

UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
MESTRADO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
MUIARA APARECIDA MORAES

ANÁLISE DA LEGISLAÇÃO SOBRE O USO DE PLANTAS
MEDICINAIS NO BRASIL. POTENCIAL QUÍMICO-
FARMACOLÓGICO DE *Palicourea rigida* Kunth

JUIZ DE FORA
2013

UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
MESTRADO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
MUIARA APARECIDA MORAES

**ANÁLISE DA LEGISLAÇÃO SOBRE O USO DE PLANTAS
MEDICINAIS NO BRASIL. POTENCIAL QUÍMICO-
FARMACOLÓGICO DE *Palicourea rigida* Kunth**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Juiz de Fora para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas, área de concentração em Produtos Naturais Bioativos.

Orientador: Prof. Dr. Aílson da Luz André de Araújo

Coorientador: Prof. Dr. Orlando Vieira de Sousa

JUIZ DE FORA

2013

Ficha catalográfica elaborada através do Programa de geração automática da Biblioteca Universitária da UFJF, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Moraes, Muiara Aparecida.

Análise da legislação sobre o uso de plantas medicinais no Brasil. Potencial químico-farmacológico de *Palicourea rigida* Kunth. / Muiara Aparecida Moraes. -- 2013.
120 p. : il.

Orientador: Aílson da Luz André de Araújo

Coorientador: Orlando Vieira de Sousa

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Faculdade de Farmácia e Bioquímica. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, 2013.

1. *Palicourea rigida*. 2. Legislação. 3. Potencial farmacológico. 4. Potencial químico. I. Araújo, Aílson da Luz André de , orient. II. Sousa, Orlando Vieira de , coorient. III. Título.

**Análise da legislação sobre o uso de plantas medicinais no Brasil.
Potencial químico-farmacológico de *Palicourea rigida* Kunth.**

Muiara Aparecida Moraes

**Prof. Dr. Aílson da Luz André de Araújo (Orientador)
Prof. Dr. Orlando Vieira de Sousa (Coorientador)**

Dissertação de Mestrado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, da Universidade Federal de Juiz de Fora - UFJF, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.


Aprovada em 19/07/2013



Dra. Ana Lúcia Santos de Matos Araújo



Prof. Dra. Rozângela Magalhães Manfrini



Prof. Dr. Aílson da Luz André de Araújo

*Ao meu marido White e
aos meus pais, Nilton e
Emiliana, dedico.*

AGRADECIMENTOS

Ao Pai do Céu, que todos os dias renova minhas forças, e tornou possível a realização de mais este sonho.

Ao meu marido White, que sempre tem uma palavra de incentivo e alegria, e consegue me fazer sorrir até mesmo depois de um dia em que tudo parece ter dado errado.

Aos meus pais, Nilton e Emiliana, que na sua aparente simplicidade souberam inculcar em minha alma o desejo do conhecimento e a busca pela sabedoria (a eterna busca), amo vocês!

Meus irmãos, Iramaia e Yansey, obrigada pelo incentivo, companheirismo e por acreditarem sempre na minha capacidade.

Aos professores Ailson, Orlando e Maria Silvana, pela acolhida e por compartilharem seu conhecimento, os laboratórios e materiais de uma maneira tão generosa. Não tenho palavras para demonstrar minha gratidão e carinho!

À Glauciemar, pela coleta da planta e pelas boas conversas.

Aos colegas mestrandos Lucas e Kamilla, que compartilharam experiências e metodologias.

Ao Jésus, pela solicitude na parte inicial do trabalho.

À Técnica do Laboratório de Farmacologia de Produtos Naturais e também mestranda, Carol, agradeço por estar sempre disposta a prestar auxílio (e socorro).

Vanessa e Jucélia, pelas conversas que esclareceram tantas dúvidas, pela disponibilidade de compartilhar experiências.

Rodrigo o Nicolas, obrigada por dividir seu tempo e conhecimento, ajudando no HPLC e também “mostrando a direção” quando eu estava perdida.

À professora Rozângela, pelas excelentes sugestões feitas durante a qualificação, e pela participação na banca.

À Dra. Ana Lúcia, por compartilhar seu conhecimento na banca de defesa.

À professora Elita, que cedeu o laboratório e materiais para a realização do HPLC.

Aos colegas da turma, agradeço pelas horas de estudo, pelas conversas divertidas, por tudo o que passamos juntos. Que todos vocês tenham um futuro brilhante!

RESUMO

Palicourea rigida Kunth, pertencente à família Rubiaceae, têm sido utilizada na medicina popular para o tratamento de inflamação e infecção do trato urinário e do aparelho reprodutor feminino. O presente trabalho teve como objetivo avaliar o potencial químico-farmacológico de *P. rigida* e verificar a sua adequação aos padrões normativos do Sistema Único de Saúde (SUS). Folhas secas e pulverizadas foram submetidas à extração em etanol. Após remoção do solvente, extrato etanólico sofreu fracionamento por partição, produzindo as frações hexânica, diclorometânica, em acetato de etila e butanólica. Foram realizadas prospecção fitoquímica, quantificação de fenóis totais e flavonoides por espectrofotometria e análise por cromatografia líquida de alta eficiência. A atividade antioxidante foi avaliada pelos métodos do DPPH, bioautografia, poder de redução e β -caroteno/ácido linoléico. A toxidez aguda foi determinada e as atividades antinociceptiva (testes de contorções, formalina e placa quente) e antiinflamatória (ensaios de edema de pata e pleurisia) foram realizadas. Análise da viabilidade da inclusão da *P. rigida* na lista de plantas de interesse ao SUS foi verificada. Os dados foram demonstrados através da média \pm erro padrão. Análise de variância seguida dos testes de Turkey ou Student-Newman-Keuls foram usados para medir o grau de significância para $p < 0,05$. Flavonoides, taninos, cumarinas, terpenoides e esteroides, alcaloides e antraquinonas foram detectadas em *P. rigida*. Os fenóis totais variaram entre 3,72 e 28,05 g/100 g, enquanto os flavonoides foram de 1,95 e 14,15 g/100g. Rutina e quercetina foram identificadas nas frações em acetato de etila e butanólica, respectivamente. Usando DPPH, as CE_{50} mostraram valores entre $24,51 \pm 0,52$ a $125,79 \pm 0,10 \mu\text{g/mL}$, enquanto o poder de redução produziu CE_{50} de $183,09 \pm 1,84$ a $703,14 \pm 1,15 \mu\text{g/mL}$. As porcentagens de inibição da oxidação do β -caroteno foram de $24,30 \pm 3,38$ a $84,76 \pm 1,40$. O extrato etanólico inibiu as contorções abdominais em 32,88 (100 mg/kg), 34,25 (200 mg/kg) e 61,64% (400 mg/kg). Doses de 200 e 400 mg/kg inibiram a primeira fase em 13,80 (200 mg/kg) e 24,74% (400 mg/kg), enquanto a segunda fase foi reduzida em 10,52 (100 mg/kg), 22,92 (200 mg/kg) e 35,73% (400 mg/kg). Após 90 min de tratamento, doses de 200 mg/kg (36,61%) e 400 mg/kg (71,21%) prolongaram o tempo de latência. Doses de 200 e 400 mg/kg reduziram o edema de pata após 3 e 4 h de tratamento. O volume do exsudato foi reduzido em 27,18 (200 mg/kg) e 36,89% (400 mg/kg) e o número de leucócitos totais sofreu inibição de 11,94 e 24,91% nas doses de 200 e 400 mg/kg, respectivamente. Os resultados indicaram que *P. rigida* constitui uma fonte promissora de substâncias bioativas com atividades antioxidante, antinociceptiva e anti-inflamatória, justificando o uso popular e reunindo características importantes de interesse do SUS.

Palavras-chave: *Palicourea rigida*. Legislação. Potencial farmacológico. Potencial químico.

ABSTRACT

Palicourea rigida Kunth, belonging to the family Rubiaceae, have been used in folk medicine for the treatment of inflammation and infection of the urinary tract and the female reproductive tract. This study aimed to evaluate the potential chemical-pharmacological *P. rigida* and verify its appropriateness to normative standards of the Unified Health System (SUS). Dried and sprayed leaves were extracted in ethanol. After removing the solvent, ethanol extract was submitted to the fractionation by partition to obtain the hexanic, dichlorometanic, in ethyl acetate and butanolic fractions. Phytochemical screening, quantification of total phenols and flavonoids by spectrophotometry and analysis by high performance liquid chromatography were performed. The antioxidant activity was evaluated by DPPH, bioautography, power reduction and β -carotene/linoleic acid methods. Acute toxicity was determined and the antinociceptive (writhing, formalin and hot plate tests) and anti-inflammatory activities (paw edema and pleurisy methods) were evaluated. Analysis of the feasibility of inclusion of *P. rigida* in list of plants of interest to the SUS has been verified. Data were expressed by mean \pm standard error. Analysis of variance followed by Turkey or Student-Newman-Keuls tests was used to measure the degree of significance to $p < 0.05$. Flavonoids, tannins, coumarins, terpenoids and steroids, alkaloids and anthraquinones were detected in *P. rigida*. The total phenols ranged between 3.72 and 28.05 g/100 g, while flavonoids were 1.95 and 14.15 g/100g. Rutin and quercetin were identified in ethyl acetate and butanolic fractions, respectively. Using DPPH, the values of EC_{50} showed between 24.51 ± 0.52 to 125.79 ± 0.10 mg/mL, while reducing power produced EC_{50} of 183.09 ± 1.84 to 703.14 ± 1.15 mg/mL. The percentages of inhibition of β -carotene oxidation were 24.30 ± 3.38 to 84.76 ± 1.40 . The ethanol extract inhibited the writhing at 32.88 (100 mg/kg), 34.25 (200 mg/kg) and 61.64% (400 mg/kg). Doses of 200 and 400 mg/kg inhibited the first phase in 13.80 (200 mg/kg) and 24.74% (400 mg/kg), while the second phase was reduced by 10.52 (100 mg / kg) , 22.92 (200 mg/kg) and 35.73% (400 mg/kg). After 90 min of treatment, doses of 200 mg/kg (36.61%) and 400 mg/kg (71.21%) prolonged the latency time. Doses of 200 and 400 mg/kg reduced the paw edema after 3 and 4 hours of treatment. The volume of exudate was reduced by 27.18 (200 mg/kg) and 36.89% (400 mg/kg) and total white cell count suffered inhibition of 11.94 and 24.91% at the doses of 200 and 400 mg/kg, respectively. The results indicated that *P. rigida* is a promising source of bioactive compounds with antioxidant, antinociceptive and anti-inflammatory activities that justifies the popular usage and gathers important characteristics of interest to the SUS.

Keywords: *Palicourea rigida*. Legislation. Pharmacological potential. Chemical potential.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Diversidade química e distribuição dos principais metabólitos secundários dentre as subfamílias de Rubiaceae.	35
Figura 2: Estrutura de substâncias isoladas de espécies do gênero <i>Palicourea</i>	39
Figura 3: Aspectos da morfologia externa de <i>P. rigida</i> Kunth.	41
Figura 4: Estrutura floral de <i>P. rigida</i> Kunth.	41
Figura 5: Substâncias isoladas de <i>P. rigida</i> Kunth.	42
Figura 6: Biossíntese simplificada de substâncias fenólicas.	46
Figura 7: Estrutura básica dos flavonoides.	48
Figura 8: Representação das subclasses de flavonoides.	48
Figura 9: Diagrama esquemático para ilustração do mecanismo de transmissão e percepção da dor.	53
Figura 10: Esquema de extração e fracionamento.	60
Figura 11: Reação do ácido gálico com molibdênio, componente do reagente de Folin-Ciocalteu.	63
Figura 12: Reação química entre o BHT e o radical DPPH.	66
Figura 13: Padrão das contorções abdominais apresentadas por camundongos.	71
Figura 14: Teste da formalina.	72
Figura 15: Teste da placa quente.	73
Figura 16: Teste do edema de pata induzido por carragenina.	75
Figura 17: Teste da pleurisia induzida por carragenina.	76
Figura 18: Espectro de absorção da rutina.	78
Figura 19: Curva de calibração do padrão rutina.	78
Figura 20: Espectro de absorção do ácido gálico.	79
Figura 21: Curva de calibração do ácido gálico.	79
Figura 22: Perfil cromatográfico do extrato etanólico de <i>P. rigida</i> a 254 nm.	81
Figura 23: Espectros de UV dos picos obtidos do cromatograma do extrato etanólico de <i>P. rigida</i> a 254 nm.	82
Figura 24: Espectros de UV dos padrões quercetina, rutina, canferol, luteolina 7-O-β-D-glicosídeo e apigenina 7-O-β-D-glicosídeo obtidos a 254 nm.	82

Figura 25: Perfil cromatográfico da fração em acetato de etila de <i>P. rigida</i> a 254 nm.	83
Figura 26: Espectros de UV dos picos 1, 2 e 3 do cromatograma da fração em acetato de etila de <i>P. rigida</i> obtidos a 254 nm.....	83
Figura 27: Perfil cromatográfico da fração butanólica de <i>P. rigida</i> a 254 nm.....	84
Figura 28: Espectros de UV dos picos 1, 2 e 3 do cromatograma da fração butanólica de <i>P. rigida</i>	84
Figura 29: Espectro de absorção do DPPH.	85
Figura 30: Bioautografia do extrato etanólico e da Fração hexânica de <i>P. rigida</i> reveladas com DPPH, cloreto férrico e reagente de Lieberman Bouchard.	87
Figura 31: Bioautografia do extrato etanólico e da fração diclorometânica de <i>P. rigida</i> reveladas com DPPH, cloreto férrico, reagente de Lieberman Bouchard e KOH.....	88
Figura 32: Bioautografia do extrato etanólico e das frações em acetato de etila e butanólica de <i>P. rigida</i> reveladas com DPPH, cloreto férrico, KOH e NP-PEG.....	89
Figura 33: Curva de descoloramento do betacaroteno do extrato etanólico e frações de <i>P. rigida</i>	91
Figura 34: Atividade antioxidante do extrato etanólico e frações de <i>P. rigida</i> pelo método betacaroteno/ácido linoléico expressa em % de inibição.	91

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Substâncias isoladas de espécies do gênero <i>Palicourea</i>	38
Tabela 2: Classificação botânica de <i>Palicourea rigida</i>	40
Tabela 3: Classificação das substâncias fenólicas de acordo com o esqueleto básico.	46
Tabela 4: Diluições a partir da solução-estoque de rutina e montagem dos tubos reacionais para confecção da curva de calibração.....	61
Tabela 5: Diluições a partir da solução-estoque extrato etanólico e partições e montagem dos tubos reacionais para quantificação de flavonoides totais.	62
Tabela 6: Diluições a partir da solução-estoque de ácido gálico (1 mg/mL) para obtenção de oito concentrações diferentes.....	64
Tabela 7: Diluições a partir da solução-estoque do extrato etanólico e frações (4 mg/mL) para obtenção de seis concentrações diferentes.	64
Tabela 8: Reações de identificação de classes químicas do metabolismo secundário das folhas de <i>Palicourea rigida</i> Kunth.....	77
Tabela 9: Teores de fenóis e flavonoides totais no extrato etanólico e frações de <i>P. rigida</i> . ..	80
Tabela 10: Atividade antioxidante do extrato etanólico e frações de <i>P. rigida</i> pelo teste de DPPH.....	86
Tabela 11: Atividade antioxidante do extrato etanólico e frações de <i>P. rigida</i> pelo método do poder de redução.....	89
Tabela 12: Efeitos do extrato etanólico das folhas de <i>P. rigida</i> sobre as contorções induzidas por ácido acético 0,6% em camundongos (n = 8).....	92
Tabela 13: Efeitos do extrato etanólico sobre a nocicepção induzida por formalina.	94
Tabela 14: Efeitos do extrato etanólico de <i>P. rigida</i> sobre o tempo de latência de ratos expostos ao teste da placa quente.	95
Tabela 15: Efeitos do extrato etanólico de <i>P. rigida</i> sobre o edema de pata induzido por carragenina em ratos.	95
Tabela 16: Efeitos do extrato etanólico de <i>P. rigida</i> sobre o volume de exsudato e o número de leucócitos totais da pleurisia induzida por carragenina.	96

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- % I - porcentagem da inibição da oxidação
- [(PMoW₁₁O₄)⁴⁻] - complexos molibdênio-tungstênio azuis
- µg – micrograma
- µL – microlitro
- Aam - absorvância das amostras
- Abs - absorvância
- Ac - absorvância do controle
- AlCl₃ – cloreto de alumínio
- ANMAT - Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica
- ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária
- BHT - Butil-hidroxi-tolueno
- BPFC - Boas Práticas de Fabricação e Controle
- ButOH - Butanol
- CDB - Convenção sobre Diversidade Biológica
- CE50 – concentração mínima da substância antioxidante necessária para reduzir em 50% a concentração inicial do DPPH
- CEEA - Comitê de Ética na Experimentação Animal
- CEME - Central de Medicamentos
- CNS - Conselho Nacional de Saúde
- COFEPRIS - Comisión Federal para la Protección Contra Riesgos Sanitarios
- COX - enzimas ciclo-oxigenase
- CP - consulta pública
- DAF - Departamento de Assistência Farmacêutica
- DCM - diclorometano
- DL50 - Dose Letal 50%
- DPPH - 2,2-difenil-1-picrilidrazila
- DPPH-H - 2,2-difenil-1-picrilhidrazina
- EMEA - European Medicines Agency
- EtOH – etanol

- FeCl_3 – cloreto férrico
- GTI - Grupo de Trabalho Interministerial
- Hex - hexano
- IC50 – Concentração inibidora 50%
- IL-1- interleucina-1
- IN – Instrução Normativa
- KOH – hidróxido de potássio
- LPO - peroxidação lipídica
- MAPA - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
- MERCOSUL - Mercado Comum do Sul
- MFAA - ácido monofluoracético
- MS – Ministério da Saúde
- $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ - Molibdato de Sódio Dihidratado
- nm – nanômetros
- NO - óxido nítrico
- NOM - normas operacionais mexicanas
- OH - hidroxila
- ONU - Organização das Nações Unidas
- PANDRH- Pan American Network for Drug Regulatory Harmonization
- pH -potencial de hidrogênio
- PIC - Práticas Integrativas e Complementares
- PMN - células polimorfonucleares
- PNAF - Política Nacional de Assistência Farmacêutica
- PNM – política Nacional de Medicamentos
- PNPIC - Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares
- PNPMF - Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos
- PPPM - Programa de Pesquisas de Plantas Medicinais
- R^2 – coeficiente de determinação
- RDC - Resolução da Diretoria Colegiada
- RE – resoluções
- RENAFITO - Relação Nacional de Fitoterápicos
- RENAPLAN - Relação Nacional de Plantas Medicinais

- RENISUS - Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS
- ROS - Espécies reativas oxigenadas
- rpm – rotações por minuto
- s.c. – sub cutânea
- S.E. – solução estoque
- SUS - Sistema Único de Saúde
- TNF- α - fator de necrose tumoral
- UV - radiação ultravioleta
- v.o. – via oral
- β – beta

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	18
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	21
2.1. CONSIDERAÇÕES INICIAIS.....	21
2.2. NORMATIZAÇÃO BRASILEIRA: MEDICAMENTOS FITOTERÁPICOS.....	22
2.2.1. Evolução histórica da normatização brasileira sobre plantas medicinais e fitoterápicos.....	23
2.2.2. Normatização brasileira: plantas medicinais e fitoterápicos no SUS.....	26
2.3. PLANTAS MEDICINAIS E FITOTERÁPICOS NO CONTEXTO INTERNACIONAL.....	29
2.4. O USO POPULAR DE PLANTAS MEDICINAIS.....	33
2.5. FAMÍLIA RUBIACEAE.....	34
2.6. GÊNERO <i>Palicourea</i>	36
2.7. ESPÉCIE <i>Palicourea rigida</i> Kunth.....	40
2.8. POTENCIALIDADE DA INSERÇÃO DA <i>Palicourea rigida</i> NA LISTA DE PLANTAS DE INTERESSE AO SUS.....	43
2.9. ASPECTOS GERAIS DO METABOLISMO SECUNDÁRIO.....	44
2.10. SUBSTÂNCIAS FENÓLICAS.....	45
2.11. FLAVONOÍDES.....	47
2.12. AÇÃO ANTIOXIDANTE.....	49
2.13. MECANISMO FISIOLÓGICO DA NOCICEPÇÃO.....	51
2.14. PROCESSO INFLAMATÓRIO.....	54
3. OBJETIVOS.....	58
3.1. OBJETIVO GERAL.....	58
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	58
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	59
4.1. ANÁLISE DA VIABILIDADE DA INCLUSÃO DA <i>P. rigida</i> KUNTH NA LISTA DE PLANTAS DE INTERESSE AO SISTEMA ÚNICO DE SAÚDE.....	59
4.2. MATERIAL VEGETAL.....	59
4.3. PROCESSO DE EXTRAÇÃO E FRACIONAMENTO.....	59
4.4. PROSPECÇÃO FITOQUÍMICA.....	60
4.5. DETERMINAÇÃO DOS TEORES DE FLAVONOÍDES TOTAIS.....	61

4.6. DETERMINAÇÃO DOS TEORES DE FENÓIS TOTAIS	62
4.7. PERFIL CROMATOGRÁFICO E CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA	65
4.8. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE.....	66
4.8.1. Teste do DPPH.....	66
4.8.2. Técnica da bioautografia com DPPH	67
4.8.3. Teste do poder de redução	68
4.8.4. Teste do β -caroteno/ácido linoleico	68
4.9. ATIVIDADES FARMACOLÓGICAS DO EXTRATO ETANÓLICO	70
4.9.1. Animais.....	70
4.9.2. Avaliação da toxidez aguda	70
4.9.3. Teste de contorções abdominais	70
4.9.4. Teste da formalina	71
4.9.5. Teste da placa quente	72
4.9.6. Edema de pata induzido por carragenina.....	73
4.9.7. Pleurisia induzida por carragenina	75
4.10. ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	76
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	77
5.1. PESQUISA E QUANTIFICAÇÃO DE CONSTITUINTES QUÍMICOS	77
5.2. PERFIL E IDENTIFICAÇÃO DE SUBSTÂNCIAS POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA.....	81
5.3. ATIVIDADE ANTIOXIDANTE	85
5.3.1. Teste do DPPH.....	85
5.3.2. Bioautografia com DPPH	86
5.3.3. Teste do poder de redução	89
5.3.4. Teste do β -caroteno/ácido linoleico	90
5.4. ATIVIDADES ANTINOCICEPTIVA E ANTI-INFLAMATÓRIA DO EXTRATO ETANÓLICO DAS FOLHAS DE <i>P. rigida</i>	92
5.4.1. Toxicidade do extrato etanólico	92
5.4.2. Atividade antinociceptiva do extrato etanólico pelo método das contorções abdominais.....	92
5.4.3. Atividade antinociceptiva do extrato etanólico pelo método da formalina	93
5.4.4. Atividade antinociceptiva do extrato etanólico pelo método da placa quente.....	94
5.4.5. Atividade anti-inflamatória do extrato etanólico pelo método do edema de pata induzido por carragenina.....	95

5.4.6. Atividade anti-inflamatória do extrato etanólico pelo método da pleurisia induzida por carragenina	96
5.5. ANÁLISE DA VIABILIDADE DA INCLUSÃO DA P. RIGIDA KUNTH NA LISTA DE PLANTAS DE INTERESSE AO SISTEMA ÚNICO DE SAÚDE.....	97
6. CONCLUSÕES	99
7. REFERÊNCIAS	100

1. INTRODUÇÃO

O uso de plantas com fins curativos data dos primórdios da medicina, com registros fósseis que documentam essa existência há pelo menos 60.000 anos (FABRICANT e FAMSWORTH, 2001). Constata-se que durante séculos produtos derivados de plantas foram peças chave para o tratamento de diversas patologias, seja pelo uso popular ou pelo fornecimento de moléculas ativas (HALBERSTEIN, 2005; BRANDÃO *et al.*, 2006). Dentre os novos fármacos aprovados nos últimos 25 anos, cerca de 30% são produtos naturais ou derivados destes. Todavia, em se tratando dos fármacos anticancerígenos, por exemplo, este número sobe para 42% (CORRÊA, MELO e COSTA, 2008).

Ressalta-se que, mesmo permanecendo nos países em desenvolvimento, em meados do século XX, com o avanço da síntese orgânica e de técnicas analíticas, o uso de espécies vegetais com finalidade preventiva ou curativa foi significativamente reduzido em países desenvolvidos (OMS, 2007). Contudo, desde o final do mesmo século tem sido observado um retorno às práticas complementares de cuidados à saúde, especificamente, à fitoterapia. Além disso, a expectativa de vida é cada vez maior, a população envelhece e, conseqüentemente, sofre com o aumento das doenças crônicas que requerem uso constante de medicamentos; ou, por outro lado, o paciente submetido à polifarmácia busca na fitoterapia uma opção mais suave de tratamento (BERTOLDI *et al.*, 2004; PANDOLFI, PIAZZOLLA e LOUZADA, 2010). Neste sentido, uma parcela significativa da população, principalmente nos países em desenvolvimento, utiliza frequentemente plantas medicinais para seus cuidados primários de saúde.

No Brasil, por exemplo, a realidade não é diferente – fato preocupante, pois o uso nem sempre é feito de maneira segura (SALES *et al.*, 2008; CASTRO *et al.*, 2010). Os relatos de acidentes na administração de plantas medicinais e fitoterápicos com falhas de identificação ou mesmo problemas de qualidade estão se tornando comuns na literatura científica. No caso da Medicina Chinesa, há o caso da fibrose intersticial renal pela ingestão de fitoterápicos – pelo menos 70 pacientes belgas e 20 chineses apresentaram nefropatia e foram submetidos a transplante renal e/ou diálise (CHANG *et al.*, 2001).

Nas últimas décadas, houve significativo crescimento do uso de plantas medicinais e fitoterápicos no mundo (SHARMA *et al.*, 2008), movimentando cada vez mais recursos financeiros, o que gera, por parte das autoridades reguladoras, preocupação com segurança, eficácia e qualidade dos produtos (OMS, 2002a; CARVALHO, SANTOS e SILVEIRA,

2008). Desse modo, o setor de fitoterápicos movimenta mundialmente US\$21,7 bilhões por ano.

No Brasil, as cerca de 400 empresas existentes alcançam a marca dos US\$400 milhões, que representam 6,7% das vendas de medicamentos ao longo de toda sua cadeia produtiva, empregando mais de 100 mil pessoas (ALVES *et al.*, 2008). Além disso, é importante destacar que as vendas crescem a cada ano, o que já era previsto tanto na PNAF (Política Nacional de Assistência Farmacêutica) quanto na PNPMF (Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos), através do incentivo à produção nacional embasado na biodiversidade do país, favorecendo a geração de emprego e renda para os produtores, visando diminuir a dependência tecnológica com a importação de medicamentos (BRASIL, 2004f; BRASIL, 2006c).

Apesar disso, são extremamente diferentes as formas de visualizar o uso de produtos vegetais: no exterior é visto como uma oportunidade de negócio, o *ecobusiness* ou mercado verde (FERRO, BONACELLI e ASSAD, 2006), enquanto no Brasil a produção de plantas medicinais para atender ao mercado ainda é muito recente, e ocorre de maneira heterogênea e descontínua. Por outro lado, muitas das indústrias utilizam matéria prima importada, devido à irregularidade da oferta e problemas com a qualidade; e para espécies nativas, o extrativismo ainda é predominante (LUSTOSA, 2003; LOURENZANI, LOURENZANI e BATALHA, 2004), o que causa inúmeros problemas como: vegetais com grande variedade de constituintes, adulterações por identificação equivocada e ameaça de extinção da espécie por coleta indiscriminada (ZUANAZZI e MAYORGA, 2010).

Para sanar os diversos problemas que envolvem a cadeia de produção de fitoterápicos no país, propõem-se ações dirigidas prioritariamente a três eixos (ZUANAZZI e MAYORGA, 2010):

- O eixo agrícola, ao qual cabe desenvolver estudos referentes ao manejo de culturas, melhoramento da qualidade da matéria prima e também à criação de novas oportunidades para o agronegócio.
- O eixo industrial, que deve atuar desenvolvendo produtos inovadores, eficazes e seguros, bem como buscar sua inserção no mercado, atentando para as prioridades nacionais em saúde.
- O eixo regulador, que tem por funções dar apoio à indústria e providenciar os mecanismos de fiscalização, que diminuirão os desvios da qualidade, na qualificação técnica e no próprio fortalecimento do setor; bem como atuar de maneira intensa na formação de recursos humanos em variados níveis de qualificação.

A espécie vegetal *Palicourea rigida*, conhecida como gritadeira ou douradão, tem suas partes aéreas empregadas na medicina popular, particularmente nas regiões do cerrado brasileiro, no tratamento de inflamações do trato urinário, dentre outras aplicações. Atividades citotóxica e antimicrobiana de extratos etanólicos, bem como a presença de triterpenos derivados de friedelanona, do iridóide loganina e do alcaloide indólico vallesiachotamina tem sido descritas na literatura (ROSA *et al.*, 2010).

Com base nas informações expostas acima, percebe-se a necessidade da realização de estudos que busquem evidenciar a eficácia terapêutica de plantas medicinais que têm uso consagrado pela população. Além disso, a qualidade do processo produtivo deve ser assegurada com intuito de oferecer à população um produto seguro. Portanto, o presente trabalho teve como objetivo avaliar os principais constituintes químicos e as atividades farmacológicas de *Palicourea rigida* Kunth, a fim de validar as atribuições que lhe são conferidas pelo uso popular e verificar a sua adequação aos padrões normativos do Sistema Único de Saúde (SUS), garantindo assim uma maior segurança para aos usuários e contribuindo para o desenvolvimento da pesquisa com plantas medicinais.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. CONSIDERAÇÕES INICIAIS

Nos últimos anos, o governo brasileiro, através da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), estabeleceu diversos marcos regulatórios sobre o tema plantas medicinais e fitoterápicos. A Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) 10 de março de 2010 criou a categoria de drogas vegetais notificadas. São aquelas que, em sua forma final de comercialização, são notificadas pela ANVISA e reguladas conforme o uso tradicional (BRASIL, 2010a). Dispõe ainda acerca de uma classificação mais abrangente, a de fitoterápico, englobando qualquer produto obtido de plantas medicinais e utilizado para fins curativos ou paliativos, podendo ser manipulado, industrializado ou produzido de forma caseira. Dessa forma, tanto a droga vegetal notificada quanto o medicamento fitoterápico são incluídos na categoria de fitoterápicos (BRASIL, 2008b).

