

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA FILHO”

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**ESTUDOS FARMACOGNÓSTICOS E AVALIAÇÃO DE ATIVIDADES  
BIOLÓGICAS DE EXTRATOS OBTIDOS DAS CASCAS PULVERIZADAS DE  
*Endopleura uchi* (HUBER) CUATREC. (HUMIRIACEAE)**

Mestrando: Flávio Augusto Sanches Politi

Orientadora: Profa. Dra. Rosemeire C. L. R. Pietro

Co-Orientadora: Profa. Dra. Raquel Regina Duarte Moreira

ARARAQUARA – SP

2009

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA FILHO”  
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**ESTUDOS FARMACOGNÓSTICOS E AVALIAÇÃO DE ATIVIDADES  
BIOLÓGICAS DE EXTRATOS OBTIDOS DAS CASCAS PULVERIZADAS DE  
*Endopleura uchi* (HUBER) CUATREC. (HUMIRIACEAE)**

FLÁVIO AUGUSTO SANCHES POLITI

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de Pesquisa e Desenvolvimento de Fármacos e Medicamentos, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, como parte dos requisitos para obtenção do Título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Mestrando: Flávio Augusto Sanches Politi

Orientadora: Profa. Dra. Rosemeire C. L. R. Pietro

Co-Orientadora: Profa. Dra. Raquel Regina Duarte Moreira

ARARAQUARA – SP

2009

## Ficha Catalográfica

Elaborada pelo Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação  
Faculdade de Ciências Farmacêuticas  
UNESP – Campus de Araraquara

Politi, Flávio Augusto Sanches

P769e            Estudos farmacognósticos e avaliação de atividades biológicas de extratos obtidos das cascas pulverizadas de *Endopleura uchi* (Huber) Cuatrec. / Flávio Augusto Sanches Politi. – Araraquara, 2009. 143 f.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista. “Júlio de Mesquita Filho”. Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas

Orientador: Rosemeire Cristina Linhari Rodrigues Pietro

Co-orientador: Raquel Regina Duarte Moreira

1. *Endopleura uchi*. 2. Estudos farmacognósticos. 3. Atividades biológicas. 4. *uchi-amarelo*. I. Pietro, Rosemeire C. L. Rodrigues, orient. II. Moreira, Raquel Regina Duarte, co-orient. III. Título.

**CAPES: 40300005**

*“A mente que se abre  
a uma nova idéia  
jamais voltará ao seu  
tamanho original”*

*(Albert Einstein)*

*Ao meu saudoso pai,  
José Américo Polítí e à  
minha querida mãe,  
Delcí Aparecida  
Sanchez Polítí*

## AGRADECIMENTOS

- ❖ *Ao meu pai José Américo Politi, ausente materialmente, mas pela força do amor, presente constantemente em minha vida, tendo sido responsável direto pela formação do meu caráter, ensinando-me os valores de Honestidade, Humanidade e Humildade*
- ❖ *À minha mãe Delci Aparecida Sanches Politi, que me deu a Vida e, enquanto pôde, depositou-me todo o carinho, preocupação e amor*
- ❖ *À Profa. Dra. Rosemeire C. L. R. Pietro pela orientação exemplar, sempre disposta a colaborar, com empenho incansável e exemplo de profissionalismo, tendo acreditado e me incentivado desde o princípio, sendo a grande responsável pelo meu crescimento e desenvolvimento intelectual*
- ❖ *À Profa. Dra. Raquel R. D. Moreira, não só pela co-orientação, mas também pela amizade e pela oportunidade dada no início do trabalho, "abrindo-me as portas" para uma área de estudos totalmente nova e fascinante*
- ❖ *Ao Prof. Dr. Luís Vítor S. Sacramento, pela amizade e pela ajuda primorosa em diversos momentos*
- ❖ *À Profa. Dra. Hérica R. N. Salgado, pelo incentivo e pelas cobranças, além das informações e sugestões dadas, não só no momento da defesa, mas também ao longo de todo o curso*
- ❖ *À Profa. Dra. Elfriede M. Bacchi e à Profa. Dra. Taís M. Baub, pelas sugestões e dicas dadas por ocasião da qualificação, bem como pelas palavras de incentivo*

- ❖ *À Profa. Dra. Niece A. J. C. Furtado, pela valiosa presença na minha defesa, bem como por suas palavras de apoio e sugestionamentos muito bem assimilados*
- ❖ *Ao Prof. Dr. João C. P. de Mello, por ter fornecido o reagente para execução do doseamento de taninos totais*
- ❖ *Ao técnico do Laboratório de Farmacognosia, Luís Eduardo, por estar sempre disposto a colaborar*
- ❖ *Aos técnicos do Laboratório de Química Farmacêutica, Osmar e Matheus, por terem me ajudado e disponibilizado equipamentos em diversos momentos*
- ❖ *Aos meus colegas de Laboratório, Émerson, Tatiana, Filipe, Elzira, Natália, Lara, Carol, Henrique, Ana Paula e Renata, pela amizade e boa convivência*
- ❖ *Aos amigos Ademir, Marcelo, Silviane, Ketelyn e Andréia pela ajuda em diversos momentos*
- ❖ *Aos funcionários da Biblioteca, Ana, Irani, Sônia e Moacir, e às funcionárias da Secretaria de Pós Graduação da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Cláudia, Sônia e Laura*
- ❖ *À CNPQ pela bolsa concedida*

# SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	1
<b>2. REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	6
2.1. <i>Endopleura uchi</i> (Huber) Cuatrec. (Humiriaceae) .....	6
2.2. Constituição fitoquímica .....	8
2.3. Taninos.....	9
2.4. Processos extrativos .....	12
2.5. Atividade antibacteriana e toxicidade .....	15
2.6. Microrganismos utilizados .....	19
<b>3. OBJETIVOS</b> .....	23
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	24
<b>4.1. MATERIAL</b> .....	24
4.1.1. Solventes, reagentes e meios de cultura.....	24
4.1.2. Equipamentos e utensílios .....	26
4.1.3.1. Cascas de <i>Endopleura uchi</i> pulverizadas adquiridas da empresa “Sítio da Mata” .....	28
4.1.3.2. Cascas <i>in natura</i> (secas) de <i>Endopleura uchi</i> adquiridas no Mercado Municipal “Ver-o-Peso” (Belém, PA) .....	28
4.1.4. Cepas padrão .....	29
4.1.5. Células de mamíferos.....	29
<b>4.2. METODOLOGIAS</b> .....	29
<b>4.2.1. ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS</b> .....	29
4.2.1.1. Granulometria.....	29
4.2.1.2. Determinação do pH.....	30
4.2.1.3. Determinação da densidade aparente não compactada .....	30
4.2.1.4. Determinação do teor de cinzas totais .....	31
4.2.1.5. Determinação da perda por dessecação em balança com infravermelho (INFRA TEST).....	31
4.2.1.6. Perda por dessecação em estufa .....	32
4.2.1.7. Determinação do teor de extrativos para a droga .....	32

<b>4.2.2. ANÁLISES MICROSCÓPICAS</b> .....	33
4.2.2.1. Análise microscópica comparativa das amostras pulverizadas com as amostras <i>in natura</i> (secas) de cascas de <i>E. uchi</i> .....	33
4.2.2.2. Montagem de lâminas com material pulverizado de <i>E. uchi</i> adquirido da empresa “Sítio-da-Mata” .....	33
4.2.2.3. Inclusão em historresina do material vegetal adquirido do Mercado Municipal “Ver-o-Peso” (Belém, PA) .....	34
4.2.2.4. Pesquisa histoquímica para compostos fenólicos .....	35
<b>4.2.3. ANÁLISES FITOQUÍMICAS</b> .....	35
4.2.3.1. Triagem fitoquímica das classes de metabólitos secundários.....	35
4.2.3.1.1. Flavonóides .....	36
4.2.3.1.1.1. Reações de caracterização de flavonóides .....	36
4.2.3.1.2. Antraquinonas .....	37
4.2.3.1.2.1. Antraquinonas livres .....	37
4.2.3.1.2.2. Glicosídeos antraquinônicos (reação de Borntraeger) .....	37
4.2.3.1.2.3. Glicosídeos Cardiotônicos.....	38
4.2.3.1.3. Reações de caracterização de glicosídeos cardiotônicos .....	38
4.2.3.1.3.1. Reação com anel lactônico insaturado.....	38
4.2.3.1.3.2. Reação com desoxi-açúcares .....	39
4.2.3.1.4. Taninos.....	40
4.2.3.1.4.1. Testes de identificação de taninos .....	40
4.2.3.1.5. Saponinas .....	41
4.2.3.1.6. Alcalóides .....	41
4.2.3.1.7. Cumarinas .....	41
4.2.3.2. Perfil cromatográfico.....	42
4.2.3.3. Perfil espectrofotométrico na região de luz ultravioleta .....	43
4.2.3.4. Obtenção e rendimento dos extratos.....	43
4.2.3.4.1. Obtenção de extratos por percolação.....	45
4.2.3.4.2. Obtenção dos extratos por maceração.....	46
4.2.3.4.3. Obtenção dos extratos por turbo-extração .....	46
4.2.3.4.4. Obtenção dos extratos por decocção .....	47
4.2.3.4.5. Obtenção dos extratos por infusão.....	47

<b>4.2.4. ANÁLISE QUANTITATIVA</b> .....	48
4.2.4.1 Determinação do teor de fenóis totais .....	48
4.2.4.1.1. Preparo da solução padrão de ácido tânico .....	48
4.2.4.1.2. Preparo das soluções de amostra .....	49
4.2.4.1.3. Cálculo do teor de fenóis totais .....	49
4.2.4.2. Doseamento de taninos totais em extratos vegetais .....	50
4.2.5. Determinação da capacidade de seqüestro de radicais livres.....	52
<b>4.2.6. DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA</b> .....	53
4.2.6.1. Preparo dos antibióticos .....	53
4.2.6.2. Solução estoque de extrato .....	53
4.2.6.3. Preparo da suspensão de bactéria.....	54
4.2.6.4. Preparo da suspensão de levedura.....	54
4.2.6.5. Teste de difusão em ágar com templates.....	54
4.2.6.6. Teste de difusão em ágar com discos de papel .....	55
4.2.6.7. Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) através do método de diluição em microplaca e concentração bactericida mínima (CBM) .....	56
<b>4.2.7. TESTE DE TOXICIDADE ORAL AGUDA EM CAMUNDONGOS</b> .....	58
<b>4.2.8. TESTE DA MOTILIDADE INTESTINAL EM CAMUNDONGOS</b> .....	58
<b>4.2.9. AVALIAÇÃO DE CITOTOXICIDADE</b> .....	59
4.2.9.1. Preparo das amostras .....	59
4.2.9.2. Avaliação da citotoxicidade dos extratos.....	60
<b>4.2.10. ANÁLISE ESTATÍSTICA</b> .....	62
<b>5. RESULTADOS</b> .....	63
<b>5.1. ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS</b> .....	63
5.1.1. Granulometria.....	63
5.1.2. Determinação do pH.....	64
5.1.3. Determinação da densidade aparente não compactada .....	65
5.1.4. Determinação do teor de cinzas totais .....	65
5.1.5. Determinação da perda por dessecação em balança com infravermelho...66	

5.1.6. Determinação da perda por dessecação em estufa .....	67
5.1.7. Determinação do teor de extrativos para a droga .....	67
<b>5.2. ANÁLISES MICROSCÓPICAS.....</b>	<b>68</b>
5.2.1. Análise microscópica comparativa das amostras pulverizadas de cascas de <i>Endopleura uchi</i> com amostras de cascas <i>in natura</i> (secas) .....	68
5.2.2. Pesquisa histoquímica para compostos fenólicos .....	70
<b>5.3. ANÁLISES FITOQUÍMICAS.....</b>	<b>71</b>
5.3.1. Triagem fitoquímica das principais classes de metabólitos secundários.....	71
5.3.2. Perfil cromatográfico.....	72
5.3.3. Perfil espectrofotométrico na região de luz ultravioleta .....	77
5.3.4. Obtenção e rendimento dos extratos .....	79
<b>5.4. ANÁLISES QUANTITATIVAS .....</b>	<b>79</b>
5.4.1. Determinação do teor de fenóis totais.....	79
5.4.2. Doseamento de taninos totais em extratos vegetais.....	82
5.4.3. Determinação da capacidade de sequestro de radicais livres.....	84
<b>5.5. DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA .....</b>	<b>86</b>
5.5.1. Teste de difusão em ágar.....	86
5.5.2. Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) através do método de diluição em microplaca e concentração bactericida mínima (CBM) .....	91
<b>5.6. TESTE DE TOXICIDADE ORAL AGUDA EM CAMUNDONGOS .....</b>	<b>92</b>
<b>5.7. TESTE DA MOTILIDADE INTESTINAL EM CAMUNDONGOS .....</b>	<b>92</b>
<b>5.8. AVALIAÇÃO DE CITOTOXICIDADE .....</b>	<b>93</b>
<b>6. DISCUSSÃO .....</b>	<b>95</b>
<b>7. CONCLUSÕES .....</b>	<b>108</b>
<b>8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>110</b>
<b>9. ANEXOS .....</b>	<b>124</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1. <i>Endopleura uchi</i> (Huber) Cuatrec. A) Vista panorâmica da espécie; B) Fotografia de uma tora do caule.....	6
FIGURA 2. <i>Endopleura uchi</i> (Huber) Cuatrec. A) Casca do caule <i>in natura</i> ; B) Cascas pulverizadas, embaladas em pacotes para comercialização em mercados, férias livres e farmácias magistrais .....	7
FIGURA 3. Fluxograma de obtenção e rendimento dos extratos de <i>Endopleura uchi</i> a 5% (m/v) .....	44
FIGURA 4. Fluxograma de obtenção e rendimento dos extratos de <i>Endopleura uchi</i> a 10% (m/v) .....	44
FIGURA 5. Fluxograma de obtenção e rendimento dos extratos de <i>Endopleura uchi</i> a 20% (m/v) .....	45
FIGURA 6. Esquema da microplaca utilizada para determinação da concentração inibitória mínima para bactérias.....	57
FIGURA 7. Representação esquemática da avaliação de citotoxicidade de extratos vegetais de <i>E. uchi</i> em microplaca de 96 poços.....	61
FIGURA 8. Tamanho médio da partícula das cascas pulverizadas de <i>Endopleura uchi</i> .....	64
FIGURA 9. Secções anatômicas de cascas <i>in natura</i> secas de <i>Endopleura uchi</i> (Huber) Cuatrec. (Humiriaceae). A) Secção longitudinal radial, submetida ao reagente azul de toluidina, evidenciando a disposição anatômica estrutural. A seta indica células parenquimáticas preenchidas por material fenólico, corado mais intensamente. A ponta de seta indica idioblastos cristalíferos dispostos ao longo do esclerênquima. B) Secção longitudinal radial, submetida ao reagente cloreto férrico 10%, evidenciando a presença de material fenólico no tecido parenquimático.....	69

FIGURA 10. Microscopia do pó da casca de <i>Endopleura uchi</i> (Huber) Cuatrec. (Humiriaceae) submetida ao reagente azul de toluidina. Ga – grão de amido; Ic – idioblastos cristalíferos; Cp – célula pétreia; Fg – fibra gelatinosa.....	70
FIGURA 11. Secções anatômicas de cascas <i>in natura</i> secas de <i>Endopleura uchi</i> (Huber) Cuatrec. (Humiriaceae). A) Secção longitudinal radial evidenciando os principais tecidos formadores, bem como os idioblastos cristalíferos abundantes dispostos ao longo do esclerênquima (ponta de seta). As esclereides mostram-se acompanhadas de conteúdo fenólico, corado intensamente (seta); B) Visualização do resultado da reação com FeCl <sub>3</sub> 10% (m/v), evidenciando os depósitos de compostos fenólicos (seta) no interior das esclereides .....	71
FIGURA 12. Cromatograma das frações acetato de etila do extrato decocção 20% (m/v) obtidos das cascas pulverizadas de <i>Endopleura uchi</i> .....	74
FIGURA 13. Cromatograma dos seguintes extratos de <i>E. uchi</i> : decocção a 5, 10 e 20% (m/v) (D5, D10 e D20); infusão a 5, 10 e 20% (m/v) (I5, I10 e I20); maceração a 5, 10 e 20% (m/v) (M5, M10 e M20); percolação a 5, 10 e 20% (m/v) (P5, P10 e P20) e turbo-extração a 5, 10 e 20% (m/v) (T5, T10 e T20). Sistema eluente: acetato de etila:ácido fórmico:água (9:5:1 v/v/v).; revelador: cloreto férrico 2% em metanol .....	76
FIGURA 14. Perfil espectrofotométrico, na região de luz ultravioleta, de ácido gálico (linha azul) e ácido tânico (linha preta) .....	78
FIGURA 15. Perfil espectrofotométrico, na região de UV (190-400 nm), dos seguintes extratos de cascas pulverizadas de <i>Endopleura uchi</i> : linha preta – decocção 20% (m/v); linha azul – infusão 10% (m/v); linha vermelha – maceração 5% (m/v); linha rosa – percolação 10% (m/v); linha amarela – turbo-extração 20% (m/v).....	78
FIGURA 16. Curva analítica de absorvância da solução de ácido tânico .....	80
FIGURA 17. Teor de fenóis totais dos extratos de cascas pulverizadas de <i>Endopleura uchi</i> (Huber) Cuatrec. (Humiriaceae) .....	82

FIGURA 18. Teor de taninos totais dos extratos de cascas pulverizadas de <i>Endopleura uchi</i> (Huber) Cuatrec. (Humiriaceae) .....	84
FIGURA 19. Atividade anti-radicalar percentual das substâncias padrão e dos extratos estudados na concentração de 250 µg/mL. (1) ácido gálico; (2) rutina; (3) vitamina C; (4) extrato de <i>Ginkgo biloba</i> ; (5) decocção 20% (m/v); (6) infusão 10% (m/v); (7) maceração 5% (m/v); (8) percolação 10% (m/v); (9) turbo-extração 20% (m/v) .....	86
FIGURA 20. A) Avaliação da atividade antimicrobiana pelo método de difusão em ágar com template dos extratos de <i>E. uchi</i> contra <i>Candida albicans</i> ; B) Avaliação da atividade antimicrobiana pelo método de difusão em ágar com template dos extratos de <i>E. uchi</i> contra <i>E. coli</i> . Anf: anfotericina B; Amp: ampicilina; D20: decocção 20% (m/v); I10: infusão 10% (m/v); M5: maceração 5% (m/v); P10: percolação 10% (m/v); T20: turbo-extração 20% (m/v) .....	90
FIGURA 21. A) Avaliação da atividade antimicrobiana pelo método de difusão em ágar com discos dos extratos de <i>E. uchi</i> contra <i>Candida albicans</i> ; B) Avaliação da atividade antimicrobiana pelo método de difusão em ágar com discos dos extratos de <i>E. uchi</i> contra <i>S. aureus</i> . Anf: anfotericina B; Amp: ampicilina; D20: decocção 20% (m/v); I10: infusão 10% (m/v); M5: maceração 5% (m/v); P10: percolação 10% (m/v); T20: turbo-extração 20% (m/v).....	90
FIGURA 22. Determinação de CIM pelo método de microdiluição em microplaca contra <i>Staphylococcus aureus</i> .....	92
FIGURA 23. Representação dos resultados de citotoxicidade dos extratos obtidos de cascas pulverizadas de <i>E. uchi</i> .....	94

## ÍNDICE DE TABELAS

TABELA 1. Cepas de bactérias e levedura utilizadas no projeto .....	29
TABELA 2. Porcentagens cumulativas de passagem e de retenção do pó das cascas pulverizadas de <i>Endopleura uchi</i> (Huber) Cuatrec. (Humiriaceae) .....	63
TABELA 3. Média dos valores de pH do pó das cascas pulverizadas de <i>Endopleura uchi</i> (Huber) Cuatrec. e pH da água destilada utilizada .....	64
TABELA 4. Densidade aparente de três amostras de cascas pulverizadas de <i>E. uchi</i> , obtidas comercialmente .....	65
TABELA 5. Teor de cinzas totais de cascas pulverizadas de <i>E. uchi</i> .....	65
TABELA 6. Decréscimo de massa das amostras iniciais do pó das cascas pulverizadas de <i>Endopleura uchi</i> (Huber) Cuatrec.....	66
TABELA 7. Decréscimo de massa das amostras iniciais do pó das cascas pulverizadas de <i>Endopleura uchi</i> (Huber) Cuatrec.....	67
TABELA 8. Análise fitoquímica das cascas pulverizadas de <i>Endopleura uchi</i> (Huber) Cuatrec. (Humiriaceae) .....	72
TABELA 9. Fator de retenção das manchas apresentadas no cromatograma da figura 12 .....	75
TABELA 10. Fator de retenção das manchas apresentadas no cromatograma da figura 13 .....	77
TABELA 11. Valores de rendimento em porcentagem (%) dos extratos obtidos a partir de cascas pulverizadas de <i>E. uchi</i> (Huber) Cuatrec. ....	79
TABELA 12. Valores dos teores de fenóis totais (TFT) dos extratos de <i>E. uchi</i> ...	61
TABELA 13. Valores de teores de extrativos (TE) e taninos totais (TT) para cada um dos extratos obtidos a partir de cascas pulverizadas de <i>E. uchi</i> .....	83

TABELA 14. Atividade anti-radicalar percentual das substâncias padrão e dos extratos estudados na concentração de 250 µg/mL.....	85
TABELA 15. Diâmetro dos halos (mm) de diferentes extratos de cascas de <i>E. uchi</i> pelo teste de difusão em ágar com templates.....	88
TABELA 16. Diâmetro dos halos (mm) de diferentes extratos de cascas de <i>E. uchi</i> pelo teste de difusão em ágar com discos .....	89
TABELA 17. Distância percorrida pelo carvão ativo no intestino dos camundongos após a administração do extrato aquoso das cascas pulverizadas de <i>Endopleura uchi</i> e da solução fisiológica controle .....	93
TABELA 18. Avaliação da citotoxicidade de extratos de cascas pulverizadas de <i>E. uchi</i> frente a células da córnea de coelhos da linhagem SIRC CCL-60 .....	94

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

Aa: Absorvância da amostra

Ad: Absorvância da solução de DPPH

ATCC: *American Type Culture Collection*

BHI: Brain-heart infusion

BM: Banho-maria

CC: Cepa clínica

CCDC: Cromatografia em camada delgada comparativa

CLSI: *Clinical and Laboratory Standards Institute*

D<sub>ap</sub>: Densidade aparente

DMSO: Dimetilsulfóxido

DP: Desvio padrão

DPPH: 2,2-difenil-1-picrilhidrazila

EtOH 50%: Etanol 50%

FD: Fator de diluição

GMA: Glicol metacrilato

M<sub>pc</sub>: Massa da proveta cheia

M<sub>pv</sub>: Massa da proveta vazia

NCCLS: *National Committee for Clinical Laboratory Standards*

PNA: Polifenóis não adsorventes

PT: Polifenóis totais

TE: Teor de extrativos

TT: Taninos totais

USP: *United States Pharmacopeia*

UV: Ultra-violeta

$V_p$ : Volume da proveta

## RESUMO

O desenvolvimento de agentes antimicrobianos eficazes e seguros para combater infecções bacterianas revolucionou o tratamento médico nos últimos 60 anos. Entretanto, aliado à própria evolução dos organismos, o uso indiscriminado dos antibióticos selecionou espécies extremamente resistentes aos agentes químicos utilizados. Como uma tentativa de contornar tal situação e ampliar o arsenal de compostos ativos contra microrganismos patogênicos, o estudo de plantas tornou-se crescente no cenário científico. Para utilizarmos os fitoterápicos na prevenção e/ou cura de doenças são necessários estudos prévios relativos a aspectos botânicos, farmacognósticos, fitoquímicos, farmacológicos e toxicológicos. Neste trabalho, foram estudados extratos obtidos com as cascas pulverizadas de *Endopleura uchi* (Huber) Cuatrec., quanto aos aspectos farmacognósticos, propriedades antimicrobianas frente a diversas linhagens bacterianas e uma levedura, e a citotoxicidade contra células de mamíferos. Nossos resultados mostraram que quanto ao rendimento, o melhor extrato foi obtido com a percolação 20% (m/v) e, quanto ao teor de taninos totais, o melhor extrato foi obtido com a percolação 10% (m/v). Nenhum dos extratos utilizados apresentou efetividade na inibição do crescimento para a os microrganismos testados. A exceção ocorreu para *Staphylococcus aureus*, no qual os extratos apresentaram baixa atividade. Quanto à citotoxicidade, todos os extratos analisados apresentaram IC<sub>50</sub> maior que a maior concentração aplicada (2 mg/mL).

## ABSTRACT

The development of effective and safe antimicrobial agents to combat microbial infections revolutionized the medical treatment in the last 60 years. However, together to the self evolution of the organisms, the indiscriminate use of the antibiotics selected extremely resistant species to chemical agents used. As an attempt of to avoid this situation and to enlarge the arsenal of active compounds against pathogenic microorganisms, the study of plants has been growing in the scientific scenary. For the use of phytotherapics in the prevention and/or cure of diseases are necessary previous studies relative to botanical, pharmacognostics, phytochemical, pharmacological and toxicological aspects. In this work, were studied extracts obtained with the powdered barks of *Endopleura uchi* (Huber) Cuatrec., for their pharmacognostic aspects, antimicrobial properties against to several bacterial strains and a yeast, and the cytotoxicity against mammals cells. Our results showed that, related to yield, the best extract was obtained with the percolation 20% (w/v) and, related to total tannins teor, the best extract was obtained with the percolation 10% (w/v). None of the used extracts presented inhibition of the growth to the most analyzed microorganisms. The exception occurred against the *Staphylococcus aureus* strain, in which the extracts presented a low activity. All analyzed extracts for cytotoxicity presented  $IC_{50}$  higher than the higher applied concentration (2 mg/mL).

# 1. INTRODUÇÃO

O conhecimento sobre plantas medicinais simboliza muitas vezes o único recurso terapêutico de muitas comunidades e grupos étnicos. O uso de plantas no tratamento e na cura de enfermidades é tão antigo quanto a espécie humana. No processo histórico das plantas medicinais, muitas civilizações descreveram a utilização de ervas e outros vegetais como forma de medicamento, em seus registros e manuscritos. Os babilônios e sumerianos (2.600 a.C.) usavam em seus remédios, frutos, folhas, flores, cascas e raízes como a oliveira e o alho. A “Tabuinha Sumeriana”, uma coleção de textos médicos em tabletes de argila, contém registros dos primeiros sintomas de doenças e a prescrição para cada enfermidade, sendo considerado o mais antigo tratado de medicina (TEIXEIRA, 1994; MIGUEL e MIGUEL, 1999). Já no primeiro século da era Cristã, Dioscórides, médico-cirurgião grego, publicava “*De Materia Medica*”, um catálogo contendo cerca de 600 plantas do Mediterrâneo, incluindo informações de como os gregos as utilizavam para fins médicos, locais onde poderiam ser encontradas e informações sobre uso, se eram comestíveis ou venenosas (SIMÕES, 2004). Foi durante a Renascença (séculos XIV a XVI) que aparecem as primeiras farmacopéias, com o propósito de padronizar a composição e a forma de preparações prescritas pelos médicos da época. A primeira farmacopéia européia foi publicada em 1498, em Florença: “*Nuovo Receptario Compositio*”; sendo que a segunda foi publicada em Barcelona, em 1511: “*Concordie apothecariorum Barchinone medicines Compositis*” (LÓPEZ-MUÑOZ et al., 2006). Em 1929 foi oficializado o Código Farmacêutico Brasileiro, ou seja, a primeira edição da Farmacopéia Brasileira,

apresentada pelo farmacêutico e professor de Farmácia Rodolpho Albino Dias da Silva, sendo uma obra de um único autor, equiparando-se às farmacopéias dos países tecnologicamente desenvolvidos, diferenciando-se por conter descrições de mais de 200 plantas medicinais, a maioria delas de origem brasileira (ANVISA, 2004). Parte destas plantas foi suprimida da segunda edição e outra parte foi destinada ao Formulário Nacional. Atualmente, a quarta edição da Farmacopéia Brasileira (1988 e seus suplementos publicados em 1996, 2000, 2002) conta com apenas 23 monografias atualizadas que, na sua grande maioria, são monografias de plantas exóticas (FARIAS, 1999).

Apesar de as plantas representarem, durante séculos, a única fonte de agentes terapêuticos para o homem, na primeira metade do século XX, com o advento da Revolução Industrial e o desenvolvimento da química orgânica, os produtos de origem vegetal foram temporariamente esquecidos em detrimento dos compostos sintéticos. Isto ocorreu, entre outros fatores, pela maior facilidade de obtenção dos compostos puros, possibilidade de modificações estruturais e pelo crescente poder econômico das indústrias farmacêuticas (RATES, 2001a).

Atualmente, apesar do grande desenvolvimento da síntese orgânica e de novos processos biotecnológicos, observamos um aumento notável da prática fitoterápica. Aproximadamente 25% dos medicamentos prescritos nos países industrializados são originários de plantas e aproximadamente 120 compostos de origem natural, obtidos a partir de cerca de 90 espécies de plantas, são utilizados na terapêutica moderna. De fato, os produtos naturais estão envolvidos no desenvolvimento de 44% de todos os novos fármacos (HOSTETTMANN et al., 2003). Os produtos atualmente disponíveis no

mercado, em algumas situações, têm-se tornado ineficientes e/ou inseguros. O excesso de efeitos colaterais, o uso abusivo, a prescrição indiscriminada e o emprego incorreto destes produtos resultam em uma razão risco/benefício indesejada, tornando as linhagens microbianas extremamente resistentes aos antibióticos sintéticos. Outro motivo que levou ao crescimento da fitoterapia é que parte da população mundial não tem acesso à medicina convencional, devido à situação econômica ou ao descaso com a população por parte do sistema político econômico mundial ou mesmo pela política adotada pelas grandes indústrias farmacêuticas (TOLEDO, 2002). A dependência das plantas como fonte de fármacos é prevalente em países em desenvolvimento, nos quais a medicina tradicional baseada nos conhecimentos populares possui papel central nos cuidados à saúde (AUSTIN, 1991; CLARK, 1996). A Organização Mundial da Saúde (OMS) estima que um terço da população global ainda não tem acesso a medicamentos essenciais e, mais do que isso, nas áreas mais pobres da África e Ásia, esse valor sobe para 50 % da população (WHO, 2002). Além disso, este órgão considera a fitoterapia nos seus programas e sugere procedimentos básicos para a avaliação de drogas vegetais (WHO, 1992; RATES, 2001b).

O desenvolvimento de fitoterápicos inclui várias etapas e envolve, atualmente, um processo interdisciplinar, multidisciplinar e interinstitucional. A pesquisa inicia-se pela busca de literatura científica e catálogos internacionais nas áreas específicas do referido conhecimento, seguindo em paralelo a pesquisa etnobotânica, que descreve o uso popular de plantas nas diferentes culturas (CAMARGO, 1999).

Além da descoberta de fármacos naturais que sirvam como protótipos para o desenvolvimento de novos medicamentos a pesquisa com as plantas visa fornecer subsídios para a prática de uma fitoterapia racional, através do uso de medicamentos fitoterápicos de qualidade, com eficácia e segurança comprovada. Entre os estudos necessários para garantir a qualidade de uma droga vegetal encontram-se os testes de autenticidade (caracterização organoléptica e identificação macroscópica e microscópica), testes de pureza e integridade (cinzas totais, cinzas insolúveis em ácido, umidade e determinação de materiais estranhos, contaminantes microbiológicos e metais pesados) e análises qualitativas e quantitativas dos constituintes ativos, quando conhecidos (BRASIL, 2000). Deve-se destacar ainda, que o desenvolvimento de um novo medicamento envolve um processo complexo de alto custo, onde se requer investimentos em torno de 100-360 milhões dólares em um período de 10-12 anos para que um fármaco seja desenvolvido (YUNES, 2001).

