloreto férrico 1%.

**Figura 6:** Cromatograma para pesquisa de taninos nos extratos de partes aéreas de *Polygonum acre*. Onde: AG: ácido gálico; PC20 (extrato obtido com material vegetal comercial por percolação a 20% com EtOH 70° GL); PH10 (Extrato obtido com material vegetal do horto por percolação a 10% com EtOH 70° GL); MH10 (Extrato obtido com material vegetal do horto por maceração a 10% com EtOH 70° GL); TH10 (Extrato obtido com material vegetal do horto por turbólise a 10% com EtOH 70° GL).



Novamente foi possível sugerir que a composição química da amostra comprada quando comparada com as amostras nativas foi diferente.

No entanto, o revelador utilizado, cloreto férrico 1% é capaz de revelar compostos fenólicos em geral, o que pode nos levar a uma interpretação equivocada do cromatograma, visto que essas manchas poderiam não ser de taninos ou unidades formadoras necessariamente.

Não podemos afirmar que a amostra apresenta taninos devido às manchas reveladas no cromatograma, pois o ácido gálico, marcador utilizado, é uma unidade formadora de taninos hidrolisáveis, sendo classificado como um fenólico simples. O que podemos dizer é que a amostra apresenta em sua composição ácido gálico e portanto, apresenta unidades formadoras de taninos, o que juntamente com a triagem fitoquímica nos leva a crer na presença de taninos hidrolisáveis na amostra.

As amostras da planta do horto apresentaram manchas de coloração esverdeada de mesma altura, e Rf 0,42, o que pode nos sugerir a presença de taninos condensados, que apresentam coloração esverdeada quando revelados com cloreto férrico 1%.

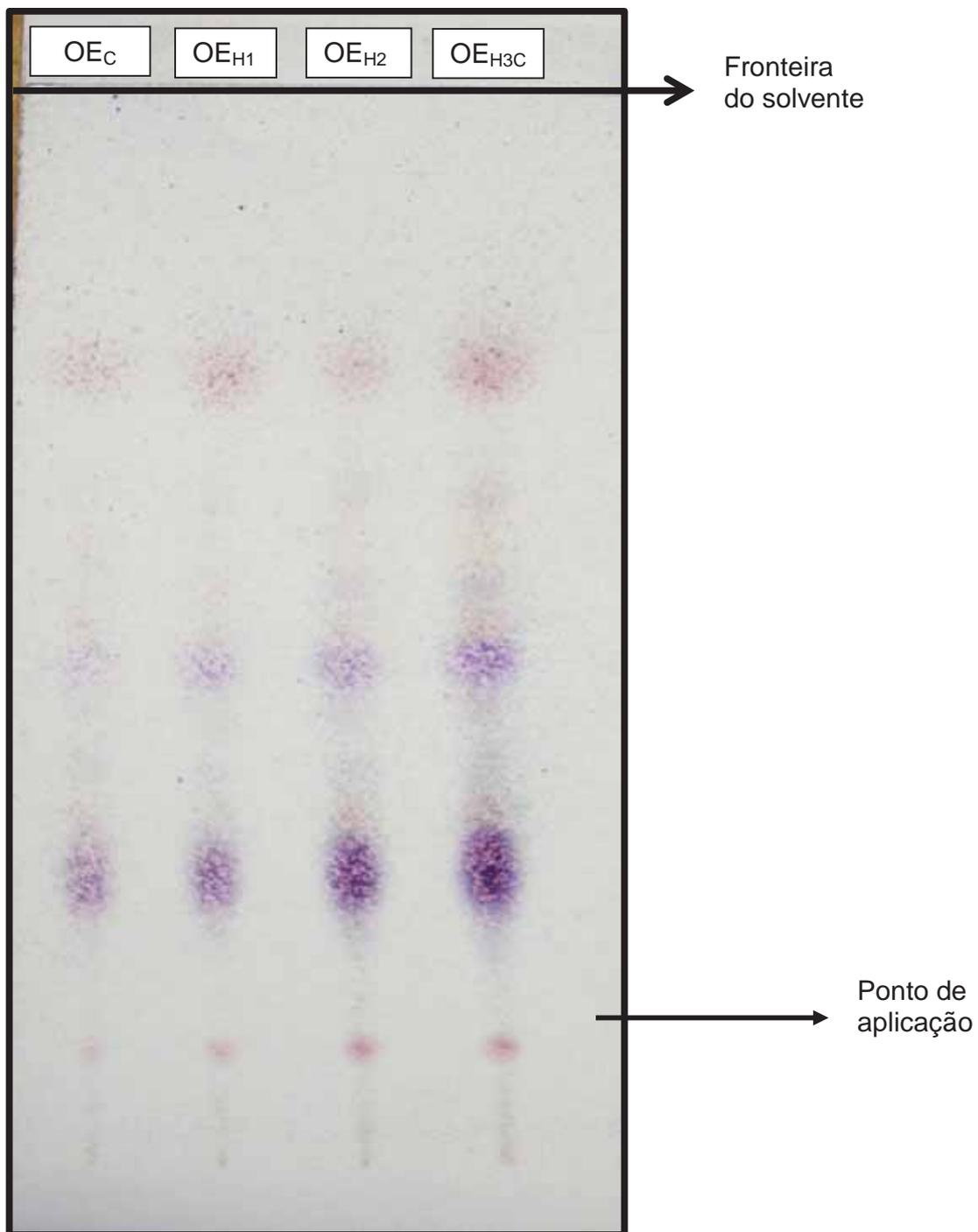
Os taninos hidrolisáveis apresentam coloração azul quando revelados com este revelador, sendo assim, podemos observar que muitas substâncias ficaram retidas na origem e que nos sugerem ser taninos hidrolisáveis devido a coloração característica (COSTA; 1995).

### **8.2.2 Perfil cromatográfico do óleo essencial**

### 8.2.2.1 Cromatografia em camada delgada comparativa (CCDC)

A figura 7 e a tabela 4 nos mostra o perfil do óleo essencial de *P. acre* obtido empregando-se a técnica de Cromatografia em Camada Delgada (CCD) segundo descrito no item 3.3.1., onde foi possível avaliar as possíveis diferenças e semelhanças no perfil fitoquímico desses óleos obtidos das diferentes amostras, as quais são planta comprada e planta do horto, bem como coletadas em diferentes períodos do mês.

**Figura 7:** Cromatograma do óleo essencial obtido a partir das partes aéreas de *Polygonum acre*. Onde: OE<sub>C</sub> (óleo essencial extraído do material vegetal comercial); OE<sub>H1C</sub> (óleo essencial extraído do material vegetal horto 1<sup>a</sup> coleta); OE<sub>H2C</sub> (óleo essencial extraído do material vegetal horto 2<sup>a</sup> coleta) e OE<sub>H3C</sub> (óleo essencial extraído do material vegetal horto 3<sup>a</sup> coleta).



**Tabela 4:** Fatores de retenção e cores das bandas correspondentes a cada amostra aplicada na cromatografia do óleo essencial de *Polygonum acre*.

<b>Amostra</b>	<b>Coloração da banda</b>	<b>Fator de retenção (RF)</b>
<b>PC</b>	<b>1:</b> rosa	0,11
	<b>2:</b> violeta claro	0,26
	<b>3:</b> violeta muito claro	0,47
	<b>4:</b> -----	-----
	<b>5:</b> -----	-----
	<b>6:</b> rosa claro	0,71
<b>PH<sub>1c</sub></b>	<b>1:</b> rosa	0,11
	<b>2:</b> violeta escuro	0,26
	<b>3:</b> violeta claro	0,47
	<b>4:</b> violeta muito claro	0,53
	<b>5:</b> violeta muito claro	0,62
	<b>6:</b> rosa claro	0,71
<b>PH<sub>2c</sub></b>	<b>1:</b> rosa	0,11
	<b>2:</b> violeta escuro	0,26
	<b>3:</b> violeta médio	0,47
	<b>4:</b> violeta muito claro	0,53
	<b>5:</b> violeta muito claro	0,62
	<b>6:</b> rosa claro	0,71
	<b>1:</b> rosa	0,11

<b>PH<sub>3C</sub></b>	<b>2:</b> violeta escuro	0,26
	<b>3:</b> violeta escuro	0,47
	<b>4:</b> violeta muito claro	0,53
	<b>5:</b> violeta muito claro	0,62
	<b>6:</b> rosa claro	0,71

Onde: OE<sub>C</sub> (óleo essencial extraído do material vegetal comercial); OE<sub>H1C</sub> (óleo essencial extraído do material vegetal horto 1<sup>a</sup> coleta); OE<sub>H2C</sub> (óleo essencial extraído do material vegetal horto 2<sup>a</sup> coleta) e OE<sub>H3C</sub> (óleo essencial extraído do material vegetal horto 3<sup>a</sup> coleta).

A análise do cromatograma nos permite dizer que não houve variação na composição química nas amostras coletas no “Horto de Plantas Medicinais e Tóxicas da Unesp de Araraquara – SP”, isso porque as três coletas foram realizadas no mesmo mês, (fevereiro), com intervalo de apenas uma semana entre uma e outra (06, 13 e 20/02/2012). Sendo assim, não houve variação de sazonalidade.

Também foi possível observar que a amostra comprada apresentou um perfil semelhante ao das amostras coletadas no horto, sendo que a variação na intensidade das manchas pode ser explicada pelo sistema de aplicação utilizado, que se deu por meio de capilares. O número de aplicações foi o mesmo, mas não podemos garantir que a concentração aplicada foi a mesma devido à variação no diâmetro dos capilares, muito embora as amostras tenham sido preparadas na mesma concentração e os capilares selecionados de maneira a ser o mais semelhantes um ao outro.

### **8.2.2.2 Cromatografia gasosa (CG) e cromatografia gasosa associada a espectrometria de massas (CG-EM)**

É sabido que as plantas representam uma extraordinária fonte de novos compostos ativos que podem ser utilizados para diversas atividades biológicas. As técnicas analíticas são essenciais para a elucidação da composição química dos produtos de origem vegetal. A espectrometria de massa (EM) é utilizada para obtenção de informações a respeito do peso molecular e das características estruturais da amostra, caracterizando-se como uma das mais importantes ferramentas analíticas na determinação do perfil desses compostos bioativos (BERGAMASCHI, 2010).

A cromatografia pode ser combinada a diferentes sistemas de detecção, tratando-se de uma das técnicas analíticas mais utilizadas e de melhor desempenho. O acoplamento de um cromatógrafo com o espectrômetro de massas combina as vantagens da cromatografia (alta seletividade e eficiência de separação) com as vantagens da espectrometria de massas (obtenção de informação estrutural, massa molar e aumento adicional da seletividade). Para que o acoplamento seja possível, idealmente, é necessário que as características de cada instrumento não sejam afetadas pela sua conexão, assim como não devem ocorrer modificações químicas não- controladas do analito e perda de amostra durante a sua passagem do cromatógrafo para o espectrômetro de massas (CHIARADIA, et al., 2008).