A RDC 14 de 30 de março de 2010 traz uma série de definições dadas aos produtos obtidos de plantas medicinais, segundo a etapa tecnológica de processamento na qual se encontram (BRASIL, 2010b):

- Planta medicinal é uma espécie vegetal, que pode ou não ser cultivada, e que é utilizada para fins terapêuticos. Ela pode estar no estado fresco, coletada no momento do uso, ou seca.
- Droga vegetal é a planta seca, rasurada ou triturada, podendo ser estabilizada ou não.
- Matéria prima vegetal é definida como o conjunto formado por planta medicinal e droga vegetal.
- Derivado vegetal é o produto gerado a partir de um processo extrativo da matéria-prima vegetal, que pode ser obtido da planta fresca ou seca, por processo extrativo ou por prensagem, como no caso dos óleos.
- Medicamento fitoterápico é aquele obtido através do uso exclusivo de matérias-primas ativas vegetais. É descrito pelo conhecimento da eficácia e dos riscos de seu uso, bem como pela reprodutibilidade e constância de sua qualidade. Nesta categoria não podem ser incluídas substâncias ativas isoladas ou associações destas com extratos vegetais.

Visando garantir o uso correto de fitoterápicos, com base em conceitos de qualidade, segurança, eficácia e desenvolvimento ambiental sustentável, são criadas políticas e acordos nacionais e internacionais que buscam regular este setor. Por exemplo, em 2002, a ONU (Organização das Nações Unidas) promoveu a Convenção sobre Diversidade Biológica (CDB) que se concretizou como o primeiro acordo global com abrangência sobre aspectos da biodiversidade, reconhecendo-a como objeto de preocupação comum da humanidade e parte integrante dos processos de desenvolvimento. Essa Convenção teve como objetivos a conservação da diversidade biológica pela utilização sustentável de seus componentes e a divisão justa e equitativa dos benefícios oriundos do uso de recursos genéticos, incluindo os vegetais (ONU, 2002).

No Brasil, a Constituição Federal determina que a União elabore e execute as políticas públicas para o desenvolvimento social e econômico do país (BRASIL 1988). E são várias as políticas públicas brasileiras que fazem referência às plantas medicinais e fitoterápicos.

2.2. NORMATIZAÇÃO BRASILEIRA: MEDICAMENTOS FITOTERÁPICOS

Medicamentos fitoterápicos podem ser manipulados ou industrializados; para uso humano ou veterinário, sendo os primeiros regulados pela ANVISA e os últimos pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA).

Os medicamentos fitoterápicos para uso humano são manipulados em farmácias de forma magistral ou officinal. Até 2011 não havia formulações officinais já que o Formulário Nacional trazia apenas formulações sintéticas. Neste mesmo ano foi publicado o Formulário Fitoterápico Brasileiro que aborda as plantas, tinturas e preparações seguindo as políticas de plantas medicinais do Ministério da Saúde e trazendo informações padronizadas para utilização nos sistemas de saúde público e privado, além das farmácias de manipulação e verde (BRASIL, 2011).

A ANVISA dispensa de registro os medicamentos manipulados, o controle é feito no processo produtivo no próprio estabelecimento. A norma que regulamenta a manipulação de medicamentos é a RDC 67/2007 (BRASIL, 2007), que foi atualizada pela RDC 87/2008 (BRASIL, 2008a).

No momento estão válidas as seguintes normas referentes à fitoterápicos (ANVISA, 2013):

- RDC nº 14, de 31/03/2010: Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos.
- RE nº 90, de 16/03/2004: Guia para a realização de estudos de toxicidade pré-clínica de fitoterápicos.
- RE nº 91, de 16/03/2004: Guia para realização de alterações, inclusões, notificações e cancelamentos pós-registro de fitoterápicos.
- IN nº 5, de 11/12/2008: Lista de medicamentos fitoterápicos de registro simplificado.
- IN nº 5, de 31/03/2010: Lista de referências bibliográficas para avaliação de segurança e eficácia de fitoterápicos.
- RDC no. 13, de 14/03/2013: Boas Práticas de Fabricação (BPF) para os produtos tradicionais fitoterápicos.
- RDC no. 14, de 14/03/2013. Dispõe sobre as Boas práticas de fabricação de insumos farmacêuticos ativos de origem vegetal.

2.2.1. Evolução histórica da normatização brasileira sobre plantas medicinais e fitoterápicos

A primeira legislação específica para medicamentos fitoterápicos foi a Portaria 22 de 1967 que, embora bem menos detalhada que as atuais legislações, já abordava os critérios básicos como identificação botânica, padrão de qualidade e identidade e provas de segurança e eficácia para validar as indicações terapêuticas. Nesta época, esses critérios só poderiam ser feitos por meio de estudos pré-clínicos e clínicos, como o exigido para medicamentos sintéticos registrados atualmente, e havia uma recomendação para que se evitasse o registro de associações de fitoterápicos (BRASIL, 1967).

Em 1995, foi republicada pelo MS a norma para registro de medicamentos fitoterápicos, como a Portaria 06/1995 (BRASIL, 1995), que trouxe um novo conceito para os produtos fitoterápicos, semelhante ao atual, definiu prazos para a realização e apresentação de estudos de comprovação da segurança (cinco anos), e eficácia terapêutica (dez anos), seguindo as exigências do Conselho Nacional de Saúde (CNS) na Resolução 01/1988.

O registro de medicamentos ficou estabelecido como uma concessão de venda que deve ser renovada a cada cinco anos, sendo que os testes de segurança eram apresentados na

primeira renovação, e os de eficácia na renovação seguinte. A portaria também dividiu o registro de fitoterápicos em classes (BRASIL, 1995):

- Fitoterápicos isentos de registro – aqueles constantes dos códigos oficiais.
- Fitoterápicos novos.
- Fitoterápicos similares – aqueles que comprovassem ação similar a outro previamente registrado.

No ano 2000, com a criação da ANVISA, a norma para registro de medicamentos fitoterápicos foi atualizada, com a RDC 17/2000. Pela primeira vez foi introduzido o conceito de medicamento fitoterápico tradicional, com critérios diferenciados de registro. Também houve isenção de registro para as formulações oficializadas no país pela Farmacopeia Brasileira (BRASIL, 2000).

Na RDC17/2000 foi contemplada uma lista de 11 espécies de registro simplificado, para as quais já se consideravam suficientes as informações publicadas na literatura científica comprobatórias de segurança e eficácia. Assim sendo, bastava à empresa seguir todos os parâmetros estabelecidos para cada espécie. Havia ainda uma lista de 15 referências científicas que poderiam ser usadas na comprovação da segurança e eficácia dos medicamentos fitoterápicos (BRASIL, 2000).

Em caso de impossibilidade de se comprovar a segurança e eficácia conforme as alternativas anteriormente citadas, a RDC reafirmava a necessidade de realização de estudos pré-clínicos, conforme Portaria 116/1996, e clínicos, de acordo com as exigências do Conselho Nacional de Saúde (CNS), descritas nas Resoluções 196/1996 e 251/1997, ou por métodos descritos na literatura.

As exigências incluíam que fossem definidas as indicações terapêuticas, contraindicações, restrições de uso, efeitos colaterais e reações adversas para cada forma farmacêutica. A exigência de reprodutibilidade e constância da qualidade foi mantida, sendo preciso apresentar a análise qualitativa e quantitativa dos princípios ativos e/ou marcadores, quando conhecidos (BRASIL, 1996a, BRASIL, 1996b, BRASIL, 1997).

Em 2004, foi publicada a RDC 48/2004 (BRASIL, 2004a), que foi complementada por diversas resoluções (RE):

- RE 88/2004, que atualizou a Lista de referências bibliográficas para avaliação de segurança e eficácia de fitoterápicos (BRASIL, 2004b).

- RE 89/2004, que trazia a lista de registro simplificado de fitoterápicos, ampliando o anexo já presente na RDC 17/2000 (BRASIL, 2004c). Essa listagem foi republicada em 2008, como IN 05/2008, sendo adicionados dois novos derivados vegetais (BRASIL, 2008c).
- RE 90/2004, que faz referência ao Guia para realização dos testes de toxicidade pré-clínica de fitoterápicos. Traz um conjunto de testes exigidos como requisitos mínimos para apresentação de resultados toxicológicos em animais (BRASIL, 2004d).
- RE 91/2004, diz respeito ao Guia para realização de alterações, inclusões, notificações e cancelamento pós-registro de fitoterápicos (BRASIL, 2004e).

Como inovação, a RDC 48/2004 trouxe a exigência de que a produção de fitoterápicos fosse orientada pelas BPFC (Boas Práticas de Fabricação e Controle) que, na época, eram regulamentadas pela RDC 210/2003 (BRASIL, 2003b).

As empresas deveriam apresentar documentação comprobatória dos testes de autenticidade, pureza e integridade, e das análises qualitativa e quantitativa dos princípios ativos e/ou marcadores, quando conhecidos, ou classes de substâncias características da espécie. Também era requerida a apresentação de documentação referente à realização da prospecção fitoquímica ou do perfil cromatográfico do produto acabado, sendo que todas as metodologias adotadas deveriam constar na Farmacopeia Brasileira ou Farmacopeias reconhecidas no país, ou ainda serem validadas segundo Guia específico sobre validação de metodologias analíticas para medicamentos, a RE 899/2003 (BRASIL, 2003a).

Em 2008, a publicação da RDC 95/2008 trouxe a padronização às bulas de fitoterápicos obtidos a partir de 13 espécies vegetais. Ela foi atualizada pela RDC 47/2009, mantendo os textos das bulas padrões (BRASIL, 2009e).

Visando atualizar o regulamento para registro de medicamentos fitoterápicos, a ANVISA publica no seu endereço eletrônico em maio de 2009 a CP 31/2009 (consulta pública). A adequação aos conceitos definidos pela Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos (PNPMF) e a adoção de alternativas para o controle de qualidade são as principais alterações propostas. Há uma reestruturação da RDC 48/2004 com o enquadramento correto para cada condição nas fases de análise de registro de um medicamento fitoterápico (BRASIL, 2009c). Após o prazo de 30 dias de consulta, as contribuições foram avaliadas pela ANVISA e, em abril de 2010, foi publicada a RDC 14 (BRASIL, 2010b).

Também foi publicada, em janeiro de 2009, a CP 03, com uma proposta de RDC que trata das BPF de medicamentos. O diferencial desta CP foi um anexo dedicado às BPF de medicamentos fitoterápicos. Após o fim do prazo, foi publicada a RDC 17/2010 (BRASIL, 2009c; BRASIL, 2010c).

2.2.2. Normatização brasileira: plantas medicinais e fitoterápicos no SUS

A diretriz “Desenvolvimento Científico e Tecnológico” da Política Nacional de Medicamentos (PNM -1998) aborda a continuidade e expansão do apoio às pesquisas para o aproveitamento do potencial terapêutico da flora brasileira, com certificação de sua segurança e eficácia (BRASIL, 1998). Já a Política Nacional de Assistência Farmacêutica (PNAF) abrange um conjunto de práticas referentes à promoção, proteção e recuperação da saúde, bem como a garantia dos princípios da equidade, universalidade e integralidade no acesso. Esta norma evidencia a necessidade de definição e pactuação de ações intersetoriais que tenham por objetivo a utilização de plantas medicinais e fitoterápicos no processo de atenção à saúde, respeitando os conhecimentos tradicionais incorporados. No entanto, deve ser feita com embasamento científico, adotando-se medidas de geração de emprego e renda, preocupando-se com a qualificação e fixação dos produtores, envolvimento dos trabalhadores em saúde na incorporação desta opção terapêutica, com base no incentivo à produção nacional utilizando a biodiversidade já existente (BRASIL 2004f).

Em 2006, foram publicadas duas novas políticas com relevância para este tema, uma por Decreto Presidencial, e outra pelo Ministério da Saúde. A primeira delas foi a Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares (PNPIC), elaborada para oferecer à população serviços e produtos relacionados à fitoterapia, acupuntura, homeopatia e termalismo social no SUS, envolvendo ações a serem incorporadas no próprio SUS, mas também em outros órgãos como Ministério da Saúde, secretarias de saúde estaduais e municipais, ANVISA e Fiocruz (BRASIL, 2006a). A segunda norma publicada no mesmo ano foi a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos (PNPMF) (BRASIL, 2006c), sendo publicado previamente um decreto que instituiu o Grupo de Trabalho Interministerial (GTI) que tinha por objetivo elaborar propostas para a PNPMF e sugerir seus métodos de regulamentação (BRASIL, 2005).

A primeira política tem por objetivos incorporar e implementar as práticas integrativas no SUS, enfatizando a prevenção de agravos e a promoção e recuperação da

saúde; contribuir para o aumento da resolubilidade do sistema e potencializar o acesso às Práticas Integrativas e Complementares (PIC), de modo a garantir segurança, eficácia e qualidade no uso; promover a racionalização das ações de saúde, através do estímulo a alternativas inovadoras e socialmente relevantes para o desenvolvimento sustentável da comunidade; e estimular ações ligadas à participação da sociedade (BRASIL, 2006b).

Dentre as diretrizes dessa política estão:

- Divulgação das informações das PIC aos profissionais de saúde, gestores e usuários do SUS (Sistema Único de Saúde), considerando também o saber popular e tradicional.
- Provisão do acesso a medicamentos homeopáticos e fitoterápicos, com vistas à ampliação da produção pública, garantindo as especificidades da assistência farmacêutica nesses âmbitos, na regulamentação sanitária. Para isso, foi prevista a elaboração da Relação Nacional de Plantas Medicinais (RENAPLAN) e da Relação Nacional de Fitoterápicos (RENAFITO) (BRASIL, 2010d), bem como a promoção do uso racional de plantas medicinais e fitoterápicos no SUS, o cumprimento de critérios pré-estabelecidos de qualidade, eficácia, eficiência e segurança no uso, bem como das boas práticas de manipulação, de acordo com a legislação vigente.
- Garantia de fiscalização da qualidade dos fitoterápicos pelo Sistema Nacional de Vigilância Sanitária.

Através da elaboração da RENAPLAN e da RENAFITO, a PNPIC preconiza o diagnóstico situacional das plantas e fitoterápicos que são utilizados em programas estaduais e municipais de saúde, além da elaboração de critérios para a inclusão e exclusão de plantas e fitoterápicos embasada em conceitos de segurança e eficácia, avaliação das necessidades epidemiológicas da população e da elaboração de monografias das plantas medicinais utilizadas (BRASIL, 2006a).

Para que um fitoterápico seja incluído na RENAFITO, há alguns critérios a serem observados: deve ser produzido a partir de plantas nativas ou exóticas adaptadas; ter registro na ANVISA; considerar os biomas brasileiros; não pertencer a listas de plantas em extinção; ser de uso na atenção básica e possuir o maior número possível de evidências de segurança e eficácia (NASCIMENTO JÚNIOR, 2010).

Entre as competências da ANVISA contempladas pela PNPIC estão: a elaboração de normas técnicas para inserção de fitoterápicos no SUS; a garantia da especificidade da assistência farmacêutica em fitoterapia nas legislações sanitárias; a elaboração e atualização constante das monografias de plantas medicinais, com prioridade para as espécies nativas

segundo os moldes da OMS e elaboração de mementos relativos às espécies selecionadas (BRASIL, 2006a).

Com a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos (PNPMF) foram estabelecidas linhas de ação para o uso racional de plantas medicinais e fitoterápicos, a fim de consolidar as demais recomendações já existentes no país e também as internacionais, com o objetivo de reduzir a dependência tecnológica do Brasil nesta área e firmar uma posição relevante do país no cenário internacional (BRASIL, 2006c).

A PNPMF tem por objetivo geral a garantia da população ao acesso seguro e uso racional de plantas medicinais e fitoterápicos, garantindo o uso sustentável da biodiversidade, o desenvolvimento da cadeia produtiva e da indústria nacional. Ela é parte fundamental das políticas públicas de saúde, meio ambiente, desenvolvimento econômico e social, pois visa implantar ações capazes de promover melhorias na qualidade de vida da população. Dentre os objetivos específicos estão a ampliação das opções terapêuticas em plantas medicinais e fitoterápicos e a construção de um marco regulatório para produção, distribuição e uso de plantas medicinais e fitoterápicos (BRASIL, 2006c).

São 17 as diretrizes contempladas na PNPMF, sendo ressaltadas aqui duas. A primeira, que traz definidas as ações da ANVISA no que se refere à regulamentação, e a segunda sobre promoção da segurança, eficácia e qualidade no acesso a plantas medicinais e fitoterápicos, sendo citada a atualização constante da RENAFITO e RENAPLAN, e a criação do Formulário Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos (BRASIL, 2006c).

Segundo a PNPMF, cabe ao gestor federal a elaboração e revisão periódica da relação nacional de plantas medicinais com potencial de utilização no SUS e a elaboração e atualização periódica das monografias de plantas medicinais, com prioridade para as espécies medicinais nativas (BRASIL, 2006c). Inicialmente, foi definida uma lista contendo 237 espécies vegetais, que não foram publicadas oficialmente (BRASIL, 2009a). Após sistematização dos dados, chegou-se a uma lista com 184 espécies utilizadas em programas estaduais e municipais de fitoterapia (RODRIGUES, SANTOS e AMARAL, 2006), às quais foram acrescentadas 53, fruto do trabalho do Programa de Pesquisas de Plantas Medicinais (PPPM) da Central de Medicamentos (CEME); as espécies constantes da lista de registro simplificado da ANVISA (que então constavam na RE 89/2004) e a lista de espécies do projeto “Plantas do Futuro” (BRASIL, 2009a).

Foi constituída, em seguida, uma equipe de trabalho intersetorial coordenada pelo Departamento de Assistência Farmacêutica (DAF)/MS, com representantes de diversos órgãos. Esta equipe elaborou critérios de inclusão e exclusão das espécies e dos fitoterápicos

nas Relações Nacionais. Realizou-se um levantamento bibliográfico das espécies constantes na lista, a fim de se verificar se havia monografias para as mesmas na Farmacopeia Brasileira e demais farmacopeias reconhecidas oficialmente. Foi realizado também um levantamento epidemiológico por região do país e dos fitoterápicos com registro na ANVISA. Foi então obtida, uma listagem de 237 espécies, subdivididas e hierarquizadas em três grupos de acordo com o atendimento aos critérios previamente estabelecidos (BRASIL, 2009a).

Em 2009 o MS publicou a RENISUS (Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS), uma lista contendo espécies vegetais de interesse potencial e capazes de gerar produtos relevantes na cadeia produtiva do SUS (BRASIL, 2009a). A RENISUS tem por finalidade subsidiar o desenvolvimento de toda a cadeia produtiva, incluindo ações que serão desenvolvidas por outros dos ministérios participantes da PNPMF, com relação à regulamentação, produção, cultivo/manejo, comercialização e dispensação de plantas medicinais e fitoterápicos. Além disso, a lista orienta estudos e pesquisas que possam subsidiar a elaboração da RENAFITO, o desenvolvimento e a inovação na área de plantas medicinais e fitoterápicos (BRASIL, 2009b; NASCIMENTO JÚNIOR, 2010).

2.3. PLANTAS MEDICINAIS E FITOTERÁPICOS NO CONTEXTO INTERNACIONAL

A Organização Mundial da Saúde (OMS) é a instituição internacional que emite recomendações aos países para a regulamentação sanitária de fitoterápicos, através do Escritório de Medicinas Tradicionais. Diversas orientações já foram publicadas, bem como relatórios da situação regulatória mundial de fitoterápicos:

- 1998: *Quality control methods for medicinal plant materials* (OMS, 1998).
- 2000: *General guidelines for methodologies on research and evaluation of traditional medicine* (OMS, 2000).
- 2002: *The importance of pharmacovigilance – Safety monitoring of medicinal products* (OMS, 2002b).
- 2003: *WHO guidelines on good agricultural and collection practices (GACP) for medicinal plants* (OMS, 2003).
- 2007: *WHO guidelines for assessing quality of herbal medicines with reference to contaminants and residues* (OMS, 2007).
- 2008: instruções operacionais – informações necessárias para a condução de ensaios clínicos com fitoterápicos (OMS, 2008).

Na Comunidade Europeia, embora haja legislações individuais dos países membros, a EMEA (European Medicines Agency) publicou uma série de regulamentações que foi aceita por toda a comunidade. As normas referem-se a fitoterápicos para uso humano e animal, e ainda há outras aplicáveis a todos os medicamentos, como os guias para excipientes e impurezas.

- 2001: *Directive 2001/83/EC – On the Community Code relating to medicinal products for human use* (EMEA, 2001).
- 2004: *Directive 2004/24/EC – Amending, as regards traditional herbal medicinal products* (EMEA, 2004).
- 2006: *Guideline on quality of herbal medicinal products/traditional herbal medicinal products* (EMEA, 2006a).
- 2006: *Reflection paper on the use of fumigants* (EMEA, 2006b).
- 2006: *Guideline on specifications – test procedures and acceptance criteria for herbal substances, herbal preparations and herbal medicinal products/traditional herbal medicinal products* (EMEA, 2006c).
- 2006: *Guideline on good agricultural and collection practice (GACP) for starting materials of herbal origin* (EMEA, 2006d).
- 2007: *Guideline on quality of combination herbal medicinal products/traditional herbal medicinal products* (EMEA, 2007).
- 2008: *Concept paper on the development of a guideline on a preparation of herbal teas* (EMEA, 2008a).
- 2008: *Reflection paper on markers used for quantitative and qualitative analysis of herbal medicinal products and traditional herbal medicinal products* (EMEA, 2008b).
- 2009: *Reflection paper on stability testing of herbal medicinal products and traditional herbal medicinal products* (EMEA, 2009).
- 2010: *Reflection paper on the level of purification of extracts to be considered as herbal preparations* (EMEA, 2010a).
- 2010: *Guideline on declaration of herbal substances and herbal preparations in herbal medicinal products/traditional herbal medicinal products* (EMEA, 2010b).
- 2011: *Guidance for companies seeking scientific support and advice on traditional herbal medicinal products* (EMEA, 2011).

- 2012 - Ainda em elaboração: *Concept paper on non- pharmacopoeial reference standards for herbal substances, herbal preparations and herbal medicinal products / traditional herbal medicinal products* (EMEA, 2012a).
- 2012 - Ainda em elaboração: *Guideline on the use of the CTD format in the preparation of a registration application for traditional herbal medicinal products* (EMEA, 2012b).

O Canadá detém uma legislação bastante detalhada referente a produtos naturais para a saúde. As normas abordam todos os produtos de uso tradicional, tais como fitoterápicos e homeopáticos, englobando ainda produtos obtidos de vitaminas, aminoácidos e probióticos, desde que possuam uso tradicional especificado. Dentre as principais normas canadenses estão:

- 2003: *Natural health products regulations* (CANADÁ, 2003).
- 2006: *Evidence for safety and efficacy of finished natural health products* (CANADÁ, 2003).
- 2007: *Evidence for quality of finished natural health products* (CANADÁ, 2007).

Para os países integrantes do MERCOSUL (Mercado Comum do Sul) existe, assim como na Comunidade Europeia, a possibilidade de unificação das legislações, mas as diferenças entre os países ainda tornam essa realidade um futuro distante. Já foram realizadas reuniões com o objetivo de harmonizar a legislação sanitária de fitoterápicos, como o Pan American Network for Drug Regulatory Harmonization (PANDRH), mas os avanços não foram significativos.

O Uruguai, integrante do MERCOSUL, não possui regulamentação específica para fitoterápicos (MERCOSUL, 2012). O Paraguai regula todos os medicamentos, incluindo os fitoterápicos, pela Lei 1119/1997 e pelo Decreto 7442/2000 do Ministério de Saúde Pública e Bem Estar Social (MSPBES), que é próprio para o registro de medicamentos fitoterápicos e homeopáticos. Segundo a legislação paraguaia, todos os medicamentos devem ser avaliados por laboratório autorizado pelo MSPBES (PARAGUAI, 1997; PARAGUAI, 2000). Algumas das principais normas paraguaias:

- 1950: *Decreto 187/1950 - Normas para la importación de productos para la salud* (ARRÚA, VILLALBA e AMARILLA, 2009).

- 1991: *Resolución 394/1991 – Por la cual se aprueba el listado de medicamentos a ser comercializados dentro e fuera de farmácias* (ARRÚA, VILLALBA e AMARILLA, 2009).
- 1997: *Ley 1119/1997 – De produtos para la salud y otros* (PARAGUAI, 1997).
- 2000: *Decreto 7442/2000 – Requisitos para el registro de medicamentos fitoterapéuticos y homeopáticos* (PARAGUAI, 2000).

Na Argentina, o Ministério da Saúde e Ação Social promulgou a Resolução 144/1998 que define o quadro jurídico para a regulamentação dos medicamentos fitoterápicos. A partir dessa norma a ANMAT (Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica) passa a ser reconhecida como a agência nacional competente, à qual cabe promulgar normas complementares e explicativas. Ficou estabelecido para a ANMAT o controle sobre importação, fabricação, fracionamento, armazenamento, comercialização e publicidade de medicamentos e preparações à base de plantas. Em seguida, o Instituto Nacional de Drogas publicou a disposição legal 2673/1999 que continha diretrizes para o registro de medicamentos fitoterápicos, complementada por outras normas:

- 1998: *Resolución 144/1998 – Importación, elaboración, fraccionamiento, depósito, comercialización y publicidade de medicamentos fitoterápicos* (ARGENTINA, 1998).
- 1999: *Disposición 2673/1999 – Solicitud de inscripción medicamentos fitoterápicos* (ARGENTINA, 1999a).
- 1999: *Disposición 2671/1999 – Habilitación establecimientos elaboradores, envasadores, fraccionadores e importadores de medicamentos fitoterápicos* (ARGENTINA, 1999b).
- 2000: *Disposición 1788/2000 – Listado de drogas vegetales a excluirse como constituyentes de medicamentos fitoterápicos, em razón de que poseen efectos tóxicos para los seres humanos* (ARGENTINA, 2000).

No México os fitoterápicos são divididos em medicamentos e remédios fitoterápicos. Há dois principais regulamentos, a Lei Geral de Saúde (LGS) e o Regulamento para Insumos de Saúde (RIS), e também as normas operacionais mexicanas (NOM). A responsável pela regulação é a COFEPRIS (Comisión Federal para la Protección Contra Riesgos Sanitarios) (CASTELLANOS, 2009). Algumas das principais normas:

- 1984: *Ley general de salud* (MÉXICO, 1984).

- 1998: *Reglamento de insumos para la salud* (MÉXICO, 1998a).
- 1998: NOM-059-SSA1-1993 (NOM = Norma Operacional Mexicana) – *Buenas prácticas de fabricación para establecimientos de la industria químico farmacêutica dedicados a la fabricación de medicamentos* (MÉXICO, 1998b).
- 2000: NOM-072-SSA1-1993 – *Etiquetado de medicamentos* (MÉXICO, 2000a).
- 2000: NOM-164-SSA1-1998 – *Buenas prácticas de fabricación para fármacos* (MÉXICO, 2000b).
- 2001: NOM-176-SSA1-1998 – *Requisitos sanitários que deben cumplir los fabricantes, distribuidores y proveedores de fármacos utilizados en la elaboración de medicamentos de uso humano* (MÉXICO, 2001).
- 2006: NOM-073-SSA1-2005 – *Estabilidad de fármacos y medicamentos* (MÉXICO, 2006).

2.4. O USO POPULAR DE PLANTAS MEDICINAIS

O Brasil é um dos países mais ricos em biodiversidade do mundo, contando com mais de 20% do total de espécies do planeta, com mais de 55 mil espécies vegetais descritas, o que corresponde a 22% do total mundial (BRANDÃO *et al.*, 2006; FERRO, BONACELLI e ASSAD, 2006). Essa riqueza em biodiversidade é seguida por uma aceitação do uso de plantas medicinais e conhecimento tradicional associado (RODRIGUES, 2006, VEIGA Jr. e MELLO, 2008). Em pesquisa realizada com população de baixa renda em municípios no interior do nordeste, 94,4% dos entrevistados afirmaram crer no poder curativo das plantas medicinais, e 83,2% cultivavam ervas em suas residências (MOURA *et al.*, 2001).

As práticas referentes ao uso popular de plantas medicinais são ainda hoje o que muitas comunidades têm como alternativa para o tratamento de doenças ou manutenção da saúde (PINTO, AMOROZO e FURLAN, 2006). As contribuições do saber popular sobre o uso e a eficácia de plantas medicinais colaboram de maneira relevante para a divulgação das propriedades terapêuticas dos vegetais, prescritos frequentemente, por seus efeitos farmacológicos, embora não tenham seus constituintes químicos normalmente conhecidos. Desse modo, os usuários de plantas medicinais em diversos países, mantêm em voga a prática do consumo de fitoterápicos, validando informações terapêuticas acumuladas durante séculos, passadas de geração em geração. Este tipo de cultura medicinal desperta o interesse de

pesquisadores de áreas multidisciplinares, como botânica, farmacologia e fitoquímica (MACIEL, PINTO e VEIGA Jr, 2002).

A fitoterapia no Brasil vem ganhando crescente destaque, o que requer cuidados no que diz respeito à preservação das espécies, para evitar que plantas de grande valor medicinal sejam extintas antes de terem suas propriedades estudadas e seus produtos e derivados transformados em medicamentos. É preciso desenvolver técnicas de cultivo e colheita viáveis, que não gerem danos à reprodução das espécies (LOPEZ, 2006). Também é preciso valorizar o saber popular, a cultura local e as formas regionais de relação com os diferentes ecossistemas, tendo como objetivo o uso racional das espécies e o codesenvolvimento (GANEM, 2011).

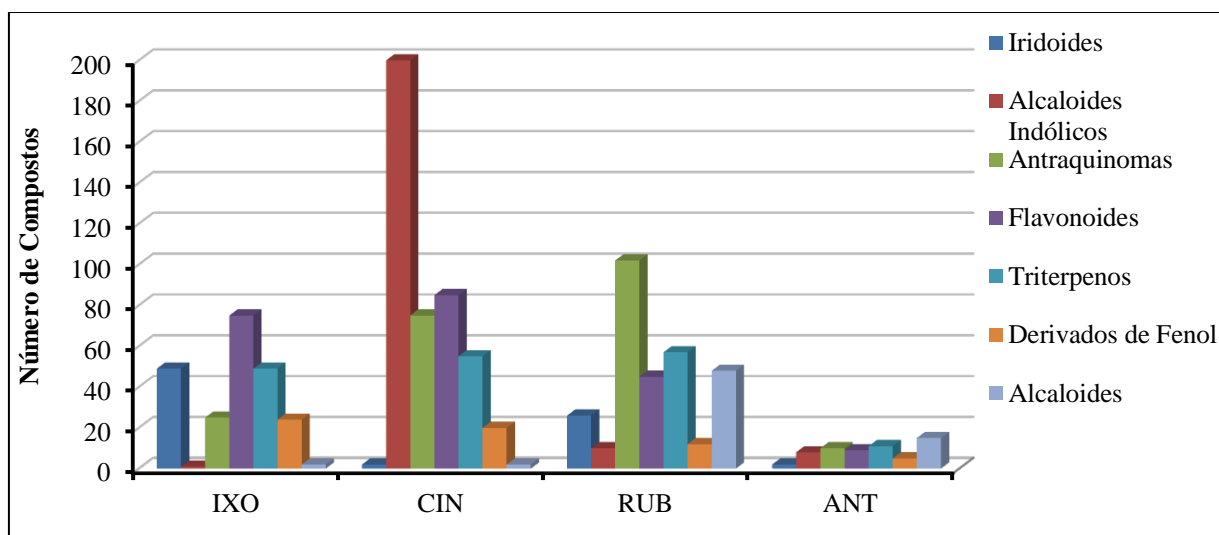
2.5. FAMILIA RUBIACEAE

A família Rubiaceae apresenta 650 gêneros e aproximadamente 13.000 espécies, sendo um dos maiores grupos entre as Angiospermas (ROBBRECHT, 1988; ROBBRECHT, 2013). É composta por árvores de grande, médio e pequeno porte, arbustos, subarbustos e ervas anuais ou perenes, distribuídas nas regiões tropicais de ambos os hemisférios (BARROSO, 1991), representando parcela significativa da vegetação lenhosa tropical, principalmente nas florestas chuvosas (ROBBRECHT, 2013). A estrutura foliar de suas espécies é caracterizada pela presença de hipoderme, estômatos classificados como paracítico e paralelocítico, epiderme adaxial papilosa, mesófilo normalmente dorsiventral e ocorrência frequente de domácias (METCALFE e CHALK, 1979). Outra característica típica é a presença comum de coléteres nas estípulas (LERSTEN, 1974).