No Brasil aproximadamente 80.000 espécies de plantas são descritas, oferecendo enorme propulsão para o descobrimento de novos fármacos. Entretanto, considerando esta enorme variedade de espécies, o potencial como fonte de novos fármacos não é completamente explorado, sendo que, somente 17% deste grupo de plantas tem sido foco de estudos sistemáticos na busca de compostos biologicamente ativos (SOERJATO, 1996). As matérias-primas vegetais que são utilizadas no preparo de medicamentos fitoterápicos necessitam de um controle de qualidade. As condições de coleta, armazenagem, secagem, dentre outras, interferem diretamente na qualidade e quantidade de princípios ativos extraídos e conseqüentemente no efeito farmacológico dos mesmos. A tradição popular de que produto "natural" não

tem efeito colateral é equivocada e faz com que muitas pessoas busquem esta terapia sem ao menos saber o que estão consumindo (SIMÕES et al., 2004). Uma limitação em relação aos fitoterápicos é o número reduzido de estudos controlados em comparação com os medicamentos sintéticos. Mais ainda, esses poucos estudos nem sempre empregam metodologias adequadas. Essa escassez de estudos, associada à falta de sistematização do levantamento e de farmacovigilância, pode, pelo menos em parte, contribuir para o reduzido número de relatos de efeitos adversos pelos fitoterápicos (WINSLOW e KROLL, 1998).

## 2. REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1. *Endopleura uchi* (Huber) Cuatrec. (Humiriaceae)

*Endopleura uchi* (Huber) Cuatrec. [sinonímia *Sacoglottis uchi* Huber] (Humiriaceae) é uma espécie originária da Amazônia brasileira, encontrada em estado silvestre em mata de terra firme, dispersa por toda a Bacia Amazônica. A família foi descrita por Antoine Laurent de Jussieu, a qual inclui 50 espécies classificadas em 8 gêneros, distribuídas principalmente em regiões tropicais das Américas. A planta é conhecida na região Amazônica como uchi, uxi-amarelo, cumatê, pururu, uxi-liso, uxi-ordinário ou uchi-pucu (CUATRECASAS, 1961; SCHULTES, 1979). As árvores eretas e de casca cinza atingem entre 25 e 30 metros de altura, com diâmetro do caule de até 1 metro (Figura 1).



**FIGURA 1.** *Endopleura uchi* (Huber) Cuatrec. A) Vista panorâmica da espécie (fonte: <http://www.ibama.gov.br>); B) Fotografia de uma tora do caule (fonte: <http://www.ibama.gov.br>).

O fruto tem uma dupla camada oblongo-elipsóide de 5 a 7 cm de comprimento, 3 a 4 cm de diâmetro, com peso entre 50 e 70 g e apresenta coloração verde-amarelada ou parda-escuro quando maduro. É considerado um alimento de grande importância para subsistência de muitas comunidades rurais mais distantes, no entanto na última década tem sido detectado um mercado em expansão na área periurbana de Belém durante os quatro meses de frutificação, gerando renda para várias famílias. A polpa *in natura* é consumida pura bem como na fabricação de sorvete e licor. O fruto é também apreciado por vários animais silvestres, tornando-o favorito aos caçadores para construção de armadilhas de caça (SHANLEY et al., 2002).

A casca é amplamente comercializada em feiras, mercados e até mesmo farmácias (Figura 2), sendo prescrita sua utilização na forma de maceração ou chá, para o tratamento de artrite, colesterol, diabete e como antiinflamatório (CORRÊA, 1984).



**FIGURA 2.** *Endopleura uchi* (Huber) Cuatrec. A) Casca do caule in natura (fonte: <http://www.ibama.gov.br>); B) Cascas pulverizadas, embaladas em pacotes para comercialização em mercados, férias livres e farmácias magistrais (fonte: <http://enkantusdafloresta.com>).

## 2.2. Constituição fitoquímica

Em seu trabalho, LUNA *et al.* (2000a), a partir do extrato etanólico bruto das cascas de *E. uchi*, realizaram sucessivas extrações com solventes de diferentes polaridades, que foram fracionadas e subsequentemente purificadas. As substâncias puras tiveram suas estruturas elucidadas com base em dados espectroscópicos no ultravioleta, infravermelho, espectrometria de massas e principalmente ressonância magnética nuclear, caracterizando a presença de duas cumarinas, a bergenina e seu derivado dimetilado, a dimetilbergenina, dois triterpenóides pentacíclicos pertencentes à série dos oleonanos: o ácido masílinico e o éster masilinato de metila (LUNA *et al.*, 2000b; LUNA *et al.*, 2001). Num estudo posterior, LAGOS (2006) demonstrou que o fracionamento cromatográfico das cascas de *E. uchi* resultou no isolamento de uma mistura de esteróides constituída por  $\beta$ -sitosterol (75,5%) e estigmasterol (24,5%), do triterpeno pentacíclico 3-oxo-friedelina, do triterpeno pentacíclico pseudotaraxasterol e da bergenina, uma lactona-isocumarina polifenólica, também isolada nos frutos (FERREIRA *et al.*, 2005; MAGALHÃES *et al.*, 2007). Extratos contendo bergenina obtidos a partir de *Macaranga peltata* são usados na medicina popular indiana para o tratamento de doenças venéreas e a bergenina acetilada tem mostrado um efeito anti-hepatotóxico em animais de experimentação (KIM *et al.*, 2000). A bergenina por si só têm demonstrado atividades antioxidantes (TAKAHASHI *et al.*, 2003), gastroprotetivas (GOEL *et al.*, 1997) e anti-HIV (PIACENTE *et al.*, 1996). Este composto também é um ingrediente farmacologicamente ativo da medicina chinesa, descrito como sendo efetivo contra resfriados e bronquite (HERZNER *et al.*, 2002). A bergenina está relatada na literatura por sua atividade antiinflamatória (SWARNALAKSHMI, 1984), e também foi descrita na espécie *Humiria balsamifera* (HARBORNE e BAXTER, 1993).

Os estudos com polpa de frutos de uchi-amarelo o indicaram como fonte de ácidos graxos, fibras, esteróides, sais minerais, vitaminas C e E. Os principais ácidos graxos identificados foram o ácido oléico (7,38%) e ácido palmítico (3,78%). A composição do aroma nos frutos também foi avaliada, sendo identificados 42 componentes, com predominância de 3,3-dimetil-2-butanol (18,8%) e eugenol (14,0%) (MARX et al., 2002).

Além dos derivados cumarínicos, POLITI et al. (2008) relatou a presença preponderante de taninos em amostras de cascas pulverizadas por meio de uma triagem fitoquímica preliminar.

### **2.3. Taninos**

Os taninos são polifenóis encontrados em plantas superiores (SIMÕES et al., 2004). Possuem peso molecular entre 500 e 3000 Daltons (SANTOS e MELLO, 2003), são solúveis em água e possuem a propriedade de precipitar proteínas e alcalóides (HASLAM, 1996). A capacidade de precipitar proteínas, particularmente salivares da cavidade oral, caracteriza o sabor adstringente dos taninos, possibilitando seu fácil reconhecimento em frutos verdes. Tal propriedade é relevante para a proteção do vegetal frente a ataques de patógenos e herbívoros (MADHAN et al., 2005).

Estruturalmente, os taninos possuem 12-16 grupos fenólicos, 5-7 anéis aromáticos com 1000 unidades relativas de massa molecular e são divididos segundo sua estrutura química em dois grupos: taninos hidrolisáveis e taninos condensados (BHAT et al., 1998; HAGERMAN, 2002).

Os taninos hidrolisáveis são caracterizados por um poliol central, geralmente D-glucose, cujas funções hidroxilas são esterificadas com ácido

gálico e seus derivados (galotaninos e elagitaninos) (MELLO e SANTOS, 2004). Os elagitaninos estão amplamente distribuídos nas subclasses HDR (Hamamelidae, Dilleniidae e Rosidae), por esse motivo são usados como marcadores taxonômicos (HASLAM, 1996).

Os taninos condensados são oligômeros e polímeros formados pela policondensação de duas unidades ou mais de flavan-3-ol e flavan-3-4-diol. Esta classe também é denominada de proantocianidina ou leucocianidinas (SANTOS e MELLO, 2004). Os taninos condensados são formados por unidades elementares de flavan-3-ol com ligações C-C e ocasionalmente ligações C-O-C. Os flavan-3-óis possuem um esqueleto típico flavonóidico com ligações C6-C3-C6 (BUELGA e SCALBERT, 2000). Os taninos ocorrem amplamente nos vegetais, porém, sua extração comercial é feita através da casca e/ou do cerne da madeira, locais onde são encontrados em maiores teores e também onde costumeiramente ocorrem os maiores problemas com injúrias e ataques de agentes xilófagos. Geralmente, os taninos ocorrem mais abundantemente nas células do raio e no parênquima longitudinal do cerne. O albúrnio contém pouco ou nenhum tanino. Na casca, quase sempre ocorrem nas células corticais (BROWN et al., 1952). A luminosidade é um fator que afeta a produção de taninos, sendo diminuída em ambientes sombreados comparados a espécies cultivadas ao sol. Tem sido relatado também que, quanto mais velha a planta, maior a concentração de taninos (SCHEFFER, 2002).

As atividades farmacológicas dos taninos são atribuídas a três ações (SIMÕES et al., 2004): complexação com íons metálicos; atividade antioxidante e sequestradora de radicais livres; complexação com macromoléculas

(proteínas e polissacarídeos). Com base nisto, já foram identificadas atividades bactericidas, fungicidas, antivirais, moluscicidas, inibidoras de enzimas, de peroxidação lipídica, antitumoral e sequestradora de radicais livres. Alguns taninos mostraram capacidade de inibir seletivamente a replicação do vírus HIV (KANBABAEE e REE, 2001). Na indústria, os taninos são usados no curtimento de couro, produção de vários tipos de polímeros, preservação de madeiras, entre outros (SIMÕES et al., 2004).

De acordo com Farmer (1967), os taninos possuem propriedade antimicrobiana e são responsáveis pela durabilidade natural de algumas madeiras. Segundo Aqüegil *et al.* (apud Granja, 1986), os taninos têm função fungicida e bactericida em qualquer solução que possua seus componentes, desempenhando papel moderador nas oxidações das substâncias antiorgânicas e antifermentativas. Scalbert (1991) revisou as propriedades antimicrobianas dos taninos, listando 33 estudos que documentaram as atividades inibitórias destes metabólitos e de acordo com estes estudos, os mesmos podem ser tóxicos a fungos filamentosos, leveduras e bactérias. Os taninos foram considerados parcialmente responsáveis pela atividade antimicrobiana de extratos metanólicos de cascas de *Terminalia alata* encontrada no Nepal (TAYLOR et al., 1996). Uma investigação da atividade antimicrobiana de diversos taninos frente a *Staphylococcus aureus* demonstrou que o ácido tânico é um ótimo adjuvante no tratamento de infecções da pele (AKIYAMA et al., 2001). A atividade biológica dos taninos tem relação com o tamanho das moléculas, ou seja, a polimerização que sofrem; por exemplo, alguns taninos hidrolisáveis apresentam maior atividade anti-HIV em moléculas

grandes e o aumento do número de grupamentos galílicos proporciona uma maior complexação com as proteínas.

#### **2.4. Processos extrativos**

A literatura classifica os processos extrativos mais utilizados em dois grupos: a maceração e a percolação, que em seus fundamentos são capazes de correlacionar outras técnicas, como a digestão, a infusão, a decocção e a turbo-extração (DÄR, 1981; VOIGT e BORNSCHEIN, 1982; PRISTA et al., 1996; ANSEL et al., 2000; SIMÕES et al., 2003).

Antes de iniciar o processo extrativo, e independente do processo a ser usado, a secagem do material é um procedimento de extrema importância. A secagem tem por finalidade a retirada de água evitando reações de hidrólise e de crescimento microbiano, além de garantir a estabilidade química do material vegetal. Pode ser realizada ao ar livre, em estufas aplicando ar quente, ou com o emprego de liofilizadores. A secagem ao ar livre é mais econômica, embora exija maior vigilância para garantir a uniformidade das condições durante a operação. Preferencialmente, deve ser realizada à sombra, já que a irradiação solar pode alterar a constituição química do material. O local deve permanecer convenientemente seco e protegido do ataque de insetos ou outros contaminantes ambientais, sendo um procedimento comum dispor o material sobre papel para absorção da umidade (DÄR, 1981; VOIGT e BORNSCHEIN, 1982; PRISTA et al., 1996; ANSEL et al., 2000; SIMÕES et al., 2003).

Na secagem por ar quente são utilizadas estufas equipadas com um termostato, o que garante a manutenção de temperatura constante durante o tempo desejado. É conveniente deixar escapar o ar da estufa, a fim de evitar a

sua saturação com o vapor d'água que vai sendo desprendido do material a secar. A secagem a frio, com liofilizadores, frequentemente é usada para preservar a integridade da amostra sensível ao aquecimento. A operação de secagem, independente de como é realizada, propicia a redução de volume e de peso e facilita a moagem dos materiais (DÄR, 1981; VOIGT e BORNSCHEIN, 1982; PRISTA et al., 1996; ANSEL et al., 2000; SIMÕES et al., 2003).

A preparação de amostras vegetais é muito complexa apresentando várias etapas. A primeira etapa, e certamente a mais importante, é a extração que tem a finalidade de separar substâncias de interesse de uma matriz complexa (COSTA, 1994; BANDEIRA, 2004).

Antes de executar uma extração, deve-se levar em consideração uma série de fatores que interferem nesta operação tais como granulometria do material, polaridade do solvente, acidez do meio, agitação, temperatura e tempo de extração (SOARES et al., 1998).

A granulometria do material influencia diretamente na eficiência da extração. A estrutura histológica das diversas partes componentes de uma planta é bastante heterogênea. Existem órgãos como as raízes e os caules, cujos tecidos estão fortemente compactados, ao passo que em folhas e flores os tecidos se apresentam com textura mais delicada. Como o poder de penetração dos solventes depende, entre outros fatores, da consistência dos tecidos que formam o material a extrair, quanto mais rígido for o material menor deve ser sua granulometria (COSTA, 1994; SIMÕES et al., 2003).

A polaridade do solvente também influencia a eficiência de extração. O solvente escolhido deve ser o mais seletivo possível, pois é devido à

seletividade que se podem extrair as substâncias desejadas. Como a seletividade depende da polaridade, o grau de polaridade do grupo que se pretende extrair determina o solvente ou a mistura de solventes que mais se aproxima do ótimo de seletividade para aquela extração (PRISTA et al., 1996; SIMÕES et al., 2003).

A extração de determinadas substâncias ainda pode ser influenciada pela acidez do meio extrator. Considerando que os processos de extração dependem, em grande parte, de fenômenos de difusão e que a renovação do solvente em contato com as substâncias a dissolver desempenha um papel de grande influência na velocidade da dissolução, pode-se concluir que a agitação pode diminuir a duração de um processo extrativo (DÄR, 1981; VOIGT e BORNSCHEIN, 1982; PRISTA et al., 1996; ANSEL et al., 2000; SIMÕES et al., 2003).

O aumento da temperatura provoca um aumento da solubilidade de qualquer substância, motivo pelo qual os métodos de extração a quente são sempre mais rápidos do que aqueles realizados à temperatura ambiente. Entretanto, o calor nem sempre pode ser empregado, já que muitas substâncias são instáveis em altas temperaturas (DÄR, 1981; VOIGT e BORNSCHEIN, 1982; PRISTA et al., 1996; ANSEL et al., 2000; SIMÕES et al., 2003).

Na escolha de um método extrativo, deve-se avaliar a eficiência, a seletividade, a estabilidade das substâncias extraídas e o custo do processo escolhido, considerando principalmente a finalidade do extrato que se quer preparar (COSTA, 1994; SIMÕES et al., 2003).

## 2.5. Atividade antimicrobiana e toxicidade

A história do desenvolvimento e uso de substâncias antimicrobianas na prática médica antecedeu a descoberta de espécies microbianas, uma vez que Hipócrates (460–337 a.C.) recomendava a lavagem de ferimentos com vinho para impedir o processo infeccioso. Documentos datados de 2500 a 3000 anos atrás, mostram que alguns povos como chineses e indianos, ainda primitivos, utilizavam mofo, papa de soja e outros produtos correlatos para o tratamento de lesões infectadas e processos inflamatórios (LIMA et al., 2000).

O uso de agentes antimicrobianos derivados de produtos naturais é muito importante no tratamento terapêutico de várias patologias. Todavia, para muitas das plantas em uso, a real eficácia e os princípios ativos relevantes não são conhecidos. Conseqüentemente, estudos que objetivem demonstrar as atividades farmacológicas destas plantas e que identifiquem os princípios ativos são necessários (FERREIRA et al., 1998).

Muitas plantas têm sido usadas devido às suas propriedades antimicrobianas, que estão relacionadas a compostos sintetizados no metabolismo secundário das mesmas. Estes compostos são conhecidos como substâncias ativas, como por exemplo, os compostos fenólicos, que podem ser parte dos óleos essenciais e também dos taninos (JANSEN et al., 1987; SAXENA et al., 1994). Porém, diferentemente do que ocorre com os agentes antibióticos e quimioterápicos, há poucos registros na literatura quanto ao possível mecanismo de ação dos produtos oriundos de plantas. Os compostos isolados das plantas são substâncias com estruturas químicas bem diferenciadas dos agentes antimicrobianos isolados a partir de bactérias, leveduras e fungos filamentosos. Tais produtos podem atuar no metabolismo

intermediário ativando enzimas, alterando a ação de inibidores que influenciam os nutrientes do meio, interferindo nos processos enzimáticos em nível nuclear ou ribossomal, provocando alterações nas membranas ou ainda interferindo no metabolismo secundário (COWAN, 1999).

Vários métodos podem ser utilizados para a determinação da atividade antimicrobiana *in vitro*, sendo aplicados em estudos de triagem de novas substâncias ativas, tais como a técnica de difusão em ágar, métodos de diluição em caldo em tubos e/ou microplacas, bioautografia etc. Tais técnicas permitem a análise de vários compostos e diferentes espécies bacterianas concomitantemente (KONEMAN et al., 1997; ELOFF et al., 1998; SOUZA et al., 2003).

No método de difusão a substância alvo da pesquisa é colocada num reservatório (disco de papel, cavidade no meio de cultura, cilindro sobre a superfície ou “template”), em contato com um meio de cultura sólido, inoculado com um determinado microrganismo. Após o tempo adequado de incubação, afere-se o diâmetro do halo de inibição – zona clara onde não houve crescimento microbiano – ao redor da substância em pesquisa (BARRY, 1991; ESPINEL-INGROFF e PFALLER, 1995). Neste método a informação é qualitativa, útil para estabelecer a sensibilidade do microrganismo. O método apresenta problemas com as substâncias que não se difundem no meio (ZACCHINO, 2001).

A técnica de diluição, que emprega a amostra a ser testada dissolvida num meio sólido ou líquido conveniente, possui a vantagem de ser quantitativa. A desvantagem deste método reside no fato do excessivo trabalho envolvido

na realização, no consumo considerável de material e de estar sujeito à solubilidade no sistema aquoso (FREIBURGHAUS et al., 1996).

Os ensaios da atividade antimicrobiana são influenciados por um grande número de variáveis técnicas ou fatores que podem interferir significativamente na pesquisa de atividade de agente antimicrobiano, incluindo a preparação e o tamanho do inóculo, a formulação do meio e seu pH, duração e temperatura de incubação e o critério usado para a verificação do resultado do ensaio. Para se obter êxito e uniformidade nos testes de atividade, estes fatores devem ser muito bem controlados (ESPINEL-INGROFF e PFALLER, 1995). No que diz respeito ao microrganismo em teste, a atividade antimicrobiana pode depender do tipo, gêneros, espécies e cepas. O meio de cultura e as soluções diluentes deverão ser selecionados de modo que previnam danos celulares. Células injuriadas requerem um meio nutritivo de recuperação (meio de enriquecimento) sem a presença de agentes inibidores ou de diferenciação. O meio de cultura inadequado pode produzir resultados onde os microrganismos aparentemente apresentam alta susceptibilidade ao agente que se está pesquisando (BARRY, 1991). A uniformidade de preparação do agente antimicrobiano, pureza do solvente utilizado, solubilidade e sua estabilidade, também podem influenciar no ensaio. O tempo de exposição deve ser cuidadosamente controlado, assim como o número inicial de células utilizadas durante o ensaio deve ser consistente para assegurar resultados reprodutíveis. O efeito da temperatura também é importante, seja durante a exposição ou durante a etapa de incubação. A temperatura de exposição deve ser ótima para o organismo testado, para se recuperar o número máximo de células viáveis e prevenir a impressão do aumento de atividade do agente. Condições de

anaerobiose ou microaerofilia deve ser considerada na composição da atmosfera. Níveis de pH também podem afetar a atividade de antimicrobianos. (WOODS e WASHINGTON, 1995). Finalmente as propriedades básicas próprias dos agentes antimicrobianos como sua solubilidade, estabilidade química, ação e tendência de produzir inibição parcial do crescimento sob diferentes concentrações, devem ser levadas em consideração (ESPINEL-INGROFF e PFALLER, 1995).

A segurança na utilização de produtos de origem vegetal é outro fator de grande importância nos dias atuais. Avaliando-se a citotoxicidade de uma planta medicinal, pode-se garantir que um produto elaborado com esta seja livre de efeitos tóxicos indesejáveis (KUSUMOTO et al., 1995). As metodologias que utilizam tecidos e células vivas são as mais empregadas, pois a intrínseca complexidade celular é mantida. As células utilizadas podem ser de vários tecidos, tanto de origem humana quanto animal, sendo que a sobrevivência e/ou proliferação celular podem ser avaliadas por contagem do número de células ou pelo uso de corantes vitais. A incorporação de radioisótopos, formação de colônias, aderência celular, produtos de metabolismo entre outros são parâmetros que também podem ser utilizados (RIDDELL et al., 1986; DE ANGELIS et al., 1986; SAOTOME et al., 1989; NOSER, 1991; SASAKI et al., 1991; HUSOY et al., 1993).

No início da década de 80, Mosmann (1983), Borenfreud e Puerner (1984) descreveram uma técnica para análise de citotoxicidade que servia para várias amostras simultaneamente. Nesta técnica, as células são semeadas em microplaca e a viabilidade celular é avaliada por métodos colorimétricos, utilizando a redução do MTT (brometo de 3 (4,5 dimetiltiazol-2-il) 2,5

difeniltetrazólio) ou a incorporação do vermelho neutro (cloridrato de 3-amino-7-dimetilamino-2-metilfenazina), os quais são quantificados por espectrofotometria. Esta técnica é rápida e quantitativa, pois permite avaliar várias concentrações de amostras e calcular a concentração que causa 50% de morte celular.

Como opção para a investigação da presença de possíveis agentes tóxicos nos extratos vegetais, o método de toxicidade aguda em dose simples representa uma avaliação estimativa e preliminar das propriedades tóxicas de um fitoterápico, fornecendo informações iniciais acerca dos riscos sobre a saúde, resultante de uma exposição de curta duração pela via de administração selecionada. Após a administração da substância teste, pela via escolhida, é feita uma observação clínica dos sintomas produzidos pela administração do fitoterápico nos animais. A anotação das respostas é efetuada em 30 minutos, 1, 2, 4, 12 e 24 horas após a administração e a partir deste tempo, uma vez ao dia durante o período de observação de 2 semanas, sendo as mais importantes: alterações de pêlo, pele e mucosas; sistemas respiratório e circulatório; sistemas nervoso central e periférico, atividade somatomotriz e comportamento. Especial atenção é dada a comportamentos tais como: tremores, convulsões, salivação, diarreia, letargia e coma. Os resultados do estudo podem demonstrar a necessidade de estudos de média e longa duração (BRITO, 1994).

## **2.6. Microrganismos utilizados**

Para os testes antimicrobianos, as bactérias utilizadas neste trabalho estão diretamente ligadas à rotina dos seres humanos.

*Staphylococcus aureus*, bactéria Gram-positiva, está amplamente distribuída na natureza e faz parte da microbiota normal da pele e mucosas de mamíferos e aves. Apresenta-se como anaeróbio facultativo, mesófilo, com temperatura ótima de crescimento na faixa de 30-37 °C (WILLIAMS e WILKINS, 1994). É o agente mais comum de infecções piogênicas e em indivíduos debilitados pode causar doenças de caráter mais grave, sendo bastante reconhecida sua elevada capacidade de desenvolver resistência a diversos antibióticos (MARTINS, 1999). Isolados de *S. aureus* resistentes à penicilina foram observados quase concomitantemente a sua introdução no uso clínico devido à produção de  $\beta$ -lactamases ou penicilases, enzimas que hidrolisam o anel  $\beta$ -lactâmico das penicilinas, inativando-as (DEL FIOLE et al., 2000; AMATO et al., 2000; MULLIGAN et al., 1993; TAVARES, 1996).

*Staphylococcus epidermidis* (Gram-positiva) também é habitante comum da epiderme e mucosas, sendo considerada a espécie de estafilococos de maior persistência na pele humana (MARTINS, 1999). É um microrganismo aeróbico que usualmente está envolvido a processos de infecção dentro da unidade sebácea (CHOMNAWANG et al., 2005). Nos últimos anos, entretanto, vem apresentando-se como causa de infecções hospitalares, atingindo, principalmente, pacientes imunocomprometidos, e/ou com doenças graves. É uma bactéria comensal, sendo esse um fator que dificulta os clínicos decidirem quando sua presença em um material indica que é o agente causativo de uma doença ou apenas uma contaminação do material. Apresenta ainda, a capacidade de formação de biofilme em equipamentos utilizados em ambientes hospitalares e flexibilidade genômica, tendo desenvolvido cepas de resistência que facilitam sua disseminação com mais frequência em indivíduos

imunocomprometidos. Por estes motivos, devem ser seguidas as mesmas medidas restritivas de higiene que foram estabelecidas para *S. aureus* em hospitais (ZIEBUHR et al., 2006).

*Bacillus subtilis*, bactéria Gram-positiva, é utilizada no controle de qualidade em testes de esterilização por óxido de etileno e a vapor, pois é capaz de sobreviver em condições muito adversas de dessecação, temperatura e pH devido à sua capacidade de produzir esporos, fato pelo qual também se deve sua ampla distribuição na natureza (MÓS, 1999). Recentemente, esta bactéria tem sido associada à incidência de gastroenterites em bebês que receberam alimentos contaminados (ABDOU et al., 2007).

*Shigella sonnei* é uma espécie bacteriana fermentadora de lactose, que pode causar desde diarréias até gastroenterites. Foram estimados cerca de 165 milhões de casos anuais de shigelose, dos quais cerca de 163 milhões ocorrem em países em desenvolvimento, resultando em mais de 1 milhão de mortes/ano (FLÓREZ, 2005). Aumentos desordenados da incidência de infecções por *Shigella* são difíceis de controlar devido à facilidade com que os inóculos se espalham e também ao progressivo aumento da resistência a múltiplos antibióticos (SOBEL et al., 1998).

*Escherichia coli* é uma bactéria Gram-negativa muito versátil quanto a sua patogenicidade, podendo causar infecções intestinais, urinárias, septicemias, meningites, além de outros tipos (CAMPOS et al., 1999). É uma das causas mais comuns de infecções da via urinária, sendo tratada eficientemente com cotrimoxazol, mas resistência *in vitro* foi relatada para casos não resolvidos de tratamento (CAMARGO et al., 2002; RODRIGUES et al., 2006).

*Candida albicans* é a espécie de levedura mais frequentemente isolada a partir de amostras biológicas. É um habitante normal do trato gastrointestinal dos seres humanos e pode ser reconhecido em mais de um terço das cavidades orais de indivíduos normais e dois terços daqueles indivíduos com doenças imunodepressivas como a AIDS (ODDS, 1988; FITCHENBAUM, 2000). Colonização oral com organismos resistentes a agentes antimicrobianos é mais comum em infecção avançada por HIV. A candidíase das mucosas pode afetar a cavidade oral, canal vaginal, traquéia, brônquios e canal alimentar, sendo as doenças orofaríngeas e vulvovaginais as formas mais comuns de candidíase mucocutânea (FITCHENBAUM, 2000; DUERR, 1993). O tratamento das candidíases vem se tornando difícil devido à emergência de cepas resistentes aos antifúngicos costumeiramente utilizados. Há um grande número de novos antifúngicos em várias fases de desenvolvimento clínico, incluindo triazóis, equinocandinas, sordarinas e inibidores de topoisomerase. A atividade *in vitro* de pelo menos 3 novos triazóis (posaconazol, ravuconazol e voriconazol) contra espécies de *Candida* mostrou-se bastante eficiente (RUHNKE et al., 1997; NIETO et al., 2000).

### 3. OBJETIVOS

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, inclusive do *E. uchi*.

Existe uma crescente demanda na comercialização de medicamentos e fitoterápicos à base de *E. uchi* pelas farmácias magistrais, drogarias, feiras públicas e até mesmo pela Internet, expondo a população que os consomem a riscos ainda desconhecidos. O presente trabalho visa realizar estudos farmacognósticos e biológicos desta droga vegetal que contribuam para comprovar a eficácia e segurança do seu uso. Assim, este trabalho tem como objetivos principais:

- ❖ Controle de qualidade das cascas pulverizadas de *Endopleura uchi* (Huber) Cuatrec. (Humiriaceae) obtidas comercialmente;
- ❖ Triagem fitoquímica das principais classes de metabólitos secundários presentes nas cascas de *E. uchi*;
- ❖ Doseamento das principais classes de metabólitos secundários presentes nas cascas de *E. uchi*;
- ❖ Análise cromatográfica dos extratos vegetais obtidos a partir das cascas pulverizadas de *E. uchi*;
- ❖ Avaliação das atividades antimicrobiana e citotóxica dos extratos vegetais obtidos a partir das cascas pulverizadas de *E. uchi*.