As análises foram realizadas com óleo essencial proveniente do material vegetal adquirido comercialmente.

Os resultados obtidos nas análises por CG-EM na avaliação da composição química do óleo essencial e seus respectivos índices de retenção estão apresentados

na tabela 4 e foram listados em ordem crescente de tempo de retenção na coluna SPB-1. Os índices de retenção foram calculados por interpolação linear relativas aos tempos de retenção de C8-C23 de n-alcanos e foram comparados com os de amostras de referência incluídos no banco de dados do laboratório CEF/Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra. Os espectros de massa obtidos foram comparados com espectros de referência do banco de dados de laboratório da Faculdade de Coimbra, com os dados das bibliotecas Wiley e NIST e com dados da literatura (ADAMS, 1995; JOULAIN, *et al.*, 1998). Quantidades relativas dos componentes individuais foram calculadas com base nas áreas de dados brutos da CG, sem fator de correção de resposta FID.

**Tabela 5:** Composição do óleo essencial de *Polygonum acre* obtida comercialmente.

RI <sup>a</sup>	RI <sup>b</sup>	Spectroscopy	Compounds	%
1085	1539	MS	Linalool	0,5
1158	1845	MS	<i>para</i> -Cymene-8-ol	0,2
1174	1666	MS	Methylchavicol	0,5
1209	1728	MS	Carvone	T
1257	1821	MS	E-anethol	T
1381	1585	MS	<b><math>\beta</math>-Elemene</b>	<b>7,5</b>
1407	1591	MS	<b><i>E</i>-Caryophyllene</b>	<b>3,1</b>
1411	n.d.	MS	Dehydro- $\beta$ -ionone	T
1429	1578	MS	<i>E</i> - $\alpha$ -Bergamotene	0,3

1440	1663	MS	$\alpha$ -Humulene	0,6
1446	1658	MS	<b><i>E</i>-<math>\beta</math>-Farnesene</b>	<b>5,8</b>
1459	1925	MS	$\beta$ -Ionone	0,4
1463	n.d.	MS	Selina-4,11-diene	0,4
1466	1699	MS	Germacrene D	0,5
1471	1713	MS	<b><math>\beta</math>-Selinene</b>	<b>3,0</b>
1481	1709	MS	<b><math>\alpha</math>-Selinene</b>	<b>2,4</b>
1484	1724	MS	$\alpha$ -Muuroolene	T
1496	1725	MS	$\beta$ -Bisabolene	0,5
1504	n.d.	MS	<i>Z</i> -Calamelene	0,5
1507	1751	MS	$\delta$ -Cadinene	0,5
1542	n.d.	MS	<i>E</i> -Nerolidol	0,8
1558	1970	MS	<b>Caryophyllene oxide</b>	<b>8,1</b>
1564	2147	MS	<b>Longiborneol</b>	<b>11,0</b>
1581	2025	MS	Humulene epoxide II	1,3
1626	2238	MS	<b>Selina-11-en-4<math>\alpha</math>-ol</b>	<b>7,4</b>
1729	n.d.	MS	<b>Drimenol</b>	<b>3,2</b>
1886	n.d.	MS	<b>Drimenin</b>	<b>2,5</b>
2100	n.d.	MS	Phytol	0,5
Monoterpenos contendo oxigênio				0.7
Hidrocarbonetos sesquiterpênicos				25.1
Sesquiterpenos contendo oxigênio				34.3

Outros compostos	1.4
<b>Total identificado</b>	<b>61.5</b>

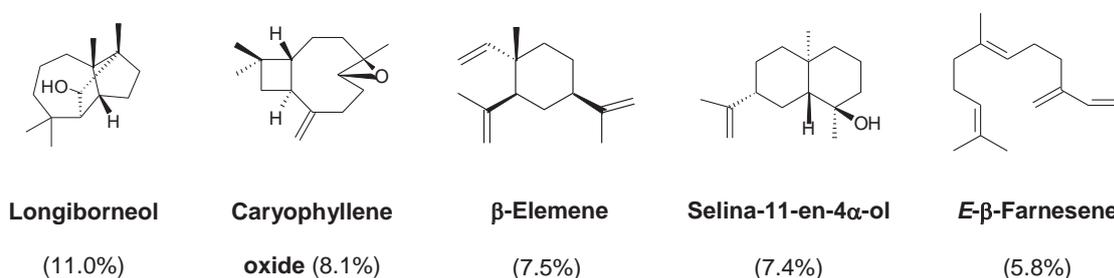
Compostos listados em ordem de eluição na coluna SPB-1;

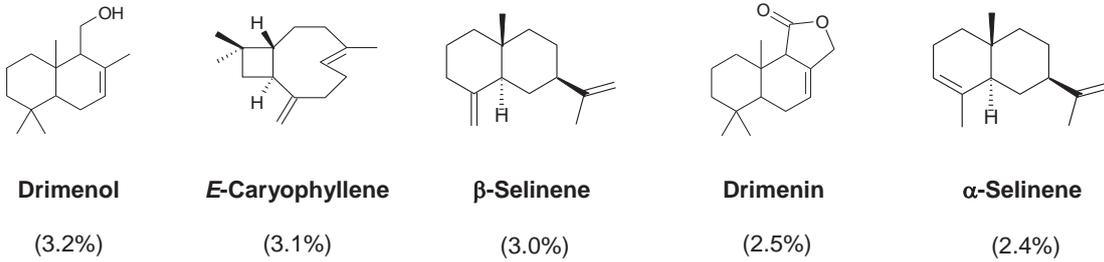
Quantificação baseada nas áreas dos picos das colunas SPB e Supelco-Wax ;

Onde: t: traços; n.d.: não determinado; <sup>a</sup> Índice de Retenção na coluna SPB-1, referente a C8–C23 *n*-alcanos; <sup>b</sup> Índice de Retenção na coluna SupelcoWax-10, referente a C8-23 *n*-alcanos.

A análise de CG-EM possibilitou a identificação de 28 compostos, que representam 61,5 % da composição total do óleo essencial, que apresentou-se predominantemente sesquiterpênico. Os compostos que apresentaram maior abundância estão representados estruturalmente na figura 13 com suas respectivas porcentagens.

**Figure 8:** Compostos majoritários ( $\geq 2.0\%$ ) no óleo essencial de *Polygonum acre*





### 8.3 Determinação do teor de flavonóides totais

Através da triagem fitoquímica e da CCDC conduzida com os extratos de *P.acre*, foi possível identificar a presença de flavonóides nas partes aéreas da espécie em estudo. Diante desses resultados, empregou-se o método colorimétrico utilizando cloreto de alumínio ( $\text{AlCl}_3$ ) para determinação do teor de flavonoides nos extratos (FUNARI, *et al.*, 2006; MARQUES, *et al.*, 2011; OLIVEIRA, 2011)

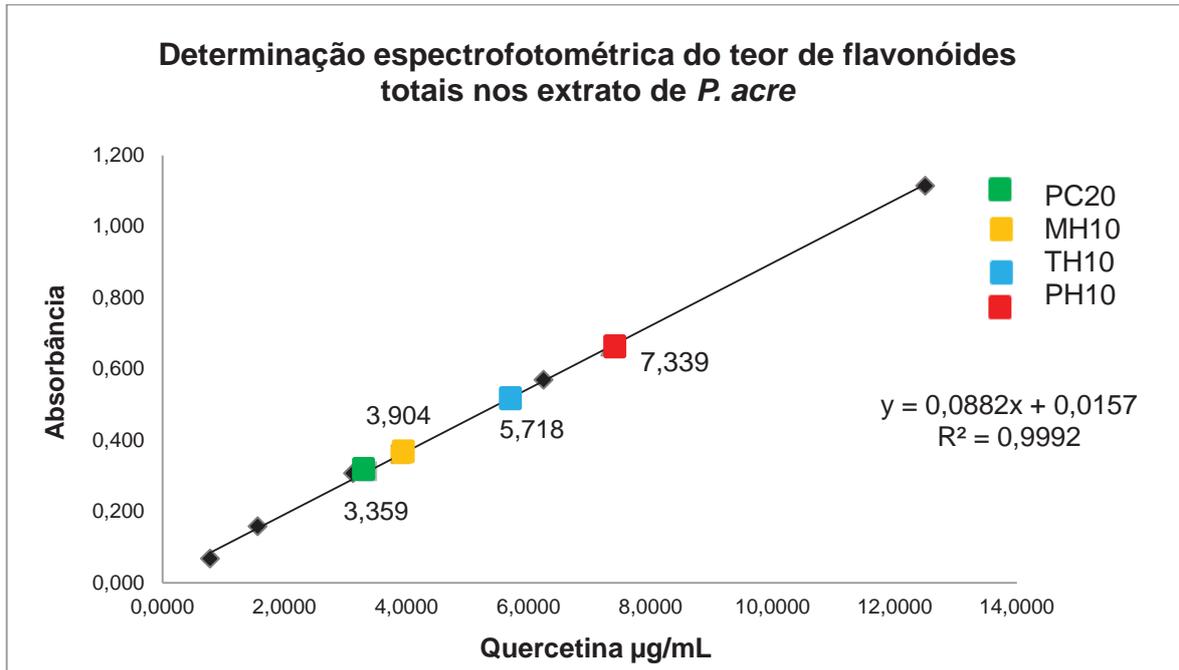
O cátion alumínio é capaz de formar complexos estáveis com os flavonoides em metanol, e dessa forma, ocorre na análise espectrofotométrica um desvio para maiores comprimentos de onda levando a intensificação da absorção. Dessa maneira, é possível determinar a quantidade de flavonóides, evitando-se a interferência de outras substâncias fenólicas, principalmente os ácidos fenólicos, que invariavelmente acompanham os flavonoides nos tecidos vegetais. A leitura é feita em espectrofotômetro a 425 nm, utilizando-se cloreto de alumínio a 2% em metanol. Nas condições citadas, o complexo flavonóide-Al é capaz de absorver luz em comprimento de onda bem maior do que o flavonóide na ausência agente complexante. É possível eliminar as interferências de outras substâncias fenólicas pois os ácidos fenólicos, mesmo os que se complexam com o  $\text{AlCl}_3$ , absorvem em comprimentos de onda

inferiores, evitando-se que haja interferências nas medidas de absorvância (WOISKY, 1996).

Apesar de bastante difundido, o uso de cloreto de alumínio na quantificação flavonóides totais não é um procedimento livre de limitações. Sabe-se que método é preciso, fornecendo desvios muito pequenos ou nulos entre um ensaio e outro com a mesma amostra. No entanto, ele pode ser pouco exato, ou seja, fornece valores que geralmente pode ser inferior em relação à quantidade de flavonoides totais realmente presente na amostra analisada (MARCUCCI, *et al.*, 2012).