No bioma Cerrado, a Savana Neotropical do Brasil Central, Rubiaceae é considerada a sétima família mais rica em espécies, com pelo menos 376 (MACHADO *et al.*, 2010). De acordo com a classificação botânica realizada por ROBBRECHT em 1988, esta família pode ser dividida em quatro subfamílias: Ixoroideae, Cinchonoideae, Antirrhoideae e Rubioideae. Cada subfamília apresenta um perfil químico típico para iridóides (Ixoroideae), alcalóides indólicos (Cinchonoideae) e antraquinonas (Rubioideae), que são considerados marcadores quimiotaxonômicos de Rubiaceae (Figura 1) (BOLZANI *et al.*, 2001). Em estudo visando avaliar o perfil quimiotaxonômico da família, verificou-se a presença de iridóides glicosilados em várias espécies, e concluiu-se então que estes metabólitos, possivelmente, estão presentes

em praticamente todas as subfamílias de Rubiaceae (HIROYUKI *et al.*, 1988; BREMER, 2009; SILVEIRA JR, SABA e JARDIM, 2012).

Figura 1: Diversidade química e distribuição dos principais metabólitos secundários dentre as subfamílias de Rubiaceae.



Fonte: adaptado de BOLZANI *et al.*, 2001.

Os alcaloides têm demonstrado importância na busca por respostas fisiológicas e mecanismos bioquímicos, bem como na elucidação de efeitos farmacológicos. Na família Rubiaceae foram encontrados compostos de interesse comercial e para diversos fins farmacêuticos, devido à suas atividades farmacológicas. Alguns exemplos são a quinidina (*Cinchona leddgeriana*), utilizada como antiarrítmico; quinina (*Cinchona leddgeriana*), que possui propriedades antimalárica e tônica e ioimbina (*Pausinystalia yoimba*), com efeitos afrodisíacos (CORDELL *et al.*, 2001).

As Rubiaceae no Brasil estão distribuídas principalmente na Amazônia, Cerrado e Floresta Atlântica, sendo que um grande número de espécies ainda permanece sem quaisquer estudos químico e biológico (SOUZA e LORENZI, 2008; ROSA *et al.*, 2010). Entretanto, sabe-se que essa família apresenta uma grande diversidade de metabólitos secundários, como iridoides, alcaloides indólicos, antraquinonas, flavonoides e outros derivados fenólicos e terpenoides (YOUNG *et al.*, 1996). Os alcaloides indólicos, as antraquinonas e os iridoides são considerados marcadores quimiotaxonômicos desta família (BOLZANI *et al.*, 2001).

Muitas são as espécies de interesse econômico pertencentes à família Rubiaceae, dentre as quais podem ser citadas a ipeca (*Cephaelis ipecacuanha* Rich.), fonte do alcaloide emetina, substância conhecida por seu efeito emético (TOKARNIA *et al.*, 2000); o jenipapo (*Genipa americana*) que, além de ser utilizado como alimento, possui diversas atividades

biológicas, como purgativa (raízes) e antidiarreica (folhas e cascas). Também já foi descrito efeito inibitório *in vitro* do crescimento de algumas cepas de bactérias Gram positivas e negativas pela genipicina, um iridoide extraído dos frutos do jenipapo (TALLENT, 1964). Há ainda o café (*Coffea arabica* L.), conhecido por ser fonte de uma bebida estimulante e utilizado para a extração da cafeína, que tem ação tônica e revigorante, e é utilizada associada a diversos antipiréticos, analgésicos e antigripais (SIMÕES *et al.*, 2004).

A família também possui exemplares ornamentais, como a gardênia (*Gardenia jasminoides* Ellis) e o jasmim-do-cabo (*Plumbago auriculata* Lam.); plantas que exibem toxicidade para animais, como a *Palicourea marcgravii* A. St. Hil; daninhas como a *Borreira verticillata* e diversas plantas medicinais, dentre as quais está a *Palicourea rigida* Kunth, usada popularmente no combate à inflamação e infecções do trato urinário (SEPTÍMIO, 1994; SARTÓRIO, 2000).

2.6. GÊNERO *Palicourea*

O gênero *Palicourea* é pertencente à tribo Psychotrieae da família Rubiaceae e abrange cerca de 200 espécies de arbustos e pequenas árvores com distribuição somente nos trópicos do Novo Mundo (TOLEDO *et al.*, 2007). Essas espécies são tipicamente membros de sub-bosques de matas tropicais e poucas delas ocorrem em savanas. Há três centros de riqueza de espécies de *Palicourea*, todos na América do Sul, sendo um deles a região do Planalto Centro-Sul do Brasil, com cerca de 37 espécies. Esse gênero possui flores com corola tubular, inodoras, de cores fortes e polinizadas principalmente por beija-flores, e os frutos carnosos, azuis a púrpuros e dispersos por aves. A maioria das espécies é distílica (nas quais são encontradas flores com dois morfós distintos: alguns indivíduos contêm flores com estilete maior que os estames - chamados morfologicamente de longistilas ou “pin”; e outros contêm flores com estilete menor que os estames – chamados morfologicamente de brevistilas ou “thrum”). Esta é uma condição considerada ancestral no gênero (COELHO e BARBOSA, 2003).

Algumas espécies do gênero *Palicourea* são bem conhecidas por sua toxicidade para com os animais. O gado, aparentemente saudável, após ingestão das folhas cai subitamente, principalmente após exercício, morrendo em poucos minutos. Na Amazônia, onde grandes áreas de floresta estão sendo transformadas em pasto, a *Palicourea* causa grandes perdas locais. A dose letal para o gado é de 0,6g /kg de folhas frescas, mas seus frutos são ainda mais

tóxicos. O quadro clínico patológico sugere que algumas dessas plantas possuem princípios tóxicos que interferem nas funções cardíacas, e dados disponíveis indicam que as mortes são causadas por insuficiência cardíaca aguda (COELHO *et al.*, 2007).

O ácido monofluoracético (MFAA) é um princípio tóxico prevalente em algumas espécies de *Palicourea*, contudo, terapias eficazes para controlar esta intoxicação já estão disponíveis (COELHO *et al.*, 2007). Há também espécies que foram relatadas como neurotóxicas para o gado, tais como a *P. marcgravii*, *P. grandiflora* e *P. juruana*. Estudo fitoquímico de espécies de *Palicourea* permitiu a identificação de β -carbólinas, monoterpenos indol e pirrolindol, alcaloides, além de triterpenos, ácidos fenólicos, cumarinas e um peptídeo cíclico (SILVA, CARVALHO e ALVES, 2008).

Estudo sobre a atividade moluscicida de algumas espécies vegetais da flora brasileira, demonstrou que a espécie *Palicourea nicotianaefolia* apresentou ação moluscicida contra caramujos de *Biomphalaria glabrata* na concentração de 100 ppm (MENDES *et al.*, 1984). Já em investigação com *Palicourea condensata*, o peptídeo palicoureína isolado da espécie inibiu os efeitos citopáticos causados pelo vírus HIV (BOKESCH *et al.*, 2001), enquanto que o extrato de *Palicourea demissa* demonstrou atividade antiinflamatória e antiviral.

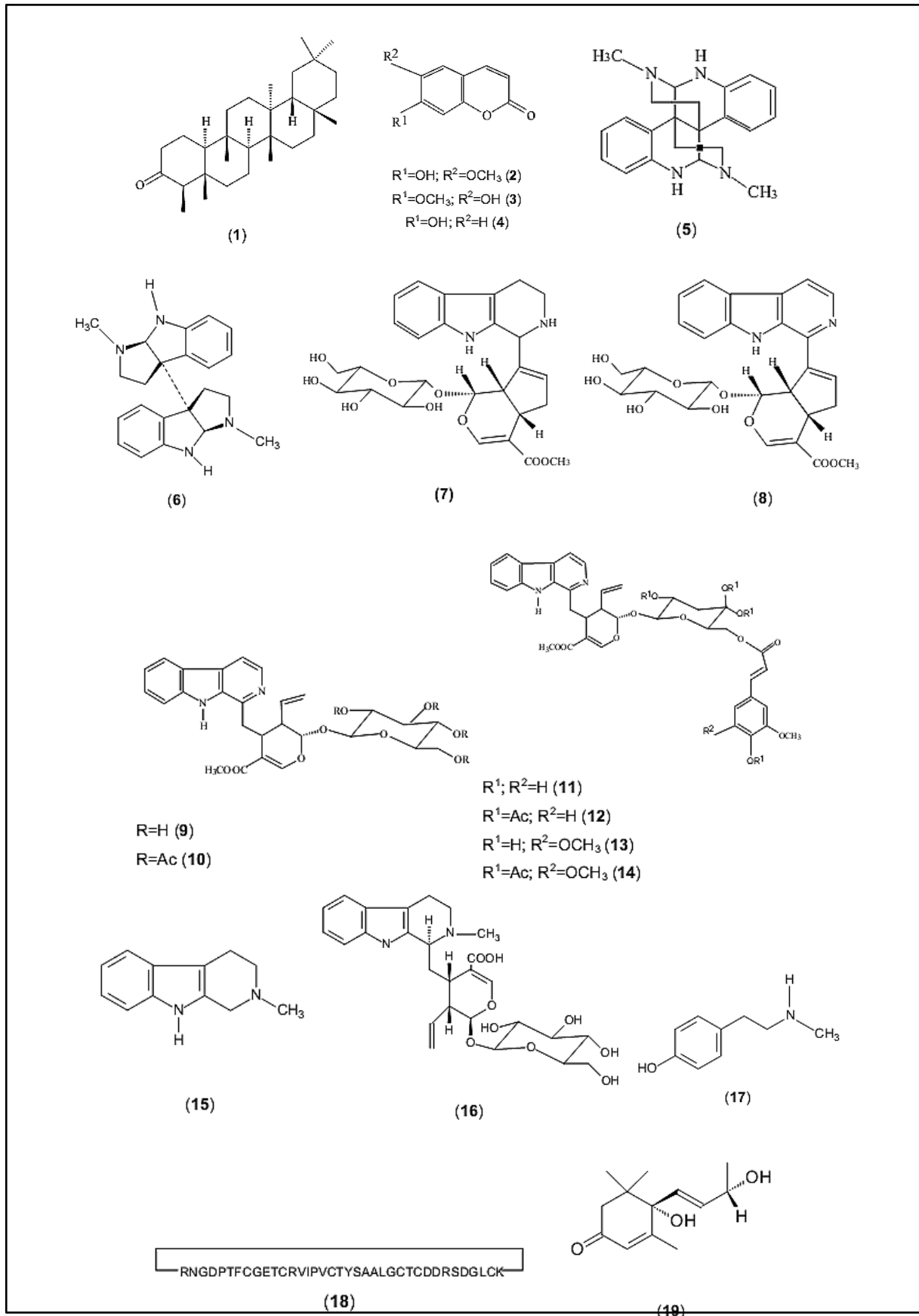
Plantas do gênero *Palicourea* contêm alcaloides indólicos e quinolínicos, podendo ser potenciais fontes de antiparasitários e citotóxicos (GARCÍA, TOBÓN e MORA, 1997). Estudos fitoquímicos realizados com espécies do gênero *Palicourea* registram o isolamento de uma grande variedade de classes metabólicas, como cumarinas, ácidos benzóicos, terpenóides, alcalóides, entre outras, destacadas na Tabela 1 e Figura 2.

Uma variedade de substâncias citotóxicas tem sido isolada a partir de espécies Psychotriae. Recentemente, extratos de *Palicourea* e intimamente relacionada à tribo Psychotriae, foram selecionados pelos EUA, no Instituto Nacional do Câncer, devido a suas atividades contra o câncer, sendo considerado como um gênero promissor entre os 90 mil investigados (SOARES *et al.*, 2012).

Tabela 1: Substâncias isoladas de espécies do gênero *Palicourea*.

Classe de substâncias	Espécie Vegetal
Terpeno	
3-friedelanona (1)	<i>P. demissa</i>
Cumarinas	
escopoletina(2) isoescopoletina(3) umbeliferona(4)	<i>P. demissa</i>
Alcaloides	
calicantina(5)	<i>P. alpina</i> <i>P. fendlerii</i>
chimonantina(6)	<i>P. domingensis</i> <i>P. fendlerii</i>
croceaina A (7) croceaina B (8)	<i>P. crocea</i>
lialosídeo(9) tetra-(O)-acetil-lialosídeo (10) (E)-O-(6)-cinamoil-4-hidróxi-3-metoxi-lialosídeo (11) (E)-tetra-(O-acetil)- O -(6)-cinamoil-4-hidróxi-3-metoxi-lialosídeo (12) (E)- O-(6)-cinamoil-4-hidróxi-3,5-dimetoxi-lialosídeo (13) (E)-tetra-(O-acetil)- O -(6)-cinamoil-4-hidróxi-3,5''-dimetoxi-lialosídeo (14)	<i>P. adusta</i>
2-metiltetraidro- β -carbolina(15)	<i>P. marcgravii</i>
palicosídeo(16)	<i>P. marcgravii</i>
Outros	
N-metiltiramina (17)	<i>P. marcgravii</i>
palicoureína(18)	<i>P. condensata</i>
vomifoliol(19)	<i>P. alpina</i>

Fonte: Adaptado de ROSA, 2009

Figura 2: Estrutura de substâncias isoladas de espécies do gênero *Palicourea*.

Fonte: Adaptado de ROSA, 2009.

2.7. ESPÉCIE *Palicourea rigida* Kunth

Palicourea rigida Kunth é caracterizada como uma árvore típica de regiões de cerrado e pode ser encontrada desde o México até a Argentina (Figura 3). Exibe flores amarelas (Figura 4), é conhecida por diversos nomes populares, como gritadeira, bate-caixa, douradinha do campo ou douradão e suas partes aéreas têm uso na medicina popular para o tratamento de desordens urinárias e do aparelho reprodutor feminino (BOLZANI *et al.*, 1992; SEPTÍMIO, 1994; VENCATO *et al.*, 2006).

Alguns ensaios biológicos realizados em *P. rigida* já foram citados na literatura, como a atividade antimicrobiana (SILVA *et al.*, 2005; CORREA *et al.*, 2005) e a atividade citotóxica (SOARES *et al.*, 2012). O extrato e a fração em acetato de etila das folhas de *P. rigidam* mostraram relevante atividade contra as células de melanoma humano SK MEL 37, sendo que o alcaloide vallesiachotamina foi sugerido como o responsável por essa atividade com valores de IC₅₀ de 16 µg/mL (SILVA *et al.*, 2006).

Segundo Engler (1964), a classificação botânica para *Palicourea rigida* é conforme apresentada na Tabela 2.

Tabela 2: Classificação botânica de *Palicourea rigida*.

Classificação	
Divisão	Angiosperma
Classe	Dicotiledônea
Ordem	Gentianales
Família	Rubiaceae
Subfamília	Rubioideae
Tribo	Psychotrieae
Gênero	Palicourea
Espécie	<i>Palicourea rigida</i>

Fonte: ENGLER (1964)

Figura 3: Aspectos da morfologia externa de *P. rigida* Kunth.



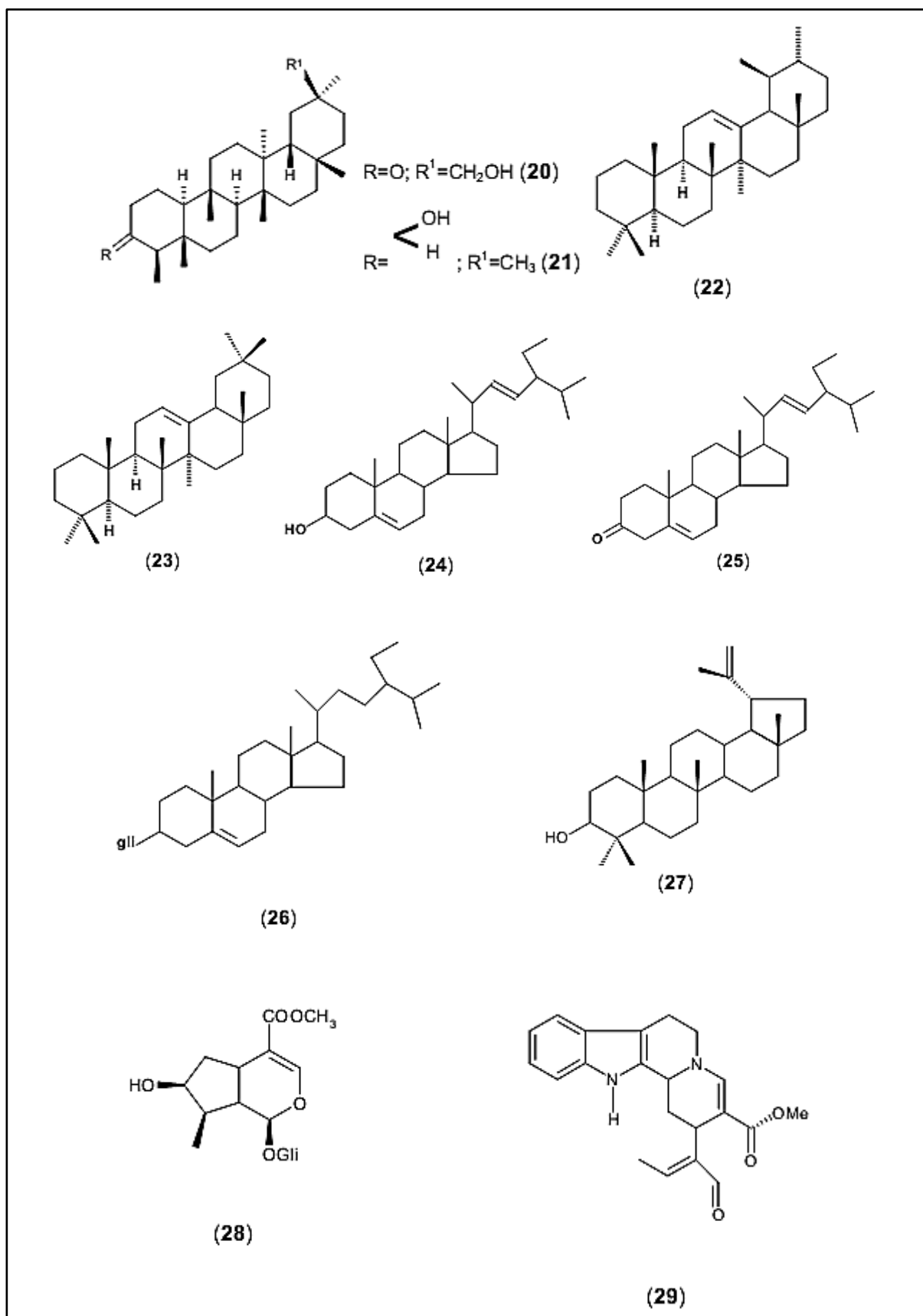
Fonte: CRUZ, 1998.

Figura 4: Estrutura floral de *P. rigida* Kunth.



Fonte: CRUZ, 1998.

Figura 5: Substâncias isoladas de *P. rigida* Kunth



Há relatos na literatura de isolamento de triterpenos, iridoide e alcaloide indólico para a espécie, como citados a seguir e constantes nas Figuras 2 e 5:

- | | |
|---------------------------------------|--|
| ✓ 3-friedelanona (1) | ✓ estigmastenona(25) |
| ✓ 30-hidroxifriedelan-3-ona (20) | ✓ 3 β -D-glicose-sitosterol (26) |
| ✓ 3 β -hidroxifriedelanona (21) | ✓ lupeol(27) |
| ✓ α -amirina(22) | ✓ loganina(28) |
| ✓ β -amirina(23) | ✓ vallesiachotamina(29) |
| ✓ estigmasterol(24) | |

2.8. POTENCIALIDADE DA INSERÇÃO DA *Palicourea rigida* NA LISTA DE PLANTAS DE INTERESSE AO SUS

Investigações embasadas na etnofarmacologia e/ou etnobotânica são as principais vias de seleção para o estudo de plantas medicinais, pois têm como principal foco o uso popular. Apenas cerca de 2% das espécies vegetais do Brasil foram estudadas, o que mostra o potencial de nossa biodiversidade como fonte de matéria-prima para produção de antibióticos, anti-inflamatórios, diuréticos, analgésicos, laxantes, antidepressivos, anti-hipertensivos, e muitos outros fármacos (SOUSA, 2008).

A RENISUS é constituída por plantas medicinais que são de interesse ao SUS por serem nativas ou exóticas adaptadas, amplamente utilizadas pela população brasileira, e já terem algumas evidências para indicação de uso na Atenção Básica de Saúde. Entretanto, necessitam de estudos para confirmar segurança e eficácia; definição da indicação de uso e da forma farmacêutica mais adequada; possibilidade de cultivo e produção.

As plantas da RENISUS já são usadas pela população, pelo conhecimento popular e/ou tradicional. Alguns dos fitoterápicos com registro na ANVISA são produzidos a partir dessas espécies vegetais, para determinada indicação. No entanto, para a maioria delas e para algumas indicações, ainda são necessários estudos para confirmação da segurança e eficácia.

O Ministério da Saúde tem recomendado uma interação entre os pesquisadores e o setor produtivo para estudar as espécies e gerar produtos de interesse ao SUS. Dessa forma, plantas medicinais e fitoterápicos serão garantidos à população com qualidade, segurança e eficácia, como também a promoção do uso sustentável da biodiversidade, o desenvolvimento da cadeia produtiva e da indústria nacional.

Palicourea rigida Kunth, amplamente distribuída no Brasil e já utilizada pela população para o tratamento de inflamações e infecções do trato urinário e do aparelho reprodutor feminino, também possui atividades citotóxica e antimicrobiana descritas na literatura (ROSA, 2009; PINTO *et al.*, 2009). Por este motivo, esta espécie é promissora para estudos que visam o desenvolvimento de novos fitomedicamentos. Destaca-se ainda a importância dos estudos de segurança, haja vista a toxicidade característica de algumas espécies do gênero.

2.9. ASPECTOS GERAIS DO METABOLISMO SECUNDÁRIO

Em contraste com as vias metabólicas primárias, que sintetizam, degradam, e geralmente interconvertem substâncias normalmente encontradas em todos os organismos, existe também uma área de metabolismo referente a constituintes que têm distribuição limitada na natureza. Estas substâncias, chamadas de metabólitos secundários ou especiais, são encontradas em organismos específicos ou grupos de organismos e podem ser uma expressão da individualidade das espécies.

Metabólitos secundários não são necessariamente produzidos em todas as condições, e na grande maioria dos casos, a função destas substâncias e os benefícios para o organismo não são ainda conhecidos. Alguns são, sem dúvida, produzidos por razões claras, por exemplo, como fornecimento de materiais tóxicos para defesa contra predadores, como atraentes voláteis para a mesma espécie ou para outra, ou como agentes corantes para atrair ou alertar outras espécies. No entanto, é lógico supor que todos desempenham algum papel vital para o bem-estar do produtor. É desta área do metabolismo das plantas que provém a maior parte dos produtos naturais farmacologicamente ativos (DEWICK, 2002).

Os metabólitos secundários (especiais ou naturais) não exercem efeitos diretos sobre processos celulares primários, tais como fotossíntese, respiração, deslocamento de solutos e água, síntese de proteínas e assimilação de nutrientes, dentre outros. São de grande utilidade na defesa dos vegetais contra herbívoros e patógenos, sendo divididos em três grupos principais: os terpenos, as substâncias fenólicas e as substâncias nitrogenadas (VICKERY e VICKERY, 1981).

Os terpenos (ou terpenoides) formam o maior grupo de produtos secundários e são, em geral, insolúveis em água e sintetizados a partir do acetyl-CoA. Exemplos de terpenoides incluem as giberelinas, os carotenoides e os piretroides (ROBINSON, 1991).

O termo “constituintes fenólicos” refere-se a moléculas que contêm um grupo fenol em sua estrutura. Nos vegetais, constituem um grupo muito heterogêneo, com mais de 10.000 substâncias. Alguns se solubilizam somente em solventes orgânicos enquanto outros são solúveis em água, havendo alguns altamente insolúveis. Possuem funções metabólicas variadas. Duas vias metabólicas estão envolvidas na síntese dos constituintes fenólicos: a via do ácido chiquímico e a via do acetato. Como exemplos de constituintes fenólicos destacam-se as ligninas, as cumarinas, os flavonoides e os taninos (ROBINSON, 1991).

As substâncias nitrogenadas se constituem por uma grande variedade de metabólitos secundários que contêm nitrogênio na sua estrutura. Nesta classe, estão incluídas algumas moléculas bastante conhecidas relacionadas à defesa vegetal contra herbivoria, como os alcaloides e os glicosídeos cianogênicos. Algumas dessas substâncias são tóxicas aos humanos, embora outras possam ser utilizadas no tratamento de doenças devido a suas propriedades medicinais. Os metabólitos secundários nitrogenados têm origem nos aminoácidos do metabolismo proteico (COSTA, 1978).

2.10. SUBSTÂNCIAS FENÓLICAS

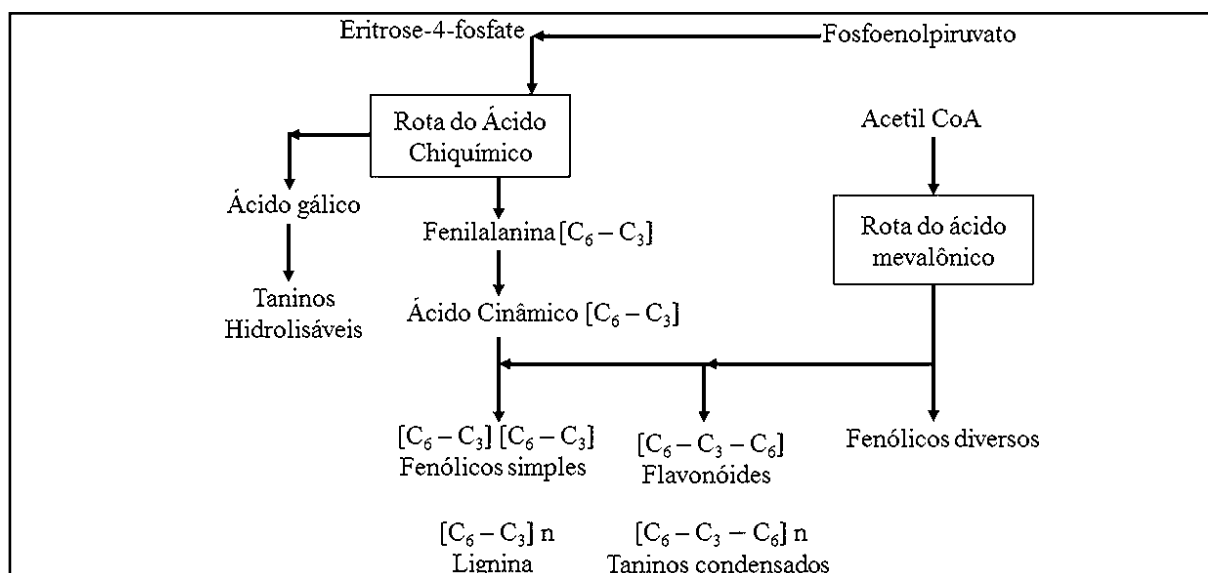
Os vegetais são fontes de substâncias antioxidantes, como os constituintes fenólicos, que são produzidos pelo metabolismo secundário, conforme Figura 6. Essa característica pode ser vista como resultado de um processo de evolução das espécies para promover sua proteção natural contra os radicais livres formados pela radiação ultravioleta (UV), que é necessária para a realização da fotossíntese. Estes constituintes são antioxidantes primários, pois são capazes de neutralizar a reatividade radicalar por meio da doação de um átomo de hidrogênio, bloqueando as reações em cadeia (F’GUYER *et al.*, 2003; NIKOLIC, 2006).

Constituintes fenólicos de origem natural são representados por substâncias que exibem desde baixo peso molecular, até aqueles com pesos mais elevados, estruturalmente mais complexos, como taninos condensados e hidrolisáveis e ligninas. Os fenólicos são classificados de acordo com o tipo do esqueleto básico, conforme apresentado na Tabela 3, em que C6 corresponde ao anel aromático contendo uma hidroxila (OH) e CX representa a cadeia substituinte com X átomos de carbono (CARVALHO *et al.*, 2000).

As vias de biossíntese das substâncias fenólicas podem ser a do ácido chiquímico, acetato, ou por ambas (via mista). De acordo com a via, o padrão de substituição será determinado: a via do ácido chiquímico produz constituintes com grupos OH em posição *orto*,

formados a partir do ácido cinâmico, enquanto a via do acetato gera moléculas de OH em *meta* (ANDERSEN; MARKHAM, 2005; DEWICK, 2009).

Figura 6: Biossíntese simplificada de substâncias fenólicas.



Fonte: adaptado de SIMÕES *et al.*, 2004.

Tabela 3: Classificação das substâncias fenólicas de acordo com o esqueleto básico.

Esqueleto básico	Classe de substâncias fenólicas
C6	Fenóis simples, benzoquinonas
C6-C1	Ácidos fenólicos
C6-C2	Acetofenonas e ácidos fenilacéticos
C6-C3	Fenilpropanóides: ácidos cinâmicos e substâncias análogas, fenilpropenos, cumarinas, isocumarinas e cromonas
C6-C4	Naftoquinonas
C6-C1-C6	Xantonas
C6-C2-C6	Estilbenos, antraquinonas
C6-C3-C6	Flavonoides e isoflavonoides
(C6-C3) ₂	Lignanas/neolignanas
(C6-C3-C6) ₂	Biflavonoides
(C6) _n	Melaninas vegetais
(C6-C3) _n	Ligninas
(C6-C1) _{glicosídeos}	Taninos hidrolisáveis
(C6-C3-C6) _n	Taninos condensados

Fonte: CARVALHO *et al.*, (2000).