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1. Material

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

- 2,2-difenil-1-picrilhidrazila (DPPH) – Vetec
- Acetato de chumbo – Reagen
- Acetato de etila – Labsynth
- Acetona – Labsynth
- Ácido 3-5 dinitrobenzóico – Labsynth
- Ácido acético – Labsynth
- Ácido bórico – Labsynth
- Ácido clorídrico – Labsynth
- Ácido fórmico - Labsynth
- Ácido gálico – Vetec
- Ácido oxálico – Labsynth
- Ácido sulfúrico - Labsynth
- Ácido tânico – Vetec
- Ágar desidratado – Acumedia
- Água destilada
- Água Milli-Q
- Água oxigenada – Labsynth
- Amônia – Labsynth
- Ampicilina – Medley genéricos, comprimidos de 500 mg de ampicilina
- Anidrido acético – Labsynth

- Anfotericina B de *Streptomyces* – Sigma-Aldrich
- Azul de metileno – Labsynth
- Bergenina – Merck
- Carbonato de cálcio - Vetec
- Carbonato de sódio – Vetec
- Cloreto de alumínio – Reagen
- Cloreto férrico – Reagen
- Clorofórmio – Labsynth
- D-glicose anidra – Labsynth
- Dimetilsulfóxido (DMSO) – Labsynth
- Etanol – Labsynth
- Éter etílico - Labsynth
- Etilenodiamina - Labsynth
- Formaldeído – Labsynth
- Gelatina – Kraft Foods
- Glicol metacrilato (GMA) – Technovit 7100
- Hipocloreto - Labsynth
- Hidróxido de sódio – Labsynth
- Historresina – Leica
- Lugol – Merck
- Magnésio metálico - Merck
- Meio ágar Sabouraud – Acumedia
- Meio ágar-Mueller-Hinton – Acumedia
- Meio de infusão de cérebro e coração (BHI) – Biobrás
- Meio Eagle – Gibco

- Meio RPMI-1640 – Sigma-Aldrich
- Metacrilato - Leica
- Metanol – Labsynth
- Nitroprussiato de sódio – Labsynth
- Piridina - Vetec
- Pó ativador – Leica
- Pó-de-pele – Merck
- Reagentes de Dragendorff, Bouchardat, Mayer e Bertrand
- Reagente de Folin-Ciocalteu – Reagen
- Reagente de Folin-Denis – Reagen
- Reagentes de Kedde, Pezez A, Pezez B
- Resazurina – Sigma-Aldrich
- Resina Permout - Permout
- Rutina – Vetec
- Soro bovino fetal - Gibco
- Sulfato de sódio anidro – Labsynth
- Tween 80<sup>®</sup> – Labsynth
- Vitamina C – Vetec
- Xantidrol - Labsynth
- Xilol – Merck

#### **4.1.2. Equipamentos e utensílios**

- Agitador – Superohm G-25
- Autoclave vertical – Fabbe 103
- Balança analítica – Micronal AB 204

- Balança de infravermelho – Mettler LP12
- Balança semi-analítica – Owa Labor
- Banho de aquecimento – Fistom
- Banho-maria – Fanem Mod.100
- Bomba a vácuo – Motores Elétricos Brasil
- Câmara de fluxo laminar – Veco
- Câmara de Neubauer - Boeco
- Câmara de ultravioleta 254 nm
- Centrífuga – Excelsa Baby
- Cubetas de quartzo
- Deionizador de água – System Millipore
- Discos de papel com 6 mm de diâmetro
- Espectrofotômetro – Shimadzu-1603
- Estufa de ar circulante – Fanem
- Estufa de CO<sub>2</sub> - Thermo Electron Corporation
- Estufa de esterilização – Fanem 315 SE
- Estufa de incubação bacteriológica – Olidef cz
- Evaporador rotatório – Marconi TE120
- Liofilizador – Solab
- Microscópio – Carl Zeiss Jena
- Microscópio Óptico – Olympus CH20
- Micrótomo Rotatório - Leica
- Paquímetro digital – Starrett
- Peagômetro – Micronal B374
- Placa de alumínio de gel de sílica F<sub>254</sub> – Merck

- Placas de molde histoquímico - Histomold
- Placas de 96-wells – TPP 92096
- Tamisador vibratório
- Templates de aço (peça única) com 6 orifícios de 6 mm de diâmetro
- Vidrarias e porcelanas em geral
- Vórtex – Biomixer Mult-Mixer MVS-1

#### **4.1.3. Material vegetal**

##### **4.1.3.1. Cascas pulverizadas de *E. uchi* adquiridas da empresa “Sítio da Mata”**

Cascas finamente pulverizadas de *Endopleura uchi* (Huber) (Humiriaceae), fornecida pela empresa Sítio da Mata (lote: Uxi03/01; N° Inscr. Prod.: 024.308.176; colheita: 01/09/2005; validade: 30/09/2008), localizada na Rodovia Cajuru, Cássia dos Coqueiros (SP), Brasil, utilizadas para todos os ensaios farmacognósticos bem como para os testes de atividades biológicas (anexo 1).

##### **4.1.3.2. Cascas *in natura* (secas) de *E. uchi* adquiridas no Mercado Municipal “Ver-o-Peso” (Belém, PA)**

Cascas *in natura* de *Endopleura uchi* compradas no Mercado Municipal Ver-o-Peso, localizado em Belém (PA), Brasil, e enviada pelo Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA), utilizadas exclusivamente na confecção de cortes histológicos para as análises microscópicas comparativas com o material pulverizado.

#### 4.1.4. Cepas padrão

Os microrganismos selecionados para o projeto, obtidos do *American Type Culture Collection* (ATCC), são apresentados na Tabela 1.

**TABELA 1.** Cepas de bactérias e levedura utilizadas no projeto

Microrganismo	ATCC
Bacillus subtilis	9372
Staphylococcus aureus	25923
Staphylococcus epidermidis	27853
Escherichia coli	25922
Shigella sonnei	CC
Candida albicans	64548

#### 4.1.5. Células de mamíferos

O ensaio de citotoxicidade foi conduzido utilizando células fibroblásticas de córnea de coelho da linhagem SIRC CCL-60, procedência ATCC-USA, adquirida do Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, Brasil.

## 4.2. METODOLOGIAS

### 4.2.1. ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS

#### 4.2.1.1. Granulometria

Baseado na Farmacopéia Brasileira (1988), 25 g do material vegetal pulverizado foram submetidos à passagem forçada por vibração, através de tamises com abertura de malhas e coletor correspondentes a 0,074; 0,125; 0,177; 0,25 e 0,42  $\mu\text{m}$ , utilizando tamisador vibratório, na escala oito do

aparelho, durante 30 minutos. Após este processo, as frações foram retiradas dos tamises e do coletor e quantificadas quanto às suas proporções. Este procedimento foi realizado em triplicata. Para os estudos de passagem e retenção a partir da quantidade de pó das cascas pulverizadas recolhida de cada tamis, foram elaboradas planilhas no software Excel<sup>®</sup> onde foram calculadas as frequências percentuais, e também, as frequências percentuais cumulativas.

#### **4.2.1.2. Determinação do pH**

Foi preparada uma solução a 1% por infusão com a droga vegetal. Em erlenmeyer, 99 g de água foram colocados sobre uma chapa-elétrica para ebulir durante 5 minutos. Em seguida, a água foi vertida sobre a droga e o recipiente foi fechado e deixado em infusão por 15 minutos. Após este tempo, a mistura foi filtrada e arrefecida, procedendo-se à leitura em peagômetro calibrado em pH de 4 a 9. O experimento foi realizado em triplicata e os resultados equivalem à média dessas medições (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 1988).

#### **4.2.1.3. Determinação da densidade aparente não compactada**

Uma proveta de 100 mL foi previamente pesada e, posteriormente, preenchida com a droga vegetal. A densidade aparente foi determinada com os dados de volume e massa, de acordo com os seguintes cálculos:

$$D_{ap} = M_{pc} - M_{pv} / V_p$$

Em que:  $D_{ap}$ =densidade aparente;  $M_{pv}$  = massa da proveta vazia;  $M_{pc}$  = massa da proveta cheia;  $V_p$  = volume da proveta.

#### **4.2.1.4. Determinação do teor de cinzas totais**

Cadinhos de porcelana foram previamente calcinados em mufla a 450 °C por 30 minutos, resfriados em dessecador (15 minutos) e suas massas (taras) foram determinados em balança analítica. Em cada cadinho foram adicionados cerca de 3,0 g da droga vegetal triturada, pesados em balança analítica, os quais foram incinerados (levados ao estado de carvão) e, posteriormente, submetidos à calcinação em mufla à temperatura de 450 °C por duas horas. Foram deixados em dessecador para arrefecimento (15 minutos), com pesagem realizada posteriormente. A técnica foi repetida até massa constante. O resultado foi expresso em porcentagem em massa de cinza na droga (% m/m) e representa a média de três determinações (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 1988).

#### **4.2.1.5. Determinação da perda por dessecação em balança com infravermelho (INFRA-TEST)**

Amostras pesando 4,032 g, 4,010 g e 4,021 g da droga vegetal foram submetidas ao aquecimento (115 °C) através de raios infravermelhos pelo período de 1 hora aproximadamente. Após esse tempo, foram feitas as leituras das massas. Repetiu-se o procedimento de hora em hora até que a massa não variasse mais do que 0,25%. Os valores foram expressos em porcentagem (% m/m), através da média de três determinações (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 1988).

#### 4.2.1.6. Perda por dessecação em estufa

Foram pesados 2 g da droga e colocados em “pesa-filtros” previamente tarados. Em seguida, foram levados até estufa a 105 °C por duas horas. Após esse tempo, os “pesa-filtros” foram mantidos para arrefecimento em dessecador por mais 30 minutos, e então, pesados. Depois dessa pesagem, os “pesa-filtros” foram colocados normalmente em estufa, repetindo o procedimento, até obtenção de massa constante. Os resultados foram expressos em perda de massa percentual, através da média de três determinações (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 1988).

#### 4.2.1.7. Determinação do teor de extrativos para a droga

Cerca de 1 g da droga vegetal foi pesado e submetido à decocção com 100 g de água, durante 10 minutos. Após resfriamento, o volume foi completado para 100 mL e a solução resultante foi filtrada em papel de filtro, sendo os primeiros 20 mL desprezados. Do restante do filtrado, foi pesada uma alíquota equivalente a 20 g, em pesa-filtro tarado e evaporado até secura em banho-maria, sob agitação ocasional (DEUTSCHES ARZNEIBUCH, 1994).

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

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

Em que: TE = teor de extrativos (%); g = massa do resíduo seco (g); m = massa da amostra (g); FD = fator de diluição (5).

## 4.2.2. ANÁLISES MICROSCÓPICAS

### 4.2.2.1. Análise microscópica comparativa das amostras pulverizadas com as amostras *in natura* (secas) de cascas de *E. uchi*

Com o intuito de verificar a autenticidade do material vegetal utilizado neste trabalho e comprovar que o farmacógeno empregado nas análises farmacognósticas bem como nos ensaios biológicos tratava-se de cascas pulverizadas de *Endopleura uchi*, efetuou-se a preparação de lâminas microscópicas destas amostras bem como das amostras *in natura*, para posterior análise histológica comparativa. A análise da lâmina com material pulverizado não visa o estudo da organização dos tecidos vegetais da amostra, mas sim, identificar elementos anatômicos vegetais característicos da parte específica da planta (cascas), tais como células pétreas, fibras, cristais, drusas, dentre outros.

### 4.2.2.2. Montagem de lâminas com material pulverizado de *E. uchi* adquirido da empresa “Sítio-da-Mata”

Para análise microscópica da droga pulverizada foram utilizadas amostras do material pulverizado submetido à passagem forçada em tamis contendo malha de abertura 0,210 mm. Este pó foi colocado em béquer com solução de hipoclorito de sódio (2-2,5%), para clareamento, durante 24 horas; filtrou-se a suspensão com papel filtro e, na sequência, passou-se três vezes pelo pó adsorvido ao papel filtro, volume suficiente de tampão fosfato (pH 6,8) para a remoção do excesso de hipoclorito. Em seguida, adicionou-se a solução de azul de toluidina 0,025% em tampão fosfato (pH 6,8). As partículas assim coradas foram removidas, com ajuda de uma espátula, e colocados em lâminas de vidro contendo solução de glicerina-

água a 50% (v/v). Observações em microscópio óptico Olympus CH20, foram feitas para a determinação dos marcadores microscópicos (MARTINS e SACRAMENTO, 2004).

#### **4.2.2.3. Inclusão em historresina do material vegetal adquirido do Mercado Municipal “Ver-o-Peso” (Belém, PA)**

As cascas *in natura* (secas) foram fragmentadas em unidades de 0,125 cm<sup>3</sup>, as quais foram imersas em etanol 50% e levadas para aquecimento durante 60 minutos, com adições ocasionais de água, à medida da evaporação do etanol, repetindo-se o procedimento por diversas vezes. Após, com o intuito de intensificar o amolecimento dos tecidos vegetais, os fragmentos foram deixados em solução de etilenodiamina 4% (v/v) por sete dias em estufa a 40 °C, e em seguida, solução de etilenodiamina 10% (v/v) por mais três dias. As amostras foram retiradas desta solução e lavadas em água destilada por três vezes, com intervalos de duas horas entre cada oportunidade.

A fixação do material vegetal foi executada em fragmentos de 0,06 cm<sup>3</sup> aproximadamente, os quais foram mantidos em solução de formaldeído 4% neutro (pH 7,2-7,4) por 24 horas sob acondicionamento de vácuo (KARNOVSKY, 1965). Na sequência, procedeu-se à desidratação em série etanólica: etanol 10% por 30 minutos; etanol 30% por 30 minutos; etanol 50% por 30 minutos; etanol 70% por 2 horas; etanol 96% por 2 horas; etanol 100% por 2 horas. Em seguida, promoveram-se as etapas de inclusão em metacrilato, seguindo-se as recomendações de Kraus e Arduin (1997), observando as instruções do fabricante da resina (Leica®).

Os cortes anatômicos foram executados em micrótomo de rotação e subsequente disposição dos mesmos em lâminas de vidro. As lâminas foram mantidas em estufa a 40 °C até completa secagem e aderência dos cortes. Na seqüência procederam-se à coloração com azul de toluidina 0,01% durante 3 minutos (pH 6,8) (O'BRIEN et al., 1964). As lâminas foram lavadas em água corrente durante 2 minutos e postas à secagem durante 24 horas em estufa a 40 °C. Após este período, sobre as lâminas foram depositadas quantidades suficientes de resina Permout<sup>®</sup> para recobrimento com lamínulas. Após secagem em local sob temperatura ambiente e ao abrigo da luz, procedeu-se à análise exploratória dos cortes em microscópio óptico Olympus CH20.

#### **4.2.2.4. Pesquisa histoquímica para compostos fenólicos**

Baseando-se em resultados de estudo preliminar prévio a respeito da constituição fitoquímica das cascas de *Endopleura uchi* (POLITI et al., 2008), que atestam a presença de taninos como uma das classes preponderantes de metabólitos secundários, executou-se a coloração de algumas lâminas (confeccionadas com o material *in natura*) com cloreto férrico 10% (m/v) para comprovar a presença de compostos fenólicos (KRAUS e ARDUIN, 1997).

### **4.2.3. ANÁLISES FITOQUÍMICAS**

#### **4.2.3.1. Triagem fitoquímica das principais classes de metabólitos secundários**

Essas análises objetivaram analisar a presença de grupos químicos por reações específicas (COSTA, 1994; HARBORNE, 1998; SIMÕES et al., 2004):

(1) flavonóides, (2) taninos, (3) saponinas, (4) glicosídeos cardiotônicos, (5) antraquinonas, (6) alcalóides.

#### **4.2.3.1.1. Flavonóides**

Em um béquer adicionou-se 3 g da droga pulverizada e 20 mL de éter de petróleo. Agitou-se durante 10 minutos, com aquecimento em banho-maria (BM). Filtrou-se ainda a quente. Secou-se o pó, colocando-o num béquer com 20 mL de metanol. Aqueceu-se em BM por 10 minutos. Filtrou-se ainda a quente, evaporando-se posteriormente o filtrado até a secura. Por fim, ressuspendeu-se com 10 mL de etanol, obtendo-se assim, o extrato final.

##### **4.2.3.1.1.1. Reações de caracterização de flavonóides**

- **Reação de Shinoda**

Colocou-se 1 mL do extrato final em tubo de ensaio, adicionando-se um fragmento de magnésio metálico e gotas de HCl concentrado. Observou-se, após o desprendimento de hidrogênio nascente o aparecimento de coloração róseo ou vermelha.

- **Reação de Taubock**

Evaporou-se (BM) 3 mL do extrato final até a secura. O resíduo foi resfriado e umedecido com algumas gotas de acetona. Adicionaram-se alguns cristais de ácido bórico e ácido oxálico. Evaporou-se (BM) novamente até a secura evitando aquecimento prolongado. Dissolveu-se o resíduo em 5 mL de éter etílico e observou-se sob luz UV. Em caso positivo aparecerá fluorescência amarelo esverdeada.

- **Reação de Pew**

Evaporou-se (BM) 3 mL do extrato final em tubo de ensaio até a secura. Ao resíduo adicionou-se 3 mL de metanol e uma pequena porção de zinco metálico. Colocou-se aproximadamente 3 gotas de HCl concentrado. Em caso positivo aparecerá coloração vermelha.

- **Reação do cloreto férrico**

Adicionou-se a 1 mL do extrato final algumas gotas de  $\text{FeCl}_3$  a 2%. Deverá aparecer coloração verde, amarelado, ou ainda, violáceo dependendo do flavonóide presente.

- **Reação do cloreto de alumínio**

Umedeceram-se áreas diferentes de papel de filtro com o extrato. Colocou-se sobre uma das manchas uma gota de cloreto de alumínio 5% em etanol. Observou-se, sob luz UV, a intensificação da fluorescência verde amarelada.

#### **4.2.3.1.2. Antraquinonas**

##### **4.2.3.1.2.1. Antraquinonas livres**

Agitou-se 1 g da droga em pó com 10 mL de éter etílico. À solução etérea, adicionou-se 1 mL de amônia diluída e agitou-se. A camada aquosa deverá tornar-se rósea no caso positivo.

##### **4.2.3.1.2.2. Glicosídeos antraquinônicos (reação de Borntraeger)**

Ao pó anterior, seco, adicionou-se 20 mL de água e aqueceu-se à ebulição por 5 minutos. Após resfriamento, filtrou-se a solução. Ao filtrado,

juntou-se 10 mL de HCl, 1N, e 3 mL de água oxigenada 30%. Após resfriamento, filtrou-se a solução. Extraiu-se por duas vezes com 5 mL de éter etílico. Juntaram-se as fases etéreas e agitou-se com 3 mL de amônia diluída. A camada aquosa deverá tornar-se rósea em caso positivo.

#### **4.2.3.1.2.3. Glicosídeos cardiotônicos**

Em um béquer colocou-se 5 g de droga vegetal moída, adicionou-se 50 mL de etanol:água (70:30). Submeteu-se a aquecimento suave em BM durante 10 minutos. Após esfriou-se, filtrou-se, e completou-se o volume até 30 mL, lavando o resíduo e o filtro com a mistura etanol/água.

Na purificação, ao filtrado adicionou-se 30 mL de água e 15 mL de acetato de chumbo a 10%. Agitou-se bem e filtrou-se. O filtrado foi transferido para um funil de separação, onde foram realizadas duas extrações sucessivas, com 15 mL de clorofórmio cada vez. Após juntar as fases orgânicas, tratou-se com sulfato de sódio anidro e evaporou-se até a metade do volume (12 mL no mínimo).

#### **4.2.3.1.3. Reações de caracterização de glicosídeos cardiotônicos**

##### **4.2.3.1.3.1. Reação com anel lactônico insaturado**

- **Reação de Legal**

Evaporou-se 2 mL de extrato clorofórmico em um tubo de ensaio. Dissolveu-se o resíduo em 1 mL de piridina e adicionou-se 0,5 mL de NaOH a 10% e 0,5 mL de nitroprussiato de sódio 10%. Deverá aparecer uma coloração vermelha intensa, se positivo.

- **Reação de Kedde**

Evaporou-se 2 mL de extrato em um tubo de ensaio. Dissolveu-se o resíduo com 0,5 mL de reagente de Kedde (ácido 3-5 dinitrobenzóico 1% em MeOH) e adicionou-se 1 mL de uma mistura de NaOH 10% em MeOH 1:1 (v/v), preparada pouco antes do uso. Deverá aparecer uma coloração vermelha violácea até castanho (fugaz).

#### 4.2.3.1.3.2. Reação com desoxi-açúcares

- **Reação de Pesez**

Evaporou-se 2 mL do extrato em um tubo de ensaio. Adicionou-se ao resíduo 1 mL do reagente de Pesez A (Xantidrol 0,5% em MeOH recente) e aqueceu-se aproximadamente 100 °C por 3 minutos. Esfriou-se e colocou-se o reagente de Pesez B (HCl a 2% em ácido acético): Deverá aparecer coloração vermelha. Aqueceu-se novamente.

- **Reação de Keller-Kiliani**

Evaporou-se 2 mL do extrato em um tubo de ensaio. Tratou-se o resíduo com 1 mL de ácido acético, adicionou-se 2 gotas de  $\text{FeCl}_3$  a 2% e transferiu-se o conteúdo deste tubo cuidadosamente para um outro contendo 2 mL de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  concentrado. Na zona de contato dos líquidos deverá aparecer um anel castanho avermelhado, e a camada acética deverá tomar coloração verde-azulada.

- **Reação de Liebermann-Burchard**

Evaporou-se 2 mL do extrato em um tubo de ensaio. Ao resíduo, adicionou-se 1 mL de anidrido acético e 10 gotas de ácido sulfúrico concentrado. Deverá aparecer coloração castanha.

#### **4.2.3.1.4. Taninos**

Preparou-se um decocto (15 minutos) com 5 g da droga vegetal pulverizada e 100 mL de água destilada. Filtrou-se e deixou-se esfriar (solução extrativa A).

##### **4.2.3.1.4.1. Testes de identificação de taninos**

- **Reação de Gelatina**

Misturou-se 2 mL da solução A, com 2 gotas de HCl diluído e solução de gelatina 2,5% gota a gota. No caso positivo haverá formação de precipitado.

- **Reação de sais de ferro**

Misturou-se 2 mL da solução A, com 10 mL de água destilada e 2 a 4 gotas de solução de  $\text{FeCl}_3$  a 1% em metanol. No caso positivo aparecerá coloração azul (taninos hidrolisáveis) ou verde (taninos condensados).

- **Reações de acetato de chumbo**

Misturou-se 5 mL da solução A com 10 mL de solução de ácido acético 10% e 5 mL de solução de acetato de chumbo a 10%. Em caso positivo aparecerá formação de precipitado esbranquiçado (taninos hidrolisáveis).

#### 4.2.3.1.5. Saponinas

Aqueceu-se sob refluxo, durante 10 minutos, 2 g do material vegetal pulverizado com 10 mL de água destilada. Esfriou-se e filtrou-se para um tubo de ensaio, completando-se para 10 mL o volume final. Agitou-se o tubo no sentido do seu comprimento, vedando com uma rolha, durante 15 segundos. Deixou-se em repouso por 15 minutos. Verificou-se em seguida o aparecimento de um anel de espuma persistente, de aproximadamente 1 cm de altura, e que não desaparece pela adição de 1 mL de HCl 2N (20%).

#### 4.2.3.1.6. Alcalóides

Numa primeira etapa, realizou-se a extração em meio alcalino. Foram utilizados 5 g da droga vegetal pulverizada, sendo homogeneizada e alcalinizada com carbonato de cálcio a 10%. Adicionou-se 25 mL de clorofórmio e, depois de homogeneizado, filtrou-se a mistura para um funil de separação através de papel previamente embebido em clorofórmio, agitando o filtrado com 7 mL de HCl 2%. Separou-se a camada superior para a realização das reações de caracterização (precipitação) com os reagentes de Dragendorff, Bouchardat, Mayer e Bertrand, colocando-se uma gota do reagente ao lado de outra da solução ácida em uma lâmina de microscópio, unindo-as posteriormente. A caracterização de alcalóides deu-se pela visualização da reação sob luz ultravioleta.

#### 4.2.3.1.7. Cumarinas

Preparou-se uma solução extrativa com 5 g da droga vegetal em 20 mL de água fervida. Após filtração, adicionou-se HCl 1 M, até que fosse alcançado

pH 1. A solução acidificada foi submetida à partição líquido-líquido com 10 mL de éter etílico. A fase etérea foi concentrada até metade de seu volume e a mesma foi aplicada em duas manchas sobre um pedaço de papel de filtro. Em uma das manchas foi adicionada uma gota de NaOH 1M, sendo esta observada à luz UV (365 nm); na outra mancha não foi aplicado nada. O aparecimento de fluorescência, no primeiro caso, deverá indicar a presença de cumarinas.

#### 4.2.3.2. Perfil cromatográfico

Foi realizada a cromatografia em camada delgada comparativa (CCDC) dos extratos de cascas pulverizadas de *Endopleura uchi*, obtidos por diferentes procedimentos e sob diferentes concentrações. A fase móvel foi composta pela fase orgânica da mistura clorofórmio:acetato de etila:ácido fórmico (5:4:1, v/v/v). A fase estacionária utilizada foi placa de alumínio de gel de sílica 60 F<sub>254</sub>. As amostras foram aplicadas e reveladas com cloreto férrico 2% em metanol, baseado na triagem fitoquímica previamente executada, que indica os taninos como principal classe de metabólitos secundários.

Além disso, foi feito um cromatograma com frações de um extrato preparado por decocção 20% (m/v). O decoccto foi filtrado e submetido à uma partição líquido-líquido com acetato de etila (20 mL, 3 vezes). A fração aquosa e a fração orgânica foram, posteriormente, evaporadas em banho de aquecimento e ressuspensas em metanol para serem analisadas por CCDC. A fase móvel foi composta por acetato de etila:ácido fórmico:água (9:5:1, v/v/v) e a placa foi revelada com cloreto férrico 2% em metanol.

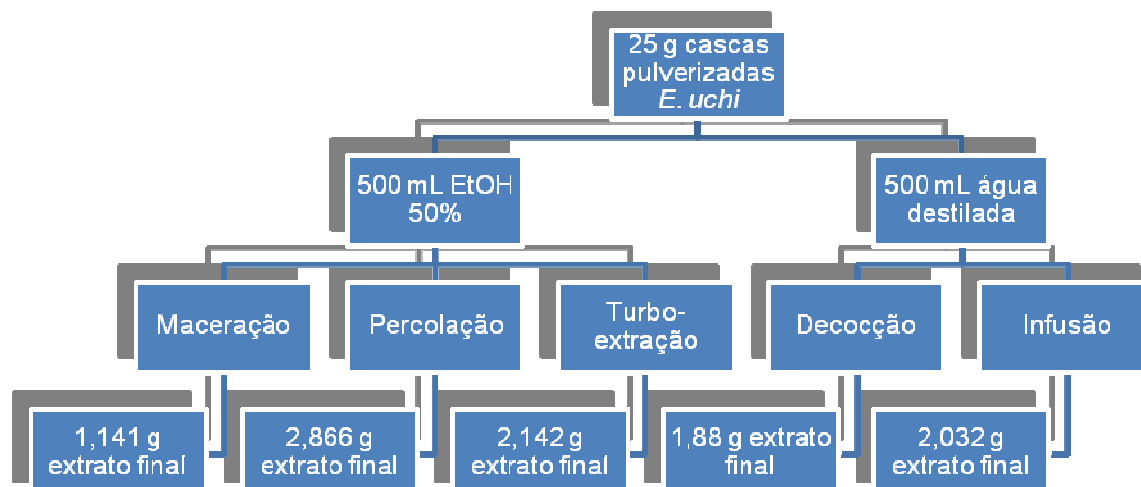
#### 4.2.3.3. Perfil espectrofotométrico na região de luz ultravioleta

Foram pesados, exatamente, 10,0 mg de ácido gálico, de ácido tânico e de cada extrato, dissolvidos em 1 mL de água:metanol (1:1; v/v) e diluídos 1:1000 (v/v) em metanol. A concentração final das soluções de leitura das substâncias padrão e dos extratos foi de 0,01 mg/mL. A leitura de absorvância foi realizada em faixa de 190 a 400 nm de comprimento de onda em espectrofotômetro Shimadzu-1603 com cubetas de quartzo de 1 cm de caminho óptico. As amostras foram lidas frente a branco de metanol (CHOI et al., 2006).

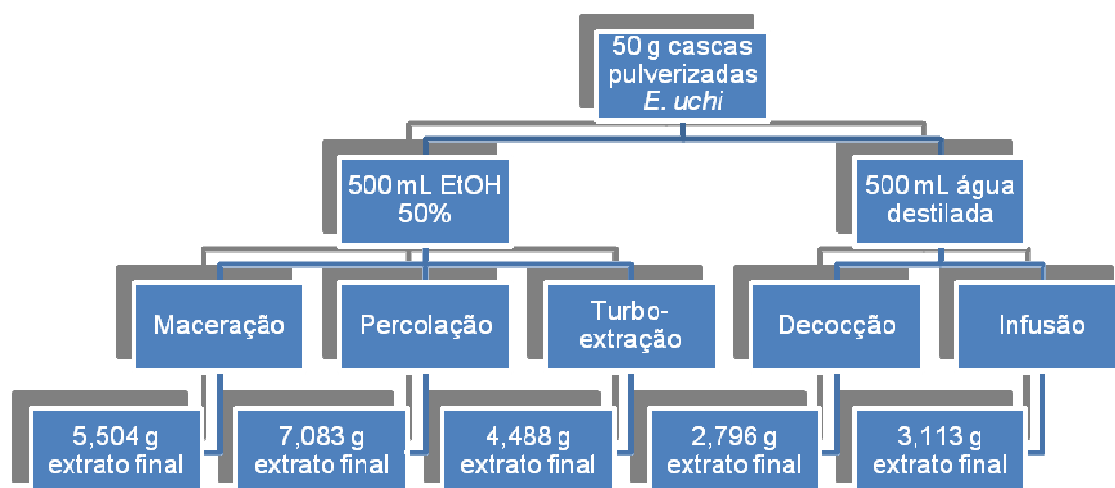
#### 4.2.3.4. Obtenção e rendimento dos extratos

Os extratos vegetais são obtidos fundamentalmente pelo emprego de vegetais secos. Como o principal objetivo é retirar do vegetal diversas possibilidades dentre um universo químico extraordinariamente complexo, a seletividade exigida fundamenta-se em dois principais fatores, as características do solvente e o processo extrativo aplicado (DÄR, 1981; VOIGT e BORNSCHEIN, 1982; PRISTA et al., 1996; ANSEL et al., 2000).

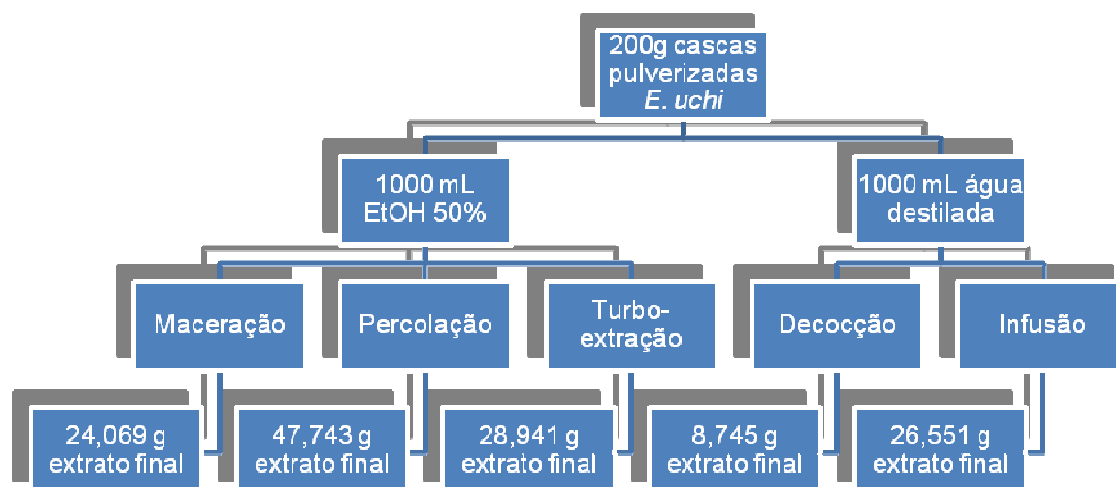
Neste trabalho foram preparados extratos vegetais a 5, 10 e 20% (m/v), de acordo com as Figuras 3, 4 e 5, segundo diferentes procedimentos: (1) maceração, (2) turboextração, (3) percolação, (4) infusão, (5) decocção. Nos três primeiros procedimentos, utilizou-se etanol (50%) como solvente e nos dois últimos, água destilada.



**FIGURA 3.** Fluxograma de obtenção e rendimento dos extratos de *Endopleura uchi* a 5% (m/v).



**FIGURA 4.** Fluxograma de obtenção e rendimento dos extratos de *Endopleura uchi* a 10% (m/v).



**FIGURA 5.** Fluxograma de obtenção e rendimento dos extratos de *Endopleura uchi* a 20% (m/v).

#### 4.2.3.4.1. Obtenção de extratos por percolação

Na obtenção de extratos por percolação foi usado o Processo Geral P, descrito na Farmacopéia dos Estados Unidos do Brasil, 1959. Foi utilizado como solvente extrator etanol 50% (EtOH 50%). Para o preparo de extrato a 5% (m/v) foram utilizados 25 g de cascas pulverizadas de *E. uchi* para 500 mL de solvente; para o extrato 10% (m/v) foram utilizados 50g de cascas pulverizadas de *E. uchi* para 500 mL de solvente e para o preparo do extrato a 20% (m/v) foram utilizados 200 g de cascas pulverizadas de *E. uchi* para 1000 mL de solvente.