O teor de flavonoides nos extratos analisados (PC20; PH10; MH10 e TH10) foi calculado com base na equação da reta obtida pela curva analítica padrão de quercetina e foram expressos em  $\mu\text{g}$  de flavonoides equivalentes à quercetina em 2 mg de extrato. A figura 9 ilustra os valores encontrados na curva.

**Figura 9:** Determinação espectrofotométrica do teor de flavonoides totais nos extratos de *P. acre*. Onde: PC20 (extrato obtido com material vegetal comercial por percolação a 20% com EtOH 70° GL); PH10 (Extrato obtido com material vegetal do horto por percolação a 10% com EtOH 70° GL); MH10 (Extrato obtido com material vegetal do horto por maceração a 10% com EtOH 70° GL); TH10 (Extrato obtido com material vegetal do horto por turbólise a 10% com EtOH 70° GL).



A tabela 6 apresenta a quantidade em µg de flavonóides equivalentes a quercetina, bem como o respectivo teor para cada uma das amostras.

**Tabela 6:** Teor de flavonoides totais expressos em quercetina nos extratos de *Polygonum acre*.

Amostras	µg de flavonoides equivalentes a quercetina em 2 mg de extrato	Teor de quercetina
PC20	3,359	1,6 %
MH10	3,904	1,9 %
TH10	5,718	2,8 %
PH10	7,339	3,7 %

Com este experimento foi possível observar que o método de extração influencia no teor de flavonóides totais presentes nos extratos, visto os extratos obtidos com a planta do horto foram preparados nas mesmas condições (mesmo solvente e mesma relação massa/volume na extração) e apresentaram teores distintos entre si, variando de 1,9 % na maceração a 3,7 % na técnica de percolação, o que nos leva a acreditar que a percolação seja método extrativo que proporciona maior teor de flavonóides nos extratos.

Quando comparamos o teor de flavonoides totais encontrado no extrato do material vegetal do horto com o extrato do material vegetal adquirido comercialmente, ambos obtidos por meio da técnica de percolação observamos que, mesmo o extrato do material comercial estando mais concentrado (20% de *P. acre*), ele apresentou um menor teor quando comparado ao extrato do material vegetal do horto (praticamente metade do valor). Tal fato nos leva a crer que o material vegetal adquirido comercialmente apresenta composição química diferente do material do horto, e que por ser comprado, não nos dá a garantia de serem da mesma espécie, além disso, as condições de cultivo podem ter sido diferentes (variação sazonal), assim como o modo de preparo e conservação da matéria prima vegetal. Isso mostra o quão perigoso é para a população fazer uso indiscriminado de plantas medicinais que não tenham boa procedência, além não promoverem os efeitos esperados podem até levar a toxicidade.

#### **8.4 Avaliação da atividade antioxidante utilizando radical livre DPPH•**

Vários métodos são utilizados para determinar a atividade antioxidante em extratos e substâncias isoladas; um dos mais usados

consiste em avaliar a atividade seqüestradora do radical livre 2,2- difenil-1-picril-hidrazila - DPPH•, de coloração púrpura que absorve a 515 nm. Por ação de um antioxidante (AH) ou uma espécie radicalar (R•), o DPPH• é reduzido formando difenil-picril-hidrazina, de coloração amarela, com conseqüente desaparecimento da absorção, podendo a mesma ser monitorada pelo decréscimo da absorbância. A partir dos resultados obtidos determina-se a porcentagem de atividade antioxidante ou seqüestradora de radicais livres e/ou a porcentagem de DPPH• remanescente no meio reacional. A porcentagem de atividade antioxidante (%AA) corresponde à quantidade de DDPH consumida pelo antioxidante, sendo que a quantidade de antioxidante necessária para decrescer a concentração inicial de DPPH em 50% é denominada concentração eficiente (CE50), também chamada de concentração inibitória (CI50). Quanto maior o consumo de DPPH por uma amostra, menor será a sua CE50 e maior a sua atividade antioxidante (SOUZA, et al., 2007).

Os compostos fenólicos presentes em plantas comestíveis e não comestíveis têm sido referidos por ter a capacidade de combater os radicais livres. A atividade antioxidante desses compostos se deve principalmente às suas propriedades redox, onde atuam com agentes de redução. Eles também possuem potencial de quelação, ou seja, de quelar metais. Compostos fenólicos, tais como os flavonóides, ácidos fenólicos, estilbenos, lignanas, lignina e taninos, são comum em folhas, tecidos de flores, talos e cascas. Eles têm sido recomendados para desempenhar um papel preventivo no desenvolvimento de canceres, doenças do coração, e doenças relacionadas com o envelhecimento (CHIN-YUAN, 2006).

Os resultados da triagem fitoquímica preliminar e da CCDC nos revelaram a presença de compostos fenólicos, tais como flavonóides e taninos nas partes aéreas e

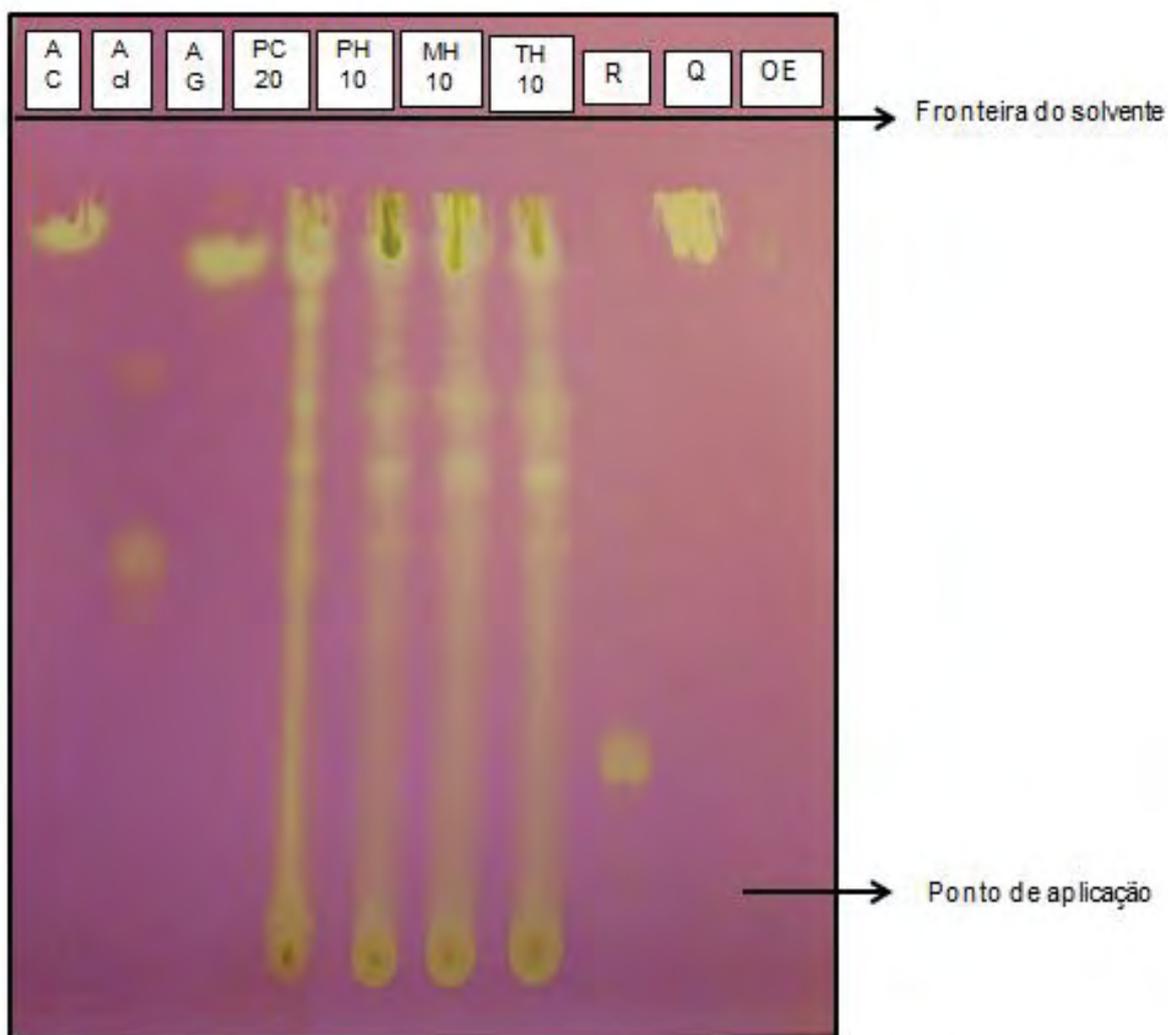
no extrato PC20 EtOH 70 de *P. acre*. No doseamento de flavonóides totais, o teor de flavonóides expressos em quercetina foi de 3,359 µg/2mg de extrato (1,6%). Sendo assim, é esperado que os extratos a serem analisados apresentem atividade antioxidante devido a presença desses compostos referidos como tendo a capacidade de combater os radicais livres.

#### **8.4.1 Avaliação qualitativa - Cromatografia em Camada Delgada Comparativa (CCDC)**

A avaliação preliminar qualitativa dos extratos por CCDC revelada com solução de DPPH• sugeriu a existência de substâncias com atividade antioxidante nos extratos obtidos a partir das partes aéreas de *P. acre* devido à presença de manchas amarelas contra o fundo violeta resultante da redução do radical DPPH•. O óleo essencial por sua vez apresentou uma mancha bem clara, quase que imperceptível, no entanto, o sistema de solventes utilizado por ser de característica mais polar, não é considerado ideal para eluir óleos essenciais. O ácido clorogênico apresentou mancha de baixa intensidade, no entanto sua concentração era a menor dentre os marcadores (0,5 mg/mL).

**Figura 10:** Cromatograma dos extratos e óleo essencial obtido a partir das partes aéreas de *Polygonum acre* e alguns marcadores revelado com solução de DPPH•. Onde: AC: ácido caféico; Acl: ácido clorogênico; AG: ácido gálico; R: rutina; Q: quercetina; OE: óleo essencial; PC20 (extrato obtido com material vegetal comercial por percolação a 20% com EtOH 70° GL); PH10 (Extrato obtido com material vegetal do horto por percolação a 10% com EtOH 70° GL); MH10 (Extrato obtido com material

vegetal do horto por maceração a 10% com EtOH 70° GL); TH10 (Extrato obtido com material vegetal do horto por turbólise a 10% com EtOH 70° GL).