Diversas propriedades são atribuídas aos constituintes fenólicos vegetais, como sabor, odor e coloração. Devido a isso, substâncias, como o aldeído cinâmico e a vanilina, são utilizadas nas indústrias de alimentos e bebidas como flavorizantes e corantes. Outras substâncias, como a hidroquinona, o ácido elágico e ésteres do ácido gálico, exercem propriedades defensivas nas plantas, e também participam da inter-relação entre animais e

vegetais, com atividades de inibição da germinação de sementes, do crescimento de fungos e plantas em geral. Alguns arilpropanoides também têm importante papel na supressão do apetite de insetos (VERMERRIS; NICHOLSON, 2007).

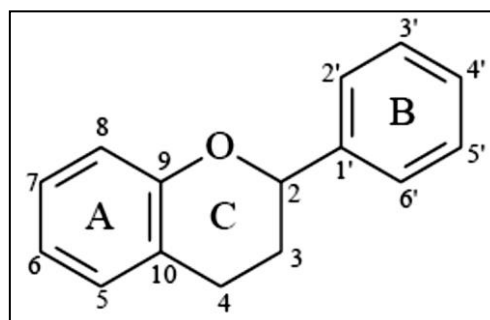
2.11. FLAVONOIDES

Os flavonoides foram descobertos pelo Prêmio Nobel Szent-György que, em 1930, isolou da casca de limão a substância citrino, que regulava a permeabilidade dos vasos capilares. Inicialmente, os flavonoides foram denominados vitamina P (de permeabilidade) e vitamina C (Porque verificou-se que alguns flavonoides têm propriedades semelhantes à vitamina C). No entanto, ambos os nomes foram abandonados por volta de 1950 (MARTÍNEZ-FLÓREZ, *et al.*, 2002).

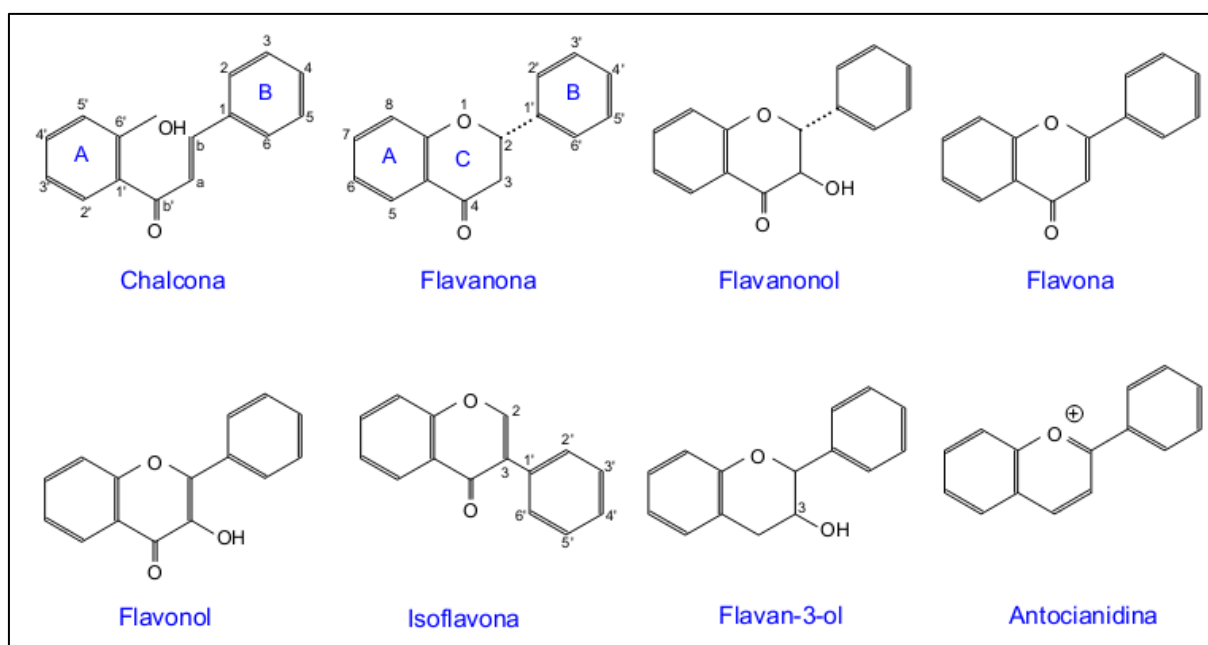
São encontrados em frutas, vegetais, sementes, cascas de árvores, raízes, talos, flores e em seus derivados, tais como os chás e vinhos (NIJVELDT *et al.*, 2001). São substâncias fenólicas com baixo peso molecular (ANDERSEN; MARKHAM, 2005; BUER *et al.*, 2010), sendo conhecidos como pigmentos amarelos, responsáveis pela maioria dos corantes amarelos, vermelhos e azuis presentes nos vegetais (WINKEL-SHIRLEY, 2001). Devido ao fato de atuarem em vários sistemas orgânicos, diversas propriedades biológicas e farmacológicas lhes são atribuídas (NIJVELDT *et al.*, 2001; TAPAS *et al.*, 2008).

Quimicamente os flavonoides são substâncias aromáticas, contendo 15 átomos de carbono no seu núcleo fundamental (Figura 7), que é caracterizado por dois anéis aromáticos (A e B) e um heterociclo oxigenado (anel C) (ANDERSEN; MARKHAM, 2005; WINKEL-SHIRLEY, 2001). A grande variabilidade de grupos substituintes nos flavonoides, aliada aos diversos padrões de hidroxilação, metilação, glicolisação e outras substituições que podem ocorrer nos anéis aromáticos, cria uma enorme diversidade de flavonoides, que ultrapassa 9.000 estruturas identificadas (BUER *et al.*, 2010).

Há várias subclasses de flavonoides, como as antocianinas, as antocianidinas, os flavonóis, as flavononas, as flavonas, as catequinas, os flavanóis e as chalconas (ANDERSEN; MARKHAM, 2005; PIETTA, 2000; WINKEL-SHIRLEY, 2001). As estruturas básicas das principais subclasses de flavonoides são mostradas na Figura 8. Essas substâncias são biossintetizadas a partir da via mista do acetil-CoA e ácido chiquímico (ANDERSEN; MARKHAM, 2005; PIETTA, 2000; BUER *et al.*, 2010).

Figura 7: Estrutura básica dos flavonoides

Fonte: ARAÚJO *et al.* (2005).

Figura 8: Representação das subclasses de flavonoides.

Fonte: adaptado de COUTINHO *et al.*, 2009.

Os flavonoides exercem diversas propriedades benéficas ao organismo humano devido a sua ação antioxidante. Como exemplo, pode-se citar a prevenção da peroxidação lipídica da membrana celular e a proteção contra o dano oxidativo de substâncias de importante papel fisiológico, como a vitamina C e a adrenalina (TAPAS *et al.*, 2008). Também agem como antialérgicos, devido à inibição da liberação de histamina e como anti-inflamatórios, por inibirem a enzima lipoxigenase, que converte o ácido araquidônico nos mediadores da inflamação (ONWUKAEME, 1995; NIJVELDT *et al.*, 2001). A catequina, um flavonoide de ocorrência natural, possui atividades antiespasmódica, broncodilatadora e vasodilatadora (GHAYUR; KHAN; GILANI, 2007).

A atividade antioxidante destas substâncias pode proteger o organismo de efeitos deletérios ou cancerígenos, e prevenir doenças crônico-degenerativas. São também capazes de prevenir doenças cardiovasculares, pela redução das taxas lipídicas sanguíneas, pela inibição da agregação plaquetária, ou ainda através da oxidação de lipoproteínas de baixa densidade (LDL) (FRANKEL *et al.*, 1993; ARAUJO, 2005).

Nas plantas, os flavonoides agem protegendo-as dos raios UV, de insetos, fungos, vírus e bactérias. Também ajudam na atração de polinizadores, regulam a ação hormonal, inibem enzimas e funcionam como agentes alelopáticos (ANDERSEN; MARKHAM, 2005; BUER *et al.*, 2010).

2.12. AÇÃO ANTIOXIDANTE

A função dos radicais livres como o radical superóxido, radical hidroxila e outros tem sido associada a inúmeras doenças, incluindo câncer, doenças cardiovasculares, catarata, doenças inflamatórias gastrointestinais e outros processos inflamatórios. Com base nesse aspecto, há um grande número de relatos sobre agentes antioxidantes e sua ação sobre a proliferação de células cancerígenas. Uma grande parcela desses estudos tem sido direcionada aos antioxidantes polifenólicos, devido a sua atividade em patologias crônicas degenerativas, incluindo doenças cardiovasculares e câncer. Embora o uso de antioxidantes polifenólicos derivados de alimentos seja bastante descrito, os mecanismos envolvidos nesses processos ainda não estão muito claros (LIANDA, 2009).

Normalmente, alimentos são fontes de antioxidantes naturais, que podem sequestrar radicais livres. Moléculas pequenas antioxidantes, como a vitamina C, vitamina E, e carotenoides, têm gerado interesse como agentes defensores contra doenças degenerativas. No entanto, têm evidenciado que substâncias fenólicas tais como ácidos fenólicos e flavonoides, exercem ações antioxidantes mais potentes que a vitamina C e a vitamina E. Além disso, tem sido mostrada ainda a alta correlação entre a atividade antioxidante total de algumas frutas e seu conteúdo fenólico (PRIOR, 2003) e a ocorrência de substâncias fenólicas em legumes e sementes relacionada com a atividade antioxidante (SIDDHURAJU e BECKER, 2007).

Espécies reativas oxigenadas (ROS) podem ter interferência direta no crescimento das células. Os danos causados por elas podem induzir mitose, aumentando o risco de danos ao DNA e a divisão celular com danos irreparáveis levando a mutações (NIJVELDT *et al.*, 2001). Dessa forma, as propriedades oncoprotetoras dos antioxidantes endógenos têm sido

demonstradas e estes são produzidos somente por plantas. Os antioxidantes endógenos são divididos em antioxidantes solúveis em água (exemplo vitamina C) e lipossolúveis (exemplos: vitamina A, vitamina E e β -caroteno). Uma vasta e heterogênea classe de substâncias são os polifenóis, que são caracterizados pela presença de um ou mais anéis fenólicos em sua estrutura. Exemplos dessas substâncias são os ácidos fenólicos simples, ácido cafeico, ácido clorogênico, ácido ferúlico, ácido sinápico, etc ou os flavonoides (catequinas, quercetina, miricetina, etc) (KAMPA *et al.*, 2004).

Tem sido relatado que os flavonoides com atividade antioxidante podem inibir a carcinogênese. Alguns como quercetina, apigenina e luteolina, já foram indicados como potentes inibidores de proliferação celular. NIJVELDT e colaboradores (2001) relataram em seu trabalho que a quercetina e apigenina exibiram potente atividade inibitória sobre o crescimento de melanoma e influenciaram significativamente o potencial invasivo e metastático em camundongos.

Pouco é conhecido acerca da absorção e metabolismo dos flavonoides. Acredita-se que não sejam tóxicos e, se absorvidos e ativos biologicamente *in vivo*, sejam capazes de prevenir a ação de radicais livres e peroxidação lipídica (LPO), o que está associado com envelhecimento celular e doenças crônicas, como arteriosclerose e câncer. A LPO ocorre em três estágios: iniciação, propagação e terminação. Na iniciação, o radical livre abstrai hidrogênio de ácidos graxos poliinsaturados para formar o radical lipídico. Na propagação, o radical lipídico reage com oxigênio para formar o radical peroxi-lipídico que irá gerar mais radicais livres, alimentando as reações em cadeia. No estágio de terminação, as espécies de radicais livres reagem entre si ou com antioxidantes para formar produtos inertes.

É possível suprimir a LPO por inativação enzimática de radicais livres e antioxidantes que inibem o estágio de iniciação e/ou aceleram o estágio de terminação. Os flavonoides inibem a LPO *in vitro* no estágio de iniciação, agindo como sequestradores de ânions superóxidos e radicais hidroxila, terminando as reações radicalares em cadeia por doação de átomos de hidrogênio para o radical peróxido, formando o radical flavonoide (menos reativo e mais estável). Este último desvia as reações com radicais livres quebrando, então, a propagação em cadeia (COOK e SAMMAN, 1996; NIJVELDT *et al.*, 2001). Em seu trabalho, COOK e SAMMAN (1996) descrevem diversos fatores estruturais dos flavonoides que influenciam a inibição da LPO, tais como:

- presença do grupo hidroxila na posição três do anel C. Exemplos de flavonoides agliconas nessas condições: canferol, quercetina, miricetina e morina (flavonóis);

- ligação dupla entre os carbonos dois e três do anel C. A hidrogenação desta ligação diminui o efeito antiperoxidativo;
- número de hidroxilas - quanto maior nos anéis A e B , maior a atividade sequestradora de radicais livres;
- presença de açúcar. A eficiência antiperoxidativa é diminuída nos grupos hidroxila adjacentes ao grupo glicosídeo devido ao impedimento estérico;
- grupos metoxila também diminuem a eficiência antiperoxidativa de flavonoides *in vitro* devido ao impedimento estérico; e
- flavonoides contendo grupo carbonila na posição quatro, e grupos hidroxila nas posições três ou cinco, tais como quercetina, rutina, canferol, miricetina e morina, formam quelatos com íons metálicos.

A capacidade dos flavonoides de sequestrar íons metálicos pode contribuir para suas propriedades antiperoxidativas pela prevenção da formação de radicais livres. Essa formação de quelatos é um mecanismo antioxidante dos flavonoides (COOK e SAMMAN, 1996). Além disso, a capacidade antioxidante das substâncias fenólicas depende, em grande parte, da sua estrutura química, orientação relativa e do número de grupos hidroxilas ligados ao anel aromático (PAGANGA *et al.*, 1996).

2.13. MECANISMO FISIOLÓGICO DA NOCICEPÇÃO

A dor pode ser definida como uma experiência de caráter subjetivo, que pode estar associada a dano real ou potencial nos tecidos, podendo ser descrita tanto em termos desses danos, quanto por ambas às características. A percepção da dor é caracterizada como uma experiência multidimensional, diversificando-se na qualidade e na intensidade sensorial, sendo afetada por diversas variáveis afetivo-motivacionais (SOUSA, 2002). O termo nocicepção diz respeito ao reconhecimento de sinais dolorosos pelo sistema nervoso, que formula informações relacionadas à lesão (KLAUMANN, 2008).

A exposição do corpo a estímulos potencialmente nocivos induz à sensação desagradável, informando o indivíduo sobre o perigo real ou potencial para sua integridade física. A informação processada pode ser diferenciada como dor fisiológica ou dor patológica (ALMEIDA *et al.*, 2006). A dor fisiológica é a que induz respostas protetoras, como o reflexo de retirada (ou reação de fuga), com o objetivo de suspender a exposição ao estímulo nocivo.

Este sinal é característico da dor aguda produzida por estímulos intensos na superfície da pele. A dor visceral e a dor somática profunda têm como causas estímulos inevitáveis, e apresentam respostas adaptativas específicas, normalmente são subagudas e podem vir acompanhadas de respostas autonômicas ou comportamentais específicas (KLAUMANN, 2008).

Ainda que a inatividade temporária e o comportamento protetor como resposta à dor subaguda possam ser benéficos, a dor persistente pode gerar um estado de depressão semelhante ao criado por estímulos estressantes inevitáveis, e não pode ser considerada uma resposta adaptativa. Estados dolorosos contínuos estimulam de maneira persistente os aferentes nociceptivos, gerando alterações que potencializam os efeitos deletérios da dor crônica, introduzindo então o conceito de dor patológica. Enquanto a dor aguda representa um sintoma de alguma doença, a dor crônica é propriamente uma doença, causando efeitos nocivos independente do estímulo que a gerou (KLAUMANN, 2008).

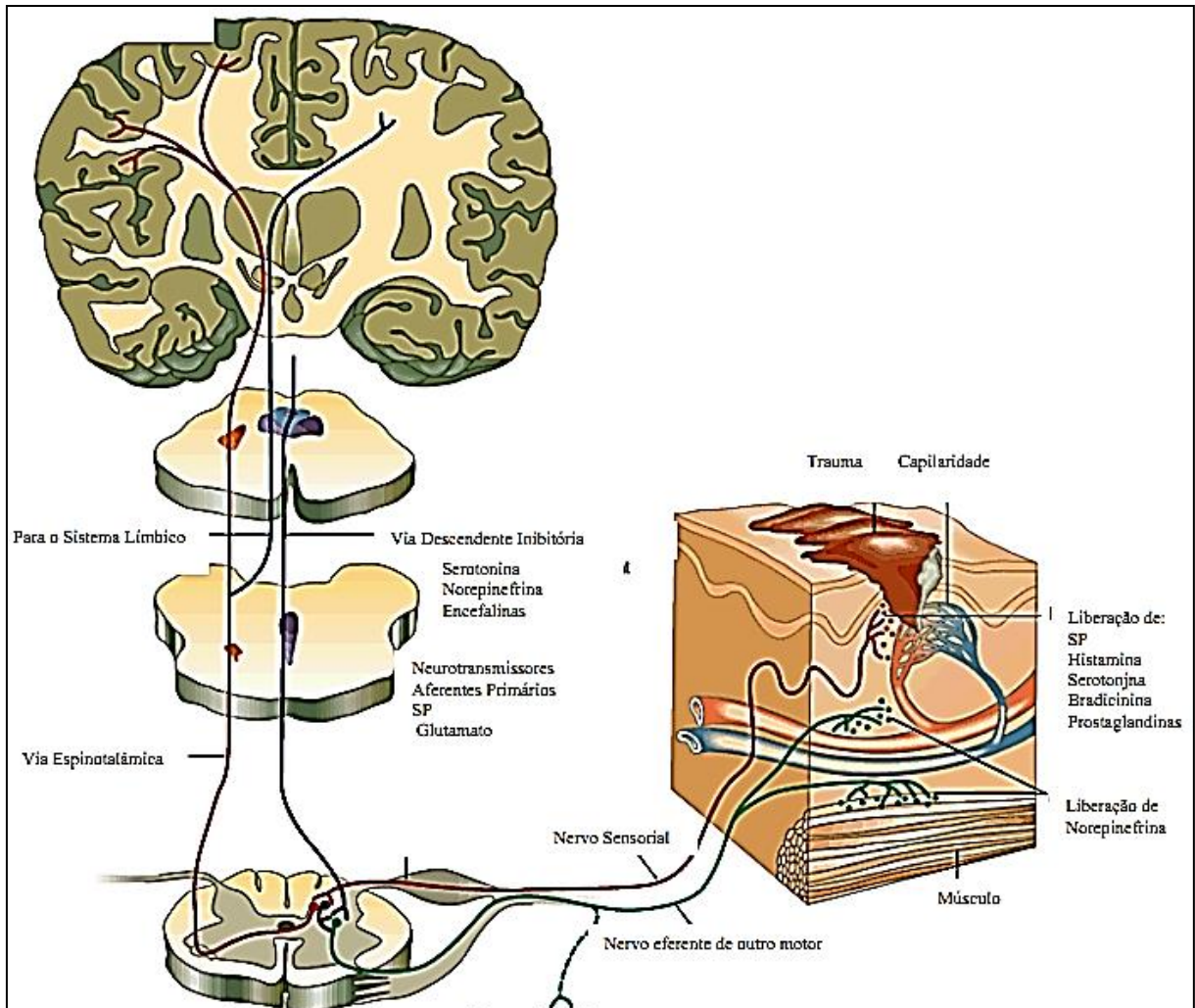
Segundo sua origem a dor persistente pode ser subdividida em nociceptiva e neuropática. A dor nociceptiva é resultado da ativação direta de nociceptores da pele e outros tecidos respondendo a uma lesão tecidual, acompanhada de inflamação. A dor neuropática ou neurogênica tem origem devido a lesões de nervos periféricos ou do sistema nervoso central (KLAUMANN, 2008; ALMEIDA *et al.*, 2006). Algumas definições correlacionadas à dor e suas formas de percepção (KLAUMANN, 2008):

- Nociceptor: receptor periférico que responde a estímulos nocivos.
- Limiar à dor: a menor intensidade de estímulo que permite ao indivíduo perceber a dor.
- Alodinia: dor que surge como resultado de estimulação não-nociva sobre a pele normal.
- Hiperalgisia: aumento da resposta dolorosa produzida por um estímulo nocivo.
- Hiperalgisia primária: hiperalgisia na região da lesão tecidual.
- Hiperalgisia secundária: hiperalgisia na região que circunda a lesão tecidual.
- Analgesia: redução ou anulação da dor.
- Hiperestesia: sensibilidade aumentada à estimulação.
- Neuralgia ou nevralgia: dor localizada em uma região inervada por nervo específico ou grupo de nervos.

Nociceptores são neurônios cujas terminações nervosas são livres, não especializadas, e que respondem a estímulos nociceptivos detectando, assim, lesões nos tecidos, nos quais os estímulos desencadeadores podem ser mecânicos, térmicos ou químicos

(MILLAN, 2002). Nas vias nociceptoras, esses neurônios projetam seus axônios da periferia para o sistema nervoso central, seguindo para a medula, tálamo e córtex cerebral (Figura 9).

Figura 9: Diagrama esquemático para ilustração do mecanismo de transmissão e percepção da dor.



Fonte: Adaptado de BEAR *et al.*, 2000

Na Figura 9 são também mostrados o mecanismo de transmissão e a percepção da dor através de diagrama esquemático mostrando o corno dorsal da medula espinhal que recebe as informações sensoriais oriundas dos terminais periféricos de fibras nervosas nociceptivas ascendentes (cor vermelha) e fibras descendentes (cor azul).

Na ocorrência de traumatismo, os receptores nociceptivos gradativamente sofrem modificações, gerando dor prolongada em decorrência de sua alteração estrutural e funcional e da liberação de substâncias algio gênicas nos tecidos. A sensibilização dos neurônios periféricos produz hiperalgesia termomecânica primária e a dos neurônios centrais hiperalgesia mecânica secundária (TEIXEIRA, 2001).

Para ser considerado antinociceptivo um produto ou substância deve inibir o estímulo doloroso por algum mecanismo que esteja envolvido na nocicepção. Por exemplo, a dor pode ser desencadeada pela ação de metabólitos da inflamação, como prostaglandinas, agindo sobre receptores de neurônios nociceptores. A inibição da ciclooxigenase, enzima responsável pela biossíntese de prostaglandinas, é um dos mecanismos capazes de suprimir a dor. Outro mecanismo relevante para a ação antinociceptiva é a ativação dos receptores opióides na medula espinhal. Os opióides, como a morfina, causam analgesia ao ativar as vias descendentes, por inibir a transmissão no corno dorsal e por impedir a excitação das terminações nervosas sensoriais na periferia (RANG *et al.*, 2007).

Animais são incapazes de verbalizar os componentes subjetivos da dor, ou seja, neles não se avalia dor, mas nocicepção. Desse modo, terminações como dor e analgesia são mais adotadas para humanos e nocicepção e antinocicepção para animais (JONES, 1992). O teste da formalina é uma metodologia bastante utilizada para avaliar a ação antinociceptiva (HUNSKAAR; HOLE, 1987). É um método que melhor mimetiza a dor clínica e é constituído por duas fases dolorosas. A 1ª fase é característica de uma ação em nível de sistema nervoso central, em que as sinapses que contêm receptores opióides constituem um dos mecanismos que controla a dor. Fármacos, como a morfina, são capazes de agir centralmente nesses receptores e diminuir o estímulo doloroso. A morfina, por ser um fármaco opioide, age também na 2ª fase (SHIBATA *et al.*, 1989). A 2ª fase é caracterizada pelo aparecimento de um processo inflamatório local, em que são produzidos mediadores químicos da inflamação, que podem ser inibidos por fármacos anti-inflamatórios como ácido acetilsalicílico, indometacina e dexametasona (RANG *et al.*, 2007).

2.14. PROCESSO INFLAMATÓRIO

O processo inflamatório se caracteriza por uma sequência de eventos que, geralmente, é iniciada por uma substância estranha ou por lesão física, seguida do recrutamento e ativação de células inflamatórias seguida da liberação de mediadores da inflamação, que tentam destruir o agente causador. Em alguns casos, a resposta inflamatória é desencadeada por um material estranho inócuo, mas também pode resultar de uma resposta autoimune como no caso da artrite reumatoide (SIQUEIRA JR. e DANTAS, 2000).

Macroscopicamente, a área inflamada exhibe características típicas: vermelhidão, intumescimento, calor, dor e perda da função, mas a expressão desses efeitos depende do local

de inflamação. Desse modo, um abscesso cutâneo pode gerar o aparecimento de todos esses sinais, enquanto uma pneumonia, devido à inacessibilidade aos pulmões em um exame físico, frequentemente manifesta-se somente como perda da função, embora ocorram processos patológicos semelhantes em ambos os locais (SIQUEIRA JR. e DANTAS, 2000).

A resposta inflamatória inicial é inespecífica e independe do tipo de agente agressor. Os eventos seguintes estão relacionados ao agente agressor e ao próprio tecido agredido. Assim, a inflamação pode mostrar uma variedade de quadros clínicos resultando em uma reação inata e uma resposta imune específica (ABBAS *et al.*, 2008).

A resposta inata, aquela que ocorre imediatamente após a infecção, apresenta um componente ligado à resposta imunológica específica, e também elementos vasculares e celulares não imunológicos. Os mediadores, derivados tanto das células quanto do plasma, modificam e regulam, por sua vez, os elementos vasculares e celulares. Os macrófagos reconhecem padrões moleculares associados ao patógeno específicos no microrganismo, e esta interação deflagra a liberação de citocinas, particularmente interleucina-1 (IL-1) e fator de necrose tumoral (TNF- α), bem como inúmeras quimiocinas. A IL-1 e o TNF- α agem sobre células endoteliais de vênulas pós-capilares locais, causando dilatação vascular e exsudação de líquido e também expressão de moléculas de adesão na superfície das células (RANG *et al.*, 2007).

O exsudato é um líquido contém os componentes das cascatas enzimáticas que originarão os mediadores da inflamação: a bradicinina do sistema das cininas, o C5a e o C3a do sistema do complemento, sendo que o complemento também fornece componentes que provocam lise das bactérias. O C5a e o C3a estimulam os mastócitos a liberar histamina, que causa a dilatação das arteríolas locais. A lesão tecidual local e as citocinas pró-inflamatórias liberam eicosanoides, as prostaglandinas I₂ e E₂ (vasodilatadores) e o leucotrieno B₄ (quimiotaxia). As citocinas promovem a síntese de óxido nítrico (vasodilatador, causa aumento da permeabilidade vascular). Os leucócitos fixam-se a moléculas de adesão e, em seguida, migram para o local em que estão os patógenos (atraídos pelas quimiotaxinas, IL-8, C5a e leucotrieno B₄), onde ocorrem a fagocitose e a destruição dos microrganismos (RANG *et al.*, 2007).

A resposta imunológica adaptativa ou específica aumenta a eficácia das respostas inatas não imunológicas. Pode ser subdividida em duas fases: a fase de indução e a efetora. Esta última consiste em (i) componentes mediados por anticorpos e (ii) componentes mediados por células. Na fase de indução as células T virgens que expressam o co-receptor

CD4 ou CD8 são expostas ao antígeno apresentado, o que induz sua proliferação (MACHADO *et al.*, 2004; RANG *et al.*, 2007):

- As células T que expressam CD8 proliferam e transformam-se em células T citotóxicas, capazes de destruir as células infectadas por vírus;
- As células Th que expressam CD4 são estimuladas por citocinas, transformando-se em células Th1 ou Th2;
- As células Th2 controlam primordialmente as respostas mediadas por anticorpos; interagem com células B, que proliferam, originando plasmócitos secretores de anticorpos e células de memória;
- As células Th1 proliferam e transformam-se em células que liberam citocinas de ativação dos macrófagos; as células Th1, juntamente com as células T citotóxicas controlam as respostas mediadas por células;
- Algumas se transformam em células de memória.

Na fase efetora estão envolvidas respostas mediadas por anticorpos e por células. Os anticorpos produzem ativação mais seletiva da cascata do complemento, uma melhor ingestão de microrganismos, fixação mais eficaz a parasitas multicelulares, o que facilita sua destruição, neutralização de alguns vírus e toxinas bacterianas. As reações mediadas por células envolvem (MACHADO *et al.*, 2004; RANG *et al.*, 2007):

- Células T citotóxicas CD8, interagindo com células infectadas por vírus, matando-as;
- Células T CD4⁺ que liberam citocinas, as quais permitem a destruição de patógenos intracelulares, como o bacilo da tuberculose, por macrófago;
- Células de memória, que são aquelas programadas para reagir rapidamente ao antígeno que induziu à formação desse clone de células por ocasião de exposição posterior ao microrganismo portador desse antígeno.

Na maioria dos casos, ocorre regressão da resposta inflamatória, contudo, se isso não ocorrer, a resposta inflamatória possivelmente exigirá uma intervenção farmacológica. A necessidade de drogas anti-inflamatórias surge quando a resposta inflamatória é inapropriada, persistente ou provoca destruição dos tecidos (SIQUEIRA JR. e DANTAS, 2000).

Dentre os testes comumente utilizados para avaliar a atividade anti-inflamatória, podem ser citados o edema de pata e a pleurisia induzidos por carragenina. O modelo de edema de pata em ratos por carragenina baseia-se no princípio da liberação de vários

mediadores inflamatórios por carragenina. A formação de edema devido à aplicação de carragenina na pata do rato é um evento bifásico. A primeira fase é atribuída à liberação de histamina e serotonina. A fase seguinte do edema é devido à liberação de prostaglandinas, protease e lisossomos.

A injeção subcutânea de carragenina produz inflamação devido ao extravasamento de plasma, exsudação de fluidos para o tecido lesionado e exsudação de proteínas plasmáticas, em conjunto com a migração de neutrófilos, devido ao metabolismo do ácido araquidônico. A primeira fase começa imediatamente após a injeção de carragenina e diminui em duas horas, enquanto a segunda fase começa no final da primeira, e permanece entre a terceira e até cinco horas (VINEGAR *et al.*, 1969).

O modelo experimental de pleurisia induzida pela carragenina, que pode ser realizado em camundongos ou ratos, é caracterizado pela migração de leucócitos para a cavidade pleural após 4 horas da aplicação do agente inflamatório. É um método de grande relevância para avaliar o infiltrado inflamatório e confirmar a atividade anti-inflamatória demonstrada pelo método do edema de pata (COMPASSO *et al.*, 1975; ALMEIDA *et al.*, 1980).