Todos os extratos assim obtidos foram evaporados. Após rotaevaporação, o fim da secagem foi realizado em capela, à temperatura ambiente, até que atingisse massa constante. Os extratos obtidos foram pesados e armazenados em dessecador para evitar que incorporassem umidade.

#### 4.2.3.4.2. Obtenção dos extratos por maceração

Para o preparo dos extratos foi utilizado como solvente extrator EtOH 50%. Para o preparo de extrato a 5% (m/v) foram utilizados 25 g de cascas pulverizadas de *E. uchi* para 500 mL de solvente; para o extrato 10% (m/v) foram utilizados 50g de cascas pulverizadas de *E. uchi* para 500 mL de solvente e para o preparo do extrato a 20% (m/v) foram utilizados 200 g de cascas pulverizadas de *E. uchi* para 1000 mL de solvente. Essas soluções foram mantidas durante duas semanas em vidros âmbar, sob o abrigo da luz e com agitações ocasionais. Após, procedeu-se à filtração do líquido extrativo, que, em seguida, foi posto em rotaevaporador, sob pressão reduzida, à temperatura de banho-maria de 40-50 °C, até quase a secura. Após rotaevaporação, o fim da secagem foi realizado em capela, à temperatura ambiente, até que atingisse massa constante. Os extratos obtidos foram pesados e armazenados em dessecador para evitar que incorporassem umidade.

#### 4.2.3.4.3. Obtenção dos extratos por turbo-extração

Para o preparo dos extratos foi utilizado como solvente extrator EtOH 50%. Para o preparo de extrato a 5% (m/v) foram utilizados 25 g de cascas pulverizadas de *E. uchi* para 500 mL de solvente; para o extrato 10% (m/v) foram utilizados 50 g de cascas pulverizadas de *E. uchi* para 500 mL de solvente e para o preparo do extrato a 20% (m/v) foram utilizados 200 g de cascas pulverizadas de *E. uchi* para 1000 mL de solvente. As soluções foram colocadas no turbo-extrator e processadas por 30 minutos, em intervalos de 10 min, para o resfriamento do sistema. Após, as soluções foram filtradas a vácuo

e rotaevaporadas, sob pressão reduzida, até quase *secura*. Após a rotaevaporação, o fim da secagem foi realizado em capela, à temperatura ambiente, até que atingisse massa constante. Os extratos obtidos foram pesados e armazenados em dessecador para evitar que incorporassem umidade.

#### **4.2.3.4.4. Obtenção dos extratos por decocção**

Para o preparo de extrato a 5% (m/v) foram utilizados 25 g de cascas pulverizadas de *E. uchi* para 500 mL de água destilada; para o extrato 10% (m/v) foram utilizados 50g de cascas pulverizadas de *E. uchi* para 500 mL de água destilada e para o preparo do extrato a 20% (m/v) foram utilizados 200 g de cascas pulverizadas de *E. uchi* para 1000 mL de água destilada. As soluções foram postas em béqueres e levadas à chapa aquecida a 100 °C. Aqueceu-se por 15 minutos. As soluções foram filtradas e então liofilizadas. Os extratos obtidos foram pesados e armazenados em dessecador para evitar que incorporassem umidade.

#### **4.2.3.4.5. Obtenção dos extratos por infusão**

Para o preparo de extrato a 5% (m/v) foram utilizados 25 g de cascas pulverizadas de *E. uchi* para 500 mL de água destilada; para o extrato 10% (m/v) foram utilizados 50g de cascas pulverizadas de *E. uchi* para 500 mL de água destilada e para o preparo do extrato a 20% (m/v) foram utilizados 200 g de cascas pulverizadas de *E. uchi* para 1000 mL de água destilada. Após ebulição da água, a mesma foi despejada sobre o material vegetal num béquer, e o sistema foi mantido tampado por 15 minutos. As soluções foram filtradas e

então liofilizadas. Os extratos obtidos foram pesados e armazenados em dessecador para evitar que incorporassem umidade.

#### **4.2.4. ANÁLISE QUANTITATIVA**

##### **4.2.4.1 Determinação do teor de fenóis totais**

A análise do extrato foi feita em espectrofotômetro, em comprimento de onda de 730 nm, utilizando cubetas de quartzo de 1 cm de caminho óptico. Como branco utilizou-se a solução obtida pela mistura entre 0,5 mL do reagente de Folin-Denis e 1 mL de solução de carbonato de sódio 30% (m/v), ajustando-se o volume a 10 mL com água destilada.

A concentração de fenóis totais do extrato foi determinada utilizando-se uma curva analítica estabelecida com soluções de concentração conhecida do polifenol ácido tânico. Os resultados foram expressos, pela média de três determinações, em porcentagem da concentração de fenóis totais frente à concentração inicial de leitura das amostras (AOAC, 1984; TEIXEIRA et al., 1990), mais ou menos os desvios-padrões. Esses dados foram analisados estatisticamente em nível de segurança de 95%.

##### **4.2.4.1.1. Preparo da solução padrão de ácido tânico**

Foram dissolvidos 10 mg de ácido tânico em água destilada, completando o volume para 100 mL em balão volumétrico. Foram tomadas alíquotas de 0,1 a 0,5 mL desta solução, recém-preparada, adicionando-se 7 mL de água destilada e 0,5 mL do reagente Folin-Denis. Após 3 minutos de agitação, foi adicionado 1 mL de solução saturada de carbonato de sódio (35 g de

carbonato de sódio anidro dissolvido em 100 mL de água destilada a 70-80 °C) e o volume ajustado para 10 mL com água destilada. A leitura foi feita 30 minutos após a reação colorimétrica a qual a solução foi submetida, em triplicata, ao abrigo de luz.

#### **4.2.4.1.2. Preparo das soluções de amostra**

Amostras de 0,200 g das cascas pulverizadas de *E. uchi*, exatamente pesadas, foram transferidas para balão volumétrico de 10 mL, completando-se o volume com água destilada. Desta primeira solução, foram transferidos 100 µL para balão volumétrico de 20 mL, completando-se o volume com água destilada. Desta segunda solução, uma alíquota de 0,5 mL foi adicionada à 7 mL de água destilada e mais 0,5 mL de solução de Folin-Denis, sendo esta nova solução, mantida por agitação por cerca de 3 minutos. Após este tempo, foi adicionado 1 mL de solução de carbonato de sódio 30% (m/v) e o volume completado com água destilada em balão volumétrico de 10 mL. A reação colorimétrica das amostras, em triplicata, foi determinada por leituras realizadas após 30 minutos da adição do último reagente.

#### **4.2.4.1.3. Cálculo do teor de fenóis totais**

A concentração de fenóis totais do extrato foi determinada, utilizando-se a curva analítica estabelecida com soluções de concentração conhecida do polifenol ácido tânico. Os resultados foram expressos pela média de três determinações, em porcentagem da concentração de fenóis totais frente à concentração inicial de leitura das amostras (0,005 mg/mL).

#### 4.2.4.2. Doseamento de taninos totais em extratos vegetais

A metodologia utilizada foi baseada e adaptada do trabalho de Glasl (1983) e da Farmacopéia Brasileira IV (1996). No doseamento de taninos totais para a droga vegetal, está referenciado na literatura o uso de 0,750 g da amostra. Porém, para os extratos, foi necessário proceder a uma pequena correção (YAMAGUTI-SASAKI et al., 2007). Assim, a quantidade de amostra pesada para cada extrato foi obtida de acordo com o seguinte cálculo (a porcentagem de resíduo seco corresponde ao teor de extrativos (TE) de cada um dos extratos, obtidos separadamente):

$$M_{\text{extrato}} = (\%) \text{ resíduo seco do extrato (TE)} \times 0,750 / 100$$

Cada amostra foi transferida para erlenmeyer com 150,0 mL de água purificada, e deixada durante 30 minutos em banho termostático à temperatura de 80-90 °C. Após este período, o erlenmeyer foi resfriado em água corrente e o seu conteúdo transferido quantitativamente para balão volumétrico de 250 mL, aferindo-se o volume. Após a homogeneização, todo o conteúdo foi filtrado desprezando-se os primeiros 50,0 mL, e o filtrado restante foi acondicionado sob proteção da luz, sendo denominado de solução-mãe (SM). Para a determinação de polifenóis totais (PT), 5,0 mL da SM foram diluídos com água purificada em balão volumétrico de 25,0 mL. Desta solução, 2,0 mL foram transferidos e adicionados de 1,0 mL de solução de ácido fosfotúngstico (Reagente fenólico de Folin-Ciocalteu 2 N) para balão volumétrico de 25,0 mL, sendo completado o volume com solução de carbonato de sódio a 10,6%. Após 3 minutos da adição da última solução foi medida a absorvância a 730 nm, sendo empregada a água como branco. Para

determinação de polifenóis não adsorventes (PNA), 10,0 mL de SM foram transferidos e adicionados de 0,10 g de pó-de-pele (Merck®) para béquer e agitados durante 60 minutos. Após, a solução foi filtrada e 5,0 mL do filtrado foram diluídos com água purificada para 25,0 mL em balão volumétrico. A seguir, 2,0 mL do filtrado desta solução foram transferidos e adicionados de 1,0 mL de solução de ácido fosfotúngstico (Reagente fenólico de Folin-Ciocalteu 2N) para balão volumétrico de 25,0 mL sendo completado o volume com solução de carbonato de sódio a 10,6%. Após 3 minutos da adição da última solução foi medida a absorvância a 730 nm, sendo empregada a água como branco. O conjunto de operações (extrações e diluições) foi realizado sob proteção da ação da luz direta, e o valor de comprimento de onda utilizado, 730 nm, foi obtido através de uma varredura espectrofotométrica realizada previamente com as amostras e também com o padrão ácido gálico. Os resultados foram expressos pela média de três determinações, mais ou menos os desvios-padrões. Esses dados foram analisados estatisticamente em nível de segurança de 95%.

A porcentagem de taninos totais foi calculada segundo as fórmulas:

$$PT = 15625 \times \text{Abs} / 1000 \times m \quad \text{PNA} = 15625 \times \text{Abs} / 1000 \times m$$

$$TT = PT - \text{PNA}$$

Em que: PT = Polifenóis totais (%), PNA = Polifenóis não adsorventes (%), Abs = Absorvância medida, m = massa da amostra em gramas, TT = teor de taninos totais (%).

#### 4.2.5. Determinação da capacidade de sequestro de radicais livres

O potencial de atividade antioxidante dos extratos foi determinado baseado na atividade sequestrante da solução de 2,2-difenil-1-picrilhidrazila (DPPH) (MACHADO, 2005; FALCÃO et al., 2006). Foi utilizado ácido gálico, rutina e vitamina C, na concentração de 250 µg/mL em metanol, como substâncias reconhecidamente antioxidantes (BROGGINI, 2006). O extrato de *Ginkgo biloba* L., adquirido da empresa Santosflora (Anexo 2) também foi utilizado neste teste, na concentração de 250 µg/mL em metanol, por ter uma reconhecida atividade antioxidante (FALCÃO et al., 2006). Os testes foram feitos com os mesmos extratos utilizados nos ensaios biológicos, selecionados por apresentarem os maiores teores de taninos totais: decocção 20% (m/v); infusão 10% (m/v); maceração 5% (m/v) (EtOH 50%), percolação 10% (m/v) (EtOH 50%); turbo-extração 20% (m/v) (EtOH 50%). A 1 mL das soluções de amostra foram adicionados 2,5 mL da solução de DPPH 0,004% em metanol. As soluções foram agitadas em vórtex e mantidas no escuro por 30 minutos a temperatura ambiente. A leitura foi feita posteriormente a este período, a 517 nm, em espectrofotômetro, com cubetas de quartzo de 1 cm de caminho óptico. A solução utilizada como branco consistiu em 1 mL da solução metanólica de amostra e 2,5 mL de metanol. Foi utilizada solução de 1 mL de metanol e 2,5 mL de solução de DPPH como controle negativo. A atividade anti-radicalar foi calculada como a porcentagem de descoloração do radical DPPH, segundo a equação:

$$\% \text{ descoloração do DPPH} = (A_d - A_a) \times 100 / A_d$$

Em que:  $A_a$  = absorvância da amostra;  $A_d$  = absorvância da solução de DPPH (controle negativo)

Os valores calculados representam a média de três determinações, mais ou menos os desvios-padrões. Para análise estatística, executamos o teste de análise de variância ANOVA, para  $P < 0,05$ .

#### **4.2.6. DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA**

A atividade antimicrobiana dos extratos de *E. uchi* foi avaliada pelo método de difusão em ágar, utilizando-se “templates” e discos de papel.

##### **4.2.6.1. Preparo dos antibióticos**

O antibiótico ampicilina foi utilizado como substância de controle positivo, uma vez que as cepas bacterianas utilizadas são sensíveis à sua ação. Partindo de uma solução-mãe de 500 mg/L, foi diluído na proporção 1:10 (m/v) em Brain Heart Infusion (BHI), de maneira que a concentração dessa solução estoque fosse de 50 µg/mL.

A anfotericina B foi o antifúngico usado como controle positivo para a cepa de *Candida albicans*. Foram dissolvidos 16 mg de anfotericina B em 10 mL de dimetilsulfóxido (DMSO) (solução estoque de 16 µg/mL) sendo diluídos, posteriormente, duas vezes na proporção 1:5 (m/v) em BHI.

##### **4.2.6.2. Solução estoque de extrato**

Ressuspendeu-se 200 mg dos seguintes extratos de cascas pulverizadas de *Endopleura uchi* em 1 mL de solução de DMSO e Tween<sup>®</sup> 80 10% (v/v): decocção 20% (m/v); infusão 10% (m/v); maceração 5% (m/v) (EtOH 50%), percolação 10% (m/v) (EtOH 50%); turbo-extração 20% (m/v) (EtOH 50%).

#### 4.2.6.3. Preparo da suspensão de bactéria

Uma colônia de cada cepa bacteriana utilizada, ou aproximadamente 150  $\mu\text{L}$  de suspensão bacteriana previamente preparada e armazenada sob refrigeração adequada, foi inoculada em BHI e incubada a 37 °C durante 24 horas. A partir deste inóculo foi padronizada a turvação até escala 0,5 de Mc Farland ( $\sim 1,5 \times 10^8$  células/mL) em solução salina 0,9%.

#### 4.2.6.4. Preparo da suspensão de levedura

Cinco colônias de *Candida albicans* foram inoculadas em caldo Sabouraud e incubadas a 35 °C durante 48 horas. A partir deste inóculo foi padronizada a turvação até escala 0,5 de Mc Farland (de  $1 \times 10^6$  a  $5 \times 10^6$  leveduras/mL) em solução salina 0,9%.

#### 4.2.6.5. Teste de difusão em ágar com templates

O teste de difusão em ágar foi realizado baseado na Norma M2-A8 do Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) de 2003, porém com algumas modificações (NCCLS, 2003a).

As placas de Petri receberam ágar Müller Hinton, sobre as quais foram adicionadas 150  $\mu\text{L}$  de suspensão bacteriana em concentração adequada (escala 0,5 McFarland). Nos testes para *Candida albicans*, as placas de Petri receberam ágar Müller Hinton suplementado com 2% de glicose e 0,5  $\mu\text{g/mL}$  de azul de metileno, sobre o qual foram adicionados 100  $\mu\text{L}$  da suspensão desta levedura previamente diluída. Depois de homogeneizadas, as placas receberam os “templates” com 6 orifícios de 6 mm de diâmetro interno. Cada poço recebeu separadamente 50  $\mu\text{L}$  de solução de ampicilina/anfotericina B; 50

$\mu\text{L}$  de cada extrato de *E. uchi* utilizado e 50  $\mu\text{L}$  de solução de DMSO-BHI como controle negativo (DMSO e BHI diluídos na proporção 1:1 v/v) colocado nas placas. Antes da incubação a 37 °C por 24-48 horas, as placas foram deixadas 1 hora a temperatura de 4° C para permitir a difusão das amostras. A inibição do crescimento bacteriano e/ou fúngico foi determinada pela medida dos halos ao redor dos poços com auxílio do paquímetro digital, e foi expressa como a média de três determinações.

#### **4.2.6.6. Teste de difusão em ágar com discos de papel**

O teste de difusão em ágar foi realizado baseado na Norma M2-A8 do Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) de 2003 (NCCLS, 2003a).

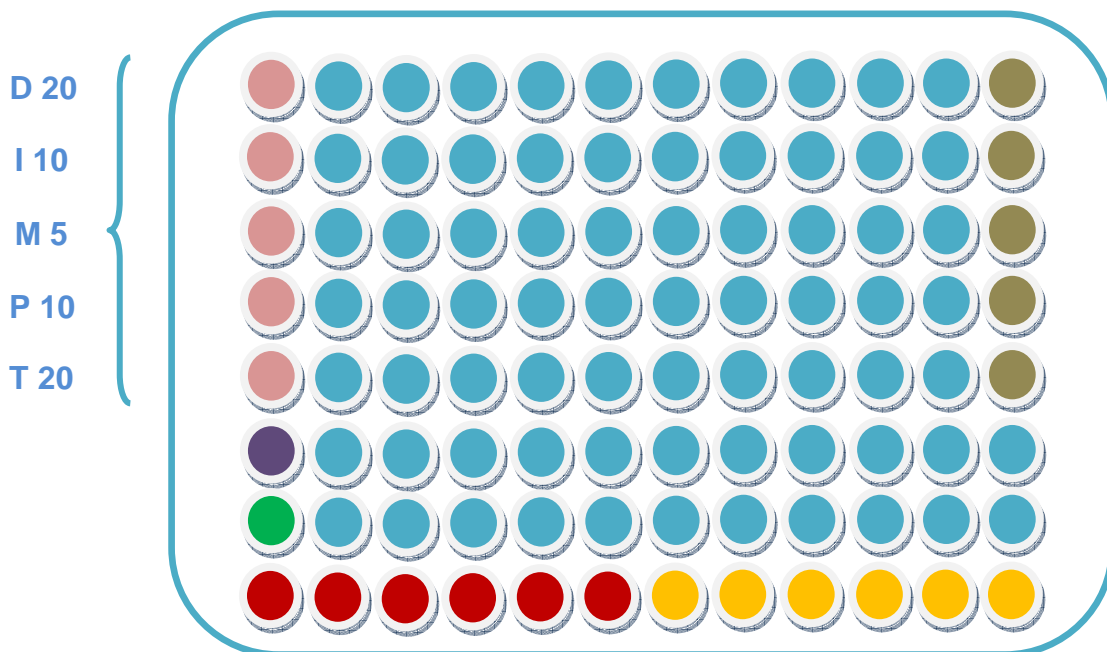
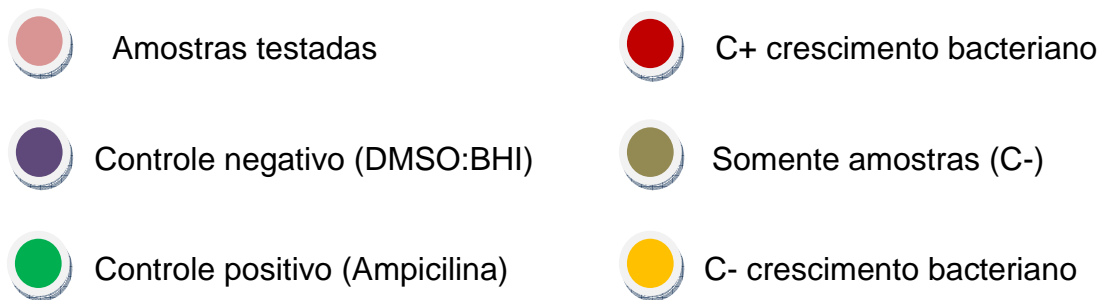
As placas de Petri receberam ágar Müeller Hinton, sobre as quais foram adicionadas 150  $\mu\text{L}$  de suspensão bacteriana em concentração adequada. Nos testes para *Candida albicans* as placas de Petri receberam ágar Saboraud, sobre o qual foram adicionados 100  $\mu\text{L}$  da suspensão desta levedura previamente diluída. Depois de homogeneizadas, discos de papel com 6 mm de diâmetro, impregnados com 40  $\mu\text{L}$  dos extratos a serem testados, 40  $\mu\text{L}$  da solução controle DMSO:BHI (1:1, v/v) e 40  $\mu\text{L}$  dos antibióticos (ampicilina/anfotericina B) foram colocados sobre a superfície do ágar MH inoculado. Antes da incubação a 37 °C por 24-48 horas, as placas foram deixadas 1 hora a temperatura de 4° C para permitir a difusão das amostras. A inibição do crescimento bacteriano e/ou fúngico foi determinada pela medida dos halos ao redor dos discos com auxílio do paquímetro digital, e foi expressa como a média de três determinações.

#### **4.2.6.7. Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) através do método de diluição em microplaca e concentração bactericida mínima (CBM)**

Foi determinada a Concentração Inibitória Mínima (CIM) utilizando diluição em microplaca, com modificações, segundo a Norma M7-A6 do Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) de 2003 (NCCLS, 2003b).

Em todos os poços foram colocados 100  $\mu$ L de BHI. Os extratos foram diluídos 1:5 em BHI a partir da solução estoque de 200 mg/mL, obtendo-se soluções teste de 10 mg/mL. Foram pipetados 100  $\mu$ L de cada uma destas soluções nos respectivos poços da primeira coluna da microplaca (linhas 1 a 5). Um poço foi utilizado para adição de 100  $\mu$ L de DMSO:BHI (1:5; v/v) para controle do solvente (linha 6) e em outro poço foram colocados 100  $\mu$ L da solução de ampicilina anteriormente preparada (linha 7). Foram realizadas diluições seriadas, transferindo-se 100  $\mu$ L do poço anterior para o poço subsequente. A linha 8 foi utilizada para controle positivo do crescimento bacteriano e para controle negativo de esterilidade do meio. Na coluna 12 foram colocados 50  $\mu$ L da solução teste dos extratos para controle microbiológico destes. A todos os poços, exceto os de controle de esterilidade do meio e microbiológico dos extratos, foram adicionados 100  $\mu$ L da suspensão bacteriana diluída 1:300 (v/v) em BHI (Figura 6). As microplacas foram incubadas por 24 horas a 37 °C. A inibição do crescimento bacteriano foi evidenciada pela adição de 20  $\mu$ L de uma solução aquosa de 0,01 % de resazurina após incubação a 37 °C por 1 hora, e foi determinada como concentração inibitória mínima a menor concentração que inibiu o crescimento bacteriano. Os testes foram realizados em duplicata.

Após, foi realizada uma subcultura de cada microplaca, utilizando Müller Hinton Agar em placa de Petri de 12 cm de diâmetro, determinando o valor da concentração bactericida mínima. As placas de Petri foram incubadas por 24 horas a 37 °C. A concentração bactericida mínima foi então observada pela ausência ou presença de crescimento bacteriano.



**FIGURA 6.** Esquema da microplaca utilizada para determinação da concentração inibitória mínima para bactérias (a primeira concentração é de 10 mg/mL com subsequente diluição 1:1).

#### 4.2.7. TESTE DE TOXICIDADE ORAL AGUDA EM CAMUNDONGOS

Para este teste, seguindo as diretrizes da OECD (Organization for Economic Co-operation and Development), Guideline 423, foram utilizados 20 camundongos (*Mus musculus*) Swiss, machos adultos, pesando entre 29-35 g, distribuídos em 4 grupos (n = 5), de acordo com as doses recebidas por via oral. As doses foram únicas e administradas nas concentrações 500 mg/kg, 1000 mg/kg, 2000 mg/kg de extrato obtido por decocção 20% (m/v) de *Endopleura uchi*, utilizando água destilada para o grupo controle. Os animais foram mantidos em caixas, em sala com ciclo claro-escuro de 12 horas e temperatura de 20 °C. Permaneceram em jejum 12 horas antes da administração dos extratos e voltaram a receber ração e água somente 4 horas após a administração dos extratos (BRITO, 1994). Foram observados nos primeiros 30, 60, 120, 240 e 360 minutos e a cada 24 horas durante 14 dias, observando-se o aparecimento de parâmetros tais como alteração da locomoção, frequência cardíaca e respiratória, piloereção, diarreia, sialorréia, hipnose, convulsões e número de óbitos.

Esta pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, UNESP, Araraquara (SP) (Anexo 3).

#### 4.2.8. TESTE DA MOTILIDADE INTESTINAL EM CAMUNDONGOS

No ensaio de trânsito intestinal foi utilizado o extrato obtido por decocção 20% (m/v) de *E. uchi*, ressuspendido em solução fisiológica. Foram constituídos 2 grupos experimentais com 10 animais cada, sendo que um grupo foi tratado com o extrato aquoso de *E. uchi* (200 mg/kg), e o outro com

solução fisiológica (10 mL/kg), como controle negativo, os quais receberam as soluções por via oral através de “gavage”. Após 90 minutos, os animais receberam a suspensão de carvão ativo 10% em solução de goma arábica 5%, 0,5 mL/animal, também através de “gavage”. Decorridos 45 minutos, os camundongos foram sacrificados em câmara de CO<sub>2</sub> e foi realizada a extirpação imediata do intestino desde o piloro até o início do ceco. Assim, foi feita a medida do comprimento total do intestino delgado e da distância percorrida pela suspensão de carvão ativo. A atividade sobre o trânsito intestinal foi determinada segundo Janssen e Jageneau (1957) e Wong e Wai (1981). A análise estatística foi realizada pelo teste-t de Student ( $P < 0,05$ ).

Esta pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, UNESP, Araraquara (SP) (Anexo 3).

#### **4.2.9. AVALIAÇÃO DE CITOTOXICIDADE**

A citotoxicidade foi realizada frente a células fibroblásticas de córnea de coelho da linhagem SIRC CCL-60. Estas células foram mantidas em garrafas de cultura incubadas em estufa a 37 °C sob atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> em meio Eagle (pH 7) suplementado 15% de soro bovino fetal e sem bicarbonato de sódio.

##### **4.2.9.1. Preparo das amostras**





Dissolvemos 10 mg de cada um dos seguintes extratos em 1 mL de DMSO: decocção 20% (m/v); infusão 10% (m/v); maceração 5% (m/v) (EtOH 50%), percolação 10% (m/v) (EtOH 50%); turbo-extração 20% (m/v) (EtOH

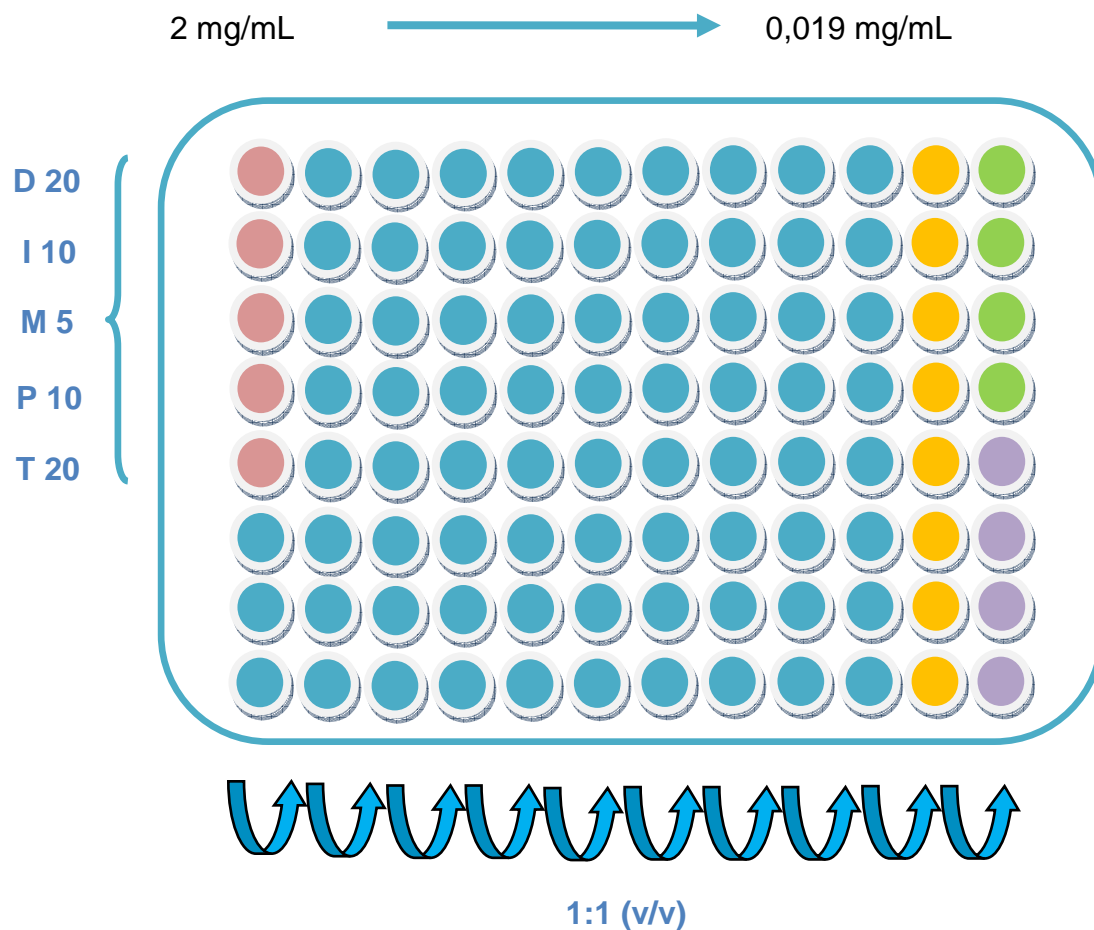
50%. A seguir, a partir dessas soluções-estoque iniciais, foi feita uma nova diluição 1:5 (m/v) em meio Eagle, obtendo-se as soluções-teste.

#### 4.2.9.2. Avaliação da citotoxicidade dos extratos

A técnica consistiu em coletar as células crescidas nas garrafas de cultura por raspagem, centrifugá-las a 1500 rpm por 10 minutos e contá-las com auxílio do corante Turk, em câmara de Neubauer, ajustando para a concentração de  $1 \times 10^5$  células/mL em meio Eagle suplementado. As células desta suspensão foram incubadas em microplaca de 96 poços a 37 °C em atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> por 72 h. Após este período, foi observada a formação de tapete celular e, subseqüentemente, foi retirado o meio existente, já inadequado para a manutenção celular. Foram colocados 100 µL de meio novo, exceto no primeiro poço de cada linha no qual foram colocados 180 µL de meio Eagle suplementado, e 20 µL das amostras de *E. uchi*. Posteriormente, em cada linha foi realizada uma diluição seriada 1:1 (v/v) nos demais poços da microplaca. A coluna 11 foi utilizada como controle do solvente colocando-se 20 µL de solução DMSO:Eagle (1:5; v/v), e quatro poços da coluna 12 foram utilizados para controle positivo do crescimento celular e quatro como controle negativo de ausência de crescimento. A concentração inicial dos extratos testados foi de 2 mg/mL, seguindo-se diluições seriadas na proporção 1:1 (v/v) (Figura 7). A microplaca foi incubada por 24 h a 37 °C em estufa com atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> (LEI et al., 2008; OHNO et al., 1998; TAKAHASHI et al., 2008). Posteriormente, adicionaram-se 15 µL de solução aquosa de resazurina 0,1 mg/mL, incubando a microplaca em estufa sob atmosfera a 5% de CO<sub>2</sub> a 37 °C para leitura após 3 h. A leitura dos resultados

foi feita visualmente pela diferenciação entre a cor azul (ausência de células vivas) e cor-de-rosa (presença de células vivas) (O'BRIEN et al., 2000) e por meio de leitor de fluorescência utilizando filtros de 530 e 590 nm.