#### 8.4.2 Avaliação quantitativa da atividade antioxidante pela captura do radical livre DPPH• (Avaliação *in vitro*)

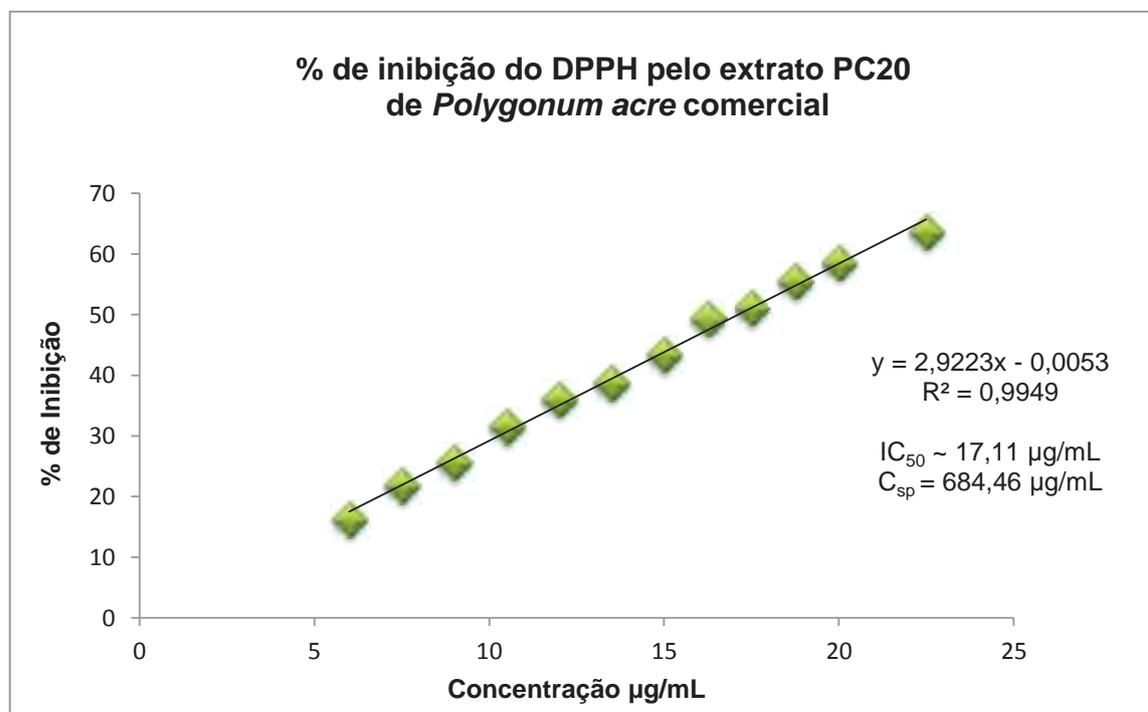
A capacidade de seqüestrar radicais livres em relação ao radical estável 2,2-difenil-1-picril hidrazil (DPPH) foi inicialmente escolhida por se tratar de uma

metodologia simples, rápida e sensível, muito conveniente para realização de “screening” de um grande número de amostras com diferentes polaridades (KOLEVA, et al., 2002).

#### 8.4.2.1 Avaliação da atividade antioxidante do extrato PC20

A capacidade do extrato PC20 de *P.acre* em sequestrar radicais livres foi expressa como concentração final do extrato necessária para inibir a oxidação do radical DPPH em 50%, os resultados podem ser observados na figura 11.

**Figura 11:** % de inibição do radical DPPH• pelo extrato PC20. Onde:  $IC_{50}$  = concentração capaz de inibir o radical DPPH• em 50% (concentração inibitória);  $C_{sm}$  = concentração na solução de partida.



O extrato PC20 de *P. acre* obtida comercialmente apresentou uma concentração inibitória do radical DPPH• em 50% (IC<sub>50</sub>) estimada em 17,11µg/mL.

As substâncias antioxidantes presentes nos extratos reagem com o DPPH que é um radical instável, e converte-o em 2,2-difenil-1-picril hidrazina de maior estabilidade. O potencial antioxidante do extrato é avaliado pelo grau de descoloração da solução contendo o radical DPPH, que de violeta pode chegar ao amarelo. Quanto mais baixo o valor da IC<sub>50</sub> maior é o poder do extrato em sequestrar radicais livres, ou seja, uma pequena quantidade de extrato é capaz de decrescer a concentração inicial do radical DPPH em 50%, ou seja, inibir a oxidação do radical em 50% (ROESLER, et al., 2007).

Chin-Yuan observou que o extrato etanólico (EtOH 50) de *Polygonum aviculare* obtido por turboextração a 25°C apresentou elevado poder antioxidante, seus resultados mostram que no ensaio utilizando o radical livre DPPH o valor da IC<sub>50</sub> foi de 50 µg/ml, os valores de IC<sub>50</sub> da catequina e do ácido ascórbico utilizados como controles positivos no estudo foram respectivamente 35 µg/ml e 50 µg/ml, indicando que o extrato de *P. aviculare* possui efeito inibitório significativo sobre o radical DPPH. Ainda em seu estudo, o autor observou que no ensaio com radical superóxido, a IC<sub>50</sub> foi de 8 µg/ml e no ensaio de peroxidação lipídica, a IC<sub>50</sub> foi de 16 µg/ml. Além disso, ele observou que o extrato de *Polygonum aviculare* exerce efeito protetor sobre a cisão das fitas de DNA (CHIN-YUAN, 2006).

Quando comparamos os resultados de CHIN-YUAN com o resultado da atividade antioxidante do presente estudo, observamos que a IC<sub>50</sub> de *P. acre* é bastante inferior, o que pode nos indicar que a mesma possui uma considerável atividade antioxidante frente ao radical DPPH, no entanto, devemos levar em consideração todas as variáveis envolvidas, as quais foram: espécies diferentes, polaridade do líquido extrator e

variação na metodologia, que apesar de utilizar o mesmo radical livre, variou nas quantidades do extrato e dos reagentes presentes no ensaio.

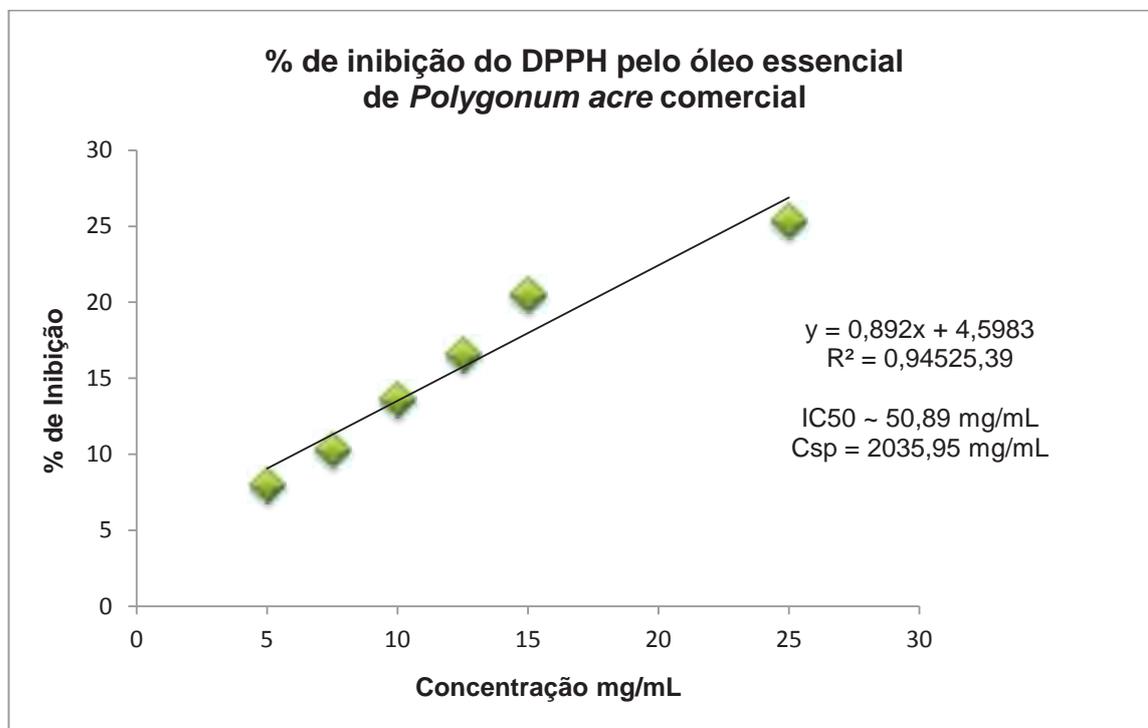
#### **8.4.2.2 Avaliação da atividade antioxidante do óleo essencial**

Devido à pequena quantidade de material disponível para análise não foi possível obter a  $IC_{50}$  nas concentrações analisadas, sendo assim, utilizamos a equação da reta obtida no experimento para calcular teoricamente o valor da concentração capaz de inibir o radical DPPH• em 50% ( $IC_{50}$ ).

Sendo assim, com base na equação da reta, o óleo essencial de *P. acre* obtida comercialmente apresentou uma concentração inibitória do radical DPPH• em 50% ( $IC_{50}$ ) estimada em 50,89 mg/mL, os resultados podem ser observados na figura 12.

O valor de  $IC_{50}$  encontrado para o óleo essencial é bastante elevado, mostrando que o mesmo não possui propriedades antioxidantes significativas.

**Figura 12:** % de inibição do radical DPPH• pelo óleo essencial de *Polygonum acre* obtida comercialmente.



## 8.5 Avaliação da atividade antifúngica

### 8.5.1 Teste para determinação da concentração inibitória mínima (CIM)

O ensaio para determinar a concentração inibitória mínima foi realizado com o objetivo de analisar a ação do extrato e do óleo essencial de *P. acre* sobre o crescimento celular.

A avaliação da atividade antifúngica do extrato PC20 e do óleo essencial de *P. acre* obtida comercialmente foi conduzida contra o fungo *Candida albicans* e o fármaco utilizado como controle positivo foi o antibiótico anfotericina. A tabela 7 apresenta os

valores de concentração inibitória mínima (CIM) expressas em  $\mu\text{g/mL}$  para o extrato e em % para o óleo essencial.

**Tabela 7:** Avaliação da atividade antifúngica do extrato PC20 e do óleo essencial de *Polygonum acre* obtida comercialmente.

Amostras	Concentração Inibitória Mínima (CIM)
Extrato PC20	250 $\mu\text{g/mL}$
Óleo essencial	50% (= 50 $\mu\text{L}$ )

Os resultados mostraram que o extrato PC20 apresentou CIM de 250  $\mu\text{g/mL}$  e o óleo essencial apresentou CIM de 50%, ou seja, 50 $\mu\text{L}$ .

De acordo com a literatura consultada, substâncias que apresentam valores de CIM  $\leq 75 \mu\text{g/mL}$  são consideradas fortemente ativas, CIM de 75,0 a 150  $\mu\text{g/mL}$  são consideradas moderadas, CIM de 150,0 a 250,0  $\mu\text{g/mL}$  são consideradas fracamente ativas e CIM  $> 250,0$  são consideradas inativas (SCORZONI, et al., 2007), e, portanto podemos dizer que o extrato PC20 EtOH70 foi inativo na inibição do crescimento do fungo analisado (*C. albicans*) pois apresentou valor de CIM acima do considerado ativo na literatura.