Há diversos produtos de origem natural que possuem propriedade anti-inflamatória, o que se deve a grande diversidade química destas substâncias. Entre essas se encontram triterpenos, esteroides, lactonas sesquiterpênicas, flavonoides, cumarinas e alcaloides que têm apresentado atividade em uma série de modelos de inflamação, agindo sobre diferentes mecanismos do processo inflamatório (WAGNER, 1989; RECIO *et al.*, 1995; LYSS *et al.*, 1997).

Um exemplo de fitoterápico com propriedade anti-inflamatória é o Acheflan®, indicado no tratamento local de processos inflamatórios. Trata-se de um produto oriundo de pesquisa 100% nacional que é encontrado nas formas farmacêuticas de aerossol e creme, cada uma contendo 5,0 mg do óleo essencial de erva-baleeira (*Cordia verbenacea*, Boraginaceae), padronizado em 2,3 – 2,9 % do terpeno α - humuleno. Outro exemplo é o Daflon 500 mg®, medicamento composto por fração flavonoídica purificada, sob forma micronizada contendo 450 mg de diosmina (extraída das Rutaceae) e 50 mg de flavonoides titulados em hesperidina (presente em frutas cítricas) com ação venotônica e vasoprotetora (COUTINHO *et al.*, 2009).

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GERAL

Este projeto teve como objetivo geral analisar o potencial químico-farmacológico de *Palicourea rigida* Kunth a fim de validar as atribuições que lhe são conferidas pelo uso popular e verificar a sua adequação aos padrões normativos do Sistema Único de Saúde (SUS), garantindo assim uma maior segurança para aos usuários e contribuindo para o desenvolvimento de pesquisa com plantas medicinais.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Pesquisar e determinar os teores de fenóis totais e flavonoides totais no extrato etanólico e frações das folhas de *P. rigida* Kunth.
- Avaliar o potencial antioxidante do extrato etanólico e frações das folhas de *P. rigida*.
- Determinar a toxidez aguda, através da dose letal 50% (DL₅₀), para garantir o uso seguro e definir as doses a serem administradas na avaliação das atividades farmacológicas.
- Investigar as atividades antinociceptiva e anti-inflamatória do extrato etanólico de *P. rigida* Kunth.
- Verificar e analisar a viabilidade da inclusão da *P. rigida* Kunth na lista de plantas de interesse ao Sistema Único de Saúde através dos padrões normativos sobre o uso de plantas medicinais.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. ANÁLISE DA VIABILIDADE DA INCLUSÃO DA *P. rigida* KUNTH NA LISTA DE PLANTAS DE INTERESSE AO SISTEMA ÚNICO DE SAÚDE

Foi realizada uma revisão da literatura sobre normas e legislação que definem a inclusão de plantas medicinais na lista de interesse do Sistema Único de Saúde do Brasil com intuito de analisar a possibilidade e os mecanismos para viabilizar a inclusão da espécie *P. rigida*. Além desta revisão, foram realizados diversos ensaios a fim de avaliar o potencial químico farmacológico da espécie, com vistas a validar o uso que lhe é popularmente atribuído.

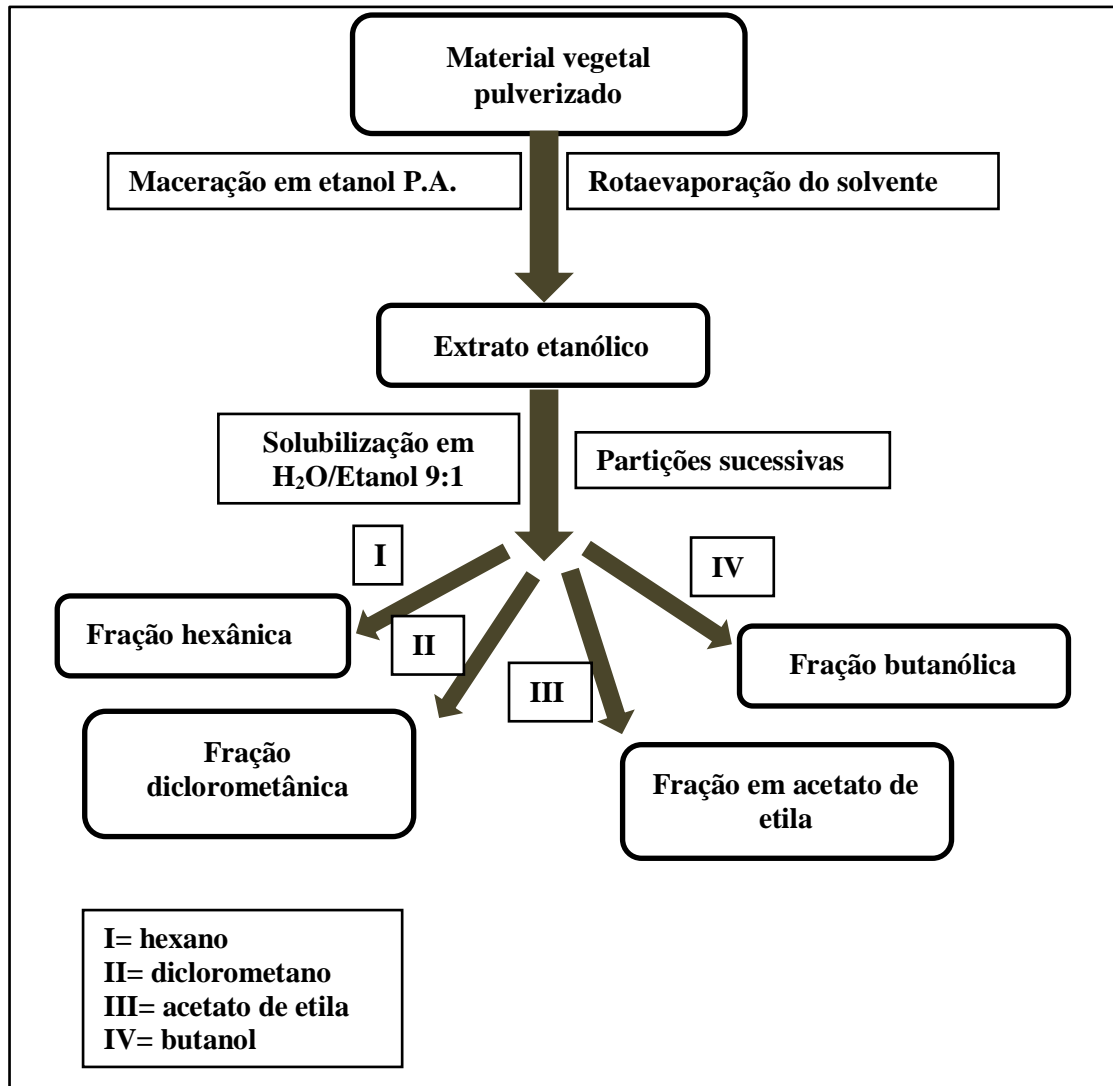
4.2. MATERIAL VEGETAL

Palicourea rigida Kunth foi coletada em São João Del-Rei, Minas Gerais, em maio de 2005 e maio de 2012. Uma exsicata está depositada como documento taxonômico no Herbário Professor Leopoldo Krieger (CESJ) do Departamento de Botânica da Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF), sob o número 42677. Folhas coletadas foram submetidas à secagem em estufa sob ventilação forçada até perda da umidade de 90 a 96%. Após secagem, o material botânico foi triturado em moinho elétrico e pulverizado em tamis nº18 para preparo dos extratos.

4.3. PROCESSO DE EXTRAÇÃO E FRACIONAMENTO

O material pulverizado foi submetido à extração por maceração estática em etanol P.A. seguido de rotaevaporação para remoção do solvente. O extrato etanólico seco foi suspenso em água: etanol (9:1) para procedimento de partição líquido/líquido com solventes de polaridade crescente: hexano, diclorometano, acetato de etila e butanol (Figura 10). Para a realização dos ensaios biológicos, o extrato etanólico e as frações hexânica, diclorometânica, em acetato de etila e butanólica foram solubilizados em quantidade mínima suficiente de mistura dimetilsulfóxido/tween 80 1:1.

Figura 10: Esquema de extração e fracionamento.



Fonte: a autora

4.4. PROSPECÇÃO FITOQUÍMICA

Foram pesquisados metabólitos secundários no extrato etanólico das folhas através de reações características dos grupos funcionais das moléculas, segundo MATOS (1997): flavonoides (reações com AlCl_3 , H_3BO_3 , NaOH 1N, e de Shinoda), taninos (reações com acetato de chumbo, sais de cobre, sais de ferro, alcaloides e gelatina), cumarinas (reação com KOH 5%), heterosídeos esteróides (reações de Kedde, Libermann-Buchard e Baljet), saponinas (índice de espuma), alcaloides (reações de Bertrand, Bouchardat, Dragendorff e Mayer) e antraquinonas (reação de Borntraeger).

4.5. DETERMINAÇÃO DOS TEORES DE FLAVONOIDES TOTAIS

Para a quantificação dos teores de flavonoides totais, foi utilizado método espectrofotométrico (LEITE, 2002; SOBRINHO *et al.*, 2008), sendo a rutina o padrão das análises. A metodologia tem por base a formação de um complexo entre o cátion alumínio, Al (III), o grupo carbonila e grupos hidroxila do flavonoide. O cátion alumínio age formando complexos estáveis com os flavonoides, com efeito batocrômico, evitando assim a interferência de outros componentes fenólicos (MARQUES *et al.*, 2013).

Para a obtenção da curva de calibração, foi preparada uma solução-estoque de rutina a 0,5 mg/mL em etanol, a partir da qual foram preparadas, em triplicata, oito concentrações de solução em tubos de ensaio, transferindo o volume necessário da solução-estoque e 0,4 mL de etanol; adicionando-se, em seguida, 0,12 mL de ácido acético, 2 mL de solução de piridina a 20% em etanol, 0,5 mL de AlCl₃ a 8% em etanol e o volume necessário de água destilada para completar o volume para 5 mL (Tabela 4).

Tabela 4: Diluições a partir da solução-estoque de rutina e montagem dos tubos reacionais para confecção da curva de calibração.

TUBOS	Sol. Rutina	EtOH	Ácido acético	Sol. piridina	Sol. AlCl ₃	Água (µL)	Concentração
1	20 µL	400 µL	120 µL	2 mL	0,5 mL	1960	2 µg/mL
2	50 µL	400 µL	120 µL	2 mL	0,5 mL	1930	5 µg/mL
3	100 µL	400 µL	120 µL	2 mL	0,5 mL	1880	10 µg/mL
4	200 µL	400 µL	120 µL	2 mL	0,5 mL	1780	20 µg/mL
5	300 µL	400 µL	120 µL	2 mL	0,5 mL	1680	30 µg/mL
6	400 µL	400 µL	120 µL	2 mL	0,5 mL	1580	40 µg/mL
7	500 µL	400 µL	120 µL	2 mL	0,5 mL	1480	50 µg/mL
8	600 µL	400 µL	120 µL	2 mL	0,5 mL	1380	60 µg/mL
Branco	-----	400 µL	120 µL	2 mL	0,5 mL	1980	-----

Após 30 min em temperatura ambiente, procedeu-se a leitura espectrofotométrica das soluções, considerando o comprimento de onda em que a solução do tubo 5 apresentou maior absorvância após varredura entre 300 e 600 nm (o pico foi observado em 407 nm). O equipamento foi zerado com etanol, e no branco das amostras a solução de rutina foi substituída por etanol, sendo os demais reagentes mantidos. Com as médias das absorvância (eixo das ordenadas) de cada concentração (eixo das abscissas) foi construída a curva de calibração, e através de análise de regressão linear, obteve-se a equação da reta com coeficiente de determinação R².

Para as amostras, foram preparadas soluções-estoque em etanol do extrato etanólico (10 mg/mL) e frações em hexano (50 mg/mL), em diclorometano (5 mg/mL), em acetato de etila (1,5 mg/mL) e em butanol (5 mg/mL). Foi realizada uma semi-purificação, com 5 mL de cada solução estoque em tubos falcon, aos quais foram adicionados 2 mL de hexano e 3 mL de água destilada. Após homogeneização, os tubos foram submetidos à centrifugação por 2 minutos. Após, a parte superior da mistura foi descartada e alíquotas de 0,4 mL da fase hidroalcolica (inferior) foram coletadas em triplicata e transferidas para tubos de ensaio. O procedimento reacional e a leitura foram realizados de maneira semelhante ao descrito para o padrão (Tabela 5).

Tabela 5: Diluições a partir da solução-estoque extrato etanólico e partições e montagem dos tubos reacionais para quantificação de flavonoides totais.

TUBOS	EtOH	Sol. amostra	Ácido acético	Sol. piridina	Sol. AlCl ₃	Água (µL)	Concentração
Extrato	-----	400 µL	120 µL	2 mL	0,5 mL	1980	0,8 mg/mL
FH	-----	400 µL	120 µL	2 mL	0,5 mL	1980	4 mg/mL
FD	-----	400 µL	120 µL	2 mL	0,5 mL	1980	0,4 mg/mL
FA	-----	400 µL	120 µL	2 mL	0,5 mL	1980	0,12 mg/mL
FB	-----	400 µL	120 µL	2 mL	0,5 mL	1980	0,8 mg/mL
Branco	400 µL	-----	120 µL	2 mL	0,5 mL	1980	-----

FH – Fração em hexano, FD – Fração em diclorometano, FA – Fração em acetato de etila, FB – Fração em butanol.

A partir dos valores de absorvância encontrados para cada amostra foram determinadas as concentrações de flavonoides totais nas mesmas, em equivalência à rutina, substituindo estes valores na equação da reta da curva de calibração da rutina. A concentração foi ajustada para teor de flavonoides totais (g/100g).

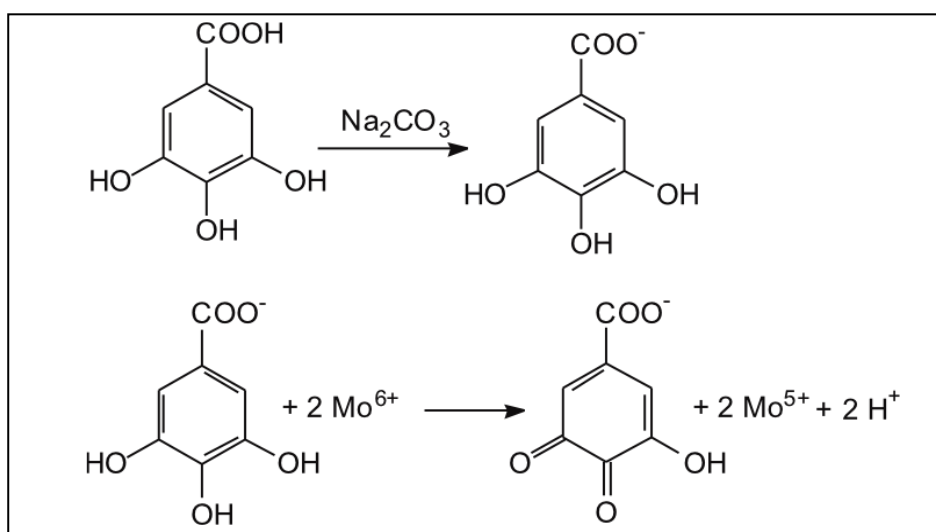
4.6. DETERMINAÇÃO DOS TEORES DE FENÓIS TOTAIS

O método de Folin–Ciocalteu (SOUSA *et al.*, 2007) foi utilizado para a determinação dos teores de fenóis totais por espectrofotometria na região do visível. O reagente de Folin–Ciocalteu consiste na mistura dos ácidos fosfomolibídico e fosfotungstístico, na qual o molibdênio está no estado de oxidação 5 (cor amarela no complexo Na₂MoO₄·2H₂O). Porém, em presença de certos agentes redutores, como os constituintes fenólicos, formam-se os chamados complexos molibdênio-tungstênio azuis [(PMoW₁₁O₄)⁴⁻], em que a média do

estado de oxidação dos metais está entre 5 e 6 permite a determinação da concentração das substâncias redutoras (OLIVEIRA *et al*, 2009).

Na Figura 11 é mostrada a desprotonação dos constituintes fenólicos (neste caso, o padrão ácido gálico) em meio básico, gerando os ânions fenolatos. A partir daí, ocorre uma reação de oxirredução entre o ânion fenolato e o reagente de Folin na qual o molibdênio, componente do reagente de Folin, sofre redução e o meio tem a coloração alterada de amarela para azul (OLIVEIRA *et al*, 2009).

Figura 11: Reação do ácido gálico com molibdênio, componente do reagente de Folin-Ciocalteu.



Fonte: OLIVEIRA *et al*, 2009.

O ácido gálico foi o padrão nas análises. Para a curva de calibração foi preparada uma solução-estoque de 1 mg/mL de ácido gálico. Foram transferidos para sete tubos em triplicata 0,2mL (tubo 1), 0,28 mL (tubo 2), 0,36 mL (tubo 3), 0,44 mL (tubo 4), 0,52 mL (tubo 5), 0,6 mL (tubo 6), 0,68 mL (tubo 7) e 0,76 mL (tubo 8) da solução-estoque de ácido gálico. Os volumes foram completados com água para 1 mL (tabela 6).

Alíquotas de 100 μL da solução de ácido gálico foram coletadas de cada tubo de ensaio e transferidas para tubos falcon, aos quais foram adicionados 500 μL de reagente de Folin-Ciocalteu e 6 mL de água destilada, sendo esta mistura agitada em vórtex por 1 min. Em seguida, foram adicionados 2 mL de Na_2CO_3 15% e os tubos agitados por mais 30 segundos e, após, os volumes foram completados para 10 mL com água destilada e os tubos deixados em temperatura ambiente por 2 horas.

A leitura das soluções foi realizada no comprimento de ondas de 786 nm obtido da solução do tubo 5 que apresentou maior absorvância após varredura espectrofotométrica entre

600 e 900 nm. O equipamento foi zerado com etanol e o branco foi composto por todos os reagentes, exceto as soluções de ácido gálico. Com as médias de absorvância (eixo das ordenadas) de cada concentração de ácido gálico (eixo das abscissas) foi construída a curva de calibração e, através de análise de regressão linear, obteve-se a equação da reta com coeficiente de determinação R^2 .

Tabela 6: Diluições a partir da solução-estoque de ácido gálico (1 mg/mL) para obtenção de oito concentrações diferentes.

Tubo	Concentração (µg/mL)	Volume de S.E. (µL)	Volume de H ₂ O (µL)	Volume total (mL)
1	200	200	800	1
2	280	280	720	1
3	360	360	640	1
4	440	440	560	1
5	520	520	480	1
6	600	600	400	1
7	680	680	320	1
8	760	760	2740	1

Para determinação das amostras, foi preparada solução-estoque do extrato etanólico e das frações (hexânica, diclorometânica, em acetato de etila e butanólica) a 4 mg/mL em etanol. A partir dessa solução, foram preparadas, em triplicata, seis concentrações diferentes de solução das amostras (extrato e frações) conforme tabela 7 em tubos de ensaio, transferindo-se o volume necessário de solução-estoque e completando-se o volume com água para 10 mL. Alíquotas de 100 µL destas soluções foram coletadas de cada tubo de ensaio e transferidas para tubos falcon, sendo a reação e leitura espectrofotométrica realizadas de maneira semelhante à descrita para o padrão.

Tabela 7: Diluições a partir da solução-estoque do extrato etanólico e frações (4 mg/mL) para obtenção de seis concentrações diferentes.

Tubo	Concentração (µg/mL)	Volume de S.E. (mL)	Volume de H ₂ O (mL)	Volume total (mL)
1	400	1	9	10
2	800	2	8	10
3	1200	3	7	10
4	1600	4	6	10
5	2000	5	5	10
6	2400	6	4	10

Dentre as seis concentrações de solução de cada amostra, apenas uma foi utilizada para a determinação do teor de fenóis totais equivalente em ácido gálico, aquela que

apresentou melhores valores de absorvância (entre 0,2 e 0,9), o que foi feito pela substituição do valor da absorvância na equação da reta da curva de calibração do ácido gálico. A concentração foi ajustada em teor de fenóis totais (g/100g).

4.7. PERFIL CROMATOGRÁFICO E CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA

O extrato etanólico e as frações hexânica, diclorometânica, em acetato de etila e butanólica das folhas de *P. rigida* foram avaliados por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) (Agilent[®], 1200 series) com detector UV DAD. As análises foram realizadas em coluna de fase reversa C₁₈ (25 cm x 4,6 cm x 5 µm); eluição em modo gradiente (0 – 30 min) e isocrático (30 – 40 min), fluxo de 1 mL/min, de fase móvel composta pela mistura de água: acetonitrila (95:5) acidificada com ácido fosfórico (H₃PO₄) 0,5%; concentração das amostras de 1 mg/mL, volume de injeção de 20 µL e temperatura da coluna de 25° C. A análise de cada amostra teve duração de 40 min, com *post time* de 5 min entre as amostras. Os cromatogramas foram obtidos nos comprimentos de onda de 210, 254, 280, 330 e 360 nm e os espectros UV foram obtidos por varredura no UV (190 a 400 nm).

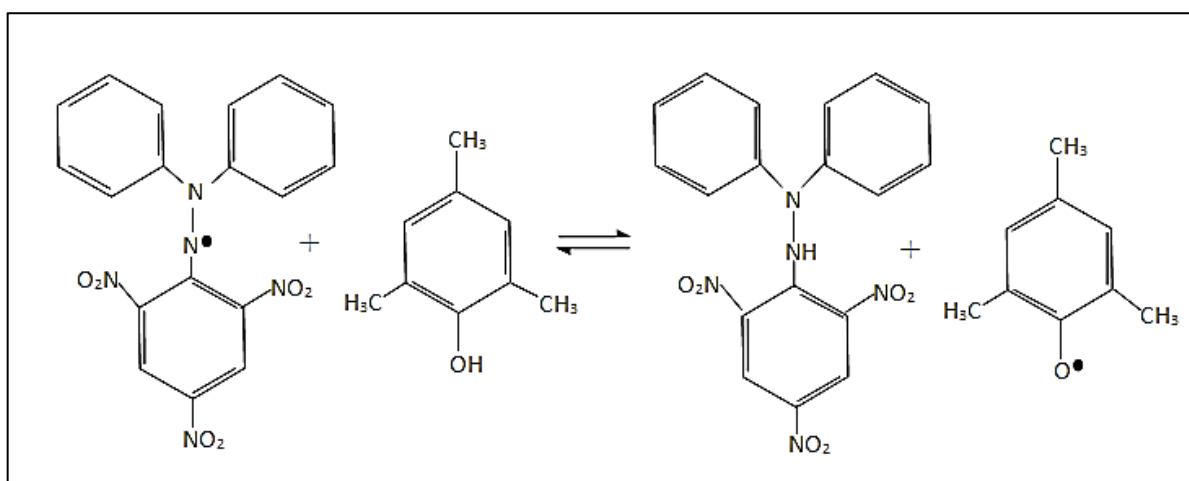
Para obtenção do perfil cromatográfico e caracterização química do extrato etanólico e frações, foram utilizadas como marcadores químicos na CLAE as seguintes substâncias fenólicas padrão (Sigma-Aldrich[®]): ácido gálico, rutina, quercetina, canferol, luteolina, luteolina 7-*O*-β-D-glicosídeo e apigenina 7-*O*-β-D-glicosídeo. Para as análises dos padrões foram empregadas as mesmas condições cromatográficas, incluindo a obtenção dos espectros por varredura no UV (190 a 400 nm). Após obtenção dos cromatogramas e espectros UV das amostras e marcadores químicos, a identificação das substâncias padrão nas amostras foi realizada por análise e comparação dos tempos de retenção dos picos nos cromatogramas e dos espectros UV.

4.8. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

4.8.1. Teste do DPPH

Por ação de um antioxidante ou uma espécie radicalar ($R\bullet$), o DPPH \bullet (de cor púrpura) sofre redução, formando a 2,2-difenilpicril-hidrazina (DPPH-H), de coloração amarela, com conseqüente desaparecimento da banda de absorção, sendo a mesma monitorada pelo decréscimo da absorbância. A Figura 12 mostra a reação entre o BHT e o DPPH \bullet . A partir dos resultados obtidos, é determinada a porcentagem de atividade antioxidante (quantidade de DPPH \bullet consumida pelo antioxidante) ou sequestradora de radicais e/ou a porcentagem de DPPH \bullet remanescente no meio reacional (OLIVEIRA *et al.*, 2009).

Figura 12: Reação química entre o BHT e o radical DPPH



Fonte: Adaptado de OLIVEIRA *et al.*, 2009

O mecanismo de reação baseia-se na transferência de elétrons, enquanto a abstração de átomo de hidrogênio é uma reação marginal, pois acontece lentamente em solventes que estabelecem fortes ligações de hidrogênio. O método sofre influência do solvente e do pH das reações (OLIVEIRA *et al.*, 2009).

A atividade antioxidante do extrato etanólico e das frações de *P. rigida* foi determinada conforme descrito por MENSOR *et al.* (2001). A partir do resíduo seco do extrato e das frações, foram preparadas soluções de concentração 1mg/mL com etanol seguida de diluição com concentrações de 1 a 1000 μ g/mL.

Uma solução 0,03 mM de DPPH foi preparada para realização do teste. O controle positivo foi feito com rutina em soluções com concentrações entre 1 e 30 μ g/mL. Todo o teste

foi realizado em triplicata. Após 30 minutos de reação, foi verificada a capacidade dos diversos extratos em reduzir o 2,2-difenil-1-picril hidrazila em 2,2-difenil-1-picril hidrazina.

A mudança de cor foi detectada através da diminuição da absorvância em espectrofotômetro a 518 nm. Partindo das leituras em absorvância, foi determinada a porcentagem de atividade antioxidante (%AA) que corresponde à quantidade de DPPH reduzida pelos extratos. Para tal porcentagem, foi utilizada a fórmula abaixo:

$$\%AA = 100 - \{ [Abs_{controle} - (Abs_{amostra} - Abs_{branco})] \times 100 \} / Abs_{controle}$$

Onde: $Abs_{controle}$ corresponde à absorvância de 2,5 mL de solvente utilizado na extração + 1 mL da solução de DPPH;

$Abs_{amostra}$ corresponde à absorvância de 2,5 mL do extrato + 1 mL da solução DPPH e

Abs_{branco} correspondem à absorvância de 2,5 mL do extrato + 1 mL do solvente utilizado na extração.

Após obtenção da atividade antioxidante, a concentração efetiva 50% (CE_{50}) dos extratos foi obtida através da análise de regressão linear pelo método dos mínimos quadrados, obtendo-se a equação da reta e o coeficiente de determinação (R^2). A abscissa do gráfico corresponde à concentração do extrato testado e a ordenada à porcentagem da atividade antioxidante. Assim, quanto maior a redução do DPPH por uma amostra, menor a concentração efetiva 50% (CE_{50}) e maior foi sua atividade antioxidante.

4.8.2. Técnica da bioautografia com DPPH

A atividade antioxidante do extrato etanólico e das frações de *Palicourea rigida* também foi analisada em cromatoplasas em camada delgada, em gel de sílica, utilizando DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazila) como reagente. Foram preparadas soluções estoque das amostras a uma concentração de 10mg/mL e aplicadas nas cromatoplasas. As placas foram eluídas com hexano: acetato de etila 7:3, para a fração hexânica; diclorometano: metanol 93:07, para a fração em diclorometânica; e butanol 60%, água 30% e ácido acético 10%, para as frações em acetato de etila e butanólica.

O extrato etanólico foi eluído em todos os sistemas de solventes. Foram aplicados 10 μ L de cada amostra nas cromatoplasas. Após a evaporação dos solventes, as placas foram nebulizadas com a solução de DPPH a 2,54mM. Após 30 min, a leitura das placas foi

realizada, e halos brancos ou amarelados sobre o fundo violeta foram considerados positivos para substâncias com atividade antioxidante. Para as cromatoplacas que apresentaram resultados relevantes frente ao DPPH, o teste foi repetido e a placa revelada com outros reagentes (NP-PEG, FeCl₃, KOH e Liebermann-Burchard) com o intuito de evidenciar as classes de substâncias presentes (CAVIN *et al.*, 1998).

4.8.3. Teste do poder de redução

Neste ensaio, é medida a capacidade dos antioxidantes para reduzir o complexo Fe(III)/ ferricianeto [FeCl₃/K₃Fe(CN)₆] a Fe(II) a forma ferrosa. Dessa forma, de acordo com o poder redutor das substâncias, a cor amarela da solução do ensaio altera-se para diferentes tons de verde ou azul, o que pode ser medido espectrofotometricamente (LEAL, 2012).

O teste foi conduzido conforme descrito por YILDIRIM, MAVI e KARA (2001) com adaptações. A partir de soluções etanólicas a 1mg/mL do extrato etanólico e das frações, foram preparadas, em triplicata, soluções em concentrações que variavam entre 10 e 750 µg/mL, em volume final de 1 mL. A essas soluções foram adicionados 2,5 mL de tampão fosfato de potássio 200 µM, pH 6,6 e 2,5 mL de ferrocianeto de potássio a 1% [K₃Fe(CN)₆]. A mistura foi incubada a 50°C por 20 minutos.

Em seguida, foram acrescentados à mistura 2,5 mL de ácido tricloroacético a 10%, e a mesma foi então centrifugada a 3000 rpm por 8 minutos. Uma alíquota de 2,5mL da camada superior foi retirada e misturada com 2,5 mL de água destilada e 0,5 ml de FeCl₃ a 0,1%, e a absorvância foi medida a 700 nm em espectrofotômetro. A rutina foi usada como referência do teste. A CE₅₀ foi calculada a partir do gráfico, no qual o eixo das abcissas correspondia às concentrações das amostras testadas e o eixo das ordenadas às absorvâncias. Estes valores determinaram a concentração efetiva na qual a absorvância foi de 0,5 para o poder de redução.

4.8.4. Teste do β-caroteno/ácido linoleico

Este método é baseado no fato de o β-caroteno perder sua cor durante a cooxidação com o ácido linoleico numa emulsão aquosa, em que o decaimento da absorvância é monitorado na região visível (MILLER, 1971). A atividade antioxidante é quantificada como porcentagem de inibição. Foi descrito inicialmente por MARCO (1968) para avaliar as

substâncias bioativas com atividade antioxidante, e é utilizado para avaliar a capacidade antioxidante de vários tipos de amostras, como constituintes puros (ABDALLA *et al.*, 1999), extratos de plantas (DAPKEVICIUS *et al.*, 1999), grãos, frutas, vegetais e outros tipos de alimentos (VELIOGLU *et al.*, 1998).

Neste ensaio mede-se a atividade antioxidante através da capacidade da substância testada de inibir a perda do β -caroteno durante sua oxidação acoplada ao ácido linoleico em uma emulsão aquosa. A reação é acelerada com aquecimento a 50°C. O descoloramento do β -caroteno, medido através do decréscimo da absorvância a 492 nm é mais lento na presença de uma substância antioxidante. É um método sensível devido à forte absorção do β -caroteno, porém, é mais lento do que o ensaio do DPPH (KOLEVA *et al.*, 2002).