-  180  $\mu$ L Eagle suplementado + 20  $\mu$ L amostras
-  20  $\mu$ L DMSO:Eagle (5:1 v/v)
-  Controle positivo do crescimento
-  Controle negativo do crescimento



**FIGURA 7.** Representação esquemática da avaliação de citotoxicidade de extratos vegetais de *E. uchi* em microplaca de 96 poços.

#### 4.2.10. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram expressos como a média de três determinações  $\pm$  os desvios-padrões dos valores obtidos, utilizando-se o programa Microsoft Office Excel 2007<sup>®</sup>. Quando conveniente, foi realizado o teste-t de Student ou a análise de variância ANOVA, com  $P < 0,05$ .

## 5. RESULTADOS

### 5.1. ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS

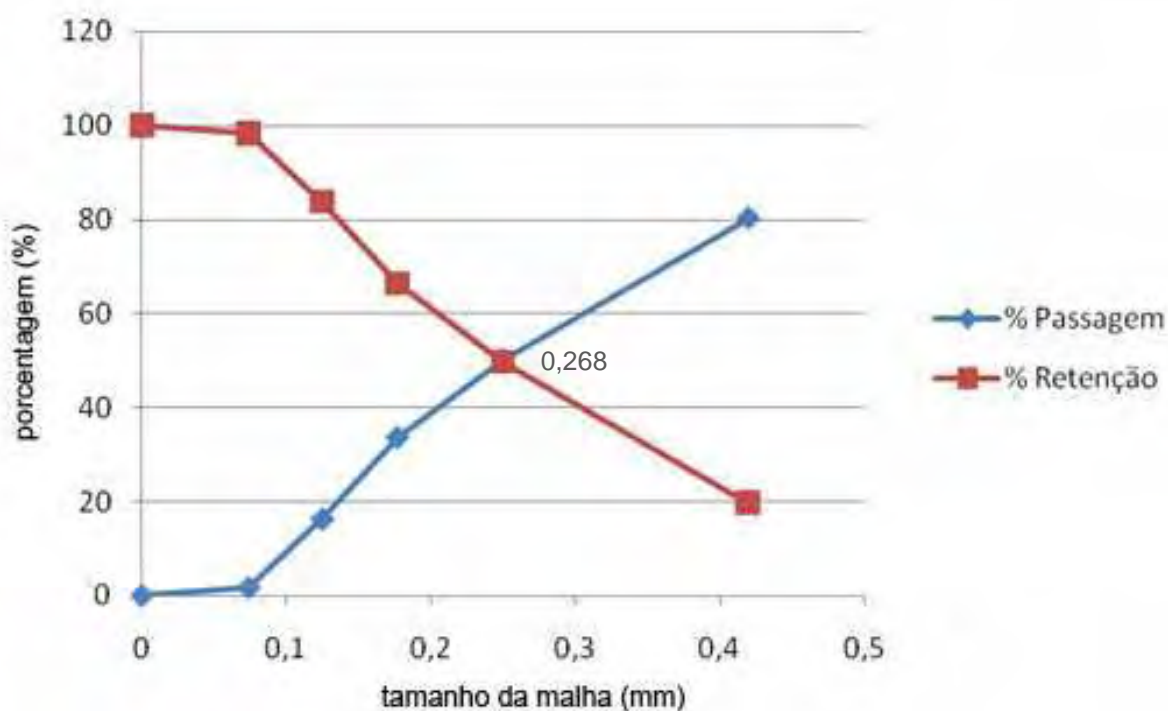
#### 5.1.1. Granulometria

Os resultados da avaliação da granulometria estão apresentados na Tabela 2. A aplicação de análise estatística dos resultados, expressos na Tabela 2 e demonstrada na Figura 8, revela um diâmetro médio de partículas de  $0,268 \text{ mm} \pm 0,01$ .

**TABELA 2.** Porcentagens cumulativas de passagem e de retenção do pó das cascas pulverizadas de *Endopleura uchi* (Huber) Cuatrec. (Humiriaceae).

Tamanho da malha (mm)	% Passagem	% Retenção
0	0	100
0,074	1,74	98,2
0,125	16,25	83,74
0,177	33,67	66,33
0,250	50,33	49,67
0,420	80,38	19,62

Média de três determinações



**FIGURA 8.** Tamanho médio da partícula das cascas pulverizadas de *Endopleura uchi*.

### 5.1.2. Determinação do pH

Em relação ao pH do pó das cascas pulverizadas de *E. uchi*, apresenta-se o valor da média de três determinações na Tabela 3. O valor do pH da água destilada foi de 6,77.

**TABELA 3.** Média dos valores de pH do pó das cascas pulverizadas de *Endopleura uchi* (Huber) Cuatrec. e pH da água destilada utilizada.

pH da água destilada	Média do valor de pH $\pm$ DP
6,77	4,85 $\pm$ 0,01

DP = desvio padrão

### 5.1.3. Determinação da densidade aparente não compactada

A Tabela 4 apresenta os valores das três determinações, em g/mL, da densidade aparente não compactada das cascas pulverizadas de *E. uchi*.

**TABELA 4.** Densidade aparente de três amostras de cascas pulverizadas de *E. uchi*, obtidas comercialmente

Amostras	Proveta (g)	Proveta Cheia (g)	Densidade (g/mL)
Amostra 1	98,432	156,286	0,578
Amostra 2	97,427	149,325	0,519
Amostra 3	97,104	151,281	0,542

A densidade aparente não compactada média encontrada foi de 0,546 g/mL  $\pm$  0,03.

### 5.1.4. Determinação do teor de cinzas totais

A Tabela 5 apresenta os valores das três determinações, em porcentagem relativa à massa de amostra inicialmente pesada, do teor de cinzas totais apresentado pelo pó das cascas pulverizadas de *E. uchi* obtido comercialmente.

**TABELA 5.** Teor de cinzas totais de cascas pulverizadas de *E. uchi*

Amostras	massa inicial (g)	massa cinzas (g)	teor cinzas (%)
Amostra 1	3,004	0,175	5,83
Amostra 2	3,001	0,201	6,70
Amostra 3	3,007	0,214	7,12

Assim, foi encontrado um valor médio de teor de cinzas totais de  $6,55\% \pm 0,65$ .

#### 5.1.5. Determinação da perda por dessecação em balança com infravermelho (INFRATEST)

A Tabela 6 apresenta o decréscimo de massa das amostras iniciais de cascas pulverizadas de *Endopleura uchi*.

**TABELA 6.** Decréscimo de massa das amostras iniciais do pó das cascas pulverizadas de *Endopleura uchi* (Huber) Cuatrec.

Pesagem	Amostra 1	Amostra 2	Amostra 3
1	4,032	4,01	4,021
2	3,881	3,715	3,798
3	3,846	3,701	3,773
4	3,829	3,699	3,764
5	3,819	3,698	3,758
6	3,812	3,696	3,754
7	3,811	3,691	3,751
8	3,811	3,691	3,751

Os cálculos revelaram uma perda porcentual média de massa de  $6,72\% \pm 1,23$ .

### 5.1.6. Determinação da perda por dessecação em estufa

Após cada pesagem, foi calculada a média de massa perdida, a partir de uma amostra inicial de 2 g de pó das cascas de *E. uchi*. Assim, seguem na tabela 7 os valores de perda, em gramas, de massa das amostras iniciais da droga vegetal.

**TABELA 7.** Decréscimo de massa das amostras iniciais do pó das cascas pulverizadas de *Endopleura uchi* (Huber) Cuatrec.

Pesagem	Amostra 1	Amostra 2	Amostra 3
1	27,630	27,430	26,960
2	27,525	27,274	26,814
3	27,523	27,272	26,813
4	27,520	27,269	26,809
5	27,519	27,268	26,808
6	27,519	27,268	26,808

A média da massa perdida total, após todas as pesagens, foi de 0,1417g. Assim, foi obtida uma perda por dessecação de 7,08%  $\pm$  1,35 em massa da amostra inicial do pó das cascas pulverizadas de *E. uchi*.

### 5.1.7. Determinação do teor de extrativos para a droga

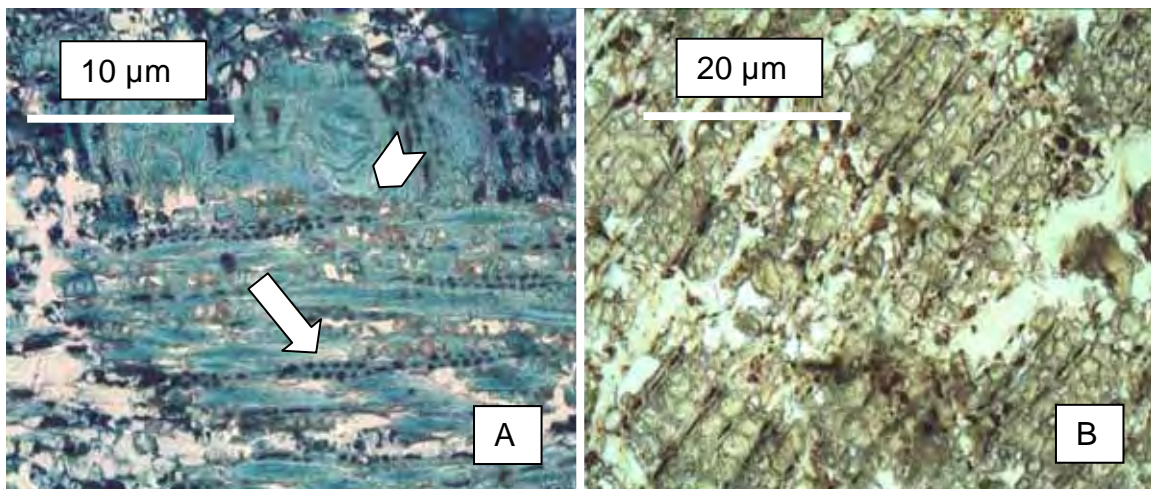
O valor médio do teor de extrativos encontrado para a droga foi de 13,77%  $\pm$  2,04. Esse valor corresponde à média de três determinações.

## 5.2. ANÁLISES MICROSCÓPICAS

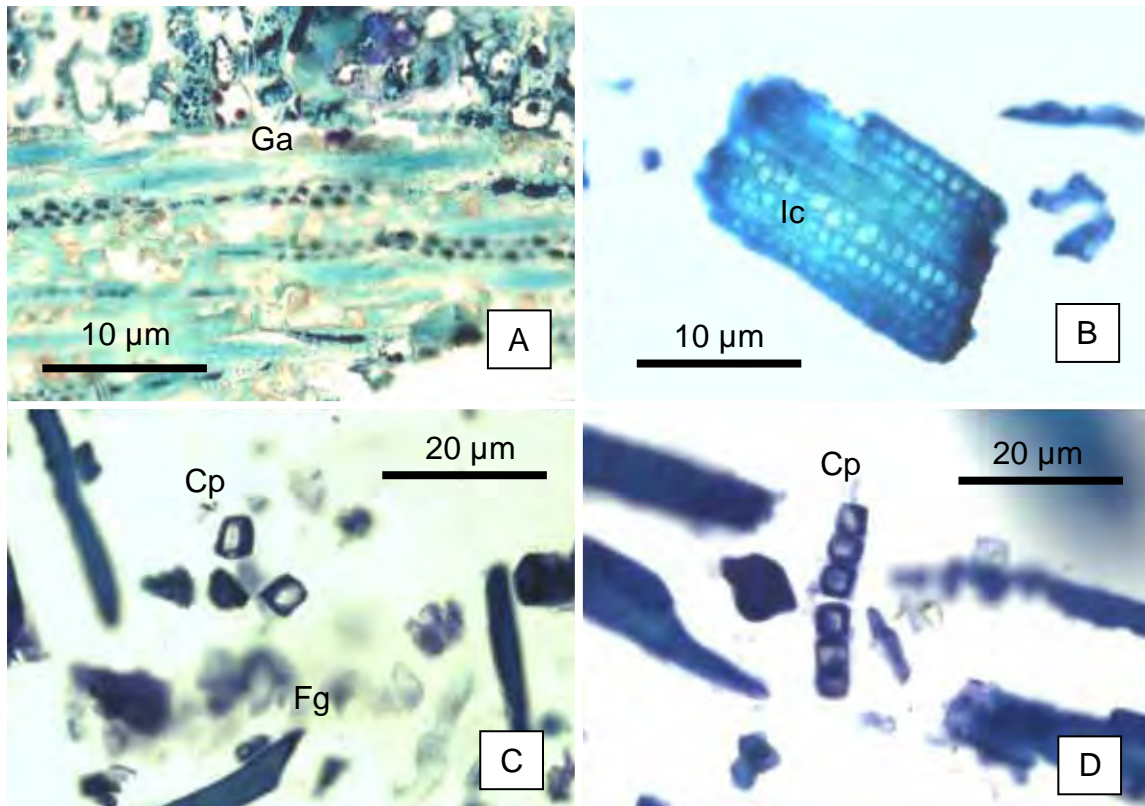
### 5.2.1. Análise microscópica comparativa das amostras pulverizadas com as amostras *in natura* (secas) de cascas de *E. uchi*

A análise das lâminas contendo os cortes anatômicos das amostras *in natura* possibilitou evidenciar a disposição da estrutura da casca de *E. uchi*. Fica evidente uma distribuição periclinal das células do esclerênquima em relação ao parênquima radial (Figura 9). Há grande abundância de idioblastos cristalíferos contendo monocristais poliédricos, em meio ao tecido parenquimático, o qual é preenchido por células com reservas de compostos fenólicos em seu interior (Figura 9).

Na microscopia de pó da casca do uchi-amarelo, foi observada a presença de fragmentos de fibras lignificadas envolvidas por bainha cristalífera, de cristais prismáticos, de fragmentos de fibras gelatinosas, poucas células pétreas e grãos de amido pequenos, esféricos e isolados (Figura 10).



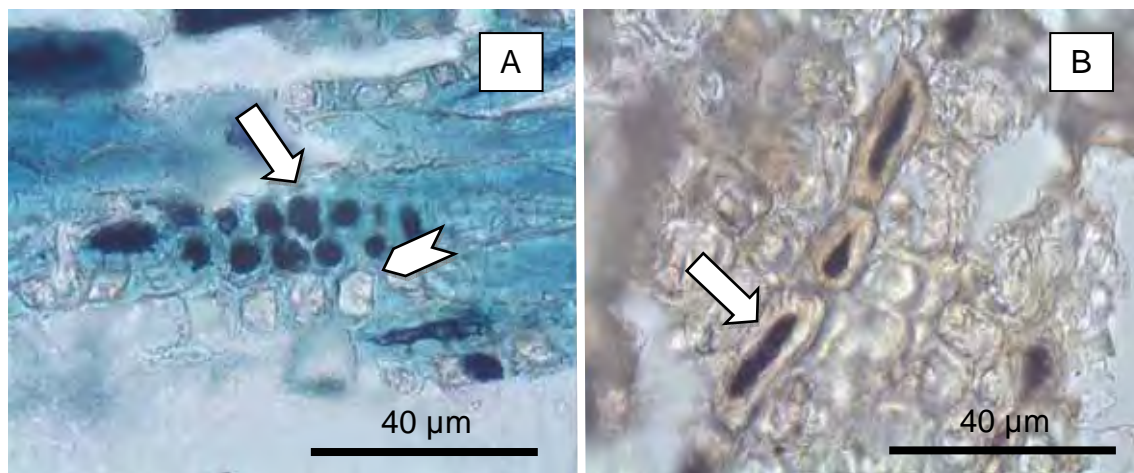
**FIGURA 9.** Secções anatômicas de cascas *in natura* secas de *Endopleura uchi* (Huber) Cuatrec. (Humiriaceae). A) Secção longitudinal radial, submetida ao reagente azul de toluidina, evidenciando a disposição anatômica estrutural. A seta indica células parenquimáticas preenchidas por material fenólico, corado mais intensamente. A ponta de seta indica idioblastos cristalíferos dispostos ao longo do esclerênquima. B) Secção longitudinal radial, submetida ao reagente cloreto férrico 10%, evidenciando a presença de material fenólico no tecido parenquimático.



**FIGURA 10.** Microscopia do pó da casca de *Endopleura uchi* (Huber) Cuatrec. (Humiriaceae) submetida ao reagente azul de toluidina. Ga – grão de amido; Ic – idioblasto cristalífero; Cp – cristal poliédrico; Fg – fibra gelatinosa.

### 5.2.2. Pesquisa histoquímica para compostos fenólicos

Foi verificada a positividade da reação com cloreto férrico 10% (m/v), pelo surgimento de pequenos depósitos de coloração bastante escura, negro-esverdeada, ao longo de toda a estrutura do material vegetal, sobretudo em depósitos no esclerênquima, dispostos radialmente ao longo do parênquima (Figura 11).



**FIGURA 11.** Secções anatômicas de cascas *in natura* secas de *Endopleura uchi* (Huber) Cuatrec. (Humiriaceae). A) Secção longitudinal radial evidenciando os principais tecidos formadores, bem como os idioblastos cristalíferos abundantes dispostos ao longo do esclerênquima (ponta de seta). As esclereides mostram-se acompanhadas de conteúdo fenólico, corado intensamente (seta); B) Visualização do resultado da reação com  $\text{FeCl}_3$  10% (m/v), evidenciando os depósitos de compostos fenólicos (seta) no interior das esclereides.

### 5.3. ANÁLISES FITOQUÍMICAS

#### 5.3.1. Triagem fitoquímica das principais classes de metabólitos secundários

Os dados da triagem fitoquímica, realizada com as cascas pulverizadas de *E. uchi* (Tabela 8), revelaram os taninos, as saponinas e as cumarinas como grupos de substâncias químicas que podem ser empregadas para a caracterização da matéria-prima. Vale ressaltar que para que fique caracterizada a presença de determinado grupo de substância química na amostra, todos os testes executados devem ser positivos.

**TABELA 8.** Análise fitoquímica das cascas pulverizadas de *Endopleura uchi* (Huber) Cuatrec. (Humiriaceae).

Classes	Reações	Resultado
Flavonóides	Shinoda	-
	Taubock	-
	Pew	-
	cloreto férrico	+
	cloreto de alumínio	-
Taninos	gelatina	+
	sais de ferro	+
	acetato de chumbo	+
Saponinas	formação e permanência de espuma	+
Glicosídeos Cardiotônicos	Legal	-
	Kedde	-
	Pesez	-
	Keller-Kiliani	-
	Liebermann-Burchard	-
Antraquinonas	livres	-
	Borntrager	-
Alcalóides	Bertrand	-
	Bouchardat	-
	Dragendorff	-
	Mayer	-
Cumarinas	NaOH	+

( + ): reação positiva; ( - ): reação negativa

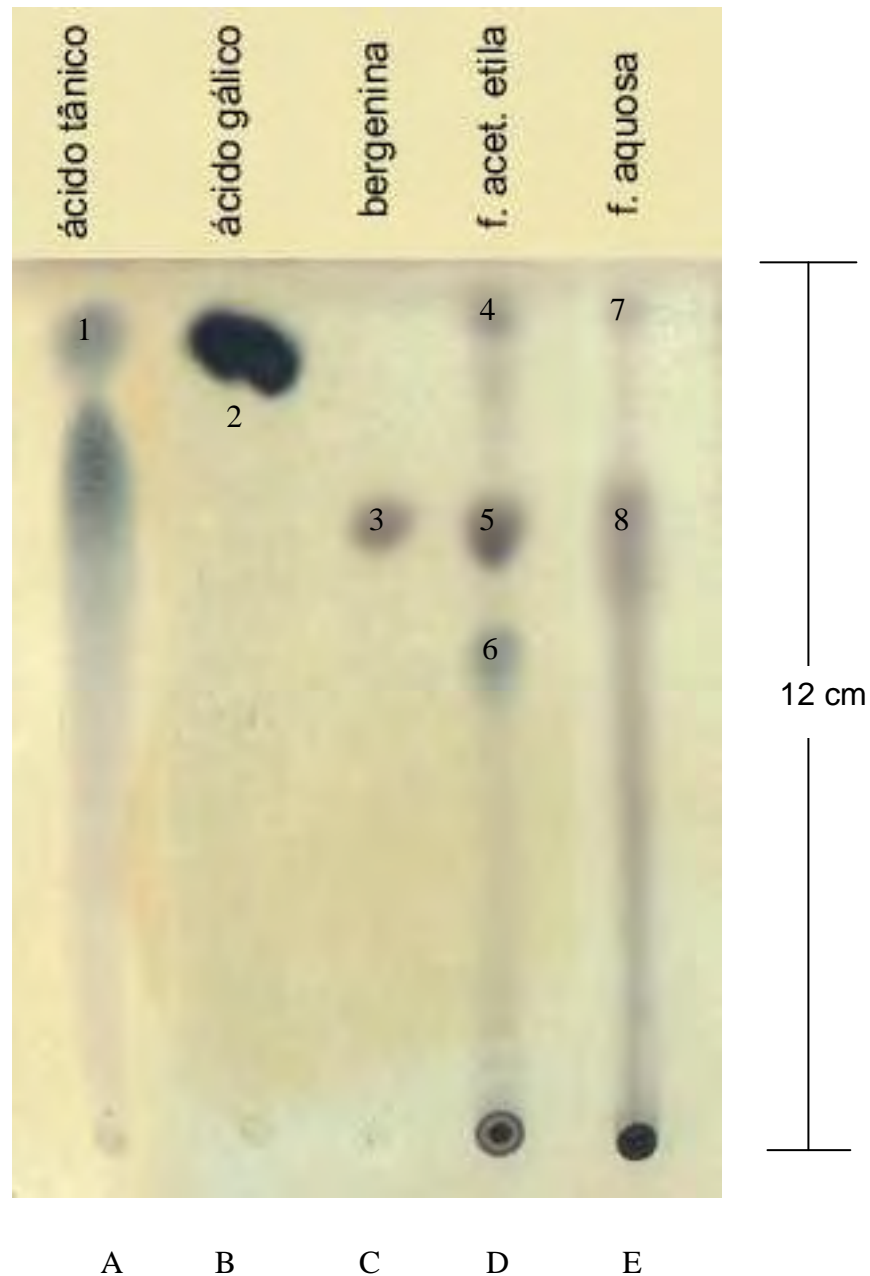
### 5.3.2. Perfil cromatográfico

Na Figura 12 pode-se visualizar o cromatograma obtido da partição com acetato de etila do decocto 20% (m/v) a partir de cascas pulverizadas de *E.*

*uchi*. A figura mostra ainda as manchas apresentadas por substâncias puras padrão, da classe dos taninos, evidenciados na triagem fitoquímica. Na Tabela 9 encontramos os valores dos fatores de retenção ( $R_f$ ) das manchas apresentadas para cada uma das amostras e das substâncias padrão. O fator de retenção consiste na seguinte razão:

$$R_f = dA / dF$$

Em que:  $R_f$  = fator de retenção;  $dA$  = distância percorrida pela amostra;  
 $dF$  = distância da fase móvel

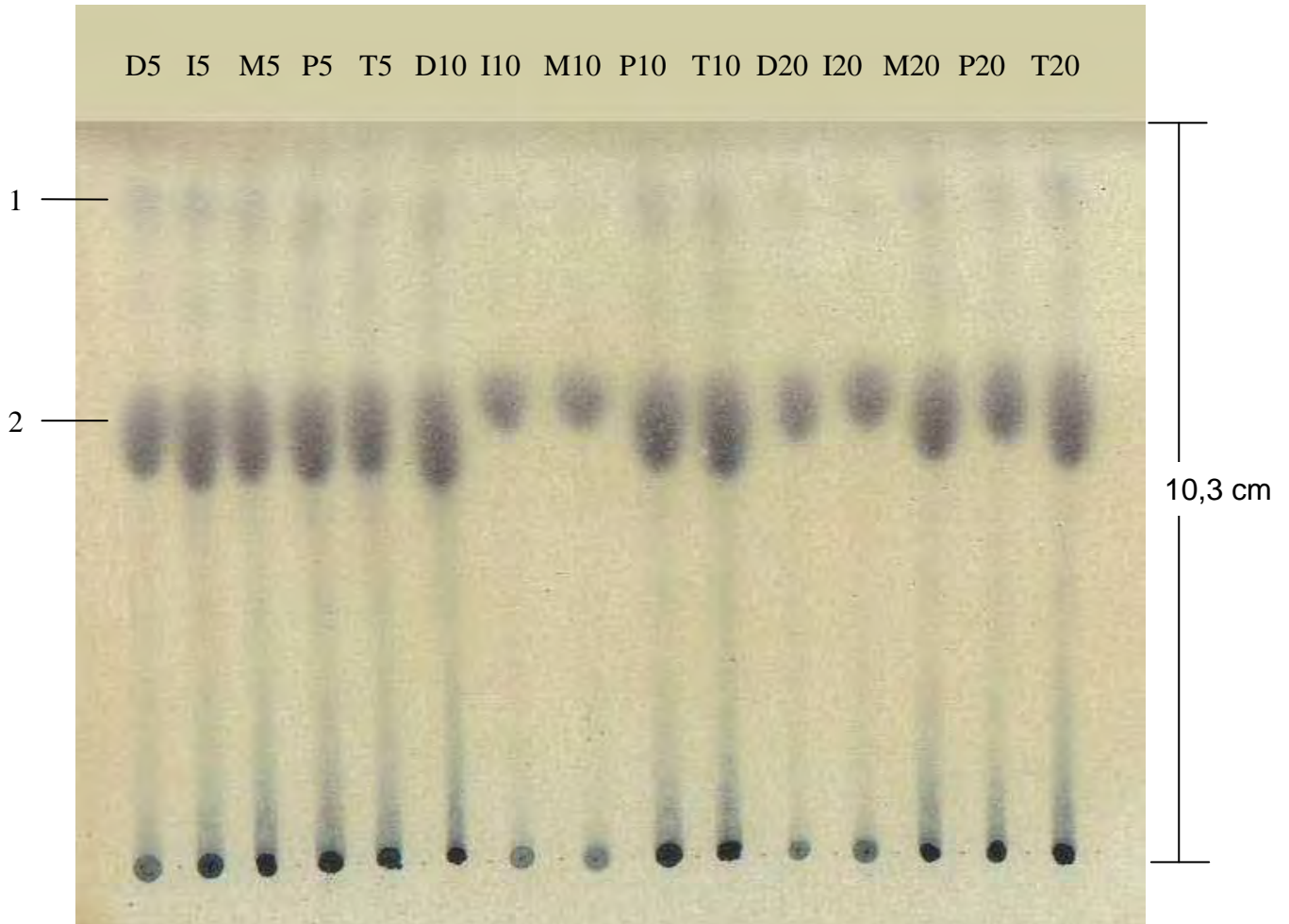


**Figura 12.** Cromatograma das frações acetato de etila do extrato decocção 20% (m/v) obtidos das cascas pulverizadas de *Endopleura uchi*. Sistema eluente: acetato de etila:ácido fórmico:água (9:5:1 v/v/v).; revelador: cloreto férrico 2% em metanol. (A) ácido tânico (B) ácido gálico; (C) bergenina; (D) fração acetato de etila; (E) fração aquosa.

**TABELA 9.** Fator de retenção das manchas apresentadas no cromatograma da figura 12.

Amostra	Nº da mancha	Rf
Ácido tânico	1	0,89
Ácido gálico	2	0,86
Bergenina	3	0,67
	4	0,89
Fração acetato de etila	5	0,66
	6	0,52
	7	0,90
Fração aquosa	8	0,69

Na Figura 13 pode-se visualizar o cromatograma obtido com todos os extratos preparados neste trabalho. A Tabela 10 apresenta os valores correspondentes de Rf.



**Figura 13.** Cromatograma dos seguintes extratos de *E. uchi*: decocção a 5, 10 e 20% (m/v) (D5, D10 e D20); infusão a 5, 10 e 20% (m/v) (I5, I10 e I20); maceração a 5, 10 e 20% (m/v) (M5, M10 e M20); percolação a 5, 10 e 20% (m/v) (P5, P10 e P20) e turbo-extração a 5, 10 e 20% (m/v) (T5, T10 e T20). Sistema eluente: acetato de etila:ácido fórmico:água (9:5:1 v/v/v).; revelador: cloreto férrico 2% em metanol. 1) Grupo de manchas com  $R_f = 0,89$ ; 2) Grupo de manchas com  $R_f = 0,64$ .

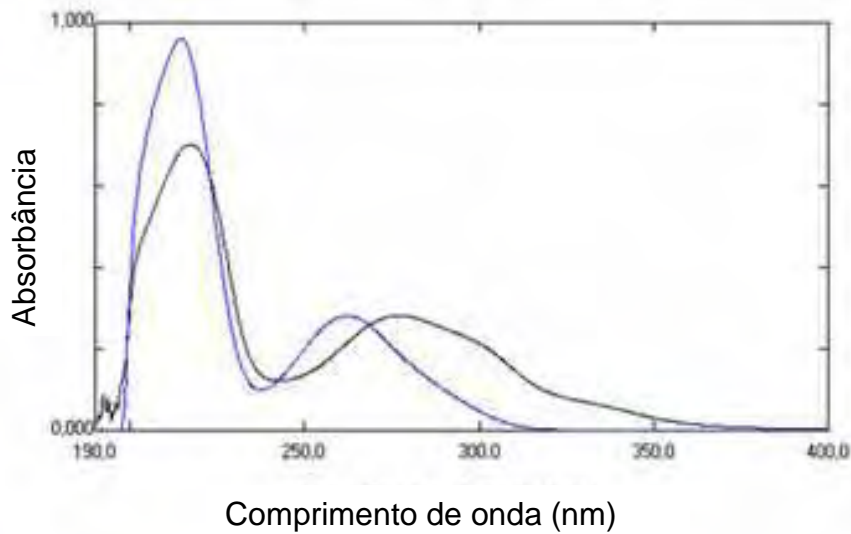
**TABELA 10.** Fator de retenção das manchas apresentadas no cromatograma da figura 13.

A	Nº	Rf	A	Nº	Rf	A	Nº	Rf
D5	1	0,89	D10	1	0,89	D20	1	0,89
	2	0,64		2	0,64		2	0,64
I5	1	0,89	I10	1	0,89	I20	1	0,89
	2	0,64		2	0,64		2	0,64
M5	1	0,89	M10	1	0,89	M20	1	0,89
	2	0,64		2	0,64		2	0,64
P5	1	0,89	P10	1	0,89	P20	1	0,89
	2	0,64		2	0,64		2	0,64
T5	1	0,89	T10	1	0,89	T20	1	0,89
	2	0,64		2	0,64		2	0,64

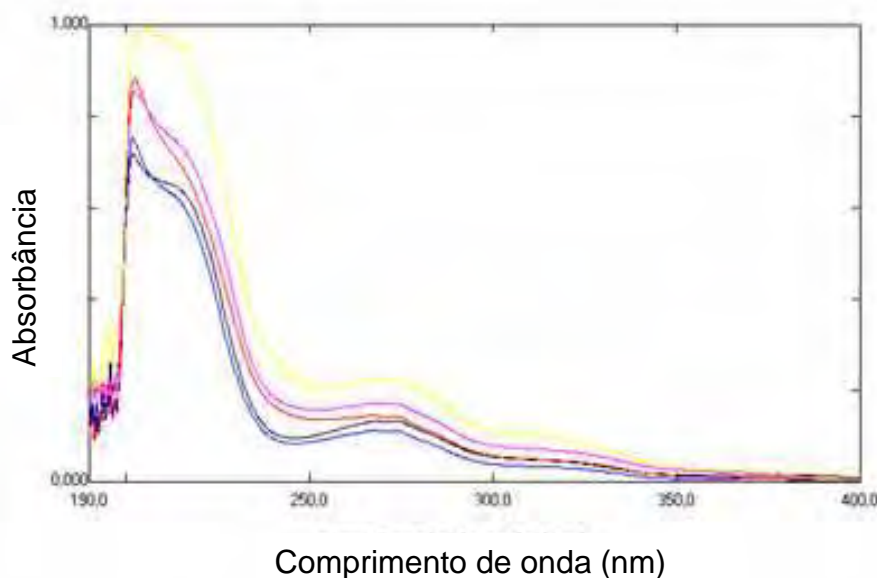
A: amostra; Nº: número da mancha; Rf: fator de retenção

### 5.3.3. Perfil espectrofotométrico na região de luz ultravioleta

O perfil espectrofotométrico dos compostos padrão da classe dos taninos, ácido gálico e ácido tânico, está mostrado na Figura 14 e o perfil dos extratos na Figura 15.