Com relação à CIM do óleo essencial, 50% de atividade é considerado um bom resultado por ser um óleo essencial bruto. Estudos de sinergismo entre o óleo essencial bruto e seus principais componentes poderia ser realizado a fim de obter % de CIM menores que a obtida e conseqüentemente, melhor atividade antifúngica.

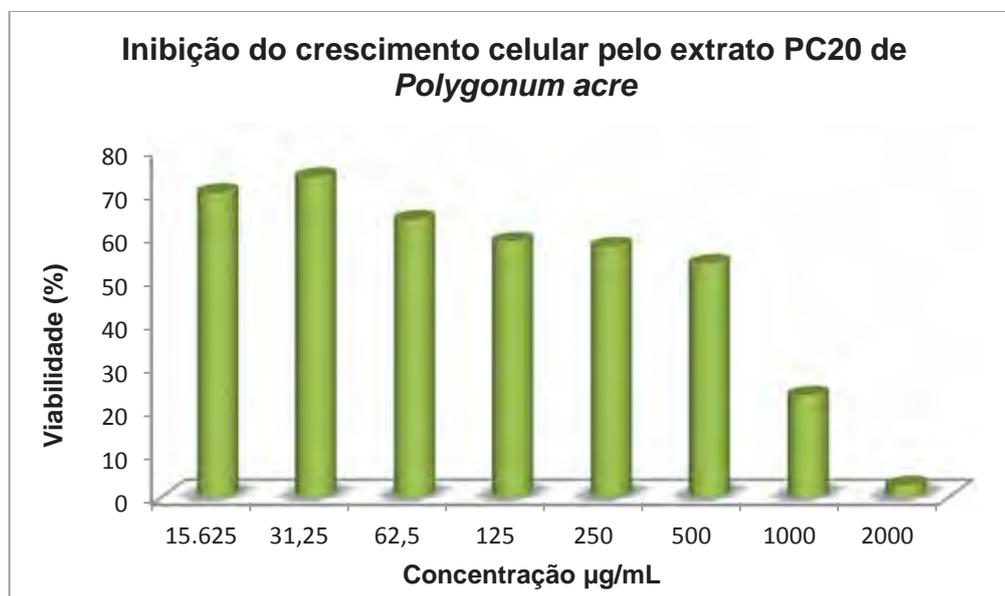
## 8.6 Avaliação da citotoxicidade

Citotoxicidade é um termo abrangente que significa, em linhas gerais, morte celular induzida. Está presente em todos os organismos multicelulares e unicelulares e em mamíferos a citotoxicidade pode ser causada pela atividade lítica direta de uma célula citotóxica (atividade fagocítica e receptores de morte, por exemplo) ou pela secreção de moléculas líticas solúveis (defensinas, componentes do sistema complemento, perforina/granzimas, por exemplo) (FIOCRUZ, 2012).

Os testes de citotoxicidade consistem em colocar o material em estudo direta ou indiretamente em contato com uma cultura de células de mamíferos, verificando-se após algum tempo as alterações celulares acarretadas. Essas alterações podem ser detectadas por diferentes mecanismos, dentre eles, a incorporação de corantes vitais ou a inibição da formação de colônias celulares (ROGERO, et al., 2003).

A figura 13 apresenta os resultados obtidos no teste de citotoxicidade, onde foi possível observar que o extrato PC20 de *Polygonum acre* obtida comercialmente apresentou redução de 50% de células ( $IC_{50}$ ) à partir da concentração 1000  $\mu\text{g/mL}$ , as concentrações inferiores apresentaram porcentagem de viabilidade celular superiores a 50 ( $IC_{50}$ ). Os resultados podem ser observados na figura 13.

**Figura 13:** Citotoxicidade do extrato PC20 de *Polygonum acre*.



Até o momento, existem poucos dados na literatura referentes à citotoxicidade dos extratos das espécies do gênero *Polygonum*. Em 2009, SOFIATI observou que o extrato etanólico (EtOH 70) de *Polygonum acre* apresentou citotoxicidade a partir da concentração de 100 µg/mL, no entanto o ensaio foi realizado com células de fibroblastos e com material vegetal nativo do Horto de Plantas Medicinais da Unesp de Araraquara.

Qader et al., observaram que os extratos aquoso e etanólico de *Polygonum minus* quando testados frente a uma linhagem celular normal de fibroblastos de pulmão humano (Hs888Lu) em placas de 96 poços não apresentaram citotoxicidade na dose 500 µg/mL, visto que a viabilidade celular do extrato aquoso foi de 80% e do extrato etanólico de 100% (QADER, et al., 2011).

Mohammad et al., observaram os efeitos do extrato metanólico de *Polygonum avicular* sobre a viabilidade de células de câncer cervical (linhagem Hela-S). O extrato

apresentou citotoxicidade dose e tempo-dependentes, e o  $IC_{50}$  variou de 270 a 410  $\mu\text{g/mL}$ , no estudo também foi observado que o extrato metanólico foi capaz de induzir apoptose nessas células cancerígenas (MOHAMMAD, et al., 2011).

Hasan e Rahman observaram que o extrato etanólico (obtido por maceração) de *Polygonum hydropiper* apresentou evidente atividade citotóxica contra uma espécie de camarão de água salgada (brine shrimps nauplii) sendo a  $IC_{50} = 35,46 \mu\text{g/mL}$  (HASAN e RAHMAN, 2011).

Em relação ao valor de citotoxicidade encontrado no presente estudo para o extrato PC20 ( $IC_{50} = 1000 \mu\text{g/mL}$ ) de *Polygonum acre*, podemos sugerir segurança na sua utilização para atividade antioxidante e antifúngica, visto que nestes ensaios, as concentrações ativas foram inferiores a concentração na  $IC_{50}$  da avaliação de citotoxicidade. No ensaio de atividade antifúngica contra *Candida albicans*, a concentração inibitória mínima foi de 250  $\mu\text{g/mL}$  e no ensaio de atividade antioxidante a concentração do extrato na  $IC_{50}$  foi de 17,11  $\mu\text{g/mL}$ .

## **8.7 Ensaios Farmacológicos**

Os ensaios farmacológicos foram realizados com o extrato rotaevaporado (consistência de mel espesso) PC20 de *P.acre* obtida comercialmente. Os resultados estão expressos a seguir.

### **8.7.1 Edema de pata induzido por carragenina**

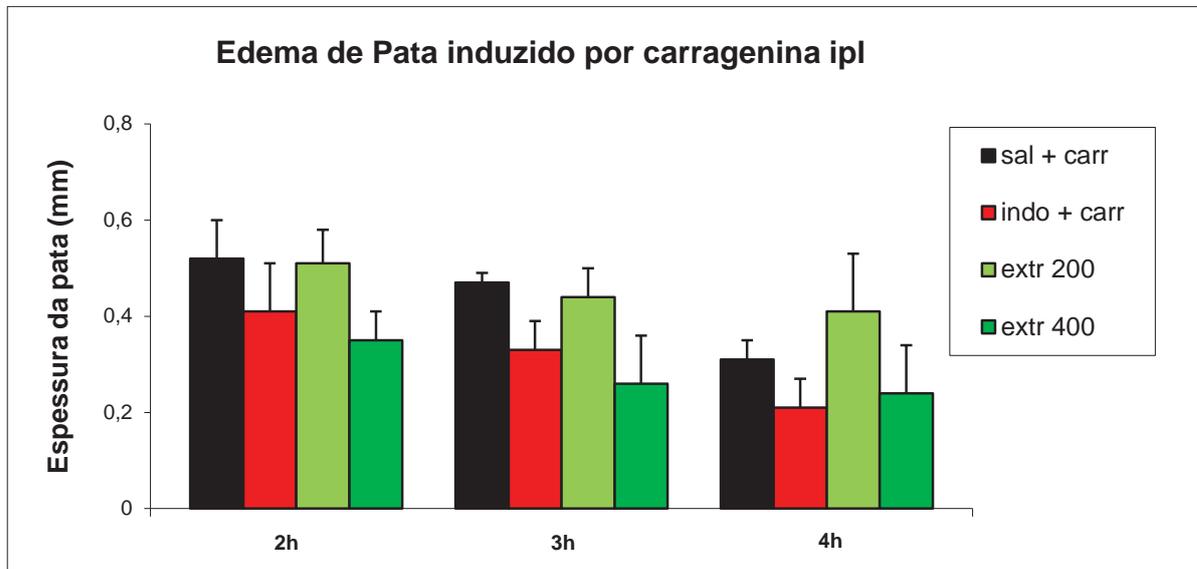
Neste ensaio foram avaliados os efeitos do extrato PC20 nas doses de 200 e 400

mg/Kg administrados por via oral, sobre a resposta inflamatória induzida por carragenina 200 µg/0,1 mL via intra-plantar. Os resultados deste experimento foram expressos como aumento do volume da pata em mm após 2, 3 e 4 horas após a injeção da carragenina, e estão demonstrados na tabela 8.

**Tabela 8:** Efeito anti-inflamatório do extrato hidroalcoólico de *Polygonum acre* sobre o edema de pata induzido por carragenina (n = 6). Indometacina (30 mg/Kg) foi o fármaco de referência.

		<b>2 horas</b>	<b>3 horas</b>	<b>4 horas</b>
<b>Grupo</b>	<b>Dose</b>	Média ± D.P.	Média ± D.P.	Média ± D.P.
<b>Controle</b>	-	0,52 ± 0,08	0,47 ± 0,02	0,31 ± 0,04
<b>Indometacina</b>	<b>30 mg/Kg</b>	0,41 ± 0,10	0,33 ± 0,06	0,21 ± 0,06
<b>Extrato</b>	<b>200 mg/Kg</b>	0,51 ± 0,07	0,44 ± 0,06	0,41 ± 0,12
<b>Extrato</b>	<b>400 mg/Kg</b>	0,35 ± 0,06	0,26 ± 0,10	0,24 ± 0,10

**Figura 14:** Efeito anti-inflamatório do extrato hidroalcoólico de *Polygonum acre* sobre o edema de pata induzido por carragenina (n = 6). Indometacina (30 mg/Kg) foi o fármaco de referência.



Os resultados (tabela 8) do presente estudo demonstraram que o extrato hidroalcoólico à 20% de *Polygonum acre* não apresentaram inibição do edema de pata induzido por carragenina (atividade anti-inflamatória), estatisticamente significante, nas doses de 200 e 400 mg/Kg, pois após análise de variância (ANOVA) considerando significância de 5% obtivemos  $P > 0,05$ , para os extratos e indometacina, em relação aos controles.