Para o preparo da emulsão, foram adicionados em balão de fundo redondo 30mg de ácido linoleico, 300 mg de tween 40 e 1 mL de solução de β -caroteno (0,2 mg/mL) em clorofórmio. Esta mistura foi submetida à rota-evaporação em temperatura inferior a 40°C até completa eliminação do clorofórmio e, em seguida, foram adicionados ao balão 50 mL de água destilada previamente oxigenada por 30 min, sendo a mistura agitada vigorosamente.

Para determinar as absorvâncias, foi utilizada microplaca com 96 cavidades. Em cada poço, foram adicionados 250 μ L da emulsão e 30 μ L de etanol (para o controle) ou das soluções padrão ou dos extratos testados, ambos diluídos. A placa foi incubada a 50°C para acelerar as reações de oxidação e iniciar o descoloramento do β -caroteno. As leituras foram realizadas imediatamente e com intervalos de 15 min, durante 120 min, em leitora de microplacas, em comprimento de onda de 492nm.

Todas as análises foram realizadas em triplicata. Os resultados foram expressos como porcentagem de inibição da oxidação, que foi calculada em relação ao decaimento da absorvância do controle (Ac), e deve ser menor que 0,2 para ser considerado que houve 100% de oxidação, após 120 min de reação. A queda da absorvância das amostras (Aam) foi correlacionada com a queda do controle, obtendo-se a porcentagem da inibição da oxidação (% I) através da Equação:

$$Ac = Abs_{\text{inicial}} - Abs_{\text{final}}$$

$$Aam = Abs_{\text{inicial}} - Abs_{\text{final}}$$

$$\%I = \frac{Ac - Aam}{Ac} \times 100$$

4.9. ATIVIDADES FARMACOLÓGICAS DO EXTRATO ETANÓLICO

4.9.1. Animais

Foram utilizados camundongos Swiss (25-30 g) e ratos Wistar (200-240 g) machos, provenientes do Centro de Biologia da Reprodução da Universidade Federal de Juiz de Fora. Os animais foram mantidos em gaiolas de polipropileno (47x34x18 cm) com ração e água *ad libitum* em temperatura ambiente (22 ± 2 °C) durante 3 dias em ciclo de 12 horas claro/escuro (claro de 06:00 às 18:00 h). Doze horas antes da realização dos experimentos, os animais foram privados de alimentação. Os protocolos utilizados foram aprovados pelo Comitê de Ética na Experimentação Animal (CEEA) desta instituição (nº 037/2010).

4.9.2. Avaliação da toxidez aguda

O ensaio para a avaliação da toxidez aguda foi conduzido segundo protocolo estabelecido por LORKE (1983), com adaptações. Os camundongos foram divididos em grupos de 10 e receberam doses de 0,5; 1,0; 1,5; 2,0 e 3,0 g/kg de solução do extrato etanólico de *P. rigida* por via oral, ou solução salina para o grupo controle. Os grupos foram então observados por 48 horas, registrando-se a mortalidade dos animais. A DL_{50} foi determinada através do método dos probitos, usando a porcentagem da mortalidade e o logaritmo das doses seguidas de regressão linear (LITCHFIELD; WILCOXON, 1949).

4.9.3. Teste de contorções abdominais

Esse ensaio é amplamente utilizado como “screening” para a identificação de novos compostos com propriedades analgésicas. A reação avaliada foi a contração do músculo abdominal em conjunto com a extensão das patas traseiras, caracterizando a contorção abdominal (Figura 13).

Camundongos ($n = 8$) foram submetidos ao tratamento, por via oral (v.o.), com o extrato etanólico de *P. rigida* nas doses de 100, 200 ou 400 mg/kg (KOSTER et al, 1959; COLLIER et al, 1968). O grupo controle negativo recebeu 0,01 mL/g de salina, administrado por via oral (v.o.). Uma hora após tratamento, foi aplicado 10 mL/kg de ácido acético 0,6%,

por via intraperitoneal. O número de contorções abdominais foi contado entre 10 e 30 minutos após a injeção do ácido acético. A indometacina, um anti-inflamatório não-esteróide, na dose de 10 mg/kg (v.o.), foi usada como controle positivo.

Figura 13: Padrão das contorções abdominais apresentadas por camundongos.



Fonte: NEPLAME (2013)

4.9.4. Teste da formalina

Neste ensaio foram aplicados no espaço subplantar da pata direita dos camundongos ($n = 8$) 20 μL de formalina 2,5% (em salina estéril) e a duração do tempo de lambida (Figura 14) foi mensurada entre 0 e 5 minutos (1ª fase) e 15 e 30 minutos (2ª fase) (HUNSKAAR; HOLE, 1987). Uma hora antes da injeção da formalina foi administrada (v.o.) solução do extrato etanólico de *P. rigida* nas doses de 100, 200 ou 400 mg/kg. Os animais do grupo controle negativo receberam 10 mL/kg de salina (v.o.) e do grupo controle positivo, morfina (5 mg/kg, s.c.).

A primeira fase de nocicepção ou inicial, que varia de zero a 5min após a injeção da formalina, é chamada de neurogênica, na qual os nociceptores são ativados pela formalina. A segunda fase de nocicepção ou tardia, conhecida como fase inflamatória, é avaliada entre 15 e 30min, onde o comportamento observado é resultante da ação de mediadores inflamatórios sintetizados e liberados após o estímulo promovido pelo formaldeído (Figura 14) (HUNSKAAR; HOLE, 1987).

Figura 14: Teste da formalina

Fonte: http://www.fcfar.unesp.br/escoladeferias2013/int_laboratorio.php. Acesso em 02/06/2013

4.9.5. Teste da placa quente

Este teste, descrito por EDDY e LEIMBACK (1953), quantifica o tempo de reação do animal ao estímulo térmico de $55 \pm 1^\circ\text{C}$, quando é exibido o comportamento de levantar (tentativa de pular) ou lambe uma das patas e, a resposta é indicativa de nocicepção. O estímulo térmico do teste da placa quente (Figura 15) é utilizado para avaliar a atividade analgésica mediada por mecanismos do sistema nervoso central.

Os camundongos foram divididos em grupos de oito, e receberam o extrato nas doses de 100, 200 ou 400 mg/kg, (v.o.; 0,1 mL/10 g), e salina para o grupo controle negativo. Os animais foram colocados na placa aquecida ($55 \pm 1^\circ$), e as medidas foram realizadas nos tempos 0, 30, 60 e 90 minutos após administração do extrato, com tempo máximo de permanência sobre a placa quente de 30 segundos. Em outro grupo de animais, foi determinado o efeito do pré-tratamento com naloxona (1 mg/kg, s.c.) sobre a analgesia produzida pelo extrato (400 mg/kg, v.o.). Como controle positivo foi usada morfina (1 mg/kg, s.c.), na ausência e na presença de naloxona.

Figura 15: Teste da placa quente.



Fonte: NEPLAME (2013).

4.9.6. Edema de pata induzido por carragenina

O teste do edema da pata induzido por carragenina é um modelo útil para avaliar a contribuição dos mediadores envolvidos nas alterações vasculares associadas à inflamação aguda. O desenvolvimento do edema na pata posterior de ratos após a injeção de carragenina tem sido descrito como um evento bifásico, em que vários mediadores operam em sequência para produzir essa resposta inflamatória.

A fase inicial do edema (0 - 1h), que não é inibida por drogas anti-inflamatórias não-esteróides, tais como a indometacina ou a aspirina, tem sido atribuída à liberação de histamina, 5-hidroxitriptamina (5-HT) e bradicinina. Em contraste, a segunda fase (1-6h), tem sido correlacionada com a elevada produção de prostaglandinas e, mais recentemente, tem sido atribuída à indução de ciclo-oxigenase (COX-2). A infiltração e ativação local de

neutrófilos também contribuem para esta resposta inflamatória ao produzir, entre outros mediadores, os radicais livres derivados do oxigênio, como ânions superóxido (O_2^-) e radicais hidroxila (SALVEMINI *et al.*, 1996).

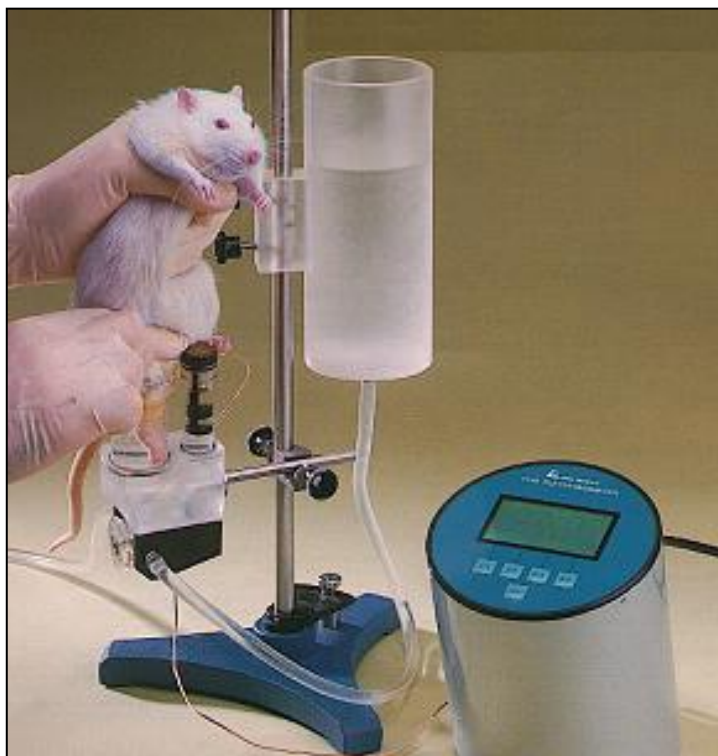
Outro mediador importante na inflamação aguda e crônica é o óxido nítrico (NO), um vasodilatador potente, e seu envolvimento durante a resposta inflamatória pode ser relacionado com sua capacidade de aumentar a permeabilidade vascular e o edema por meio de mudanças no fluxo sanguíneo local. Além disso, foi demonstrado que o NO aumenta a produção de prostaglandinas *in vitro*, *ex vivo* e *in vivo*, potencialmente por S- nitrosação de resíduos de cisteína no domínio catalítico de enzimas ciclo-oxigenase (COX). O NO também pode reagir com o ânion superóxido para formar peroxinitrito (ONOO⁻), uma molécula oxidante potente capaz de induzir a peroxidação lipídica e danos celulares. Portanto, o NO tem a capacidade de exercer múltiplos efeitos citotóxicos durante as respostas inflamatórias, incluindo aumentar a produção de PG, bem como a formação de ONOO⁻ (SALVEMINI *et al.*, 1996).

Para a indução do edema de pata foram injetados 0,2 mL de carragenina (1% p/v) em salina estéril administrada na região subplantar da pata traseira direita de ratos Wistar machos (n = 6). Uma hora antes da injeção, o extrato foi administrado (v.o.) nas doses de 100, 200 ou 400 mg/kg (WINTER *et al.*, 1962). Salina 10 mL/kg (v.o.) foi administrada ao grupo controle. Na pata esquerda, usada como controle, foram injetados 0,2 mL de salina estéril. A medida do edema foi feita pela diferença entre o volume da água deslocado pela pata direita e o da pata esquerda, utilizando um pletismômetro, nos tempos 1, 2, 3 e 4 horas após a injeção de carragenina. Como controle positivo foi usada Indometacina (10 mg/kg, v.o.).

O pletismômetro contém uma célula cilíndrica para a medida do volume de pata, preenchida com uma solução de baixa concentração eletrolítica, conectada a outra célula, dentro da qual existe um eletrodo. Um sistema de vasos comunicantes faz com que o deslocamento da solução eletrolítica na célula onde a pata do animal é mergulhada resulte em um deslocamento da solução na célula que contém o eletrodo (Figura 16).

Após ter sido calibrado, o aparelho converte o deslocamento do líquido em volume, que é indicado em um visor digital. Quando a pata do animal é introduzida na célula de medida até a articulação tíbio-tarsal, um pedal é pressionado pelo experimentador, que fixa, dessa forma, o valor do volume observado.

Figura 16: Teste do edema de pata induzido por carragenina.



Fonte: COSTA, 2004

4.9.7. Pleurisia induzida por carragenina

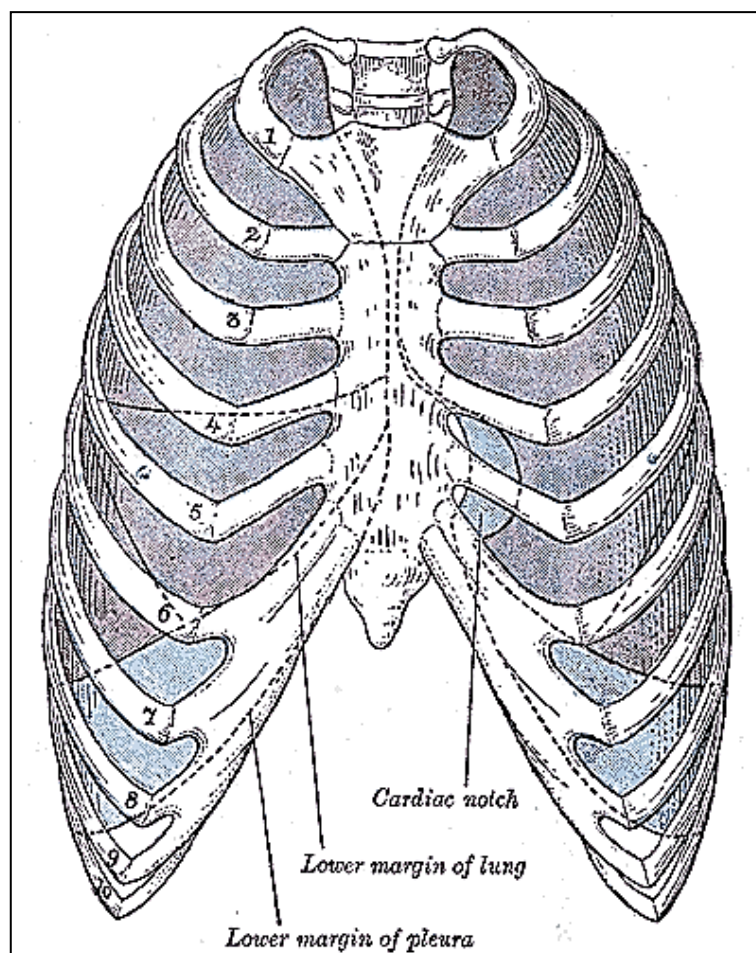
Neste ensaio, a carragenina produz uma reação inflamatória no espaço pleural (espaço virtual entre a pleura parietal e a pleura visceral) conhecida como pleurisia. É um modelo clássico de estudo do processo inflamatório e para teste de possíveis drogas anti-inflamatórias. O volume de fluido extravasado, o acúmulo celular e a produção de mediadores químicos do processo inflamatório podem ser analisados quantitativa e qualitativamente (COELHO, 2009).

Para a indução da pleurisia, foi realizada uma injeção intrapleural de 0,5 mL, entre a terceira e a quinta costelas do lado direito do mediastino (Figura 17) de uma suspensão de carragenina 1% em solução salina estéril (VINEGAR *et al.*, 1973). Grupos de seis ratos foram tratados com o extrato de *P. rigida* (100, 200 ou 400 mg/kg, v.o.), indometacina (10 mg/kg, v.o.) ou salina (10 mL/kg, v.o.) uma hora antes da aplicação do agente inflamatório.

Quatro horas após a indução da inflamação por carragenina, os animais sofreram aprofundamento de anestesia com cloridrato de cetamina (75 mg/kg) e cloridrato de xilazina (10 mg/kg) seguido de eutanásia. Uma incisão foi feita entre a terceira e quinta costela em

cada lado do mediastino e o exsudato pleural foi coletado, que foi transferido a um tubo cônico de centrífuga e teve o volume determinado. Uma alíquota de 20 μL do exsudato foi usada para determinar a contagem total de leucócitos em câmara de Neubauer.

Figura 17: Teste da pleurisia induzida por carragenina.



Fonte: en.academic.ru/dic.nsf/enwiki/2467211. Acesso em 03/06/2013.

4.10. ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os resultados foram demonstrados através da média \pm erro padrão da média. Análise de variância (ANOVA) seguida do teste de Student Newman-Keuls ou Tukey foi utilizada para medir o grau de significância ($p < 0,05$).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. PESQUISA E QUANTIFICAÇÃO DE CONSTITUINTES QUÍMICOS

As reações de identificação das classes químicas do metabolismo secundário detectaram a presença de flavonoides, taninos, cumarinas, terpenoides e esteroides, alcaloides e antraquinonas nas amostras de *P. rigida* (Tabela 8). A reação para determinação qualitativa de saponinas teve resultado negativo. Estes dados confirmam a riqueza de metabólitos secundários característica do gênero e a presença dos marcadores químicos do mesmo. As reações negativas são indicativas da ausência ou baixo teor dos constituintes nos extratos analisados. A ausência de constituintes como as saponinas, pode ser devido à falta ou à diminuição da expressão gênica de enzimas envolvidas na biossíntese do metabolismo secundário (PICHERSKY; GANG, 2000).

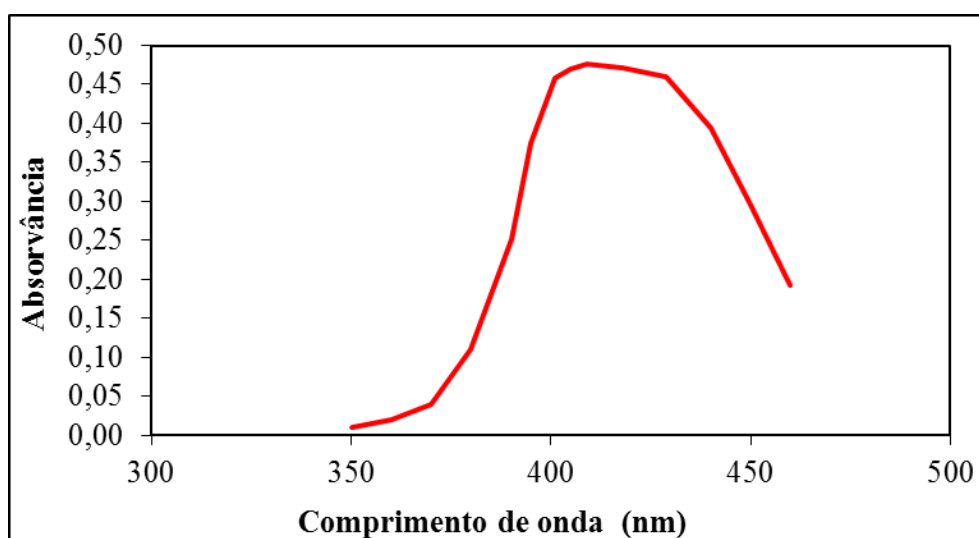
Tabela 8: Reações de identificação de classes químicas do metabolismo secundário das folhas de *Palicourea rigida* Kunth

Classes químicas	Reações	Resultados
Taninos	Sais de Ferro	+
	Sais de Cobre	-
	Acetato de Chumbo	-
	Gelatina	+
	Alcaloides	+
Flavonoides	AlCl ₃	+++
	H ₃ BO ₃	+++
	NaOH	+
	Shinoda	-
Cumarinas	KOH	+
Triterpenos/Esteroides	Lieberman-Buchard	+
	Kedde	+
	Baljet	+
Saponinas	Índice de Espuma	-
Alcaloides	Dragendorff	+
	Mayer	+
	Bouchardat	-
	Bertrand	-
Antraquinonas	Borntraeger	+

Os resultados evidenciaram a presença de diferentes classes químicas, as quais podem estar associadas às atividades biológicas e farmacológicas de *P. rigida* (Kunth), especialmente aquelas relacionadas aos radicais livres.

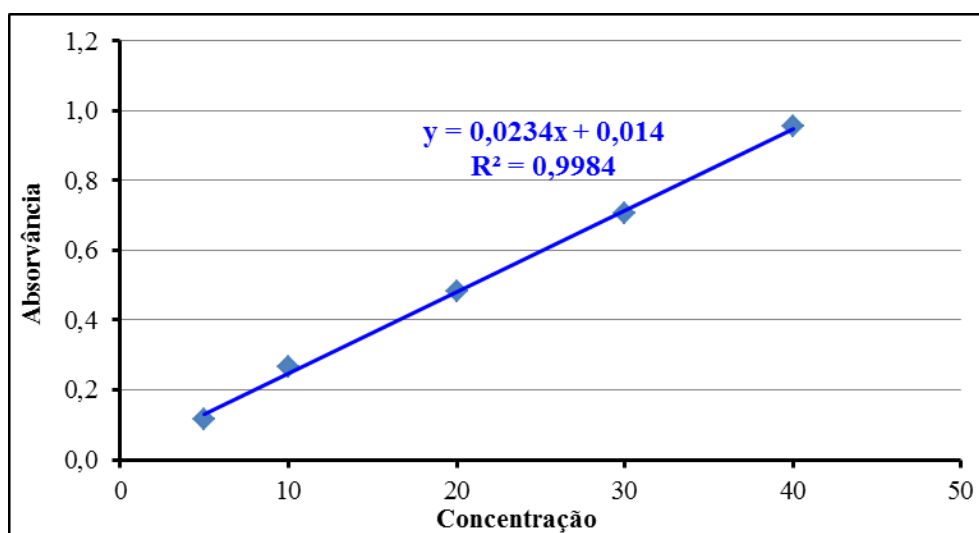
Para a quantificação do teor de flavonoides totais, foi realizada uma varredura espectrofotométrica entre 350 e 460 nm com solução de rutina, visando obter um espectro de absorção (Figura 18). O comprimento de onda de 407 nm foi o que apresentou máximo de absorção, e por isso foi usado para obtenção da curva de calibração e determinação dos flavonoides totais.

Figura 18: Espectro de absorção da rutina.



A partir das leituras do padrão rutina em diferentes concentrações, foi traçada a curva de calibração mostrada na figura 19. Os dados obtidos foram submetidos à análise de regressão linear para determinação da equação da reta e do coeficiente de determinação (R^2), resultando na equação da reta: $y = 0,0234x + 0,014$.

Figura 19: Curva de calibração do padrão rutina.



Procedimento semelhante foi realizado para a quantificação de fenóis totais. O espectro de absorção do ácido gálico foi obtido a partir de varredura entre 600 e 900nm (Figura 20). O comprimento de onda de 786nm foi o que apresentou pico de absorção, passando a ser adotado para a confecção da curva de calibração (Figura 21) e para a realização das leituras. A partir da curva obtida, os dados foram tratados por regressão linear e obtidos o coeficiente de determinação (R^2) e a equação da reta: $y = 0,0012x + 0,0538$. Esta equação foi utilizada para o cálculo dos teores de fenóis totais das amostras.

Figura 20: Espectro de absorção do ácido gálico.

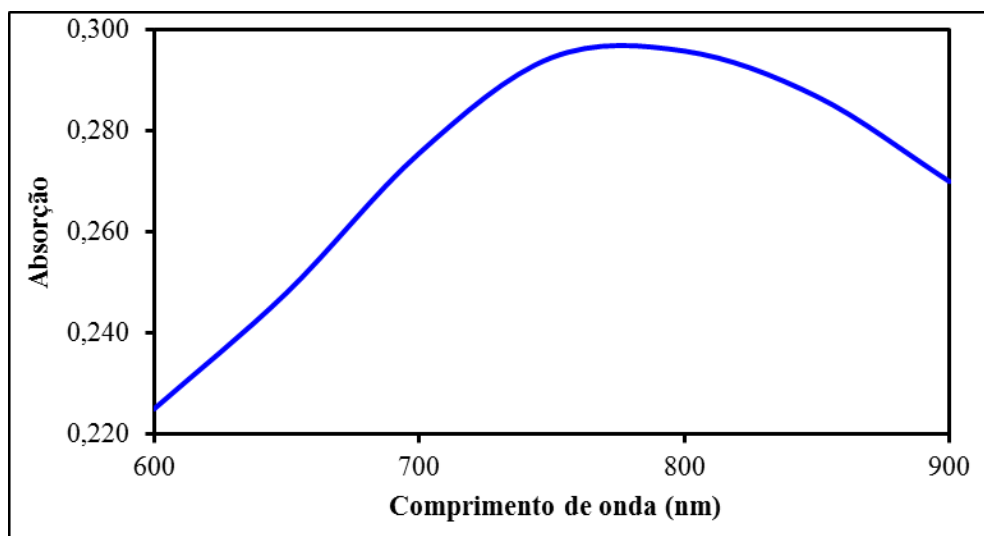
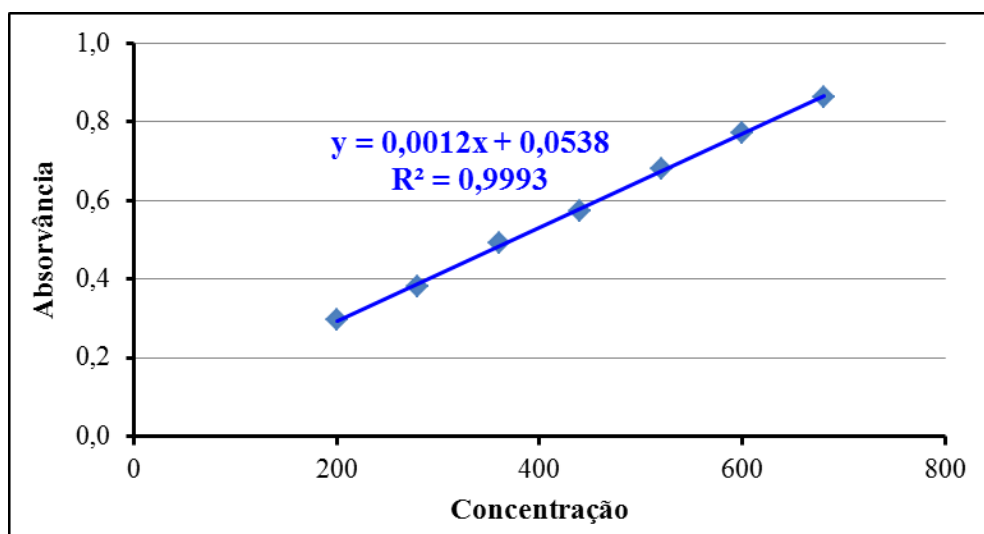


Figura 21: Curva de calibração do ácido gálico.



Na tabela 9 são mostrados os teores de fenóis e flavonoides encontrados no extrato etanólico bruto das folhas de *P. rigida*, bem como nas frações em hexano, diclorometano, acetato de etila e butanol. Com relação aos fenóis totais, os valores variaram entre 3,72 e 28,05 g/100 g. A fração em acetato de etila apresentou maior rendimento desses constituintes. Os teores de flavonoides variaram entre 1,95 e 14,15 g/100g, sendo que a fração em acetato de etila exibiu a maior quantidade dessa classe do metabolismo secundário.

Tabela 9: Teores de fenóis e flavonoides totais no extrato etanólico e frações de *P. rigida*.

Produtos testados	Fenóis totais (g/100g)	Flavonoides totais (g/100 g)
Extrato etanólico	5,78±0,05	3,95±0,02
Fração hexânica	3,72±0,09	1,95±0,04
Fração diclorometânica	11,45±0,05	4,97±0,03
Fração em acetato de etila	28,05±0,08	14,15±0,07
Fração butanólica	11,45±0,04	4,90±0,11

Considerando os teores de fenóis totais e flavonoides no extrato em acetato de etila, é possível que os principais constituintes fenólicos encontrados nesta fração sejam os taninos e flavonoides, como mostrado na Tabela 8. Dessa forma, o resultado de fenóis totais e flavonoides na fração em acetato de etila corrobora com os achados da prospecção fitoquímica.

Os teores de constituintes totais em derivados vegetais dependem do processo de extração e suas variáveis, como o solvente utilizado. A polaridade do solvente interfere na extração, podendo extrair flavonoides glicosilados no extrato etanólico ou flavonoides livres no extrato em acetato de etila (CECHINEL FILHO; YUNES, 1998). Portanto, o solvente pode direcionar o isolamento de certos grupos de flavonoides.

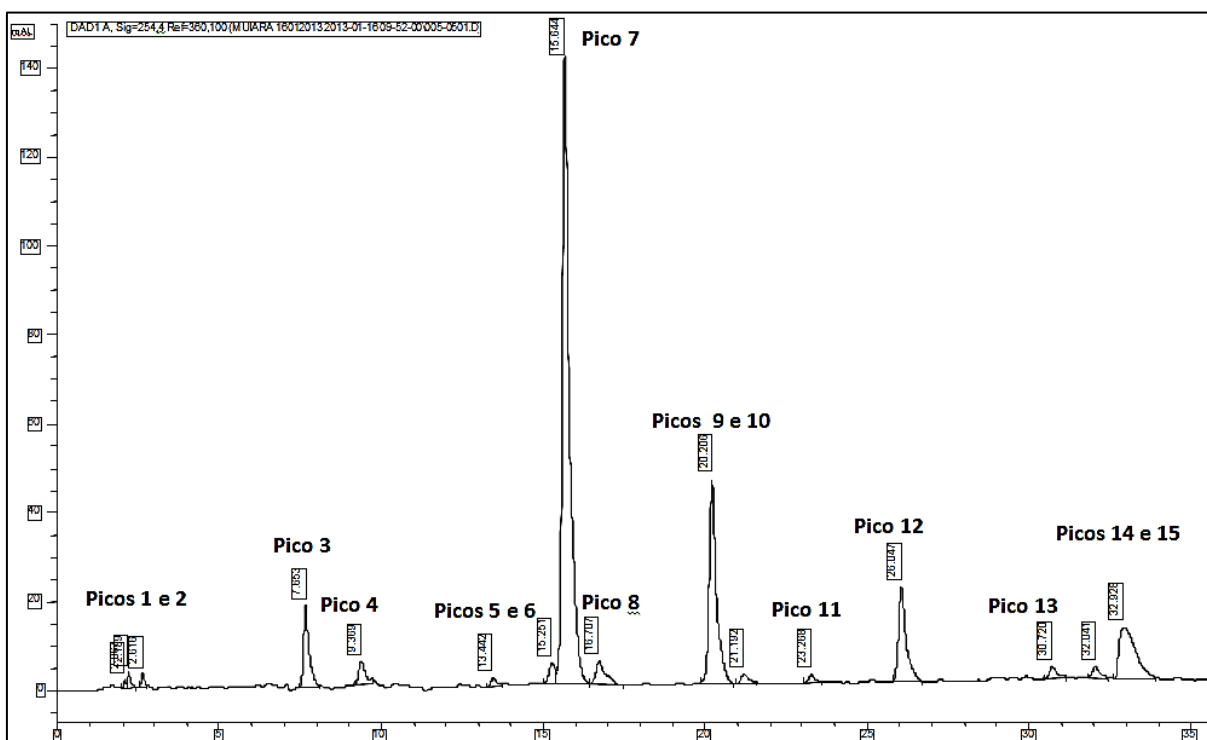
Os flavonoides quercetina 3-O-β-D-glicosídeo, isoraminetina 3-glicosídeo e quercetina 3-O-soforosídeo já foram isolados da fração em acetato de etila de *P. rigida* (ROSA *et al.*, 2010). Esses flavonoides, como a quercetina 3-O-β-D-glicosídeo, foram associados às atividades antioxidante e fitotóxica (RAZAVI *et al.*, 2009). LEE *et al.* (2005) relataram que isoraminetina 3-glicosídeo tem potencial para ser estudado como um novo medicamento para tratamento ou prevenção da diabetes.