**FIGURA 14.** Perfil espectrofotométrico, na região de luz ultravioleta, de ácido gálico (linha azul) e ácido tânico (linha preta).



**FIGURA 15.** Perfil espectrofotométrico, na região de UV (190-400 nm), dos seguintes extratos de cascas pulverizadas de *Endopleura uchi*: linha preta – decocção 20% (m/v); linha azul – infusão 10% (m/v); linha vermelha – maceração 5% (m/v); linha rosa – percolação 10% (m/v); linha amarela – turbo-extração 20% (m/v)

### 5.3.4. Obtenção e rendimento dos extratos

Foram calculados os valores de rendimento para todos os processos, obtendo os seguintes valores, listados na Tabela 11 abaixo:

**TABELA 11.** Valores de rendimento em porcentagem (%) dos extratos obtidos a partir de cascas pulverizadas de *E. uchi* (Huber) Cuatrec.

Extrato	Rm (%)	Rp (%)	Rt (%)	Rd (%)	Ri (%)
EtOH 50% (5%, m/v)	4,564	11,464	8,568	x	x
EtOH 50% (10%, m/v)	11,000	14,160	8,980	x	x
EtOH 50% (20%, m/v)	12,031	23,870	14,470	x	x
Aquoso (5%, m/v)	x	x	x	7,520	8,128
Aquoso (10%, m/v)	x	x	x	5,590	6,220
Aquoso (20%, m/v)	x	x	x	4,370	13,270

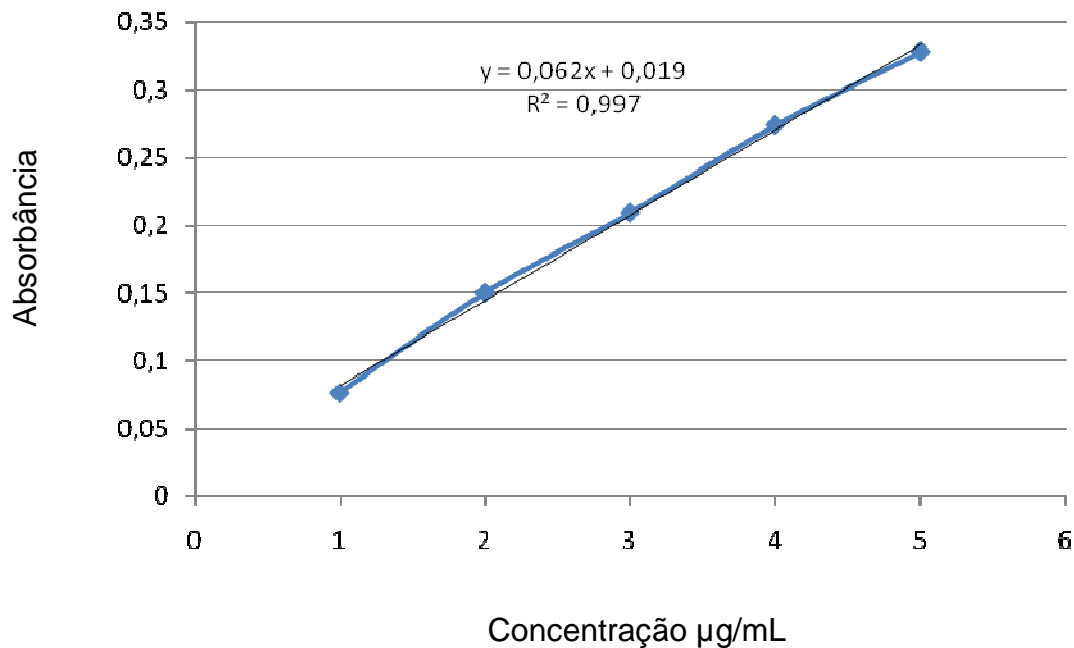
EtOH 50%: etanol 50%; x: não se aplica; Rm: rendimento final em porcentagem da maceração; Rp: rendimento final em porcentagem da percolação; Rt: rendimento final em porcentagem da turbo-extração; Rd: rendimento final em porcentagem da decocção; Ri: rendimento final em porcentagem da infusão

## 5.4. ANÁLISES QUANTITATIVAS

### 5.4.1. Determinação do teor de fenóis totais

As leituras de absorvância da solução padrão de ácido tânico e do extrato foram feitas em triplicata, portanto, os resultados apresentados referem-se à

média da absorvância, para cada concentração (em  $\mu\text{g/mL}$ ) utilizada nas leituras. A Figura 16 apresenta a curva analítica construída com diferentes concentrações da solução padrão de ácido tânico.



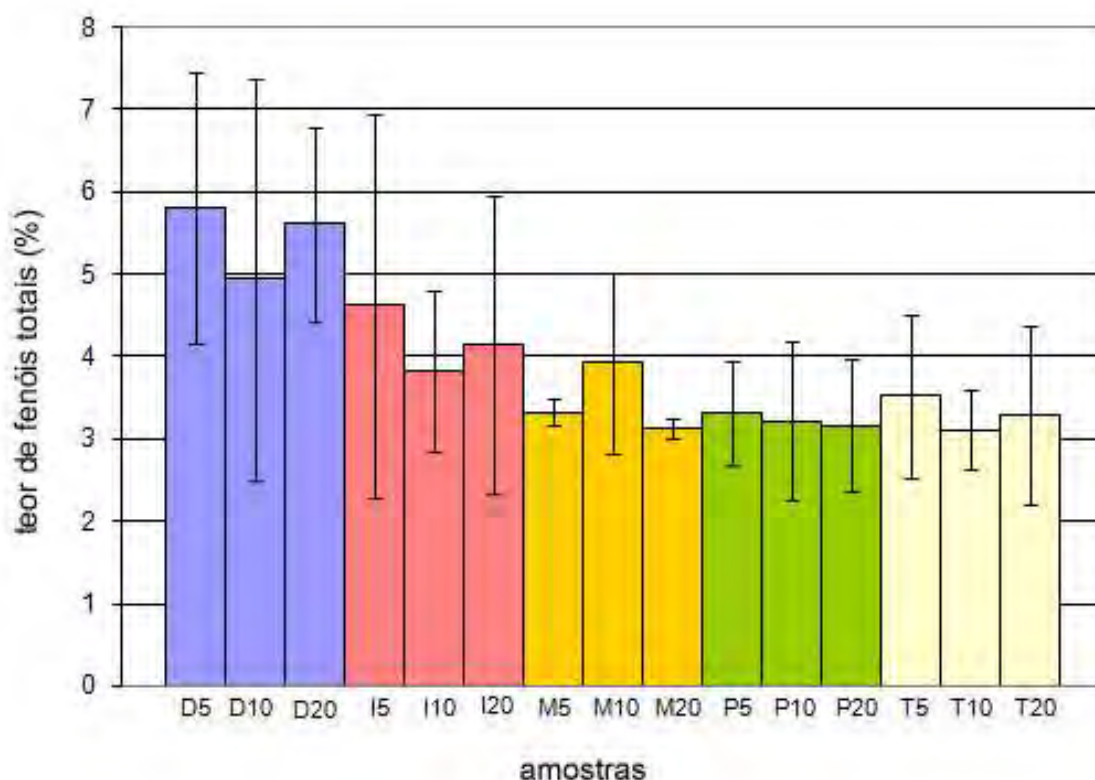
**FIGURA 16.** Curva analítica de absorvância da solução padrão de ácido tânico

A partir da curva analítica obtida com a solução padrão de ácido tânico pôde-se calcular a porcentagem de fenóis totais existentes nas amostras de cascas pulverizadas de *E. uchi* utilizando a equação da reta da solução padrão de ácido tânico. As porcentagens finais são expressas pela média dos valores de porcentagem da absorvância de cada solução de leitura das amostras e podem ser visualizadas na Tabela 12 e Figura 17.

**TABELA 12.** Valores dos teores de fenóis totais (TFT) dos extratos de *Endopleura uchi*

amostras	TFT (%) $\pm$ DP
D5	5,810 $\pm$ 0,81
D10	4,940 $\pm$ 2,44
D20	5,610 $\pm$ 1,18
I5	4,620 $\pm$ 2,34
I10	3,830 $\pm$ 0,98
I20	4,150 $\pm$ 1,81
M5	3,326 $\pm$ 0,16
M10	3,920 $\pm$ 1,10
M20	3,130 $\pm$ 0,13
P5	3,327 $\pm$ 0,63
P10	3,220 $\pm$ 0,97
P20	3,170 $\pm$ 0,81
T5	3,520 $\pm$ 0,99
T10	3,110 $\pm$ 0,48
T20	3,290 $\pm$ 1,09

D5: decocção 5% (m/v); D10: decocção 10% (m/v); D20: decocção 20% (m/v); I5: infusão 5% (m/v); I10: infusão 10% (m/v); I20: infusão 20% (m/v); M5: maceração 5% (m/v); M10: maceração 10% (m/v); M20: maceração 20% (m/v); P5: percolação 5% (m/v); P10: percolação 10% (m/v); P20: percolação 20% (m/v); T5: turbo-extração 5% (m/v); T10: turbo-extração 10% (m/v); T20: turbo-extração 20% (m/v). Os extratos obtidos por maceração, percolação e turbo-extração foram preparados com etanol 50% (v/v).



**FIGURA 17.** Teor de fenóis totais dos extratos de cascas pulverizadas de *Endopleura uchi* (Huber) Cuatrec. (Humiriaceae).

Na análise da Figura 17 foi verificado que algumas amostras apresentaram, para um nível de confiança de 95%, desvios-padrões acima do limite estatístico aceitável, como no caso dos extratos D10 e I5.

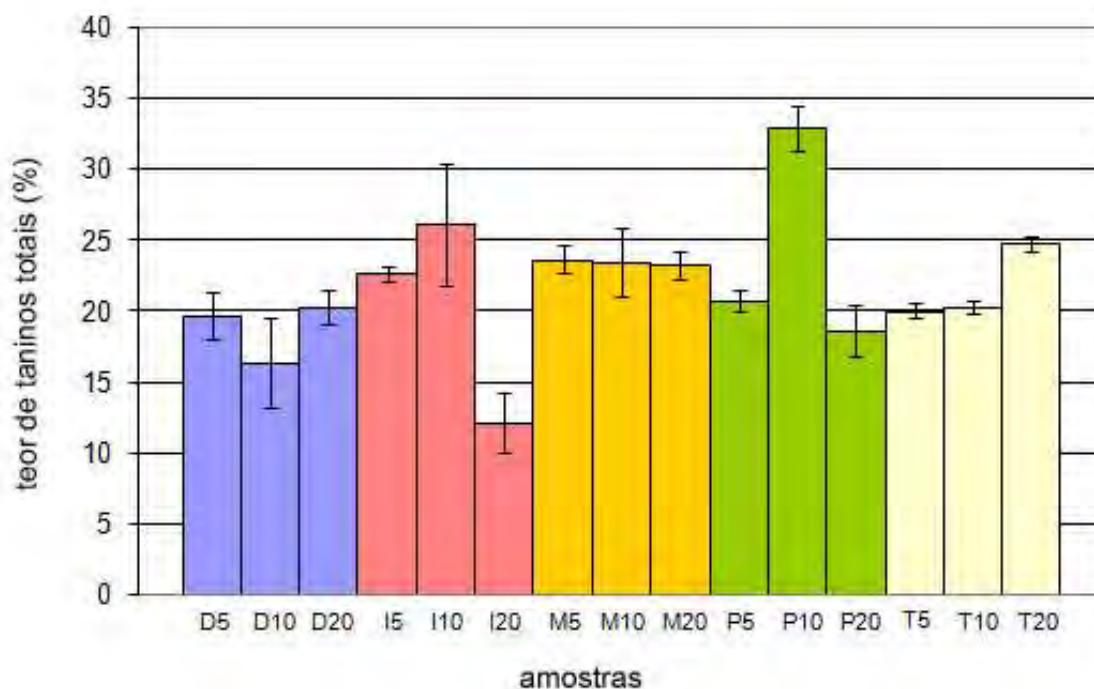
#### 5.4.2. Doseamento de taninos totais em extratos vegetais

Os valores médios das quantidades de taninos totais (TT) e os valores médios de resíduo seco (teor de extrativos, TE) para cada um dos extratos das cascas pulverizadas de *Endopleura uchi* estão apresentados na Tabela 13 e na Figura 18, assim como mais ou menos seus respectivos desvios-padrões.

**TABELA 13.** Valores de teores de extrativos (TE) e taninos totais (TT) para cada um dos extratos obtidos a partir de cascas pulverizadas de *E. uchi*.

amostras	TT (%)	TE (%)
D5	19,65 ± 1,59	12,53 ± 1,02
D10	16,34 ± 3,18	11,41 ± 0,40
D20	20,27 ± 1,16	9,65 ± 0,22
I5	22,66 ± 0,53	9,70 ± 0,05
I10	26,06 ± 4,27	8,85 ± 0,05
I20	12,08 ± 2,11	8,525 ± 0,25
M5	23,62 ± 1,00	13,73 ± 0,11
M10	23,41 ± 2,47	13,10 ± 0,17
M20	23,18 ± 0,93	13,04 ± 0,05
P5	20,72 ± 0,79	18,60 ± 0,26
P10	32,85 ± 1,62	16,80 ± 0,39
P20	18,56 ± 1,79	18,87 ± 0,27
T5	19,99 ± 0,49	12,83 ± 0,32
T10	20,26 ± 0,50	12,95 ± 0,62
T20	24,77 ± 2,54	14,85 ± 0,54

D5: decocção 5% (m/v); D10: decocção 10% (m/v); D20: decocção 20% (m/v); I5: infusão 5% (m/v); I10: infusão 10% (m/v); I20: infusão 20% (m/v); M5: maceração 5% (m/v); M10: maceração 10% (m/v); M20: maceração 20% (m/v); P5: percolação 5% (m/v); P10: percolação 10% (m/v); P20: percolação 20% (m/v); T5: turbo-extração 5% (m/v); T10: turbo-extração 10% (m/v); T20: turbo-extração 20% (m/v). Os extratos obtidos por maceração, percolação e turbo-extração foram preparados com etanol 50% (v/v). Os valores estão expressos como porcentagem da média de três determinações mais ou menos os desvios-padrões.



**FIGURA 18.** Teor de taninos totais dos extratos de cascas pulverizadas de *Endopleura uchi* (Huber) Cuatrec. (Humiriaceae).

Na análise da Figura 18 foi verificado que algumas amostras apresentaram, para um nível de confiança de 95%, desvios-padrões acima do limite estatístico aceitável. Foi o caso dos extratos D10, I10, I20 e M10.

#### 5.4.3. Determinação da capacidade de sequestro de radicais livres

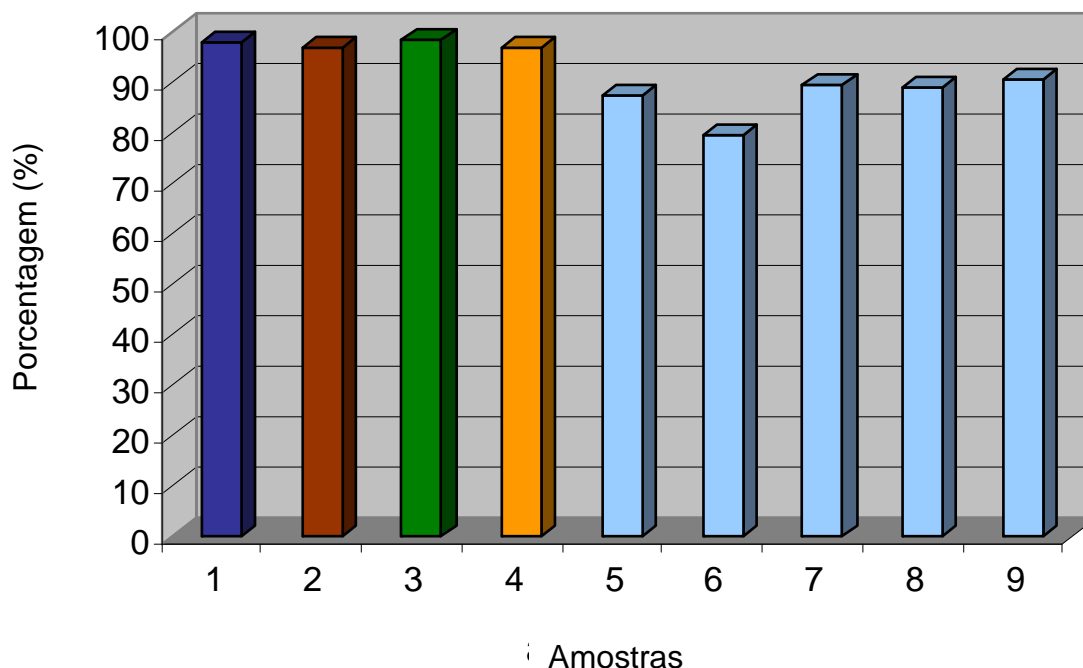
O potencial da atividade antioxidante dos extratos foi determinado baseado na atividade sequestrante da solução de 2,2-difenil-1-picrilhidrazila (DPPH). A atividade anti-radicalar, em porcentagem, dos padrões e das amostras, em suas definidas concentrações, está apresentado na Tabela 14 e ilustrado na Figura 19.

**TABELA 14.** Atividade anti-radicalar percentual das substâncias padrão e dos extratos estudados na concentração de 250 µg/mL.

Amostra (250 µg/mL)	Atividade anti-radicalar (%)
ácido gálico	97,24 ± 0,05
rutina	96,83 ± 0,06
vitamina C	98,14 ± 0,06
extrato de <i>Ginkgo biloba</i>	96,97 ± 0,09
D20	87,46 ± 2,59
I10	79,54 ± 2,63
M5	89,22 ± 0,82
P10	88,9 ± 2,52
T20	90,58 ± 0,62

Os valores correspondem à média de três determinações e estão expressos em porcentagem ± os desvios-padrões. D20: decocção 20% (m/v); I10: infusão 10% (m/v); M5: maceração 5% (m/v); P10: percolação 10% (m/v); T20: turbo-extração 20% (m/v).

As análises estatísticas dos valores observados na Tabela 14 (ANOVA) mostraram que há diferença significativa entre as porcentagens de atividade anti-radicalar dos extratos em relação aos padrões.



**FIGURA 19.** Atividade anti-radicalar percentual das substâncias padrão e dos extratos estudados na concentração de 250  $\mu\text{g/mL}$ . (1) ácido gálico; (2) rutina; (3) vitamina C; (4) extrato de *Ginkgo biloba*; (5) decocção 20% (m/v); (6) infusão 10% (m/v); (7) maceração 5% (m/v); (8) percolação 10% (m/v); (9) turbo-extração 20% (m/v).

## 5.5. ANÁLISE DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

### 5.5.1. Teste de difusão em ágar

A solução de controle de atividade do DMSO não apresentou formação de halo de inibição contra as bactérias em estudo, portanto, este solvente não foi interferente da atividade antimicrobiana apresentada pelos extratos utilizados. Os resultados dos testes de difusão com templates são apresentados na Tabela 15 e os resultados dos testes de difusão com discos na Tabela 16.

A Figura 20A ilustra o halo de inibição do antibiótico anfotericina B frente à linhagem de *C. albicans* pelo método de difusão com “template”. Foi

constatado ainda, da análise desta figura, que nenhum dos extratos testados foi efetivo na inibição do crescimento do microrganismo. A Figura 20B ilustra o halo de inibição do antibiótico ampicilina frente à linhagem de *E. coli* pelo método de difusão com “template”. Também foi observado da análise desta figura que nenhum dos extratos testados foi efetivo na inibição do crescimento do microrganismo.

A Figura 21A ilustra o halo de inibição do antibiótico anfotericina B e também um pequeno halo de inibição do extrato I10 (infusão 10%, m/v) frente à linhagem de *Candida albicans* pelo método de difusão com discos. A Figura 21B ilustra o halo de inibição do antibiótico ampicilina frente à linhagem de *Staphylococcus aureus* pelo método de difusão com discos. Apesar de não aparecer claramente nesta figura, foi observado o aparecimento de pequenos halos de inibição para todos os extratos testados.

**TABELA 15.** Diâmetro dos halos (mm) de diferentes extratos de cascas de *E. uchi* pelo teste de difusão em ágar com templates.

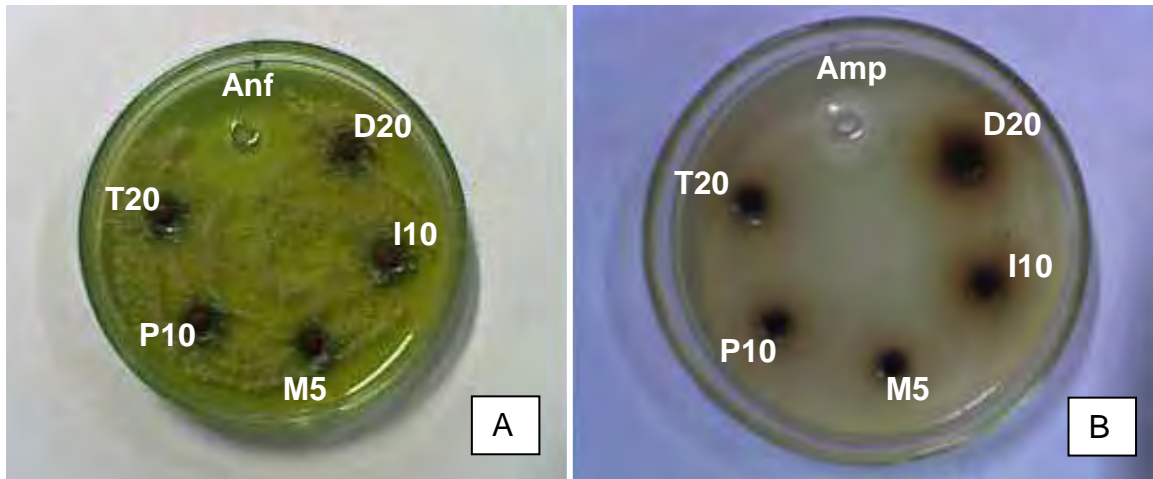
Amostra	EC	SA	BS	SS	SE	CA
D20	-	15,0	-	-	-	-
I10	-	15,0	-	-	-	-
M5	-	13,0	-	-	-	-
P10	-	13,0	-	-	-	-
T20	-	14,0	-	-	-	-
A	18,0	23,0	15,5	13,0	17,5	23,5
C	-	-	-	-	-	-

Os valores representam a média de três determinações. D20 – decocção 20% (m/v); I10 – infusão 10% (m/v); M5 – maceração 5% (m/v); P10 – percolação 10% (m/v); T20 – turbo-extração 20% (m/v). A = antibiótico (ampicilina/anfotericina B); C = controle negativo (solução de DMSO-BHI); EC = *Escherichia coli*; SA = *Staphylococcus aureus*; BS = *Bacillus subtilis*; SS = *Shigella sonnei*; SE = *Staphylococcus epidermidis*; CA = *Candida albicans*

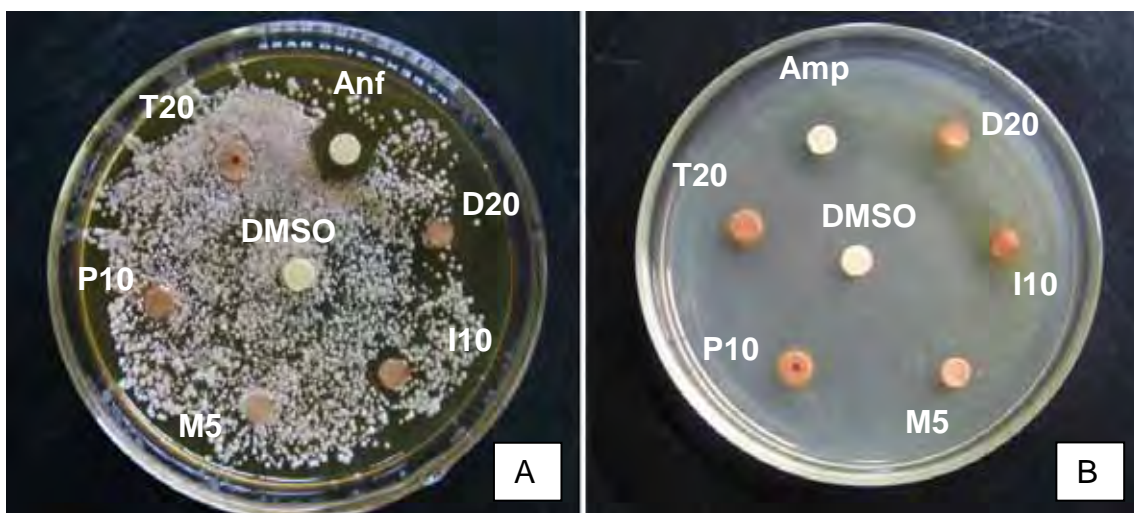
**TABELA 16.** Diâmetro dos halos (mm) de diferentes extratos de cascas de *E. uchi* pelo teste de difusão em ágar com discos.

Amostra	EC	SA	BS	SS	SE	CA
D20	-	7,0	-	-	-	-
I10	-	7,0	-	-	-	8,0
M5	-	7,0	-	-	-	-
P10	-	8,1	-	-	-	-
T20	-	7,9	-	-	-	-
A	13,7	19,3	19,7	17,5	12,7	17,5
C	-	-	-	-	-	-

Os valores representam a média de três determinações. D20 – decocção 20% (m/v); I10 – infusão 10% (m/v); M5 – maceração 5% (m/v); P10 – percolação 10% (m/v); T20 – turbo-extração 20% (m/v). A = antibiótico (ampicilina/anfotericina B); C = controle negativo (solução de DMSO-BHI); EC = *Escherichia coli*; SA = *Staphylococcus aureus*; BS = *Bacillus subtilis*; SS = *Shigella sonnei*; SE = *Staphylococcus epidermidis*; CA = *Candida albicans*



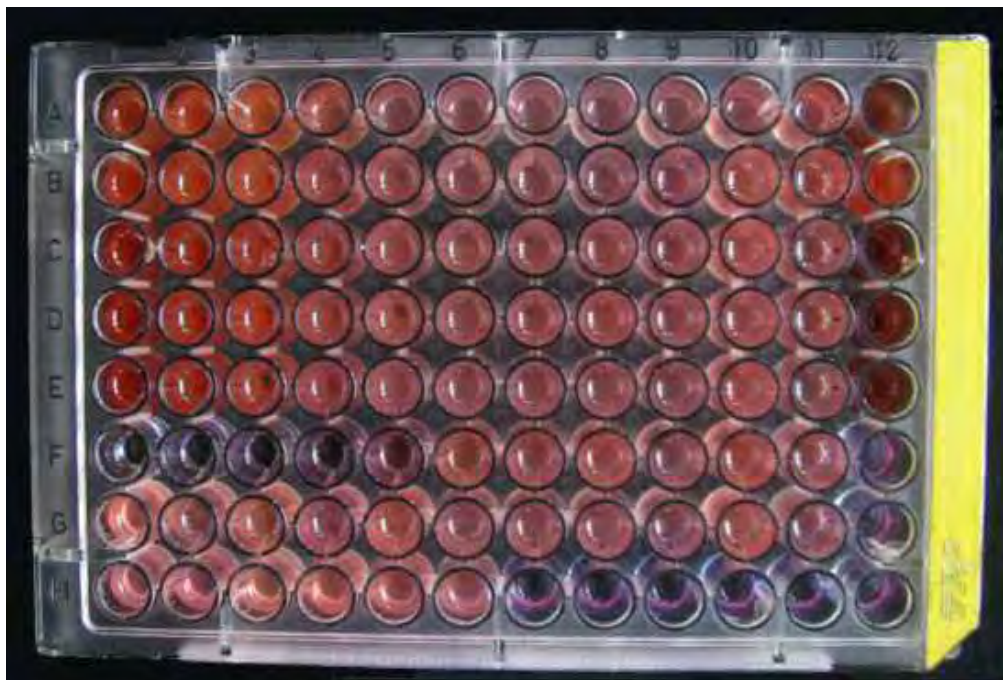
**FIGURA 20.** A) Avaliação da atividade antimicrobiana pelo método de difusão em ágar com templates dos extratos de *E. uchi* contra *Candida albicans*; B) Avaliação da atividade antimicrobiana pelo método de difusão em ágar com discos dos extratos de *E. uchi* contra *E. coli*. Anf: anfotericina B; Amp: ampicilina; D20: decocção 20% (m/v); I10: infusão 10% (m/v); M5: maceração 5% (m/v); P10: percolação 10% (m/v); T20: turbo-extração 20% (m/v).



**FIGURA 21.** A) Avaliação da atividade antimicrobiana pelo método de difusão em ágar com discos dos extratos de *E. uchi* contra *Candida albicans*; B) Avaliação da atividade antimicrobiana pelo método de difusão em ágar com discos dos extratos de *E. uchi* contra *S. aureus*. Anf: anfotericina B; Amp: ampicilina; D20: decocção 20% (m/v); I10: infusão 10% (m/v); M5: maceração 5% (m/v); P10: percolação 10% (m/v); T20: turbo-extração 20% (m/v).

### 5.5.2. Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) através do método de diluição em microplaca e concentração bactericida mínima (CBM)

A Figura 22 mostra uma microplaca incubada com *Staphylococcus aureus*, segundo o esquema apresentado na Figura 6. Houve crescimento bacteriano nos poços selecionados para controle positivo de crescimento. Nota-se ausência de crescimento bacteriano nos poços que não receberam o inóculo, indicando a esterilidade do meio de cultura (controle negativo) e a ausência de contaminação dos extratos. Houve crescimento bacteriano nos poços onde foram colocados os controles de solvente DMSO indicando que este solvente não foi interferente dos resultados de inibição do crescimento bacteriano apresentados pelos extratos. Quanto ao antibiótico, mostrou-se efetivo nas quatro primeiras diluições, perdendo sua atividade a partir daí (CIM = 0,125 mg/ mL). Em relação aos extratos, nenhum deles foi efetivo em nenhuma das diluições. Assim sendo, também não foram encontrados resultados positivos na determinação de concentração bactericida mínima, tendo havido crescimento da linhagem de *S. aureus* em todas as diluições empregadas.



**FIGURA 22.** Determinação de CIM pelo método de microdiluição em microplaca contra *Staphylococcus aureus*.

### 5.6. TESTE DE TOXICIDADE ORAL AGUDA EM RATOS

Os resultados não revelaram sinais de toxicidade sistêmica com a administração do extrato aquoso obtido por decocção 20% (m/v) de *Endopleura uchi*. Não foram observadas mortes e nem alterações de comportamento dos animais, tampouco ocorreram alterações de massa corporal dos animais.

### 5.7. TESTE DA MOTILIDADE INTESTINAL EM CAMUNDONGOS

O ensaio do trânsito intestinal em camundongos demonstrou que houve uma redução na distância percorrida pelo carvão ativo após administração do extrato obtido por decocção 20% (m/v) de cascas pulverizadas de *Endopleura uchi*, quando comparados com o controle negativo (solução fisiológica) (Tabela 17). Porém, para  $P < 0,05$ , o valor de “t” encontrado ( $t = 0,9057$ ) foi menor que

o “T” tabelado ( $T=2,101$ ), sugerindo que o resultado apresentado pela nossa amostra não difere significativamente do controle.