No entanto, os resultados demonstram uma tendência na redução desses efeitos, pois o extrato 400 mg/kg produziu efeito antiinflamatório mais eficiente que a indometacina nos tempos de 2 e 3 horas após a indução da inflamação.

O edema de pata induzido por carragenina, em ratos, é um modelo de inflamação aguda freqüentemente utilizado para o estudo de atividade anti-inflamatória, uma vez que a carragenina aplicada é responsável pela liberação de mediadores de inflamação tais como histamina e serotonina e, posteriormente, prostaglandinas e bradicinina (DI ROSA, 1972; VINEGAR et al., 1969).

### 8.7.2 Contorções abdominais induzidas por ácido acético

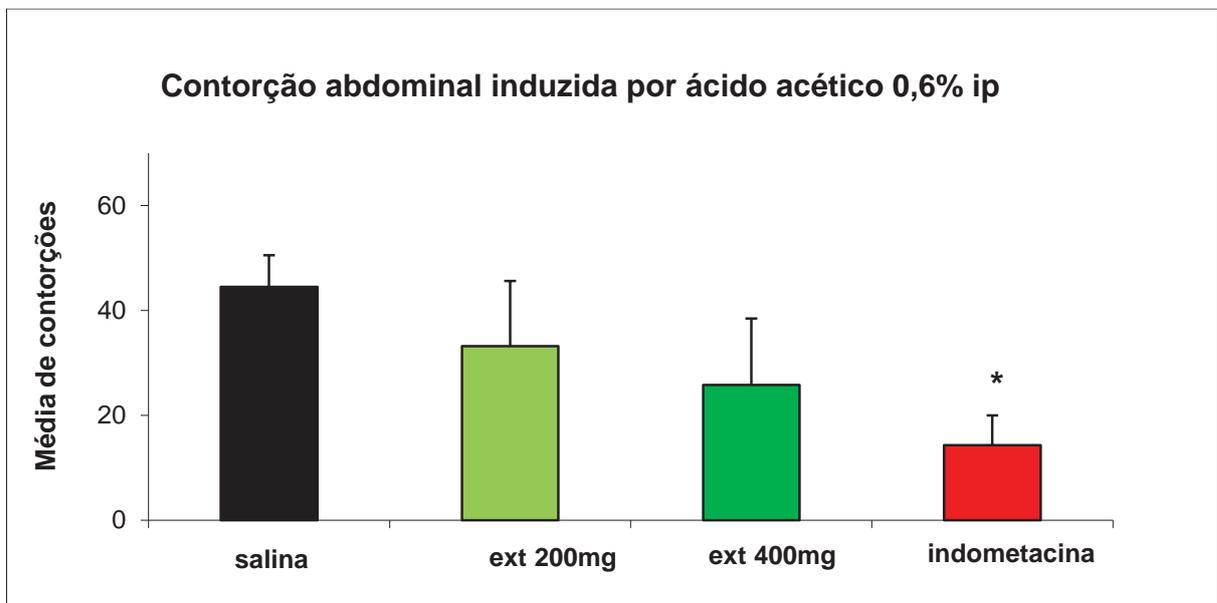
Neste ensaio foram avaliados os efeitos do extrato PC20 nas doses de 200 e 400 mg/Kg administrados por via oral, sobre o número de contorções abdominais induzidas por ácido acético 0,6%. Os resultados deste experimento foram expressos como a média do número de contorções realizadas durante um intervalo de tempo de 0 a 20 minutos, e estão demonstrados na tabela 9.

**Tabela 9:** Atividade analgésica do extrato hidroalcocólico de *Polygonum acre* sobre o número de contorções abdominais induzido por ácido acético 0,6% (n = 6). Indometacina (30 mg/Kg) foi o fármaco de referência.

	<b>Controle</b>	<b>Indometacina</b>	<b>Extrato</b>	<b>Extrato</b>
<b>Dose</b>	-	<b>30 mg/Kg</b>	<b>200 mg/Kg</b>	<b>400 mg/Kg</b>
<b>Média ± D.P</b>	44,5 ± 6,037	14,33 ± 5,67	33,16 ± 12,43	25,83 ± 12,65

**Figura 15:** Efeito analgésico do extrato de *Polygonum acre* sobre o número de contorções abdominais induzidas por ácido acético (0,6%) em camundongos (n = 6).

\*P < 0,05 em relação ao controle.



Estatisticamente, os resultados (tabela 9) da inibição no número de contorções induzidas por ácido acético não foram significativos (figura 15) para o extrato nas doses de 200 e 400 mg/Kg, pois após análise de variância (ANOVA), considerando significância de 5%, obtivemos  $P > 0,05$ , em relação ao controles.

Neste caso, porém, a indometacina inibiu 67,7% das contorções em relação ao controle. O extrato na dose de 400 mg/k, inibiu 41,95%.

O teste de contorções abdominais em camundongos, por sua vez, é um modelo utilizado para verificação de efeito analgésico. O ácido acético utilizado produz aumento dos níveis de prostaglandinas E2 e F2alfa no fluido peritoneal (DUARTE et al., 1988), além de promover liberação de serotonina, histamina, prostaglandinas, bradicinina e substância P (COLLIER et al., 1968), o que gera dor no processo inflamatório.

De acordo com a porcentagem de contorções inibidas pelo extrato, nas duas doses utilizadas, encontra-se a intensidade de analgesia produzida. No entanto, em nossos experimentos, a dose utilizada dos extratos, não produziu analgesia significativa, comparada ao controle.

## 9. CONCLUSÕES

- De acordo com os resultados obtidos na triagem fitoquímica e nas cromatografias em camada delgada comparativa, podemos concluir a presença de saponinas, flavonóides e taninos, que podem ser os responsáveis pela ação farmacológica do extrato etanólico a 20% de *P. acre*.
- Os perfis cromatográficos do extrato obtido comercialmente e dos extratos obtidos no horto se apresentaram composição química diferentes.
- Com relação aos óleos essenciais, o perfil do óleo da planta comercial e da planta do horto foram semelhantes. Os resultados da análise de CG-EM do óleo essencial da planta comprada possibilitou a identificação de 28 compostos, que representando 61,5 % da composição total do óleo essencial, sendo os componentes majoritários foram: longiborneol, caryophyllene, elemene, selina-11-em-4 $\alpha$ -ol e *E*- $\beta$ -farnesene.
- O teor de flavonóides totais expresso em quercetina foi de 0,16% para o extrato percolado obtido da planta comercial, e de 0,19%, 0,28% e 0,36% para os extratos obtidos da planta do horto pelos métodos extrativos de maceração, turbólise e percolação respectivamente.
- A avaliação preliminar da atividade antioxidante dos extratos por CCDC revelada com solução de DPPH• sugeriu a existência de substâncias com atividade antioxidante no extrato das partes aéreas de *P. acre* obtida comercialmente, sendo a concentração inibitória do radical DPPH• em 50% (IC<sub>50</sub>) de 17,11 $\mu$ g/mL. O óleo essencial de *P. acre*

obtida comercialmente apresentou uma concentração inibitória do radical DPPH• em 50% (IC<sub>50</sub>) de 50,89 mg/mL.

- No teste de citotoxicidade, foi possível observar que o extrato liofilizado de *Polygonum acre* obtida comercialmente apresentou redução de 50% de células (IC<sub>50</sub>) à partir da concentração 1000 µg/mL.
- A avaliação da atividade antifúngica contra *Candida albicans*, os resultados mostraram que o extrato PC20 apresentou CIM de 250 µg/mL e o óleo essencial apresentou CIM de 50%, ou seja, 50µL.
- Estatisticamente, os resultados da inibição do edema de pata e inibição no número de contorções abdominais induzidas por carragenina e ácido acético, respectivamente, não foram significativos nas doses de 200 e 400 mg/Kg, no entanto, observamos uma tendência relevante a ser considerada.

## 10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS, R. P. **Identification of Essential Oils Componentes by Gas Chromatography/Quadrupole Mass Spectroscopy**. Allured Publishing Corporation, Carol Stream, Illinois, USA, 1995.

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

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

BARROSO, G. M. **Sistemática de angiospermas do Brasil**. São Paulo: EDUSP, v. 1, 1978.

BERGAMASCHI, K.B.; **Capacidade antioxidante e composição química de resíduos vegetais visando seu aproveitamento**. 2010. 92 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2010.

BIESKI, I.G.C. **Plantas medicinais e aromáticas no sistema único de saúde da região sul de Cuiabá-MT**. 2005. 92f. Monografia (Especialista em Plantas Mecedinais) – Departamento de agricultura, Universidade Federal de Lavras, Lavras 2005.

BRASIL. Decreto nº 5.813, de 22 de junho de 2006. Aprova a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos e dá outras providências. 2006.

BRUNETON J.; **Elementos de Fitoquímica y de Farmacognosia**, Ed. Acribia, AS: Espanha, 1991.

CALIXTO, J. B. Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicine (phytoterapeutic agents). **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 33, n. 2, p. 179-189, 2000.

CALIXTO, J. B. Medicamentos fitoterápicos. In: YUNES, R.A.; CALIXTO, J.B. **Plantas medicinais sob a ótica da química medicinal moderna**. Chapecó: Argos, p.297- 315, 2001.

CAMARGO, E.E.S. **Diagnóstico dos programas de plantas medicinais e medicamentos fitoterápicos, visando subsidiar a distribuição no sistema único de saúde**. 2010. 223 f. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2010.

CHIARADIA, M.C.; COLLINS, C.H.; JARDIM, I,C,S.F. O estado da arte da cromatografia associada à espectrometria de massas acoplada à espectrometria de

massas na análise de compostos tóxicos em alimentos. **Quim. Nova**, v. 31, n. 3, p. 623-636, 2008.

CHIN-YUAN HSU. Antioxidant activity of extract from *Polygonum aviculare* L. **Biol. Res.**, n. 39, p. 281-288, 2006.

CIALDELLA, A.M. e BRANDBYGE, J. Polygonaceae. In R. Spichiger & L. Ramella (eds.) **Flora del Paraguay. Conservatoire et Jardin Botaniques de la ville de Genève & Missouri Botanical Garden**. Saint Louis, vol. 33, p. 1-106, 2001.

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

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

COSTA, A. F. **Farmacognosia**. 5. ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 1995.

CROVETTO, M. R. **Estudios Etnobotânicos II. Nombres de plantas y su utilidad segun los indios tobas del este del Chaco**. Bonplandia 4, 270–333, 1965.

CUENDET, M.; HOSTETTMANN, K.; POTTERAT, O. Iridoid glucosides with free radical scavenging properties from *Fagraea blumei*. **Helv. Chim. Acta**, v.80, p. 1144–1152, 1997.

DI ROSA, M. Biological properties of carrageenin. **Journal Pharmacy. Pharmacology**, v.24, p.89 – 102, 1972.