5.2. PERFIL E IDENTIFICAÇÃO DE SUBSTÂNCIAS POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA

Nesta etapa do estudo, foram enfatizadas substâncias pertencentes à classe dos flavonoides. Essas substâncias são comumente encontradas, com maior abundância, em extratos ou frações em acetato de etila e/ou butanólica. No entanto, é importante mencionar que esta fase ainda não está totalmente concluída, mas os resultados obtidos, até o presente momento, foram descritos neste item e mostraram-se promissores.

Na figura 22 é mostrado o cromatograma do extrato etanólico das folhas de *P. rigida* em 254nm. Pela quantidade de picos, pode-se perceber que há diversas substâncias presentes no extrato. A figura 23 representa os espectros de UV de alguns destes compostos e, comparando-os com os espectros das substâncias padrão (figura 24), pode-se perceber que há entre os constituintes do extrato etanólico compostos flavonoídicos, representados pelos picos 4, 9, 11, 12 e 13.

Figura 22: Perfil cromatográfico do extrato etanólico de *P. rigida* a 254 nm.



Considerando os espectros obtidos a partir da amostra (Figura 22) e das substâncias padrão (Figura 24), o pico 12 da Figura 22, com tempo de retenção em 26,04 min (em 254 nm), produziu espectro de ultravioleta com bandas características do flavonoide quercetina

(Figura 24), que apresentou tempo de retenção muito próximo, 26,01 min, em teste realizado nas mesmas condições, o que proporciona forte indício da presença desta substância na amostra analisada. Este flavonoide já foi isolado em *P. rigida* em pesquisas como a de ROSA *et al.*, 2010. Os demais picos não demonstraram bandas características dos padrões utilizados (quercetina, rutina, canferol, luteolina 7-*O*- β -D-glicosídeo e apigenina 7-*O*- β -D-glicosídeo).

Figura 23: Espectros de UV dos picos obtidos do cromatograma do extrato etanólico de *P. rigida* a 254 nm.

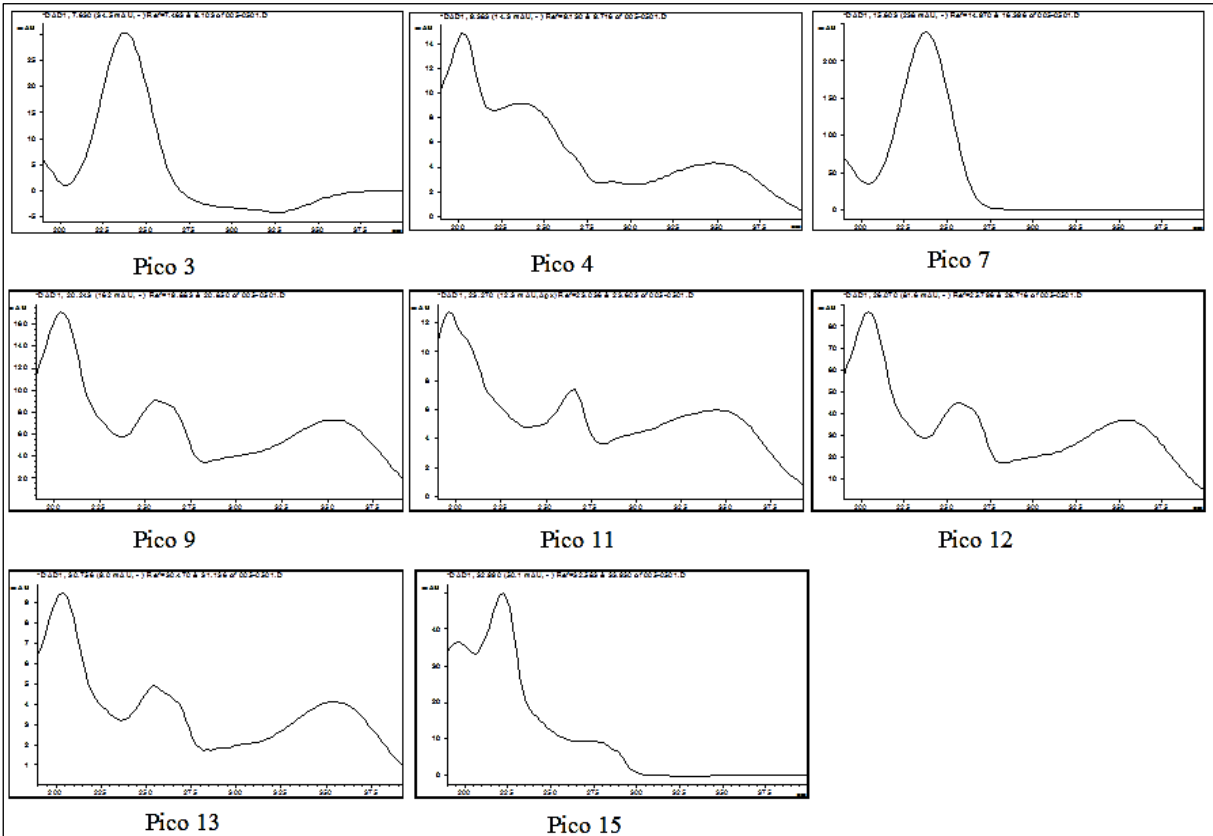
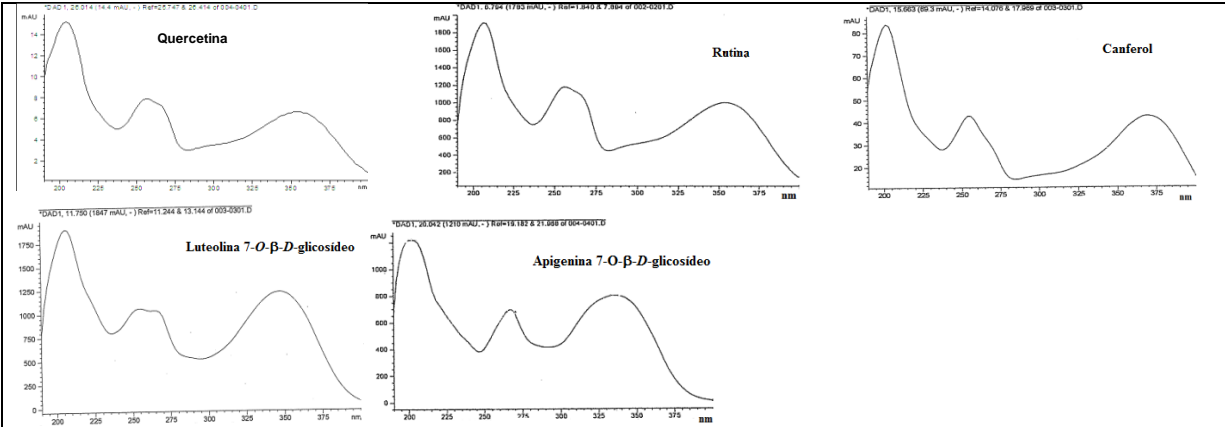


Figura 24: Espectros de UV dos padrões quercetina, rutina, canferol, luteolina 7-*O*- β -D-glicosídeo e apigenina 7-*O*- β -D-glicosídeo obtidos a 254 nm.



Na Figura 25 é representado o cromatograma da fração em acetato de etila de *P. rigida* em 254 nm. Nas condições cromatográficas empregadas, espectros com bandas características de flavonoides foram detectados (Figura 26 picos 1 e 2) e comparados aos espectros das substâncias padrão (Figura 24). Dessa forma, pode-se afirmar que esta fração contém constituintes flavonoídicos, embora não tenham apresentado tempos de retenção semelhantes aos padrões utilizados no ensaio (quercetina, rutina, canferol, luteolina 7-*O*- β -D-glicosídeo e apigenina 7-*O*- β -D-glicosídeo).

Figura 25: Perfil cromatográfico da fração em acetato de etila de *P. rigida* a 254 nm.

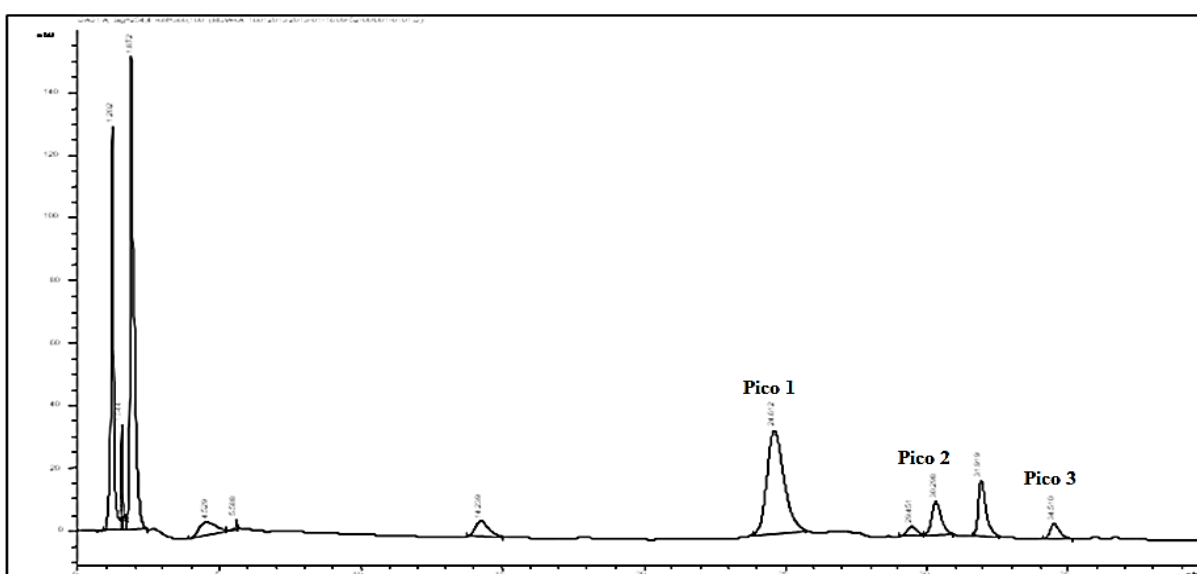


Figura 27: Perfil cromatográfico da fração butanólica de *P. rigida* a 254 nm.

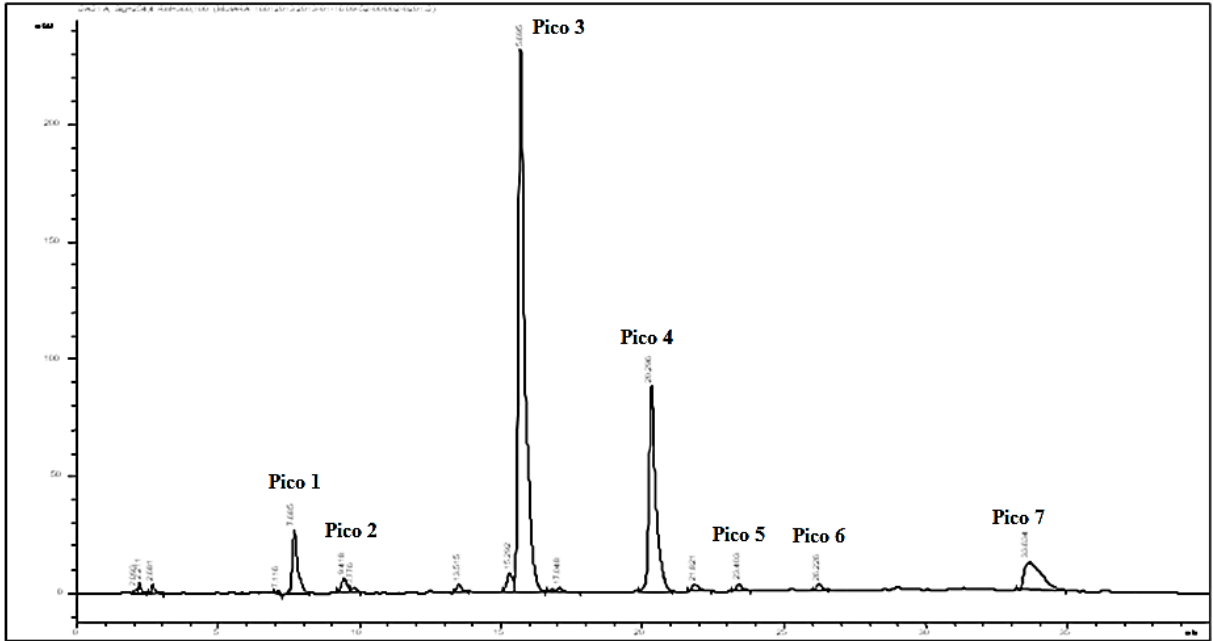
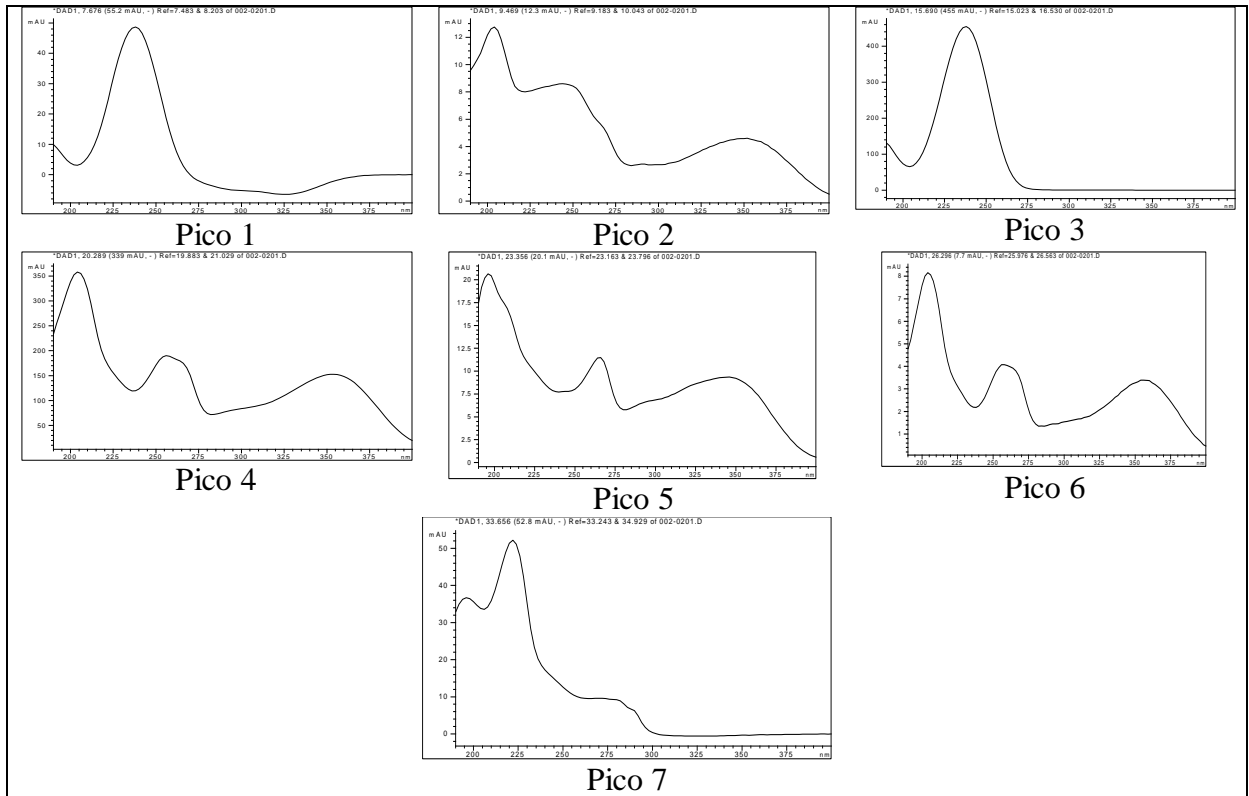


Figura 28: Espectros de UV dos picos 1, 2 e 3 do cromatograma da fração butanólica de *P. rigida*.



A partir do perfil cromatográfico da fração butanólica, foram detectados espectros de ultravioleta com características de substâncias flavonoídicas, correspondentes aos picos 4, 5, e 6 (Figura 28). Dos espectros analisados, novamente nenhum apresentou tempo de retenção

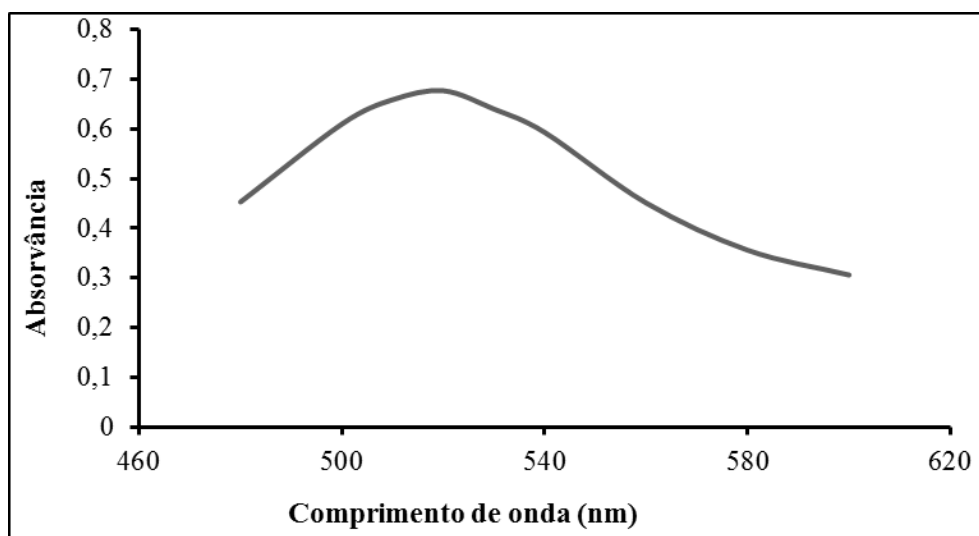
semelhante ao dos padrões utilizados (quercetina, rutina, canferol, luteolina 7-*O*- β -D-glicosídeo e apigenina 7-*O*- β -D-glicosídeo).

5.3. ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

5.3.1. Teste do DPPH

Substâncias presentes nas amostras, possivelmente as fenólicas, têm a capacidade de sequestrar radicais livres exibindo, portanto, atividade antioxidante. Tomando por base este princípio, a atividade antioxidante do extrato etanólico e das frações de *P. rigida* foi avaliada usando o método 2,2-difenil-1-picrilidrazil (DPPH). Foi traçado o espectro de absorção do DPPH, revelando pico máximo de absorção a 518nm, conforme Figura 29.

Figura 29: Espectro de absorção do DPPH.



A atividade antioxidante do extrato etanólico e das frações de *P. rigida* avaliada pela CE_{50} é apresentada na Tabela 10. A concentração efetiva 50% (CE_{50}) mostrou valores entre $24,51 \pm 0,52$ a $125,79 \pm 0,10 \mu\text{g/mL}$. A fração em acetato de etila foi a mais eficaz ao inibir o radical livre DPPH em comparação com os demais produtos testados, produzindo uma CE_{50} igual a $24,51 \mu\text{g/mL}$. Como observado na Tabela 9, esta fração também produziu maior teor de fenólicos e flavonoides totais, sendo que há flavonoides já identificados na espécie, como a quercetina 3-*O*- β -D-glicosídeo, isoraminetina 3-glicosídeo e quercetina 3-*O*-soforosídeo, com

atividade antioxidante previamente descrita (ALVES *et al.*, 2007; FIORENTINO, 2007; MILIAUSKAS, 2004; SUZGEÇ, 2005).

A fração butanólica, por sua vez, apresentou também valor expressivo de CE_{50} (48,56 $\mu\text{g/mL}$) que, provavelmente, são constituintes pertencentes às classes dos flavonoides glicosilados e taninos (CECHINEL FILHO e YUNES, 1998). É possível que haja nesta fração outras substâncias polares, como as saponinas, carboidratos e iridoides, que são também capazes de doar um átomo de hidrogênio livre, conferindo assim a atividade (CECHINEL FILHO e YUNES, 1998).

Tabela 10: Atividade antioxidante do extrato etanólico e frações de *P. rigida* pelo teste de DPPH.

Produtos testados	CE_{50} ($\mu\text{g/mL}$)
Extrato etanólico	65,37 \pm 0,16
Fração hexânica	125,79 \pm 0,10
Fração diclorometânica	89,06 \pm 0,60
Fração em acetato de etila	24,51 \pm 0,52
Fração butanólica	48,56 \pm 0,11
Rutina	8,72 \pm 0,35

É preciso considerar que, segundo RAMALHO *et al* (2006), existem constituintes classificados como antioxidantes sinérgicos, ou seja, possuem pouca ou nenhuma atividade antioxidante, mas são capazes de aumentar a atividade dos antioxidantes primários quando em combinação adequada. Assim sendo, a presença de tais substâncias deve ser considerada na fração butanólica ou em outras frações.

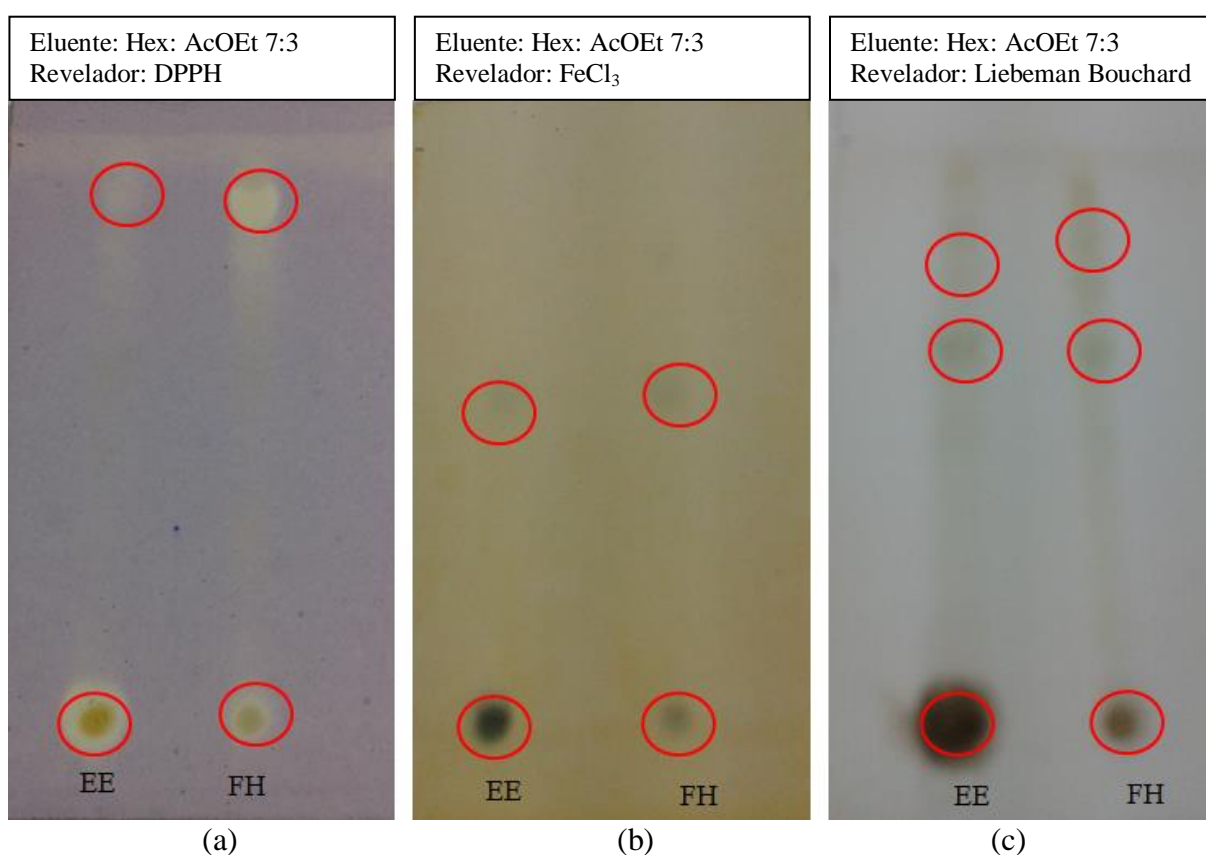
Também é válido ressaltar que, segundo ALVES *et al* (2007), a presença de unidades de açúcares na estrutura dos flavonoides causa decréscimo da atividade sequestradora de radicais, pois há perda da coplanaridade devido à presença de grupos volumosos. Já foram isolados flavonoides com até duas unidades de açúcar, como relata ROSA (2009), e estas substâncias podem estar presentes nas frações em acetato de etila e butanólica, o que pode ter contribuído para a atividade antioxidante.

5.3.2. Bioautografia com DPPH

Nas Figuras 30 (a), (b) e (c) são mostradas as placas de cromatografia de camada fina, contendo o extrato etanólico e a fração hexânica que foram reveladas com substâncias que podem evidenciar constituintes com atividade antioxidante. A placa revelada com DPPH

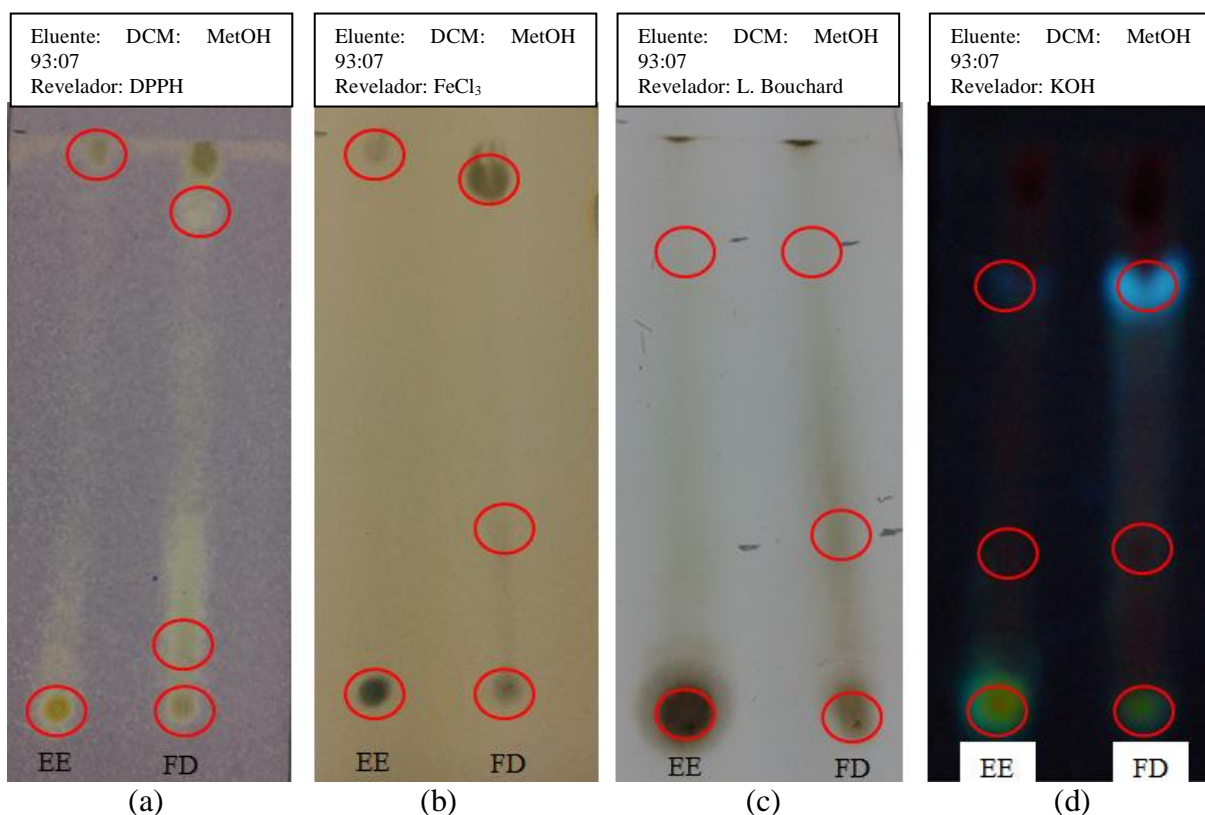
(Figura 30a) mostrou substâncias antioxidantes no topo da eluição tanto do extrato etanólico como da fração hexânica. O revelador cloreto férrico evidenciou constituintes fenólicos (Figura 30b), produzindo manchas, principalmente no local da aplicação. O reagente de Lieberman Bouchard revelou a presença de terpenos e esteroides em ambas as amostras. As bandas características foram observadas no ponto de aplicação e na extensão da eluição, sendo algumas manchas foram mais pronunciadas (Figura 30c).

Figura 30: Bioautografia do extrato etanólico e da Fração hexânica de *P. rigida* reveladas com DPPH, cloreto férrico e reagente de Lieberman Bouchard.



Nas Figuras 31 (a), (b), (c) e (d) são mostradas as bioautografias do extrato etanólico (EE) e da fração diclorometânica (DCM) reveladas com DPPH, cloreto férrico, reagente de Lieberman Bouchard e KOH. O DPPH evidenciou a presença de constituintes com atividade antioxidante (Figura 31a). O cloreto férrico mostrou que há presença de substâncias fenólicas (Figura 31b) e o reagente de Lieberman Bouchard novamente evidenciou a presença de terpenos e esteróides (Figura 31c), marcadamente no ponto de partida. Após revelação com KOH, a fluorescência verde-amarelada ou azul, destacada na luz UV a 365 nm, é indicativa da presença de cumarinas e antraquinonas (Figura 31d).