**TABELA 17.** Distância percorrida pelo carvão ativo no intestino dos camundongos após a administração do extrato aquoso das cascas pulverizadas de *Endopleura uchi* e da solução fisiológica controle.

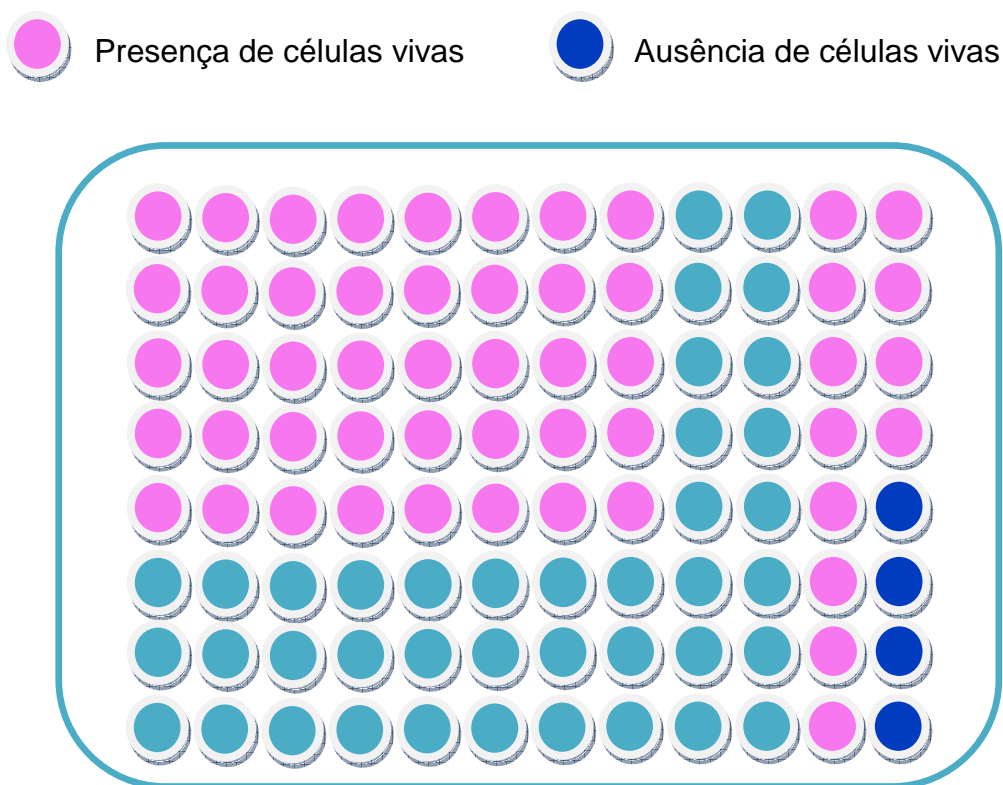
Tratamento	Dose (mg/kg)	Distância média (cm)
Extrato aquoso	200 mg/kg	43,81 ± 11,84
Controle negativo	10 mL/kg	48,00 ± 8,58

Os resultados representam a média de três determinações ± os desvios-padrões.

## 5.8. AVALIAÇÃO DE CITOTOXICIDADE

A Figura 23 mostra um esquema, baseado na Figura 7, com os resultados do teste de citotoxicidade. A Tabela 18 apresenta os valores, em porcentagem, de sobrevivência das células da córnea de coelhos da linhagem SIRC CCL-60.

Verificamos a partir do teste que nenhum dos extratos aplicados foi tóxico, em nenhuma das concentrações utilizadas, apresentando  $IC_{50}$  maior que 2 mg/mL.



**FIGURA 23.** Representação dos resultados de citotoxicidade dos extratos obtidos de cascas pulverizadas de *Endopleura uchi*.

**TABELA 18.** Avaliação da citotoxicidade de extratos de cascas pulverizadas de *E. uchi* frente a células da córnea de coelhos da linhagem SIRC CCL-60

Amostra	% Sobrevivência	IC <sub>50</sub>
D20	100	> 2 mg/mL
I10	100	> 2 mg/mL
M5	100	> 2 mg/mL
P10	100	> 2 mg/mL
T20	100	> 2 mg/mL

D20: decocção 20% (m/v), I10: infusão 10% (m/v), M5: maceração 5% (m/v); P10: percolação 10% (m/v), T20: turbo-extração 20% (m/v); IC<sub>50</sub>: índice de citotoxicidade para 50% das células testadas.

## 6. DISCUSSÃO

A atividade farmacêutica teve origem na preparação artesanal de medicamentos, posteriormente evoluindo para a fase industrial. Por motivos diversos, a atividade magistral teve uma retomada de interesse nas últimas décadas e hoje ocupa setores expressivos de mercado. O volume de matérias-primas associadas a essa atividade e as dificuldades de avaliação da qualidade dos materiais levou ao surgimento de problemas de diversas ordens, estimulando a regulamentação oficial do segmento para assegurar a qualidade dessa classe de produtos. Para isso, o Ministério da Saúde Brasileiro, através da Agência Nacional de Vigilância Sanitária, vem instituindo uma série de normas com o objetivo de organizar a produção dos medicamentos fitoterápicos comercializados no país. Para se obter os registros de comercialização junto a ANVISA, as empresas produtoras precisam cumprir uma série de procedimentos, indispensáveis para a preparação dos produtos dentro de padrões de qualidade. A legislação que rege o registro destes medicamentos é a RDC 48/04, sendo complementada pelas RE 88, 89, 90 e 91/04 (BRASIL, 2004). No entanto, tal norma foi editada com enfoque predominantemente voltado às boas práticas farmacêuticas e com exigências de controle de qualidade específicas para fármacos sintéticos, geralmente inaplicáveis aos produtos da classe de fitoterápicos (TOBIAS, 2007).

Uma grande parte das plantas medicinais brasileiras encontra-se descrita apenas na primeira edição da Farmacopéia Brasileira, editada em 1926, com partes das mesmas suprimidas na Segunda edição ou destinadas ao Formulário Nacional. Com os avanços científicos e tecnológicos, suas

monografias tornaram-se obsoletas para fins analíticos. Sendo assim, quando uma droga vegetal não consta em uma Farmacopéia atualizada, é essencial que a empresa que emprega essa planta como matéria-prima elabore uma monografia estabelecendo seus padrões de qualidade (FARIAS, 1999). Porém, fica evidente em nosso país, ainda bastante enraizado às tradições populares, que grande parte das drogas vegetais estão sendo utilizadas indiscriminadamente, sem quaisquer cuidados ou medidas de controle, fundamentado no pensamento de que “o que é natural não faz mal”. É fato bastante conhecido nos meios científicos que dependendo da dose, podem-se ter plantas com atividade terapêutica ou tóxica. Como exemplo, a *Digitalis purpurea* L. (popularmente conhecida como “dedaleira”), espécie vegetal que contém glicosídeos cardiotônicos, utilizada em casos de insuficiência cardíaca, com dose terapêutica muito próxima à dose tóxica. Uma dose um pouco mais elevada pode causar intoxicação, provocando a morte por parada cardíaca (SIMÕES, 2004).

Os processos de prospecção fitoquímica são de extrema importância, pois permitem identificar quais classes de metabólitos secundários e/ou princípios ativos estão presentes em determinada amostra vegetal e, a partir daí, orientar a extração e/ou fracionamento de extratos para isolamento de compostos de maior interesse.

Muitas substâncias, quando tratadas com determinados reativos, apresentam reações de coloração e/ou precipitação características, que permitem a identificação das amostras que as contêm. As plantas produzem diferentes substâncias químicas e o fazem em diferentes proporções, dependendo do hábitat, do regime de chuvas, da insolação, do solo, enfim, das

características climato-edáficas. Entretanto, algumas substâncias químicas são bastantes características para um determinado vegetal, e desta forma podem servir como parâmetro para sua caracterização e identificação.

No caso das cascas pulverizadas de *E. uchi*, ficou bem evidente, a partir da triagem fitoquímica executada, a presença de três grupos: saponinas, cumarinas e taninos. Apesar da reação de cloreto férrico no teste para flavonóides ter sido positiva, as demais reações não apresentaram positividade, descaracterizando assim a presença deste grupo de substâncias na amostra em estudo.

A positividade para taninos pode representar uma explicação quanto ao uso das cascas como antibacteriano ou mesmo antiinflamatório. Tal afirmação encontra respaldo ao confirmar-se o uso de plantas medicinais ricas em polifenóis para obtenção de efeito anti-séptico (KOLODZIEJ et al., 2003).

A presença de substâncias antimicrobianas nos vegetais superiores, bem como o seu uso para tratar infecções não são fatos recentes (RODRIGUES, 1980; BUHNER, 1999; COWAN, 1999; YUNES e CALIXTO, 2001). Durante a sua vida, as plantas reagem a várias injúrias advindas do ambiente, e são capazes de produzir compostos antimicrobianos para protegê-las contra infecções causadas por patógenos como bactérias, fungos e vírus (RODRIGUES, 1980; WOJTASZEK, 1997; YUNES e CALIXTO, 2001; ESQUENAZI et al., 2002).

Em vista da resistência que muitos patógenos humanos apresentam devido à seleção a que passaram pelo uso indiscriminado de antimicrobianos, da emergência de infecções incomuns e efeitos adversos apresentados por alguns medicamentos, as pesquisas tornaram-se mais direcionadas às plantas

medicinais, sendo que muitas espécies já se mostraram eficazes como agentes antimicrobianos (ZAMPINI et al., 2005).

Entre tantas plantas nativas e aclimatadas no Brasil, o objetivo deste trabalho foi o estudo farmacognóstico e das atividades antimicrobiana e citotóxica de extratos de cascas pulverizadas de *Endopleura uchi* (Huber) Cuatrec. As cascas de uchi-amarelo, como conhecido popularmente, são vendidas, trituradas ou pulverizadas, em mercados municipais, feiras de produtos naturais, internet ou até mesmo em farmácias magistrais, sem quaisquer restrições, e o que é mais preocupante, sem que haja estudos que comprovem sua real eficácia e segurança. A população utiliza o chá destas cascas no tratamento de diversos males, destacando-se seu uso no tratamento de miomas e inflamações do trato digestivo, gripes, resfriados e afecções intestinais. Assim, para atingir os objetivos deste trabalho, foram necessários estudos de caracterização físico-química, qualitativa e quantitativa da droga e dos extratos utilizados. É importante ressaltar que praticamente não existem estudos de referência com esta droga na literatura, o que torna este trabalho pioneiro, aumentando sua importância.

Inicialmente, foi determinada a granulometria da droga para sua padronização, a fim de otimizar os processos extrativos (SONAGLIO et al., 2004). A granulometria, que é o grau de divisão de pós, é expressa em referência à abertura nominal da malha do tamis utilizado (FARMACOPÉIA, 1988). Segundo a literatura (LIST e SCHMIDT, 2000), a droga pulverizada que apresente partículas de tamanho superior à classificação de fino é mais adequada para os processos de extração. No caso do material utilizado neste trabalho, aconteceu justamente o contrário. A granulação muito fina dificultou a

obtenção de extratos por turbo-extração e por percolação, sobretudo no momento da filtração. Constata-se que o uchi-amarelo é vendido como pó fino para facilitar o seu encapsulamento, mesmo sendo proibido, por empresas que lidam com o comércio de produtos naturais. Para fins científicos, o ideal seria trabalhar com cascas moídas de forma mais grosseira, acima da classificação de pó muito fino.

Uma das importâncias do pH nos vegetais está no mecanismo de formação de ATP, que é impulsionado por uma força próton-motriz durante a fotofosforilação nos cloroplastos (STRAYER, 1996). O ATP é uma molécula de alta energia, que acopla reações não favoráveis no interior das células. Entre essas reações, estão aquelas que fazem parte da biossíntese de enzimas importantes no metabolismo secundário (STRAYER, 1996). As alterações metabólicas provocadas por reações de óxido-redução podem modificar o pH das células vegetais, promovendo desvio das rotas metabólicas normais (STRAYER, 1996). De acordo com os dados da Tabela 3, encontrou-se um pH médio de 4,85 na amostra de *E. uchi*, conferindo-a um caráter ácido.

A determinação do teor de cinzas totais permite a verificação de impurezas inorgânicas não-voláteis (SIMÕES et al., 2004; VIGO et al., 2004). Essa análise permite a verificação de adulteração da amostra, através da observação da quantidade de material contaminante na mesma, após a calcinação. As cinzas totais incluem aquelas derivadas de tecido vegetal (cinzas fisiológicas) e derivadas de materiais estranhos, especialmente areia e terra aderente à superfície da droga (cinzas não fisiológicas) (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2000). Como não existem valores de teor de cinzas totais, na

literatura, para as cascas de *Endopleura uchi*, os resultados obtidos neste trabalho tornam-se importantes para o processo de sua padronização.

Outro parâmetro que auxilia a caracterização da droga é representado pela perda por dessecação, que está ligada à estabilidade microbiológica da droga, como expressão de sua susceptibilidade ao desenvolvimento de bactérias e fungos, e estabilidade química, representada especialmente pelos processos de hidrólise (WHO, 1992). A variabilidade nos valores pode ser reduzida, desde que haja padronização nos parâmetros de plantio, coleta, armazenagem e tratamento prévio da droga utilizada. A perda por dessecação pode fornecer dados acerca do rendimento de extração, já que a secagem influi no estado de integridade das estruturas celulares, expondo-as mais ou menos ao contato com solventes (HARBORNE, 1993). Além do mais, sob o ponto de vista tecnológico e de produção, é importante conhecer quantitativamente o conteúdo de água presente na matéria-prima vegetal, para que este valor seja considerado nos cálculos de rendimento. Embora não existam dados de referência na literatura para *E. uchi*, os valores encontrados tanto para perda por dessecação em balança com infravermelho quanto para perda por dessecação em estufa, estão abaixo dos limites máximos encontrados no código oficial brasileiro (8 a 14% de umidade), com relação à maioria das drogas vegetais constituídas de sumidades floridas (FARMACOPÉIA, 2000).

Há uma considerável variação na distribuição dos extrativos através da madeira de uma determinada espécie vegetal. Açúcares e outros constituintes da seiva e as substâncias de reserva como ácidos graxos e amidos são encontradas no alburno. Materiais fenólicos, contudo, são usualmente depositados no cerne. Existe ainda uma variação na quantidade de material

depositado através da altura da árvore e entre o tronco e os galhos (BUCHANAN, 1963). De acordo com BROWNING (1967), a extração com solventes orgânicos (éter, acetona, etanol, benzeno, e álcool-benzeno) retira da madeira, resina, ácidos graxos, ésteres, ceras, substâncias insaponificáveis e materiais corantes. A extração em água retira sais inorgânicos, açúcares, polissacarídeos e algumas substâncias fenólicas. Alguns dos materiais solúveis em água são mais ou menos solúveis em solventes orgânicos (NEARN, 1955).

O ensaio do teor de extrativos (TE) indica a quantidade de substâncias extraíveis, ou seja, solúveis em determinado sistema solvente. É um método empregado na seleção do solvente mais adequado à extração das substâncias de interesse de uma planta ou como indicativo para o ajuste da quantidade de matéria-prima a ser utilizada visando uma concentração final determinada de substância de interesse no produto da extração. Neste estudo, o teor de extrativos da droga vegetal foi empregado exclusivamente como um ensaio auxiliar na caracterização físico-química, visto que se trata de um parâmetro importante no controle de qualidade da matéria-prima vegetal. O valor de TE encontrado para a droga vegetal em estudo foi de 13,77 % (m/m).

Considerando que o presente trabalho propôs-se a buscar e comprovar o efeito antibacteriano de extratos de cascas pulverizadas de *E. uchi* e considerando ainda a bem documentada atividade antimicrobiana apresentada pelos taninos, justifica-se a realização do doseamento deste grupo de substâncias presentes neste farmacógeno. Porém, ao efetuarem-se os doseamentos, estava-se na verdade sendo escolhido um parâmetro pelo qual pudéssemos optar pelos melhores extratos, ao menos segundo o teor total de taninos, para que fossem empregados nos testes antimicrobianos e citotóxicos.

Das análises dos dados apresentados na Tabela 14, constatou-se que o extrato a 5% (m/v) com maior teor de taninos totais foi o preparado por maceração ( $23,62\% \pm 1,0$ ); o extrato a 10% (m/v) com maior teor de taninos totais foi o preparado por percolação ( $32,85\% \pm 1,62$ ), sendo também, o extrato com o maior teor de taninos totais dentre todos os demais; por fim, o extrato a 20% (m/v) com o maior teor de taninos totais foi o preparado por turbo-extração ( $24,77\% \pm 2,54$ ).

Ainda, além destes três extratos, foram inclusos, nos testes biológicos, a infusão 10% (m/v) ( $26,06\% \pm 4,27$ ) e a decocção 20% (m/v) ( $20,27\% \pm 1,16$ ), uma vez que o uso popular é quase que totalmente baseado no consumo de chás. Verificamos que para alguns processos de extração, os valores do teor de taninos totais (TT) encontrados nos extratos a 5% (m/v) são muito próximos aos valores encontrados nos extratos a 20% (m/v), sendo que estas diferenças não são estatisticamente significativas ( $P < 0,05$ ), o que os tornam mais interessantes do ponto de vista econômico, uma vez que é necessário menos material vegetal ao prepará-los. Esses valores de TT encontrados para os extratos de cascas pulverizadas de *E. uchi*, em torno de 21%, podem ser considerados razoáveis, comparando-se com os valores encontrados por Yamaguti-Sasaki e colaboradores (2007), que trabalharam com extratos aquosos 5% (m/v) ( $16,16\% \pm 0,44$ ), brutos (acetona:água) ( $31,15\% \pm 1,46$ ) e frações semi-purificadas ( $30,05\% \pm 0,54$ ;  $17,09\% \pm 0,52$ ) de sementes de *Paullinia cupana* H. B. K. var. *sorbilis* (Mart.) Ducke (“guaraná”).

O reagente de Folin-Denis não é específico para uma determinada classe de metabólitos e pode detectar todos os fenóis, ácidos fenólicos, flavonóides e taninos presentes em uma planta. Assim, esta metodologia pode ser usada

para a quantificação do total de fenóis, uma vez que ocorre a oxidação de qualquer fenol presente pela reação com o ácido fosfomolibídico e tungístico do reagente de Folin-Denis (TEIXEIRA et al., 1990, FERREIRA et al., 2004). A partir da curva analítica obtida com a solução padrão de ácido tânico pôde-se calcular, através da equação da reta, a porcentagem de fenóis totais existentes nas amostras. Assim, constatamos que os extratos aquosos obtidos por decocção e infusão apresentaram os maiores valores de fenóis totais, o que pode ser explicado, pela polaridade similar do solvente e dos polifenóis. Podemos sugerir também que os processos de decocção e infusão, por serem métodos de extração com aquecimento, retiram uma quantidade maior de substâncias, uma vez que o calor aumenta a solubilidade das mesmas.

Ainda com relação à caracterização fitoquímica, procurou-se avaliar a atividade antioxidante dos extratos. O DPPH é um radical livre estável que interage com substâncias antioxidantes, que, por sua vez, transferem elétrons ou átomos de hidrogênio ao DPPH, neutralizando o radical livre. Quando o processo antioxidante ocorre, a coloração da reação muda de violeta a amarelo e a absorvância torna-se reduzida a 517 nm (BANERJEE et al., 2005). A análise de variância demonstrou que os extratos testados apresentaram valores semelhantes de atividade anti-radicalar quando comparados entre si e diferenças estatísticas significantes quando comparados com o extrato de *Ginkgo biloba* e demais padrões (ácido gálico, vitamina C e rutina). Porém, há de se dizer que os valores de atividade sequestrante do radical estável DPPH dos padrões são altos por se tratarem de substâncias puras isoladas e que, desta forma, não descaracterizam a atividade antioxidante de nossas amostras. Na verdade, como não há valores de referência citados na literatura para as

cascas de *E. uchi*, devemos aceitar os resultados aqui apresentados como padrão para o controle de qualidade desta droga vegetal.

A partir do perfil espectrofotométrico na faixa de comprimento de onda da radiação ultravioleta, observou-se correspondência do pico de máxima absorção entre todos os extratos e os padrões. No entanto, como não foi isolada nenhuma substância dos extratos, não é possível afirmar a constituição dos mesmos com base nos espectros de ultravioleta.

Quanto ao preparo dos extratos, a escolha dos solventes para extração deve basear-se, principalmente, na seletividade que o mesmo apresenta pelos compostos a serem extraídos. No entanto, outras características não podem ser ignoradas, como a facilidade de manuseio, proteção ao ambiente e toxicidade (LIST e SCHMIDT, 2000). Foi possível observar que a extração mais eficiente, em termos de rendimento, foi a percolação. Cabe ressaltar que dos processos extrativos utilizados, o único que se enquadra no grupo de processos extrativos exaustivos é este, possibilitando o esgotamento da matéria-prima. Assim, considerando apenas o rendimento final obtido para os extratos, podemos assegurar que a percolação trata-se do processo extrativo mais apropriado. Porém, na escolha de um método extrativo, deve-se avaliar a eficiência, a seletividade, a estabilidade das substâncias extraídas e o custo do processo escolhido, considerando a finalidade do extrato que se quer preparar (COSTA, 1994; SIMÕES et al., 2003). Assim sendo, a turbo-extração aparece como uma boa alternativa. Esta técnica baseia-se na extração com simultânea redução do tamanho de partícula, resultado da aplicação de elevadas forças de cisalhamento, geradas no pequeno espaço compreendido entre o extrator e um rotor de alta velocidade. A redução drástica do tamanho da partícula e, o

conseqüente rompimento das células, favorece a rápida dissolução das substâncias ativas. Nestas circunstâncias, a difusão das substâncias dissolvidas pela membrana celular fica relegada a um plano secundário, resultando em tempos de extração da ordem de minutos e o quase esgotamento da droga. A esse incremento da eficiência somam-se a simplicidade, rapidez e versatilidade da técnica, que permitem a fácil utilização dela em processamentos em pequena e média escala (DÄR, 1981; VOIGT e BORNSCHEIN, 1982; SIMÕES et al., 2003). No caso da decocção e da infusão, o solvente aquoso apresenta certos inconvenientes, tais como o alto ponto de ebulição, que pode corromper a estrutura de algumas substâncias presentes no material vegetal, e o fato de extrair sais inorgânicos, que possivelmente interferirão nos ensaios biológicos. Portanto, antes de utilizá-los, seria necessário fazer uma partição, para remover estes reagentes.

Nas análises de atividade antimicrobiana, pelo método de difusão em ágar, não obtivemos resultados satisfatórios para nenhum dos extratos testados, sendo que verificamos uma pequena atividade destes frente a *S. aureus* nos testes de difusão com templates e com discos e ainda uma ação isolada do extrato I10 contra *C. albicans* no teste de difusão com discos. Porém, em estudos preliminares com outros extratos de cascas pulverizadas de *E. uchi* realizados por POLITI et al. (2008), verificou-se uma pequena atividade frente a *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus* e *Candida albicans*. Aqui vale ressaltar que, pelo fato dos taninos complexarem-se com proteínas, pode ter ocorrido precipitação local, impedindo os mesmos de difundirem-se no meio de cultura, impossibilitando sua real atividade, mesmo tendo sido utilizado o Tween<sup>®</sup> 80.

De forma geral, o extrato de uma planta contém baixa concentração de compostos ativos e um grande número de outros compostos que podem ter atividades promissoras, embora necessitando para isto, adequada sensibilidade dos testes (RATES, 2001a). É possível também que existam outras substâncias nos extratos interferindo com o potencial antimicrobiano real dos taninos neles presentes, sendo, portanto, bem mais interessante fracioná-los para isolarmos os compostos, obtendo-se assim, uma avaliação precisa.

Apesar desta baixa atividade apresentada pelos extratos testados, foi feita a determinação da concentração inibitória e bactericida mínima para a linhagem de *S. aureus* utilizada. Ao menos para as concentrações utilizadas, não foi verificada nenhuma atividade. Desta forma, seria necessário realizar novos testes, com outras concentrações, para assegurar de fato a atividade antimicrobiana dos extratos de cascas de *E. uchi*.

O ensaio do trânsito intestinal em camundongos demonstrou que houve uma pequena redução na distância percorrida pelo carvão ativo nos animais após administração do extrato decocção 20% (m/v), obtido de cascas pulverizadas de *E. uchi*, quando comparados com o controle negativo (solução fisiológica). Porém, segundo o teste t de Student realizado, o valor de distância percorrida pelo carvão ativo encontrado na amostra não é significativamente diferente do valor encontrado para o controle. Assim sendo, não podemos concluir que o extrato aplicado tenha alterado a motilidade intestinal dos animais. Uma possibilidade alternativa seria testar frações dos extratos, em busca de um resultado mais satisfatório.

Nos testes de toxicidade oral aguda em camundongos os resultados não revelaram sinais de toxicidade sistêmica com a administração do extrato obtido

por decocção 20% (m/v). Não foram observadas mortes, tampouco alterações fisiológicas ou comportamentais em nenhum dos animais. Os resultados caracterizam o extrato de cascas de *Endopleura uchi* como pouco tóxico, conforme Larini (1987), que classifica os agentes tóxicos via oral como extremamente tóxicos ( $DL_{50}$  igual ou inferior a 25 mg/kg), altamente tóxicos ( $DL_{50}$  entre 100 e 500 mg/kg), mediamente tóxicos ( $DL_{50}$  entre 500 e 2000 mg/kg) e pouco tóxicos ( $DL_{50}$  acima de 2000 mg/kg).

Na avaliação de citotoxicidade em células fibroblásticas da córnea de coelho da linhagem SIRC CCL-60, nenhum dos extratos avaliados mostraram-se tóxicos, sendo que todos os valores, em porcentagem, de sobrevivência das células foi 100%. Assim sendo, o  $IC_{50}$  para os extratos utilizados é maior que a maior concentração testada (2 mg/mL).

## 7. CONCLUSÕES

- ❖ Uma vez que nenhum estudo de controle de qualidade fora feito com cascas de *E. uchi*, os resultados obtidos em nosso trabalho conferem um padrão para eventuais pesquisas futuras.
- ❖ A triagem fitoquímica revelou a presença de três classes de metabólitos secundários predominantes: taninos, cumarinas e saponinas, embora a importância da droga como agente fitoterápico ao menos em nosso trabalho esteja voltada para o estudo dos primeiros. Aqui cabe ressaltar que, apesar de enfocarmos esta classe, sabemos que o principal marcador do uchi amarelo é uma isocumarina, a bergenina. Porém, não foi a intenção trabalhar com composto isolado, mas sim com extratos, sobretudo considerando-se que o uso popular é basicamente voltado ao consumo de chás.
- ❖ A análise microscópica comparativa comprovou que as amostras utilizadas em nosso trabalho são de fato cascas de *Endopleura uchi*.
- ❖ O doseamento de taninos totais de todos os extratos revelou que o processo mais eficaz em extração foi a percolação 10% (m/v), embora em termos de rendimento bruto, o melhor extrato tenha sido a percolação 20% (m/v).
- ❖ A análise cromatográfica dos extratos revelou a presença dos principais marcadores utilizados, a bergenina e o ácido gálico, sendo que este último confirma que os extratos possuem taninos em sua constituição.
- ❖ Dos extratos escolhidos para os testes antimicrobianos, nenhum apresentou atividade inibitória de crescimento satisfatória; mesmo os que

apresentaram, não foram efetivos na determinação da concentração inibitória mínima.

❖ O ensaio de trânsito intestinal em camundongos, executado com o extrato decocção 20% (m/v), não apresentou alterações significativas de motilidade do carvão ativo.

❖ No teste de toxicidade oral aguda em camundongos, executado também com o extrato decocção 20% (m/v), os animais não apresentaram quaisquer sinais de alterações fisiológicas ou comportamentais, tampouco ocorreram mortes. Assim, para a concentração testada, o extrato não apresentou traços de toxicidade.

❖ As análises de citotoxicidade indicaram que todos os extratos testados apresentaram  $IC_{50}$  maior que a maior concentração aplicada, indicando assim, que não conferem riscos de consumo.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDOU, A. M.; HIGASHIGUCHI, S.; ABOUELEININ, A. M.; KIM, M.; IBRAHIM, H. R. Antimicrobial peptides derived from hen egg lysozyme with inhibitory effect against *Bacillus* species. **Food Control.**, v.18, p.173-178, 2007.

AKIYAMA, H.; FUJII, K.; YAMAZAKI, O.; OONO, T.; IWATSUKI, K. Antibacterial action of several tannins against *Staphylococcus aureus*. **J. Antimicrob. Chemoter.**, v.48, n.4, p.487-491, 2001.

AMATO NETO, V.; LEVI, G.C.; LOPES, H.V.; MENDONÇA, J.S.; BALDY, J.L.S. **Antibióticos na prática médica**. 5.ed. São Paulo: Roca, 2000. 304 p.

ANSEL, H. C.; POPOVICH, N. G.; ALLEN JR., L. V. **Farmacotécnica: formas farmacêuticas e sistemas de liberação de fármacos**. 6.ed. São Paulo: Premier, 2000. p.516-518.

ANVISA, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Comissão Permanente de Revisão da Farmacopéia Brasileira. Farmacopéia Brasileira. 2004. Disponível em: <http://www.farmacopeia.org.br>. Acesso em: 01 ago. 2008.

AOAC. Association of Official Analytical Chemists. **Official Methods of Analysis of the Association of Chemists**. 13<sup>th</sup> ed. Washington, D.C.: Association of Official Analytical Chemists. 1984.

AUSTIN, D. F. *Iponema littoralis* (Convolvulaceae) – Taxonomy, distribution and ethnobotany. **Econ. Bot.**, v.45, p. 251-6, 1991.

BANDEIRA, K. F. **Otimização e comparação de metodologias de extração de casearinas em *Casearia sylvestris***. 2004. p.11-16. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Química, UNESP, Araraquara (SP), 2004.

BANERJEE, A.; DASGUPTA, N.; DE, B. In vitro study of antioxidant activity of *Syzygium cumini* fruit. **Food Chem.**, v. 90, p.727-733, 2005.

BARRY, A.L. Procedures and theoretical considerations for testing antimicrobial agents in agar media. In: Lorian, **Antibiotics in Laboratory Medicine**. 3.ed. Baltimore: The Williams & Wilkins Co., Md, 1991.

BHAT, T.K.; SHING, B.; SHARMA, O.P. Microbial degradation of tannins – A current perspective. **Biodegradation**, v.9, p.343-357, 1998.