DUARTE, I. D. G.; NAKAMURA, M.; FERREIRA, S. H. Participation of the sympathetic system in acetic acid induced writhing in mice. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.21, p.341 – 3, 1988.

ECHEVERRI, F.; LUIS, JG.; TORRES, F.; QUINONES, W.; ALZATE, F.; CARDONA, G.; ARCHBOLD, R.; ROLDAN, J.; IAHLOU, E-H. Danilol, a new drimane sesquiterpene from *Polygonum punctatum* leaves. **Natural Product Letters**, v. 10, p. 295-301, 1997.

ENGLER, A. **Syllabus der Pflanzenfossilien**. Borntraeger, Berlin, 2nd ed., 666 pp., 1964.

FARMACOPEIA DOS ESTADOS UNIDOS DO BRASIL, 2 ed, São Paulo: Atheneu, 1959.

FRACASSO, J. F.; NUNES-DE-SOUZA, R. L.; TEIXEIRA, C. E.; CASTRO, R. C.; LEPERA, E. Z. P.; SILVA, R. F. P. Effect of dipyrone, L-NAME and L-arginine on endotoxin-induced rat paw edema. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.29,p.1543-1548, 1996.

FUKUYAMA, Y.; SATO, T.; ASAKAWA, Y.; TAKEMOTO, T. A potent cytotoxic warburganal and related drimane-type sesquiterpenoids from *Polygonum hidropriper*. **Phytochemistry**, v. 21, n. 12, p. 2895-2898, 1982.

FUNARI, C.S.; FERRO, V.O. Análise de própolis. **Rev. Ciênc. Tecnol. Aliment.**, Campinas, 26(1): 171-178, 2006.

GIORDANI, R.B.; PAGLIOSA, L.B.; HENRIQUES, A.T.; ZUANAZZI, J.A.S. Investigação do potencial antioxidante e anticolinesterásico de *Hippeastrum* (AMARYLLIDACEAE). **Rev. Quim. Nova**, v.31, n.8, p 2042-2046, 2008.

GUERRA, P. M.; NODARI, O. R. Biodiversidade: aspectos biológicos, geográficos, legais e éticos. In: SIMÕES, M. O. et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 3. ed. Porto Alegre: UFRGS; Florianópolis: UFSC, p.15, 2001.

GORZALCZANY, S.; ACEVEDO, C.; MUSCHIETI, L.; MARTINO, V.; FERRARO, G. Search for antiinflammatory activity in Argentine Medicinal Plants. **Phytomedicine**, v. III (2), p. 181-184, 1996.

GULLO, F.P. **Antifúngicos naturais e sintéticos: estudo dos mecanismos de ação em sistemas de infecção *in vitro* empregando cepas de *Cryptococcus***. 2012. 144 f. Dissertação de Mestrado. Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2012.

HARAGUCHI, H.; OHMI, I.; SAKAI, S.; FUKUDA, A. Effect of *Polygonum hydropriper* sulfated flavonoids on lens aldose reductase and related enzymes. **Journal of Natural Products**, v. 59, n. 4, p. 443-445, 1996.

HASAN, M.F.; RAHMAN, M.M.; Screening of antibacterial, antifungal and cytotoxic activities of *Polygonum hydropriper* L. stem extracts. **Int. J. Biosci**, v. 1 n. 6, p. 47-53, 2011.

HOLETZ, F.B.; UEDA-NAKAMURA, T.; FILHO, B.P.D.; CORTEZ, D.A.G.; MELLO, J.C.P.; NAKAMURA, C.V. In: Effect of plant extracts used in folk medicine on cell growth and differentiation of *Herpetomonas samuelpeessoai* (Kinetoplastida, Trypanosomatidae) cultivated in defined medium. **Acta Scientiarum**, v. 24, p. 657-662, 2002.

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

JOACHIMOVITS, R. Estudo Farmacológico da ação anti-hemorrágica do *Polygonum acre* H.B.K. **Med. Cir.Farm.**, Rio de Janeiro, v.278, p.216-234, 1959.

JOULAIN, D.; KOENING, W. **The Atlas of Spectral Data of Sesquiterpene Hydrocarbons**. Hamburg Verlag, Hamburg, 1998.

KOLEVA, I. I.; BEEK, T. A.; LINSSEN, A.; EVSTATIEVA, L. N. Screening of Plant Extracts for Antioxidant Activity: a Comparative Study of Three Testing Methods. **Phytochemical Analysis**, v. 13, n. 1, p. 8-17, 2002.

KOSTER, R.; ANDERSON, M.; DE BEER, E. J. Acetic acid for analgesic screening. **Fed. Proc.**, v. 18, p. 412, 1959.

KOTT, V.; BARBINI, L.; CRUAÑES, M.; MUÑOZ, J.D.; VIVOT, E.; CRUAÑES, J.; MARTINO, V.; FERRARO, G.; CAVALLARO, L.; CAMPOS, R. Antiviral activity in Argentine medicinal plants. **Journal of Ethnopharmacology**, n. 64, p 79-84, 1999.

LEWIS, W.H.; ELVIS-LEWIS, M.P. **Medical Botany**. John Wiley and Sons, New York, 1977.

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

LIMA, S.S.; TAVARES, E.S.; MOREIRA D.L.; LEITÃO, G.G.; ESQUIBEL, M.A. Anatomia de folha e caule e quantificação espectrofotométrica de fenóis totais e taninos da erva-de-bicho (*Polygonum acre* Kunth var. *aquatile* Meisn.) **Revista Brasil. Bot.**, v.32, n.2, p.339-348, 2009.

LIMA, S.S.; MOREIRA, D.L.; AFFONSO, V.R.; HENRIQUES, A.B.; SATO, A.; ESQUIBEL, M.A. LEITAO, G.G.; LAGE, C.L.S. Micropropagation of *Polygonum acre* Kunth var. *aquatile* (Mart) Meins, and seasonal variation of tannins in acclimatized plants. **J. Med. Plant. Res.**, v. 4, n. 7, pp. 573-578, 2010.

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

LOPES, D.E.S.; OLIVEIRA, V.D.C.; MACEDO, J.F.; OLIVEIRA, A.B.; JACOME, R.L.R.P. Anatomia e histoquímica dos órgãos vegetativos de *Polygonum Hydropiperoides* Michx., Polygonaceae. **Rev. Bras. Farmacogn.** v. 19, n. 3, p. 677-685, 2009.

LOPEZ, S.N.; SIERRA, M.G.; GATUSO, S.J.; FURLAN, R.L. ZACCHINO, S.A. An unusual homoisoflavanone and a structurally-related dihydrochalcone from *Polygonum ferrugineum* (Polygoaceae). **Phytochemistry**, n. 67, p. 2152–2158, 2006.

LOPEZ, S.N.; FURLAN, R.L.E.; ZACCHINO, S.A. Detection of antifungal compounds in *Polygonum ferrugineum* Wedd. extracts by bioassay-guided fractionation. Some evidences of their mode of action. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 138, p. 633–636, 2011.

- LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas**. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2002.
- MARQUES, G. S.; MONTEIRO, R.P.M.; LEÃO, W.F.; LYRA, M.A.M.; PEIXOTO, M.S.; ROLIM-NETO, P.J.; XAVIER, H.S.; SOARES, L.A.L. Avaliação de procedimentos para quantificação espectrofotométrica de flavonoides totais em folhas de *Bauhinia forficata* LINK. **Quim. Nova**, v. 15, n. 00, p. 1-6, 2011.
- MEISNER, C.F. Polygonaceae. In **Flora Brasiliensis** (C.F.P. Martius & A.G. Eichler, eds.). v.5, Parte I, p.18-19, 1855.
- MELLO, J. C. P.; PETROVICK, P. R. Quality control of *Baccharis trimera* (Less.) DC. (Asteraceae) hydroalcoholic extracts. **Acta Farm. Bonaer.**, v. 19, n. 3, p. 211-215, 2000.
- MELO, E.; O gênero *Polygonum* L. (Polygonaceae) no estado da Bahia, Brasil. **Sitientibus**, Feira de Santana, n.14, p. 45-55, 1996.
- MELO, E. Flora da serra do cipó, Minas Gerais: Polygonaceae. **Bol. Bot. Univ. São Paulo**, n. 26(2), p. 165-174, 2008.
- MOHAMMAD R.; HOSSEIN, B.; DAVOOD, F.; FARNAZ, T.; ALI, F.; YUSEF, R.; The apoptotic and cytotoxic effects of *Polygonum avicular* extract on Hela-S cervical cancer cell line. **Afr. J. Biochem. Res.**, v. 5, p. 373-378, 2011.
- MORGAN, R. **Plantas medicinais**. São Paulo: Hemus, 555 p., 1984.
- NAKAEMA, N. M. K.; FRACASSO, J. F.; LONGO, M. C. SIQUEIRA, C. E.; GODÓI, P. H. B.; RODRIGUES, L.A. Efeito do tratamento com algumas vitaminas B na potencialização do efeito antiinflamatório e antinociceptivo do diclofenaco e da talidomida. **Rev. Ciênc. Farm. Básica Apl.**, v. 26, n. 3, p. 189-193, 2005.
- O'BRIEN, J.; WILSON, I.; ORTON, T. et al. Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. **European Journal of Biochemistry**, v. 267, p. 5421-5426, 2000.
- OHNO, Y.; MIYAJIMA, A.; SUNOUCHI, M. Alternative methods for mechanistic studies in toxicology. Screening of hepatotoxicity of pesticides using freshly isolated and primary cultured hepatocytes and non-liver-derived cells, SIRC cells. **Toxicology Letters**, v. 102-103, p. 569-573, 1998.
- OLIVEIRA, J.R.S. **Caracterização de extratos de cajá-manga (*Spondias dulcis* PARKINSON) potencialmente ativos e seguros para obtenção de fitocosmético antioxidante**. 2001. 212 f. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2011.

PELLISSARI, G. P. **Estudo farmacognóstico e avaliação das atividades antibacteriana e imunomoduladora de *Melampodium divaricatum* (RICH. IN PERS.) DC.(Asteraceae)**. 2008. 178f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2008.

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

PETERSON, J.; DWYER, J. Flavonoids: Dietary occurrence and biochemical activity. **Nutrition Research**, v. 18, n. 12, p. 1995-2018, 1998.

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

PRANCE, G. T. **Floristic inventory of the tropics: where do we stand?**. Ann. Missouri Bot. Gard., [S.l.], v.64., p. 559-684, 1977.

QADER, S.W.; ABDULLA, M.A.; CHUA, L.S.; NAJIM, N.; ZAIN, M.M.; HAMDAN, S. Antioxidant, Total Phenolic Content and Cytotoxicity Evaluation on Selected Malaysian Plants. **Molecule**, v. 16, p. 3433-3443, 2011.