- BORENFREUD, E.; PUERNER, J. A. A simple quantitative procedure using monolayer cultures for cytotoxicity assays (HTD-NR 90). **J. Tissue Cult. Method.**, Gaithersburg, v.9, n.1, p.7-9, 1984.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução - RDC n. 48 de 16 de março de 2004. Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, seção , 25 mar. 2004.
- BRITO, A. R. M. S. Toxicidade aguda (dose simples). In: **Manual de ensaios toxicológicos in vivo**. Campinas: UNICAMP; Rio de Janeiro: Editora Três, 1994, p.15-22.
- BROGGINI, L. S. C. **Estudo fitoquímico e farmacológico de *Serjania erecta* Radlk.**: análises *in vivo* e *in vitro*. Ribeirão Preto: Universidade de Ribeirão Preto, 2006. 61f. Dissertação (Mestrado) – Universidade de Ribeirão Preto, Ribeirão Preto (SP), 2006.
- BROWN, H. P.; PANSHIN, A. J.; FORSAITH, G. C. **Textbook of wood technology**. New York: McGraw-Hill, 1952. v. 2, p. 736-744.
- BROWNING, B. L. **Methods of wood chemistry**. New York, John Wiley, 1967. 384p.
- BUCHANAN, M. A. Extraneous components of wood. In: BROWNING, B.L., (Ed.) **The chemistry of wood**. New York: John Wiley, 1963. p.313-68.
- BUELGA, C. S.; SCALBERT, A. Proantocyanidins and tannin-like compounds-nature, occurrence, dietary intake and effects on nutrition and health. **J. Sci. Food Agr.**, v. 80, p. 1094 - 1117, 2000.
- BUHNER, S.H. **Herbal antibiotics: natural alternatives for treating drug – Resistant Bacteria (A medicinal herb guide)**. Pownal, Vermont: Storey Books, 1999.
- CAMARGO, M. T. R. A. **Contribuciones a los estudios etnofarmacobotánicos de espécies vegetales usados en los ritos afrobrasileiros**. Caracas: Ed. Arte, 1999.
- CAMARGO, C. B. S.; PEDRO, C. C.; LOURENÇO, D. S.; GIRONI, R. H. A. R.; MARTINEZ, R. Infecção de vias urinárias na comunidade de Ribeirão Preto - SP: etiologia, sensibilidade bacteriana a antimicrobianos e implicações terapêuticas. **Medicina**, Ribeirão Preto, v.35, p.173-178, abr./jun. 2002

- CAMPOS, L. C.; TRABULSI, L. R. Staphylococcus. In: TRABULSI, L. R. *et al.* **Microbiologia**. 3. ed. São Paulo: Atheneu, 1999. p.149-155.
- CHOI, Y. M.; NOH, D. O.; CHO, S. Y.; SUH, H. J.; KIM, K. M.; KIM, J. M. Antioxidant and antimicrobial activities of propolis from several regions of Korea. **LWT**, v.39, p.756-761, 2006.
- CHOMNAWANG, M. T.; SURASSMO, S.; NUKOOLKARN, V. S.; GRITSANAPAN, W. Antimicrobial effects of Thai medicinal plants against acne inducing bacteria. **J. Ethnopharmacol.**, v.101, n.1-3, p. 330-333, 2005.
- CLARK, A. M. Natural products as a resource for new drugs. **Pharmacol. Res.**, v. 13, p. 1133-141, 1996.
- CORRÊA, M. P. **Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas**. Rio de Janeiro: Imprensa Nacional, 1984. v.6, 764p.
- COSTA, A. F. **Farmacognosia**. 5.ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 1994. v.3.
- COWAN, M. M. Plant products as antimicrobial agents. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 12, n. 4, p. 564-582, 1999.
- CUATRECASAS, J. A. A taxonomic revision of Humiriaceae, contributions from the United States National Herbarium. **Bull. United States National Museum**, v.35, part 2, 1961.
- DÄR, A. **Tecnologia farmacêutica**. Zaragoza: Acribia, 1981. p.141-142, 144-152, 366.
- DE ANGELIS, I.; GIUBILEI, L.; STAMMATI, A.; ZAMPAGLIONI, F.; ZUCCO, F.; BARTOLINI, G.; SALVATORE, G. *In vitro* toxicity of some cosmetic ingredients. **Food Chem. Toxicol.**, v.24, n.6/7, p.477-479, 1986.
- DEL FIOLE, F. S.; MATTOS FILHO, T. R.; GROPPA, F. C. Resistência bacteriana. **Rev. Bras. Med.**, v.57, n.10, p.85-87, 2000.
- DEUTSCHES ARZNEIBUCH. 10.ed. Stuttgart: Deutscher Apotheker, 1994.
- DUERR, A.; SIERRA, M.; CLARK, L.; LANDESMAN, S.; EHRLICH, I.; MINKOFF, H. Vaginal candidiasis among HIV infected women. In: 9<sup>th</sup> International Conference on AIDS, Institute for Clinical and Experimental Virology of the Free University of Berlin, Berlin, 1993.
- ELOFF, J. N. A sensitive and quick microplate method to determine the minimal inhibitory concentration of plant extracts for bacteria. **Planta Med.**, v.64, p.711-713, 1998.

- ESPINEL-INGROFF, A.; PFALLER, M. A. Antifungal agents and susceptibility tests. In: MURRAY, P. R.; BARON, E. J.; PFALLER, M. A.; TENOVER, F. C.; YOLKEN, R. H. **Manual of clinical microbiology**. 6<sup>th</sup>.ed. Washington, DC: C. V. Mosby, 1995.
- ESQUENAZI, D.; WIGG, M. D.; MIRANDA, M. M. F. S.; RODRIGUES, H. M.; TOSTES, J. B. F.; ROZENTAL, S.; SILVA, A. J. R.; ALVIANO, C. S. Antimicrobial and antiviral activities of polyphenolics from *Cocos nucifera* Linn. (Palmae) husk fiber extract. **Res. Microbiol.**, v.153, n. 10, p. 647-652, 2002.
- FALCÃO, D. Q.; COSTA, E. R.; ALVIANO, D. S.; ALVIANO, C. S.; KUSTER, R. M.; MENEZES, F. S. Atividade antioxidante e antimicrobiana de *Calceolaria chelidonioides* Humb. Bonpl. e Kunth. **Rev. Bras. Farmacognos.**, v.16, n. 1, p. 73-76, 2006.
- FARIAS, M. R. Avaliação da qualidade de matérias-primas vegetais. In: SIMÕES, C. M. O. *et al.* (Org.). Farmacognosia: da planta ao medicamento. Porto Alegre: Ed. UFRGS; Florianópolis: Ed. UFSC, 1999. p.197-220.
- FARMACOPÉIA dos Estados Unidos do Brasil. 2.ed. São Paulo: Indústria Gráfica Siqueira, 1959.
- FARMACOPÉIA BRASILEIRA. 4. ed. São Paulo: Atheneu, 1988, 1996, 2000.
- FARMER, R. H. **Chemistry in the utilization of wood**. Oxford: Pergamon Press, 1967. v. 9.
- FERREIRA, S. H.; BARATA, L. E. S.; SALLES FILHO, S. L. M.; QUEIROZ, S. R. R. **Medicamentos a partir de plantas medicinais no Brasil**, Academia Brasileira de Ciências, São Paulo, 1998.
- FERREIRA, E. C.; NOGUEIRA, A. R. A.; SOUZA, G. B.; BATISTA, L. A. R. Effect of drying method and length of storage on tannin and total phenol concentrations in *Pigeon pea* seeds. **Food Chem.**, v.86, p.17-23, 2004.
- FERREIRA, A. G.; MAGALHÃES, L. A. M. ; LIMA, M. P. Isolamento de Bergenina nos frutos de *Endopleura uchi* (HUMIRIACEAE). In: REUNIÃO ANUAL DA SBPC, 57, 2005, Fortaleza, CE. Anais eletrônicos da 57<sup>a</sup>. Reunião Anual da SBPC, Fortaleza, 2005. CD-ROM.
- FICHTENBAUM, C. J.; KOLETAR, S.; YIANNOUTSOS, C.; HOLLAND, F.; POTTAGE, J.; COHN, S. E.; WALAWANDER, A.; FRAME, P.; FEINBERG, J.; SAAG, M.; VAN DER HORST, C.; POWDERLY, W. G. Refractory mucosal

candidiasis in advanced human immunodeficiency virus infection. **Clin. Infect. Dis.**, v.30, p.749-756, 2000.

FLÓREZ, J. A.; ROTH, E. P.; LINARES, S. G.; ÁLVAREZ, S. M. Outbreak of *Shigella sonnei* in a rural hotel in La Gomera, Canary Islands, Spain. **Int. Microbiol.**, v.8, p.133-136, 2005.

FREIBURGHAUS, F.; KAMINSKY, R.; NKUNYA, M. H. H.; BRUN, R. Evaluation of African medicinal plants for their *in vitro* trypanocidal activity. **J. Ethnopharmacol.**, v. 55, p. 1-11, 1996.

GLASL, H. Zur photometrie in der drogenstandardisierung - 3. Gehaltsbestimmung von Gerbstoffdrogen. **Deutsche Apotheker Zeitung**, v.123, n.42, p.1979-1987, 1983.

GOEL, R. K.; MAITI, R. N.; MANICKAM, M.; RAY, A. B. Antiulcer activity of naturally occurring pyrano-coumarin and isocoumarins and their effect on prostanoïd synthesis using human colonic mucosa. **Ind. J. Exp. Biol.**, v.35, n.10, p.1080-1083, 1997.

GRANJA, A. Acácia negra e tanino. **Roessléria**, Porto Alegre, v.8, n.1. p.1-71, 1986.

HAGERMAN, A. E. Tannin Chemistry. 2002. Disponível em: <<http://www.users.muohio.edu/hagermae/tannin.pdf>>. Acesso em: 23 dez. 2008.

HARBORNE, J. B.; BAXTER, H. **Phytochemical Dictionary. A handbook of Bioactive Compounds from Plants**. London: Taylor e Francis, 1993.

HASLAM, E. Natural polyphenols (vegetable tannins) as drug: possible modes of action. **J. Nat. Prod.**, v.59, p.205-215, 1996.

HERZNER, H.; PALMACCI, E. R, SEEBERGER, P. H. Short total synthesis of 8,10-di-o-methylbergenin. **Organic Lett.**, v.17, p.2965-2967, 2002.

HOSTETTMANN, K.; QUEIROZ, E. F.; VIEIRA, P. C. **Princípios ativos de plantas superiores**. São Carlos: EdUFSCar, 2003. p.9, 60-61.

HUSOY, T.; SYVERSEN, T.; JENSSEN, J. Comparisons of four *in vitro* cytotoxicity tests: the MTT assay, NR assay, uridine incorporation and protein measurements. **Toxicol. In Vitro.**, v.7, n.2, p.149-154, 1993.

JANSEN, P.; JAGENAU, A. H. A new series of potent analgesics. Part I – Chemical structure and pharmacological activity. **J. Pharm. Pharmacol.**, v.9, p.381-400, 1957.

- KHANBABAEE, K.; van REE, T. Tannins: classification and definition. **Nat. Prod. Rep.**, v.18, p.641-649, 2001.
- KARNOVSKY, M. J. A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy. **J. Cell. Biol.**, v.27, p.137A-138A, 1965.
- KIM, H. S.; LIM, H. K.; CHUNG, M. W.; KIM, Y. C. Antihepatotoxic activity of berberin, the major constituent of *Mallotus japonicus*, on carbon tetrachloride intoxicated hepatocytes. **J. Ethnopharmacol.**, v.69, p.79-83, 2000.
- KOŁODZIEJ, H.; KAYSER, O.; LATTÉ, K. P.; FERREIRA, D. Evaluation of the antimicrobial potency of tannins and related compounds using the microdilution broth method. **Planta Med.**, v.65, p.444-446, 1999.
- KONEMAN, E. W.; ALLEN, S. D.; JANDA, W. M.; SCHRECKENBERGER, P. C.; WINN, W. C. **Diagnóstico Microbiológico**. 5.ed. Rio de Janeiro: Medsi, 2001.
- KRAUS, J. E.; ARDUIM, M. **Manual básico de métodos em morfologia vegetal**. Seropédica: Ed. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 1997.
- KUSUMOTO, I. T.; NAKABAYASHI, T.; KIDA, H.; MIYASHIRO, H.; HATTORI, M.; NAMBA, T.; SHIMOTOHNO, K. Screening of various plant extracts used in ayurvedic medicine for inhibitory effects on human immunodeficiency virus type 1(HIV-1) protease. **Phytother. Res.**, v.9, n.3, p.180-184, 1995.
- LAGOS, I.A. Estudo químico de fitoconstituintes isolados de *Sacoglottis uchi* Huber (Humiriaceae). Dissertação (Mestrado em Química), Universidade Federal do Amazonas, 2006.
- LARINI, L. **Toxicologia**. 1.ed. São Paulo: Manole, 1987. p.301.
- LEI, J.; YU, J.; YU, H.; LIAO, Z. Composition, cytotoxicity and antimicrobial activity of essential oil from *Dictamnus dasycarpus*. **Food Chem.**, v.107, p.1205-1209, 2008.
- LIMA, E. O.; GUERRA, M. F. L.; SILVA, M. G. Atividade antimicrobiana do óleo essencial de *Turnera ulmifolia* L. (Turneraceae). **Rev. Bras. Farm.**, Rio de Janeiro, v.81, n.3/4, p.95-97, 2000.
- LIST, P. H.; SCHMIDT, P. C. **Phytopharmaceutical technology**. Florida: CRC Press, 2000.
- LÓPEZ-MUÑOZ, F.; ALAMO, C.; GARCÍA-GARCÍA, P. "The herbs that have the property of healing...": The phytotherapy in *Don Quixote*. **J. Ethnopharmacol.**, v.106, n.3, p.429-441, 2006.

- LUNA, J. S. Estudo dos constituintes químicos de *Endopleura uchi* (Humiriaceae). 2000a. Dissertação (Mestrado em Química e Biotecnologia) - Universidade Federal de Alagoas, 2000a.
- LUNA, J. S.; SILVA, T. M.; BENTO, E. S.; SANT`ANA, A. E. G. Isolamento e identificação estrutural dos constituintes químicos de *Endopleura uchi* (Humiriaceae). In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE QUÍMICA, 23, 2000b, Poços de Caldas: **Livro de Resumos**, 2000b, v.2.
- LUNA, J.S.; BENTO, E.S.; SANT`ANA, A.E.G. Identificação estrutural de dois triterpenóides pentacíclicos de *Endopleura uchi* (Humiriaceae). In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE QUÍMICA, 24, 2001. Poços de Caldas: **Livro de Resumos**, 2001.
- MACHADO, F. A. V. **Estudo fitoquímico e avaliação da capacidade antioxidante de extratos das cascas de *Stryphnodendron polyphyllum* Mart., Leguminosae, barbatimão**. 2005. 100p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2005.
- MADHAN, B.; SUBRAMANIAN, V.; RAGHAVA RAO, J.; BALACHANDRAN, U. N.; RAMASAMI, T. Stabilization of collagen using plant polyphenol: role of catechin. **Int. J. Biol. Macromol.**, v.37, n.1-2, p.47-53, 2005.
- MAGALHÃES, L. A. M.; LIMA, M. P.; MARINHO, H. A.; FERREIRA, A. G. Identificação de bergenina e carotenóides no fruto de uchi (*Endopleura uchi*, Humiriaceae). **Acta Amaz.**, v.37, n.3, p.447-450, 2007.
- MARTINS, L.T. *Staphylococcus*. In: TRABULSI, L. R. *et al.* **Microbiologia**. 3.ed. São Paulo: Atheneu, 1999. p.149-155.
- MARTINS, A. B., SACRAMENTO, L. V. S. Análise microscópica e física para controle de qualidade primário de matéria-prima vegetal pulverizada. In: CONGRESSO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UNESP, 16, 2004, Ilha Solteira. São Paulo: Pró-Reitoria de Pós-Graduação e Pesquisa, UNESP, 2004. CD-ROM.
- MARX, F., ANDRADE, E. H. A.; ZOGHBI, M. G. B.; MAIA, J. G. S. Studies of edible Amazonian plants. Part 5: Chemical characterization of Amazonian *Endopleura uchi* fruits. **Eur. Food Res. Technol.**, v.214, p.331-334, 2002.
- MELLO, J. C. P.; SANTOS, S. C. Taninos. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R.

(Orgs). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5.ed. Porto Alegre: UFSC, 2003. p.615-656.

MIGUEL, M. D.; MIGUEL, O. G. **Desenvolvimento de fitoterápicos**. São Paulo: Probe, 1999. 116 p.

MONTENEGRO, G. **Manual de técnicas de estudio structural y ultraestructural em vegetales**. Laboratório de botânica de la Facultad de Ciências Biológicas. Santiago de Chile: Pontificia Universidad Católica de Chile, 1985.

MÓS, E. N. Outras bactérias aeróbicas e anaeróbicas facultativas. In: TRABULSI, L.R. *et al.* **Microbiologia**. 3.ed. São Paulo: Atheneu, 1999. p.273-283.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **J. Immunol. Method.**, Amsterdam, v.65, p.55-63, 1983.

MULLIGAN, M. E.; MURRAY-LEISURE, K. A.; RIBNER, B. S.; STANDIFORD, H. C.; JOHN, J. F.; KORVICK, J. A.; KAUFFMAN, J. A.; YU, V. L. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: a consensus review of the microbiology, pathogenesis and epidemiology with implications for prevention and management. **Am. J. Med.**, v.94, p.313-328, 1993.

NCCLS. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved Standard - 8<sup>th</sup> Edition. Wayne, Pennsylvania: NCCLS, 2003a. (NCCLS document M2-A8).

NCCLS. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically. Approved Standard - 6<sup>th</sup> Edition. Wayne, Pennsylvania: NCCLS, 2003b. (NCCLS document M7-A6).

NEARN, W. J. - **Effect of water soluble extractives on the volumetric shrinkage and equilibrium moisture content of eleven tropical and domestic woods**. Mont Alto: Pennsylvania State University, 1955. 37p.

NIETO, L.; NORTHLAND, R.; PITTISUTTITHUM, P. *et al.* Posaconazole equivalent to fluconazole in the treatment of oropharyngeal candidiasis. In: INTERSCIENCE CONFERENCE ON ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY, 40, 2000, Toronto. **Abstracts Book**.

- NOSER, F. Cultura de células a service da cosmetologia. **Cosmet. Toiletries, Ed. Port.**, São Paulo, v.3, p.46-47, 1991.
- O'BRIEN, T. P.; FEDER, N.; MCCULLY, M. E. Polychromatic staining of plant cell walls by toluidine blue O. **Protoplasma**, v.59, p.368-373, 1964.
- O'BRIEN, J.; WILSON, I.; ORTON, T.; POGNAN, F. Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. **Eur. J. Biochem.**, v.267, p.5421-5426, 2000.
- ODDS, F. C. **Candida and candidosis**. London: Bailliere Tindall, 1988. p.117.
- OECD – Organization for Economic Co-operation and Development, Guideline 423: Acute Oral Toxicity – Acute Toxic Class Method.
- OLIVEIRA, A. L.; PADILHA, C. D.; ORTEGA, G. G.; PETROVICK, P. R. *Achyrocline satureioides* (Lam.) DC. (Marcela), Asteraceae: Avaliação comparativa da droga vegetal e estudos preliminares da otimização da extração. **Cad. Farm.**, v.17, n.1, p.33-38, 2001.
- OHNO, Y.; MIYAJIMA, A.; SUNOUCHI, M. Alternative methods for mechanistic studies in toxicology. Screening of hepatotoxicity of pesticides using freshly isolated and primary cultured hepatocytes and non-liver-derived cells, SIRC cells. **Toxicol. Lett.**, v.102-103, p.569-573, 1998.
- PIACENTE, S.; PIZZA, C.; DE TOMAZZI, N.; MAHMOOD, N. Constituents of *Ardisia japonica* and their *in vitro* anti-HIV activity. **J. Nat. Prod.**, v.59, n.6, p.565-569, 1996.
- POLITI, F. A. S.; SOFIATI, F. T.; SOUZA, T. M.; MOREIRA, R. R. D.; PRIETO, R. C. L. R. Antimicrobial activity of different extracts from barks of *Endopleura uchi* (huber) Cuatrec. (Humiriaceae). In: SIMPÓSIO DE PLANTAS MEDICINAIS DO BRASIL, 20, E CONGRESSO INTERNACIONAL DE ETNOFARMACOLOGIA, 10, 2008, São Paulo. CD de resumos, p.1240, 2008.
- POLITI, F. A. S.; SOFIATI, F. T.; HUBINGER, S. Z.; MOREIRA, R. R. D.; PRIETO, R. C. L. R. Quality control and preliminary phytochemistry screening of powdered barks of *Endopleura uchi* (Huber) Cuatrec. (Humiriaceae) commercially obtained. In: SIMPÓSIO DE PLANTAS MEDICINAIS DO BRASIL, 20, E CONGRESSO INTERNACIONAL DE ETNOFARMACOLOGIA, 10, 2008, São Paulo. CD de resumos, p.1240, 2008.
- PRISTA, L. N.; ALVES, A. C.; MORGADO, R. **Tecnologia farmacêutica**. 4.ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 1996. v.1, p.1113-1115, 1127.

PROVASI, M.; OLIVEIRA, C. E.; MARTINO, M. C.; PESSINI, L. G.; BAZOTTE, R. B.; CORTEZ, D. A. G. Avaliação da toxicidade e do potencial antihiperlipemizante da *Averrhoa carambola* L. (Oxalidaceae). **Acta Scient.**, v.23, n.3, p.665-669, 2001.

RATES, S. M. K. Plants as source of drugs. **Toxicon**, v.39, p.603-13, 2001a.

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

RIDDELL, R. J., CLOTHIER, R. H., BALLS, M. An evaluation of three *in vitro* cytotoxicity assays. **Food Chem. Toxicol.**, v.24, n.6/7, p.469-471, 1986.

RODRIGUES, C. J. **Mecanismos de resistência das plantas aos agentes patogênicos**. Lisboa: Junta de Investigações Científicas do Ultramar, 1980. p.23.

RODRIGUES, F.; ALVES, A. F.; LEMOS, L. Infecções urinárias diagnosticadas num serviço de urgência: dados microbiológicos e implicações na terapêutica e profilaxia. **Acta Pediatr. Portug.**, v.1, n.37, p.5-8, 2006.

RUHNKE, M.; SCHMIDT-WESTHAUSEN, A.; TRAUTMANN, M. *In vitro* activities of voriconazole (UK-109,496) against fluconazole susceptible and resistant *Candida albicans* isolates from oral cavities of patients with human immunodeficiency virus infection. **Antimicrob. Agents. Chemother.**, v.41, p.575-577, 1997.

SANT'ANA, A. E. G.; OMENA, M. C.; SANTOS, A. F. Atividades biológicas do óleo extraído das sementes de *Pterodon polygalaeflorus* Benth (Leguminosae) sobre vetores de doenças tropicais. In: SIMPÓSIO DE PLANTAS MEDICINAIS DO BRASIL, 16, 2000, Recife (PE). **Livro de Resumo**. v.229, 2000.

SANTOS, S. C.; MELLO, J. C. P. Taninos. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. (Orgs). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5.ed. Porto Alegre: UFSC, 2003. p.615-656.

SAOTOME, K.; MORITA, H.; UMEDA, M. Cytotoxicity test with simplified crystal violet staining method using microtitre plates and its application to injection drugs. **Toxicol. in Vitro**, v.3, n.4, p.317-321, 1989.

SASAKI, K.; TANAKA, N.; WATANABE, M.; YAMADA, M. Comparison of cytotoxic effects of chemicals in four different cell types. **Toxicol. in Vitro.**, v.5, n.5/6, p.403-406, 1991.

- SAXENA, G.; MCCUTCHEON, A. R.; FARMER, S.; TOWERS, G. H. N.; HANCOCK, R. E. W. Antimicrobial constituents of *Rhus glabra*. **J. Ethnopharmacol.**, v.42, p.95-99, 1994.
- SCALBERT, A. Antimicrobial properties of tannins. **Phytochem.**, v.30, n.12, p.1875-1883, 1991.
- SCHEFFER, M.C. Fisiologia pós-colheita de espécies medicinais, condimentares e aromáticas. In: WACHOWICZ, C.M.; CARVALHO, R.I.N. **Fisiologia vegetal: produção e pós-colheita**. Curitiba: Champagnat, 2002. p. 383-404.
- SCHULTES, R. E. De plantis toxicariis e mundo novo tropicale commentationes. XXI. Interesting native uses of the Humiriaceae in the northwest Amazon. **J. Ethnopharmacol.**, v.1, p.89-94, 1979.
- SHANLEY, P.; LUZ, L.; SWINGLAND, I. R. The faint promise of a distant market: a survey of Belém's trade in non-timber forest products. **Biodivers. Conservat.**, v.11, p.615-636, 2002.
- SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R.. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5.ed. Porto Alegre: Ed. UFRGS; Florianópolis: Ed. UFSC, 2004.
- SOARES, L. A. L.; GONZÁLEZ, O. G.; PETROVICK, P. R.; BASANI, V. L. Desenvolvimento tecnológico de soluções extrativas aquosas de *Phyllanthus niruri* L. (quebra-pedra) empregando planejamento fatorial. **Cad. Farm.**, v.14, n.1/2, p.21-26, 1998.
- SOBEL, J.; CAMERON, D. N.; ISMAIL, J.; STROCKBINE, N.; WILLIAMS, M.; DIAZ, P. S.; WESTLEY, B.; RITTMANN, M.; DICRISTINA, J.; RAGAZZONI, H.; TAUXE, R. V.; MINTZ, E. D. A prolonged outbreak of *Shigella sonnei* infections in traditionally observant Jewish communities in North America caused by a molecularly distinct bacterial subtype. **J. Infect. Dis.**, v.177, p.1405-1409, 1998.
- SOERJATO, D. D.; Biodiversity prospecting and benefits haring: perspectives from the field. **J. Ethnopharmacol.**, Limerick, v.51, p.1-15, 1996.
- SONAGLIO, D.; ORTEGA, G. G.; PETROVICK, P. R.; BASSANI, V. L. Desenvolvimento tecnológico e produção de fitoterápicos. In: SIMÕES, C.M.O. *et al.* (Org.). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5.ed. Porto Alegre: Ed. UFRGS; Florianópolis: Ed. UFSC, 2004. p.290-326.

- SOULIMANI, R.; YOUNO, C.; JARMOUNI, S.; BOUSTA, D.; MISLIN, R.; MORTIER, F. Behavioural effects of *Passiflora incarnate* L. and its indole alkaloid and flavonoid derivatives and maltol in the mouse. **J. Ethnopharmacol.**, v.57, n.1, p.11-20, 1997.
- SOUZA, M. M.; CRUZ, A. B.; SCHUMACHER, M. B.; KREUGER, M. R. O.; FREITAS, R. A.; CRUZ, R. C. B. Métodos de avaliação de atividade biológica de produtos naturais e sintéticos. In: BRESOLIN, T. M. B.; CECHINEL FILHO, V. **Ciências Farmacêuticas: contribuição ao desenvolvimento de novos fármacos e medicamentos**. Itajaí: Univali, 2003.
- STRAYER, L. **Bioquímica**. 4. ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1000 p., 1996.
- SWARNALAKSHMI, T.; SETHURAMAN, M. G.; SULOCHANA, N.; ARIVUDAINAMBI, R. A note on the antiinflammatory of bergenin. **Curr. Sci.**, v.53, p.917, 1984.
- TAKAHASHI, H.; KOSAKA, M.; WATANABE, Y.; NAKADE, K.; FUKUYAMA, Y. Synthesis and neuroprotective activity of bergenin derivatives with antioxidant activity. **Bioorganic Med. Chem.**, v.11, p.1781-1788, 2003.
- TAKAHASHI, Y.; KOIKE, M.; HONDA, H.; ITO, Y.; SAKAGUCHI, H.; SUZUKI, H.; NISHIYAMA, N. Development of the short time exposure (STE) test: an *in vitro* eye irritation test using SIRC cells. **Toxicol. In Vitro**, v.22, p.760-770, 2008.
- TAVARES, W. **Manual de antibióticos e quimioterápicos antiinfeciosos** 2.ed. São Paulo: Atheneu; 1996. 792p.
- TAYLOR, R. S. L.; EDEL, F.; MANANDHAR, N. P.; TOWERS, G. H. N. Antimicrobial activities of southern Nepalese medicinal plants. **J. Ethnopharmacol.**, v.50, p.97-102, 1996.
- TEIXEIRA, M. L.; SOARES, A. R.; SCOLFORO, J. R. S. Variação do teor de tanino da casca de barbatimão [*Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville] em 10 locais de Minas Gerais. **Ciênc. Prática**, Lavras, v.14, n.2, p.229-232, 1990.
- TEIXEIRA, P. C. **Do herbalismo tribal aos remédios florais do Dr. Bach**. São José do Rio Preto: São José, 1994. 33 p.
- TOBIAS, M. L.; OLIVEIRA, F.; OLIVEIRA, K. P.; MARQUES, L. C. Controle de qualidade de drogas vegetais de farmácias de manipulação de Maringá (Paraná – Brasil). **Rev. Eletrônica Farm.**, v.4, n.1, 95-103, 2007.

- TOLEDO, C. E. M. **Estudos anatômico, químico e biológico das cascas e extratos de *Stryphnodendron adstringens* (Martius) Coville, Leguminosae.** 2002. p. 2-28. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual "Júlio de Mesquita Filho", Araraquara, 2002.
- VIGO, C. L. S.; NARITA, E.; MARQUES, L. C. Influências da variação sazonal e tipos de secagem nas características da droga vegetal – raízes de *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen (Amaranthaceae). **Rev. Bras. Farmacog.**, v.14, n.2, p.137-144, 2004.
- VOIGT, R.; BORNSCHEIN, M. **Tratado de tecnologia farmacêutica.** Zaragoza: Acribia, 1982. p.496-513, 769.
- WHO. **Quality control methods for medicinal plants materials.** Geneva: WHO, 1992.
- WHO. Traditional Medicine – Growing Needs and Potential. **WHO Policy Perspectives on Medicines.** Geneva, 2002. n.2. Disponível em: <[http://whqlibdoc.who.int/hq/2002/WHO\\_EDM\\_2002.4.pdf](http://whqlibdoc.who.int/hq/2002/WHO_EDM_2002.4.pdf)>. Acesso em: 27 ago. 2008.
- WILLIAMS, M. D.; WILKINS, S. T. **Bergey's manual of determinative bacteriology.** 9<sup>th</sup> ed., Baltimore: Springer, 1994.
- WINSLOW, L. C.; KROLL, D. J. Herbs as medicines. **Arch. Intern. Med.**, v.158, p.2192-2199, 1998.
- WOODS, G. L.; WASHINGTON, J. A. Antibacterial susceptibility tests: dilution and disk diffusion methods. In: MURRAY, P. R.; BARON, E. J.; PFALLER, M. A.; TENOVER, F. C.; YOLKEN, R. H. **Manual of clinical microbiology.** 6<sup>th</sup> ed., Washington, DC: C. V. Mosby, 1995.
- WOJTASZEK, P. Oxidative burst: an early plant response to pathogen infection. **Biochem. J.**, v.322, p.681-692, 1997.
- WONG, C. L.; WAY, M. K. Effects of aspirin and paracetamol on naloxone reversal or morphine-induced inhibition of gastrointestinal propulsion in mice. **Eur. J. Pharmacol.**, v.73, p.11-19, 1981.
- YAMAGUTI-SASAKI, E.; ITO, L. A.; CANTELI, V. C. D.; USHIROBIRA, T. M. A.; NAKAMURA, T. U.; FILHO, B. P. D.; NAKAMURA, C. V.; MELLO, J. C. P. **Molecules**, v.12, p.1950-1963, 2007.
- YUNES, R. A.; CALIXTO, J. B. **Plantas medicinais sob a ótica da química medicinal moderna.** Chapecó: Argos, 2001.

ZACCHINO, S. Estratégia para a descoberta de novos agentes antifúngicos. In: YUNES, R. A.; CALIXTO, J. B. **Plantas medicinais sob a ótica da química medicinal moderna**. Chapecó: Argos. 2001. p. 435-479.

ZAMPINI, I. C.; VATTUONE, M. A.; ISLA, M. I. Antibacterial activity of *Zuccagnia punctata* Cav. ethanolic extracts. **J. Ethnopharmacol.**, v.102, n.3, p.450-456, 2005.

ZIEBUHR, W.; HENNIG, S.; ECKART, M.; KRÄNZLER, H.; BATZILLA, C.; KOZITSKAYA, S. Nosocomial infections by *Staphylococcus epidermidis*: how a commensal bacterium turns into a pathogen. **Int. J. Antimicrob. Agents**, v.28, p.14-20, 2006.

## 9. ANEXOS