RATES, S.M.K. Promoção do uso racional de fitoterápicos: uma abordagem no ensino de farmacognosia. **Rev. Bras. Farmacognosia**, v. 11, p. 57-69, 2001.

ROESLER, R.; MALTA, L.G.; CARRASCO, L.C.; HOLANDA, R.B.; SOUZA, C.A.S.; PASTORE, G.M. Atividade antioxidante de frutas do cerrado. **Rev. Ciênc. Tecnol. Aliment.**, v. 27, n.1, p. 53-60, 2007.

RODRIGUES, L. A.; FRACASSO, J. F.; SIQUEIRA, C. E. Potencialização do efeito antiinflamatório e antinociceptivo do diclofenaco e da nimesulida por vitaminas do complexo B. **Rev. Ciênc. Farm. Básica Apl.** v.28, n. 1, p. 45-49, 2007.

ROGERO, S.O.; LUGÃO, A.B.; IKEDA, T.I.; CRUZ, A.S. Teste in vitro de Citotoxicidade: Estudo Comparativo entre Duas Metodologias. **Materials Research**, v. 6, n. 3, p. 317 – 320, 2003.

SANTOS S.C.; MELLO J.P.C. Taninos. In: SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMAN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5a ed., Porto Alegre: Editora da UFRGS/Editora da UFSC, p. 577-614, 2004.

a) SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; PETROVICK, P. R. Produtos de origem vegetal e o desenvolvimento de medicamentos. In: SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMAN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5a ed., Porto Alegre: Editora da UFRGS/Editora da UFSC, p. 577-614, 2004.

b) SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; ATHAYDE, M.L. Saponinas. In: SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMAN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5a ed., Porto Alegre: Editora da UFRGS/Editora da UFSC, p. 577-614, 2004.

SCORZONI, L.; BENADUCCI, T.; ALMEIDA, A.M.F.; SILVA, D.H.S.; BOLZANI, V.S.; MENDES-GIANNINI, M.J.S. Comparative study of disk diffusion and microdilution methods for evaluation of antifungal activity of natural compounds against medical yeasts *Candida* spp and *Cryptococcus* sp. **Rev. Ciênc. Farm. Básica Apl.**, v. 28, n.1, p.25-34, 2007.

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

SIMOES, C.M.O. RIBEIRO-DO-VALE, R.M., POLI, A., NICOLAU, M. & ZANIN, M. The pharmacologic action of extracts of *Polygonum punctatum* Elliot. **Journal de Pharmacie de Belgique**. v. 44, n.4 p.275-284, 1989.

SOFIATI, F.T. **Estudo fitoquímico e atividades biológicas preliminares de extratos de *Polygonum acre* H.B.K. (Polygonaceae) e *Synadenium carinatum* BOISS (Euphorbiaceae)**. 2009. 110f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2009.

SOUZA, C.M.M.; SILVA, H.R.; VIEIRA-JR, G.M.; AYRES, M.C.C.; COSTA, C.L.S.; ARAÚJO, D.S.; CAVALCANTE, L.C.D.; BARROS, E.D.S.; ARAÚJO, P.B.M.; BRANDÃO, M.S.; CHAVES, M.H. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. **Quim. Nova**, Vol. 30, No. 2, 351-355, 2007.

SVETAZ, L.; ZULJAN, F.; DERITA, M.; PETENATTI, E.; TAMAYO, G.; CÁCERES, A.; FILHO, V.C.; GIMÉNEZ, A.; PINZON, R.; ZACCHINO, S.A.; GUPTA, M. Value of the ethnomedical information for the discovery of plants with antifungal properties. A survey among seven Latin American countries. **Journal of Ethnopharmacology**, n. 127, p. 137–158, 2010.

TAKAHASHI, Y.; KOIKE, M.; HONDA, H. et al. Development of the short time exposure (STE) test: An in vitro eye irritation test using SIRC cells. **Toxicology in Vitro**, v. 22, p. 760-770, 2008.

TEIXEIRA, A. H.; DALOSTO, C.; BOLASSEL, C. CHAGAS, A. M.; BORTOLUZZI, M, A. P. JUNCHEM, W. R. C. Efeito protetor do *Polygonum acre* H.B.K. sobre as hemorragias artificiais em camundongos. **Saúde**, v. 15, p. 105-116, 1989.

TESKE, M.; TRENTINI, A.M.M. **Compêndio de fitoterapia**. Curitiba: Herbarium Laboratório Botânico, 317 p., 1996.

VEIGA-JR., V. F.; PINTO, A. C.; MACIEL, M. A. M. Plantas medicinais: cura segura? **Quim. Nova**, v. 28, n. 3, p. 519-528, 2005.

VINEGAR, R.; SCHREIBER, W.; HUGO, R. Biphasic development of carrageenin edema in rats. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v.166, p.96 – 103, 1969.

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

WASICKY, R. Uma modificação do aparelho de Clevenger para extração de óleos essenciais. **Rev. Fac. Farm. Bioquím.**, São Paulo, v. 1, p. 7-81, 1963.

WILEY REGISTRY 8th Edition with NIST 05 MS Spectra, Revision 2005 D.06.00, Agilent Technologies 2007.

WOISKY, R.G. **Métodos de controle químico de amostras de própolis**. Tese de Mestrado apresentada à faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP, para obtenção do grau de Mestre em Fármacos e Medicamentos, 74 pp, 1998.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Quality control methods for medicinal plants materials**. Geneva, 1998.

XIAO, K; XUAN, L.; XU, Y.; BAI, D. Stilbene glycoside sulfates from *Polygonum cuspidatum*. **J. Nat. Prod.**, v.63, n.10, p.1373-1376, 2000.

YAGI, A.; UEMURA, T.; OKAMURA, N.; HARAGUCHI, H.; IMOTO, T., HASHIMOTO, K. Antioxidative sulphated flavonoids in leaves of *Polygonum hidropiper*. **Phytochemistry**, v.35, n.4, p.885-888, 1994.

ZACCHINO, S.; SANTECCHIA, C.; LOPEZ, S.; CATTUSO, S.; MUFIOZ, J.D.; CRUAFIES, A.; VIVOT, E.; CRUAFIES, M.C.; SALINA, A.; RUIZ, R.E.; RUIZ, S. *In vitro* antifungal evaluation and studies on mode of action of eight selected species from the Argentine flora. **Phytomedicine**, v. 5, n. 5, p. 389-395, 1998.

ZUANAZZI, J.A.S.; MONTANHA, J.A. Flavonóides. In: SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMAN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5a ed., Porto Alegre: Editora da UFRGS/Editora da UFSC, p. 577-614, 2004.

## 10.1 Referências Digitais

Guia de consultas botânica II. Facultad de Ciencias Exatas Y Naturales Y Agrimensura (UNNE). **CARYOPHYLLIDAE – Polygonaceae.** Disponível em: <http://www.biologia.edu.ar/diversidadv/fascIII/12.%20Polygonaceae.pdf>, acesso 20/09/2012 às 10:39.

MARCUCCI, M.C.; WOISKY, R.G.; SALATINO, A. **Uso de cloreto de alumínio na quantificação de flavonoides em amostras de própolis.** Faculdade de Farmácia da Universidade Bandeirante de São Paulo. Disponível em: <http://www.apacame.org.br/mensagemdoce/46/artigo.htm>, acesso em 18/09/2012.

FIOCRUZ - PONS, A.H.; PINTO, L.M.O. **Citotoxicidade.** Instituto Oswaldo Cruz, Fiocruz, 21045-900, Rio de Janeiro, RJ, Brasil Disponível em: <http://www.fiocruz.br/chagas/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?sid=166>, acesso 18/09/2012 as 08:49.

RENISUS (2009) **Relação Nacional de Plantas Mediciniais de Interesse ao SUS - 71 espécies vegetais.** Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/RENISUS.pdf>, acesso: 29/09/11, 19:42.





**Anexo 3. Protocolo do Comitê de Ética em Pesquisas**

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

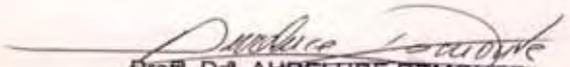
Protocolo CEP/FCF/CAr nº 33/2009  
Interessado: BEATRIZ FERREIRA MENES  
Orientador: Profa. Dra. Raquel Regina Duarte Moreira  
Co-orientador: Prof. Dr. José Francisco Fracasso  
Projeto: Avaliação da atividade farmacológica de extrato hidroalcoólico de *Polygonum acre* (Erva-de-bicho)

**Parecer nº 19/2010 – Comitê de Ética em Pesquisa**

O Comitê de Ética em Pesquisa desta Faculdade, considerou o protocolo para uso de animais na pesquisa "Avaliação da atividade farmacológica de extrato hidroalcoólico de *Polygonum acre* (Erva-de-bicho)", estruturado dentro dos princípios éticos na experimentação animal do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal – COBEA, manifestando-se FAVORÁVEL à sua execução.

O relatório final do protocolo de pesquisa, com no máximo três folhas (espaço 1,5 e letra 12) deverá ser entregue em agosto de 2011.

Araraquara, 21 de junho de 2010.

  
Prof.ª Dr.ª AURELUCE DEMONTE  
Coordenadora do CEP



#### Anexo 4. Protocolo de Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisas

Protocolo CEUA/FCF/CAr nº 33/2009

Pesquisador: BEATRIZ FERREIRA MENES

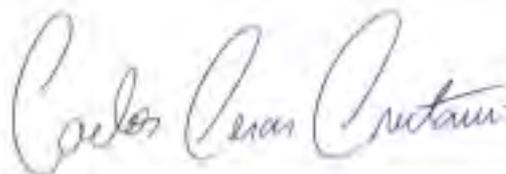
Orientador: Pro<sup>fa</sup>Dr<sup>a</sup> Raquel Regina Duarte Moreira

Projeto: Avaliação da atividade farmacológica de extrato hidroalcoólico de *Polygonum acre* (Erva-de-bicho).

#### Parecer nº 44/2012 – Comissão de Ética no Uso de Animais

A Comissão de Ética no Uso de Animais desta Faculdade, reunida em 15 de agosto de 2012, analisou o relatório final do protocolo para uso de animais na pesquisa: "Avaliação da atividade farmacológica de extrato hidroalcoólico de *Polygonum acre* (Erva-de-bicho)", apresentado pela acadêmica Beatriz Ferreira Menes, sob orientação da Pro<sup>fa</sup>Dr<sup>a</sup> Raquel Regina Duarte Moreira, do Departamento de Princípios Ativos Naturais e Toxicologia desta Faculdade, esta estruturado dentro dos princípios éticos na experimentação animal do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal - CONCEA, manifestando-se FAVORÁVEL à sua execução.

Araraquara, 16 de agosto de 2012.



Prof.Dr. CARLOS CESAR CRESTANI  
Coordenador da CEUA