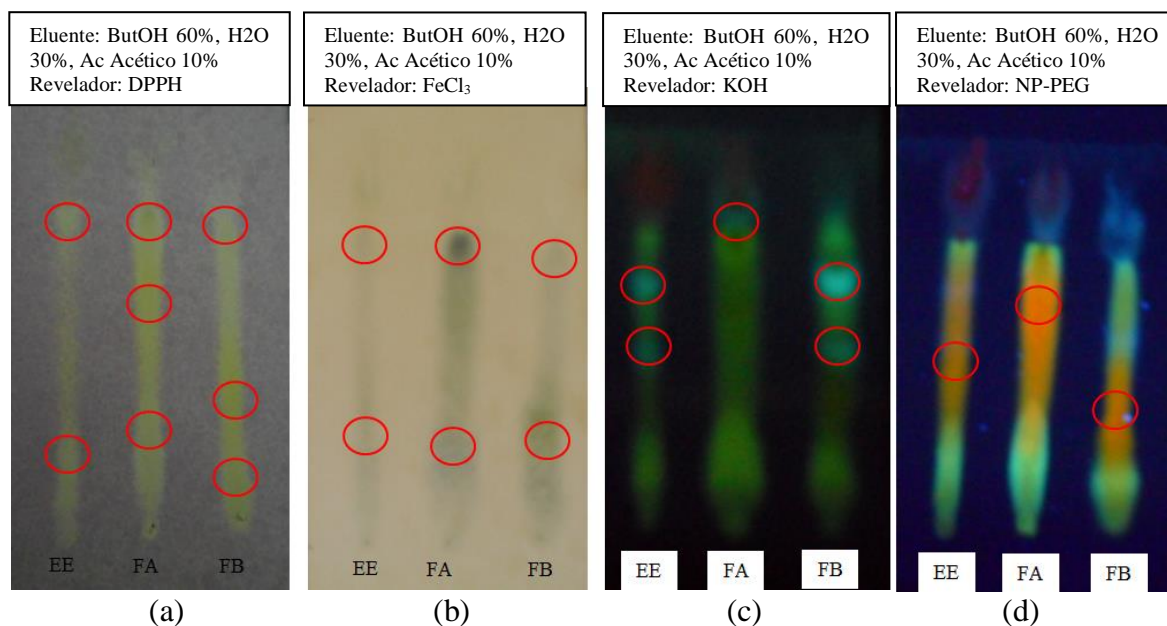
Figura 31: Bioautografia do extrato etanólico e da fração diclorometânica de *P. rigida* reveladas com DPPH, cloreto férrico, reagente de Lieberman Bouchard e KOH.



A bioautografia contendo extrato etanólico (EE) e as frações em acetato de etila (FA) e butanólica (FB) é apresentada na Figura 32 (a), (b), (c) e (d). Após reveladas com DPPH, as manchas destacadas representam a presença de substâncias antioxidantes (Figura 32a). A reação com o cloreto férrico evidenciou manchas características de substâncias fenólicas (Figura 32b). Manchas de antraquinonas e cumarinas foram detectadas após pulverização com KOH na presença da luz UV a 365 nm (Figura 32c). O revelador NP-PEG, na presença de luz UV a 365 nm, mostrou a presença abundante de flavonoides com coloração laranja (Figura 32d).

Estes resultados estão em concordância com a quantificação de fenóis e flavonoides totais, presentes em maior quantidade nas frações mais polares. Além disso, corroboram com o ensaio de DPPH (Tabela 10), no qual as frações em acetato de etila e butanólica apresentaram atividade mais expressiva.

Figura 32: Bioautografia do extrato etanólico e das frações em acetato de etila e butanólica de *P. rigida* reveladas com DPPH, cloreto férrico, KOH e NP-PEG.



5.3.3. Teste do poder de redução

Na tabela 11 é mostrada a atividade antioxidante do extrato etanólico e das frações de *P. rigida* pelo método do poder de redução. Os valores da concentração efetiva 50% (CE₅₀) variaram entre $183,09 \pm 1,84$ e $703,14 \pm 1,15$ $\mu\text{g/mL}$. A fração em acetato de etila, com CE₅₀ igual $183,09 \pm 1,84$ $\mu\text{g/mL}$, exibiu maior atividade do que o padrão rutina ($212,93 \pm 4,34$).

Tabela 11: Atividade antioxidante do extrato etanólico e frações de *P. rigida* pelo método do poder de redução.

Produtos testados	CE ₅₀ ($\mu\text{g/mL}$)
Extrato etanólico	$697,36 \pm 2,48$
Fração hexânica	$703,14 \pm 1,15$
Fração diclorometânica	$461,05 \pm 0,21$
Fração em acetato de etila	$183,09 \pm 1,84$
Fração butanólica	$440,80 \pm 1,13$
Rutina	$212,93 \pm 4,34$

Palicourea rigida é popularmente utilizada no tratamento de inflamação e infecções do trato urinário e do aparelho reprodutor feminino. Os teores de fenóis e flavonoides e a atividade antioxidante podem justificar outras atividades, como a anti-inflamatória, que evidenciaria o uso popular da planta. Esta correlação tem sido sugerida em alguns estudos, pois diversos extratos vegetais têm a capacidade de reduzir processos inflamatórios por

eliminar superóxidos e por participarem do recrutamento de células polimorfonucleares (PMN), que estão presentes em tecidos inflamados (THAMBI *et al.*, 2009).

5.3.4. Teste do β -caroteno/ácido linoleico

As curvas de descoloramento do β -caroteno estão expostas na Figura 33, e as porcentagens de inibição da oxidação variaram de $24,30 \pm 3,38$ até $84,76 \pm 1,40$, conforme mostrado na Figura 34. A fração hexânica apresentou menor velocidade de descoloramento do betacaroteno, demonstrando uma atividade mais expressiva. É importante ressaltar que esta fração contém substâncias apolares de caráter lipofílico, principalmente esteróides, terpenoides e ácidos graxos (CECHINEL FILHO e YUNES, 1998).

Em sistemas lipofílicos, as reações de sequestro podem sofrer influência do coeficiente de partição dos constituintes fenólicos entre a fase aquosa e lipídica e, assim, diminuir a reação dos fenólicos polares com o radical não polar (RICE-EVANS *et al.*, 1996). Em sistemas multifases, a eficiência de substâncias antioxidantes é fortemente influenciada pela solubilidade que determina a distribuição destas nas diferentes fases, incluindo a localização e orientação. Antioxidantes polares (solúveis em água) tendem a ser mais ativos do que os apolares (solúveis em lipídeos) quando testados em óleo puro. Já os antioxidantes apolares, por sua vez, tendem a exercer maior atividade em uma emulsão óleo em água do que os constituintes polares (PORTER, 1980 *apud* CARPES, 2008).

HUANG *et al.* (1996) observaram um comportamento paradoxal nos antioxidantes. Quando se utiliza um sistema de emulsão com óleo de milho, a ordem de atividade de antioxidantes hidrofílicos como trolox e ácido ascórbico se inverte. Esse fenômeno interfacial foi explicado por diferenças na afinidade dos antioxidantes pelas fases ar/óleo e óleo/água, bem como em suas interfaces. Este fenômeno, chamado “paradoxo polar”, é baseado na suposição de que o começo da oxidação dos lipídeos está localizado na interface do sistema. Assim, a oxidação de óleo puro acontece na interface ar/óleo, local de concentração dos antioxidantes hidrofílicos; e a oxidação de emulsões se localiza na interface óleo/água, onde se localizam os antioxidantes lipofílicos (FRANKEL e MEYER, 2000). Dessa forma, em emulsões óleo em água, os antioxidantes hidrofóbicos estão situados no óleo e na interface óleo/água, onde exercem maior proteção do que os antioxidantes hidrofílicos.

Figura 33: Curva de descoloramento do betacaroteno do extrato etanólico e frações de *P. rigida*.

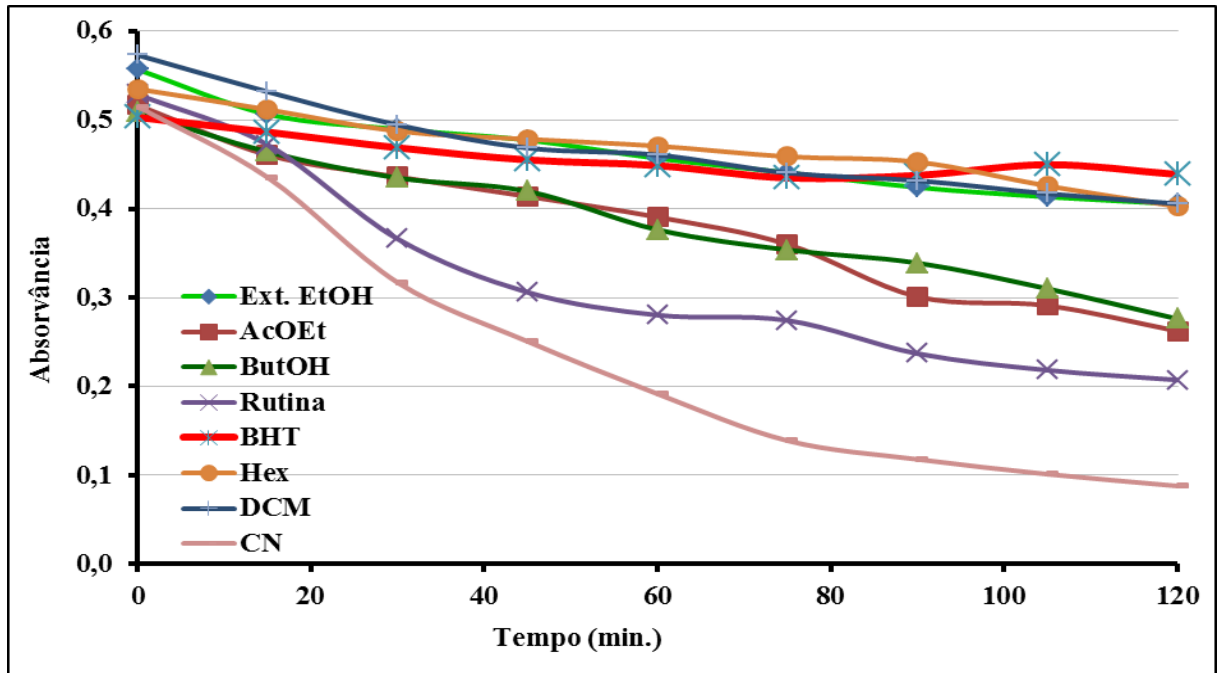
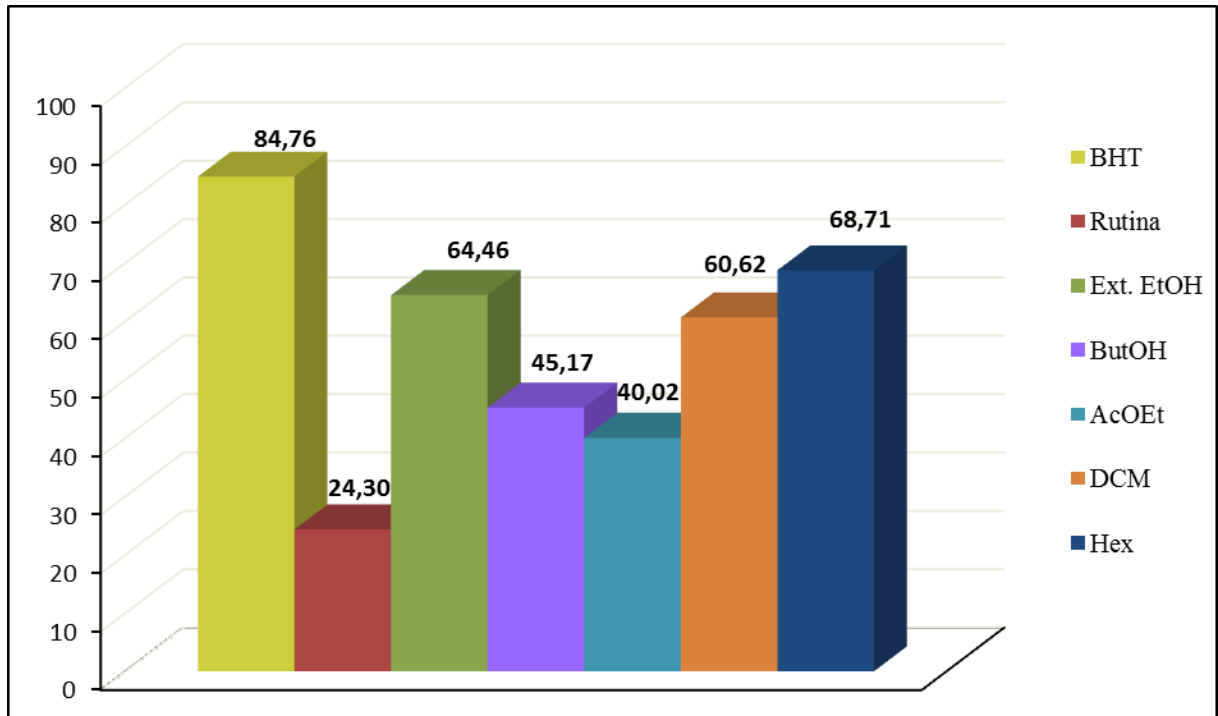


Figura 34: Atividade antioxidante do extrato etanólico e frações de *P. rigida* pelo método betacaroteno/ácido linoléico expressa em % de inibição.



5.4. ATIVIDADES ANTINOCICEPTIVA E ANTI-INFLAMATÓRIA DO EXTRATO ETANÓLICO DAS FOLHAS DE *P. rigida*

5.4.1. Toxicidade do extrato etanólico

Nas doses administradas e nas condições do ensaio, o extrato etanólico de *Palicourea rigida* não foi tóxico para os animais, pois apresentou DL₅₀ acima da maior dose utilizada (3,0 g/kg). No período avaliado, os animais não mostraram cianose, pelo-ereção, contorções, tremores, convulsão, ataxia, hipnose, urina vermelha e diarreia. Além disso, não houve alterações nos parâmetros de atividade motora e respiratória, reflexo corneal e do tônus corporal.

5.4.2. Atividade antinociceptiva do extrato etanólico pelo método das contorções abdominais

O extrato etanólico de *P. rigida* foi capaz de inibir as contorções abdominais induzidas por ácido acético em camundongos nas doses de 100 (32,88%), 200 (34,25%) e 400mg/Kg (61,64%) em relação ao grupo controle, conforme pode ser observado na Tabela 12.

Tabela 12: Efeitos do extrato etanólico das folhas de *P. rigida* sobre as contorções induzidas por ácido acético 0,6% em camundongos (n = 8).

Grupo	Dose (mg/kg)	Contorções	% inibição
Controle	Salina	73 ± 3	-
	100	49 ± 2***	32,88
Extrato	200	48 ± 2***	34,25
	400	28 ± 2***	61,64
Indometacina	10	18 ± 1***	75,34

Dados representam a média ± Erro Padrão (n = 8). ***p < 0.001 vs grupo controle (salina).

DERAEDT *et al.* (1980) descreveram a quantificação de prostaglandinas por radio-imuno-ensaio no exsudato peritoneal de ratos, obtidos após injeção intraperitoneal de ácido acético, tendo observado altos níveis de prostaglandinas PGE_{2a} e PGF_{2a} durante os 30 minutos iniciais após sua administração. O ácido acético administrado por via intraperitoneal

induz a liberação de prostaglandinas, e também a liberação de mediadores (aminas - norepinefrina e acetilcolina) do sistema nervoso simpático (DUARTE *et al.*, 1988; BORSATO *et al.*, 2000). Dessa forma, é possível que substâncias com atividade anti-inflamatória, anticolinérgicos ou anti-adrenérgicos podem estar envolvidos na atividade analgésica periférica (FERREIRA *et al.*, 2003).

Embora as contorções abdominais induzidas pelo ácido acético representem um modelo de nocicepção periférico (WEI *et al.*, 2002), não constitui um modelo específico, pois substâncias, como analgésicos opioide (FRANÇA *et al.*, 2001), antidepressivos tricíclicos (TAKAHASKI *et al.*, 1987), dentre outras, também são capazes de inibir a nocicepção induzida por ácido acético. Portanto, apesar do extrato etanólico de *P. rigida* ter se mostrado capaz de reduzir a quantidade de contorções, foi necessária a utilização de testes mais específicos, como o da formalina e o da placa quente para obter conclusões mais precisas.

5.4.3. Atividade antinociceptiva do extrato etanólico pelo método da formalina

A característica marcante desse ensaio é o fato de que o animal apresenta duas fases diferentes de nocicepção, que parecem envolver estímulos distintos. A primeira tem início imediatamente após a injeção de formalina e estende-se pelos próximos 5 minutos (dor neurogênica ou aguda), estando relacionada com a estimulação química direta dos nociceptores das fibras aferentes do tipo C e em parte das fibras do tipo A δ . Além disso, está associada a liberação de aminoácidos excitatórios, óxido nítrico e substância P, entre outros. A segunda fase acontece entre 15 - 30 minutos após a injeção da formalina e tem relação com a liberação de vários mediadores pró-inflamatórios, como a bradicinina, prostaglandinas e serotonina, entre outros (HUNSKAAR e HOLE, 1987).

A injeção subplantar de formalina promoveu uma resposta típica bifásica (Tabela 13). O tempo gasto para o grupo controle na primeira fase (0-5 min) foi $74,25 \pm 2,60$ s e na segunda fase (15-30 min) foi de $86,75 \pm 2,40$ s. Após 60 min de tratamento, doses de 200 e 400 mg/kg do extrato foram capazes de inibir significativamente ($p < 0,01$ e $p < 0,001$) a primeira fase em 13,80 e 24,74%, respectivamente. Na segunda fase, houve inibição pelas doses de 100 (10,52%), 200 (22,92%) e 400 mg/kg (35,73%) quando comparadas ao grupo controle. A morfina (referência) inibiu significativamente ambas as fases da lambida da pata induzida por formalina. Os resultados demonstraram, portanto, que o extrato agiu em dois níveis, periférico

e central, sugerindo atividades antinociceptiva e anti-inflamatória por reduzir a resposta bifásica.

Tabela 13: Efeitos do extrato etanólico sobre a nocicepção induzida por formalina.

Grupo	Dose (mg/kg)	Duração do tempo da lambida (s)			
		1ª Fase	Inibição (%)	2ª Fase	Inibição (%)
Controle	Salina	74,25±2,60	-	86,75±2,40	-
	100	73,88±2,50	0,50	77,62±2,30**	10,52
Extrato	200	64,00±1,87**	13,80	66,87±2,05***	22,92
	400	55,88±2,17***	24,74	55,75±2,48***	35,73
Morfina	5	19,38±1,74***	73,90	21,62±1,73***	75,08

Dados representam a média ± Erro Padrão (n = 8). **p < 0,01; ***p < 0,001 vs grupo controle.

5.4.4. Atividade antinociceptiva do extrato etanólico pelo método da placa quente

Como descrito acima, o extrato etanólico de *P. rigida* exibiu, a exemplo da morfina, inibiu ambas as fases do teste da formalina. Este resultado, somado ao do ensaio das contorções induzidas por ácido acético, sugere que o efeito antinociceptivo do extrato apresenta um possível componente central. Para confirmar este efeito central, foi realizado o teste da placa quente, no qual utiliza-se a temperatura como estímulo nociceptivo, não havendo processo inflamatório. Portanto, este modelo é um teste seletivo para a detecção de substâncias analgésicas com efeito central, especialmente no sistema opioide (ANKIER, 1974).

Conforme Tabela 14, o extrato etanólico de *P. rigida* aumentou o tempo de latência de camundongos expostos à placa quente. Após 60 min de tratamento, a dose de 400mg/Kg (50,26%) aumentou significativamente o tempo de permanência sobre a placa quente em relação ao respectivo controle. Em 90 min de tratamento, as doses de 200 mg/kg (36,61%) e 400 mg/kg (71,21%) também prolongaram os tempos de latência dos animais.

Este teste confirmou a ação central do extrato, mostrando efeito máximo após 90 minutos da resposta. Os resultados indicaram que o efeito analgésico observado pode ou não ser dependente do sistema opioide, pois o efeito do extrato etanólico não foi totalmente revertido na presença de naloxona, um antagonista opioide.

Tabela 14: Efeitos do extrato etanólico de *P. rigida* sobre o tempo de latência de ratos expostos ao teste da placa quente.

Grupo	Dose (mg/kg)	Tempo de reação			
		0 min	30 min	60 min	90 min
Controle	salina	5,45±0,46	5,60±0,37	5,79±0,29	6,01±0,25
	100	5,46±0,38	5,64±0,31	6,22±0,32	6,23±0,33
Extrato	200	5,55±0,31	5,81±0,30	7,09±0,26	8,21±0,18**
	400	5,54±0,27	6,75±0,33	8,70±0,44***	10,29±0,49***
Morfina	1	5,48±0,38	7,42±0,25***	10,57±0,56***	13,62±0,71***
Naloxona + morfina	1+1	5,50±0,37	7,10±0,23**	6,97±0,30	6,87±0,27
Naloxona + extrato	1+400	5,54±0,38	6,69±0,21	6,92±0,29	7,53±0,18*

Dados representam a média ± Erro Padrão (n = 8). *p < 0,05; **p < 0,01; ***p < 0,001 vs grupo controle.

5.4.5. Atividade anti-inflamatória do extrato etanólico pelo método do edema de pata induzido por carragenina

O efeito anti-inflamatório do extrato etanólico também foi avaliado pelo teste do edema de pata induzido por carragenina (Tabela 15). Após 2 h da aplicação da carragenina, a dose de 400mg/Kg do extrato foi capaz de reduzir o edema em 19,70%. A inibição do edema foi também observada 3 e 4 h após injeção de carragenina nas doses de 200mg/Kg (12,79 e 12,35%, respectivamente) e 400 mg/kg (17,44 e 19,75%, respectivamente) quando comparada ao grupo controle. A indometacina, usada como referência no ensaio, também inibiu o edema de pata em 2, 3 e 4 horas, demonstrando seu efeito anti-inflamatório.

Tabela 15: Efeitos do extrato etanólico de *P. rigida* sobre o edema de pata induzido por carragenina em ratos.

Grupo	Dose (mg/kg)	Tempo de reação			
		1 h	2 h	3 h	4 h
Controle	salina	0,51±0,05	0,66±0,03	0,86±0,03	0,81±0,02
	100	0,49±0,04	0,64±0,03	0,84±0,02	0,80±0,01
Extrato	200	0,50±0,04	0,63±0,03	0,75±0,02**	0,71±0,02***
	400	0,50±0,04	0,53±0,02**	0,71±0,02***	0,65±0,03***
Indometacina	10	0,50±0,04	0,52±0,02**	0,67±0,03***	0,60±0,01***

Dados representam a média ± Erro Padrão (n = 6). **p < 0,01; ***p < 0,001 vs grupo controle.

O edema induzido por carragenina é um modelo bifásico, com vários mediadores atuando em sequência para produzir a resposta inflamatória. Na fase inicial (0-1 h) são liberadas histamina, serotonina e bradicinina. A fase posterior (1-6 h) está correlacionada com elevada produção de prostaglandinas, ativação da COX-2 e, mais recentemente liberação de NO, na resposta inflamatória (LIMA, 1999). A capacidade do extrato de *P. rigida* de reduzir o

edema de pata induzido por carragenina permite sugerir que a ação anti-inflamatória deste está relacionada à inibição de uma ou mais vias da sinalização intracelular envolvidas nos efeitos desses mediadores.

5.4.6. Atividade anti-inflamatória do extrato etanólico pelo método da pleurisia induzida por carragenina

O método da pleurisia induzida por carragenina também foi usado para avaliar o efeito anti-inflamatório do extrato etanólico de *P. rigida* (Tabela 16). Foi observado que doses de 200 ($p < 0,01$) e 400 mg/kg ($p < 0,001$) do extrato reduziram significativamente o volume do exsudato em 27,18 e 36,89%, respectivamente, quando comparadas ao grupo controle. O número de leucócitos totais também sofreu redução nas doses de 200 (11,94%; $p < 0,001$) e 400 mg/kg (24,91%; $p < 0,001$) em comparação ao respectivo controle. Indometacina (fármaco de referência) reduziu o volume de exsudato e a migração leucocitária.

Tabela 16: Efeitos do extrato etanólico de *P. rigida* sobre o volume de exsudato e o número de leucócitos totais da pleurisia induzida por carragenina.

Grupo	Dose (mg/kg)	Volume do exsudato (mL)	Inibição (%)	Nº de leucócitos totais ($\times 10^3$ células/mm ³)	Inibição (%)
Controle	salina	1,03±0,08	-	13,73±0,26	-
	100	0,98±0,06	4,85	13,27±0,25	3,35
Extrato	200	0,75±0,04**	27,18	12,09±0,27***	11,94
	400	0,65±0,04***	36,89	10,31±0,28***	24,91
Indometacina	10	0,58±0,05***	43,69	9,07±0,25***	33,94

Dados representam a média ± Erro Padrão (n = 6). **p < 0,01; ***p < 0,001 vs grupo controle.

A formação do exsudato na cavidade pleural e a migração leucocitária foram produzidas pela injeção intrapleural de carragenina (ALMEIDA *et al.*, 1980). Este método foi utilizado para confirmar os resultados obtidos no ensaio do edema de pata. Fármacos anti-inflamatórios não esteroides, como a indometacina, são capazes de inibir o acúmulo de exsudato e a mobilização dos leucócitos entre 3 e 6 horas da aplicação de carragenina (ALMEIDA *et al.*, 1980). O extrato etanólico de *P. rigida* reduziu o volume do exsudato e a migração leucocitária, confirmando a atividade anti-inflamatória demonstrada pela redução do edema de pata.

A atividade anti-inflamatória verificada neste estudo já foi também comprovada para outras plantas do gênero, como *Palicourea demissa*, cujo extrato bruto demonstrou ainda

atividade antiviral (ROSA, 2009). *Palicourea rigida* exibiu valores consideráveis de fenólicos e flavonoides, especialmente a fração em acetato de etila. Diversas atividades têm sido atribuídas a estes constituintes, principalmente como antioxidantes (MARTÍNEZ-FLÓREZ *et al.*, 2002; MACHADO *et al.*, 2008) e anti-inflamatório (SILVA *et al.*, 2002; MACHADO *et al.*, 2008; PEREIRA, 2009).

Quercetina e kaempferol, flavonóis amplamente distribuídos pelo reino vegetal, apresentam significativa ação anti-inflamatória, que pode ser devida à inibição das enzimas fosfolipase A2 (PLA2), lipo-oxigenase, ciclo-oxigenase e inibição da produção de óxido nítrico, através da modulação da enzima iNOS (SANTANGELO *et al.*, 2007). Como já descrito anteriormente, flavonoides derivados da quercetina já foram isolados em *P. rigida*, e podem contribuir para as atividades encontradas neste trabalho. Dada a riqueza de componentes revelada pela prospecção fitoquímica, a hipótese de uma ação sinérgica é mais aceitável, haja vista que outros constituintes identificados no gênero e detectados no ensaio, tais como os terpenos, possuem relatos de atividade antioxidante, seja de forma direta ou indireta (GONZÁLEZ-BURGOS e GÓMEZ-SERRANILLOS, 2012).

5.5. ANÁLISE DA VIABILIDADE DA INCLUSÃO DA *P. rigida* KUNTH NA LISTA DE PLANTAS DE INTERESSE AO SISTEMA ÚNICO DE SAÚDE

No processo de revisão da literatura, foram relatadas diversas substâncias já isoladas e identificadas na espécie, e que possuem atividades biológicas significativas. As atividades antioxidante e anti-inflamatória são descritas para muitas destas substâncias, principalmente terpenos e flavonoides.

Os ensaios realizados neste trabalho confirmaram uma substancial capacidade antioxidante, além de atividades antinociceptiva e anti-inflamatória, o que justifica, em parte, o uso popular da planta em questão.

Com os dados obtidos até o momento, pode-se afirmar que a espécie *Palicourea rigida* é fonte de substâncias promissoras para o desenvolvimento de novos fármacos que tratem de patologias que envolvam processos oxidativos ou inflamatórios, porém, ainda são necessários mais estudos a fim de se identificar as substâncias envolvidas e seu real mecanismo de ação.

Quanto à inclusão da espécie na lista de plantas de interesse ao SUS, embora os dados de atividade farmacológica disponíveis até o momento sejam promissores, alguns fatores devem ser considerados:

- *P. rigida* é típica de regiões de cerrado, um bioma com características peculiares. Pode haver certa dificuldade em adaptá-la a outro ambiente no caso da necessidade de um cultivo sistemático.
- A espécie é de grande porte (árvore), o que torna sua indicação à RENISUS desfavorável, devido ao tempo necessário para que o espécime atinja a maturidade e ao dano causado por sua exploração.

Assim sendo, uma alternativa seria o isolamento de substâncias ativas da *P. rigida* com vistas ao prosseguimento dos estudos e, em caso de bons resultados, promover a síntese de novos fármacos.

6. CONCLUSÕES

Diante dos resultados alcançados, foi possível obter as seguintes conclusões:

- O estudo fitoquímico mostrou que as folhas de *Palicourea rigida* são ricas em substâncias do metabolismo secundário, entre as quais estão flavonoides, terpenos, esteroides, taninos, antraquinonas, cumarinas e alcaloides.
- Nas frações em acetato de etila e butanólica foram identificadas substâncias com características de espectro de ultravioleta da rutina e quercetina.
- As frações em acetato de etila e butanólica podem ser fontes de novas substâncias fenólicas com atividade antioxidante.
- As frações hexânica e diclorometânica são promissoras para o isolamento de novos compostos com atividade antioxidante, direta ou indireta, tais como terpenos e esteroides.
- O extrato etanólico das folhas de *Palicourea rigida* deve ser considerado como fonte potencial de novos fármacos com ação analgésica, anti-inflamatória e antioxidante.
- Os resultados apresentados abrem perspectivas para o futuro isolamento, purificação e identificação das substâncias bioativas da espécie que possam ser utilizadas na terapêutica.
- *Palicourea rigida* apresentou resultados promissores e que justificam, em parte, seu uso popular, e abrem caminhos para novas formas de utilização. No entanto, há necessidade de realização de estudos mais aprofundados, como estudos clínicos e toxicológicos para provar a segurança e eficácia de seu uso como fitomedicamento.

7. REFERÊNCIAS

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILAI, S. In: **Imunologia celular e molecular**. 6^a ed. Rio de Janeiro: Elsevier. 564p. 2008.

ABDALLA, A. E.; TIRZITE, D.; TIRZITE, G.; ROOZEN, J. P. Antioxidant activity of 1, 4-dihydropyridine derivatives in β -carotene-methyl linoleate, sunflower oil and emulsions. **Food Chemistry**. V. 66, n. 2, p. 189-195, 1999.

ALMEIDA, A. P.; BAYER, B. M.; HORAKOVA, Z.; BEAVEN, M. A. Influence of indomethacin and other anti-inflammatory drugs on mobilization and production of neutrophils: studies with carrageenan-induced inflammation in rats. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**. V. 214, n. 1, p. 74-79, 1980.

ALMEIDA, T. P.; MAIA, J. Z.; FISCHER, C. D. B.; PINTO, V. M.; PULZ, R. S.; RODRIGUES, P. R. C. Classificação dos processos dolorosos em medicina veterinária. **Veterinária em Foco**. V. 3, n. 2, p. 107-118, 2006.

ALVES, C.Q.; BRANDÃO, H. N.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P.; LIMA, L.S. Avaliação da atividade antioxidante de flavonoides. **Diálogos & Ciência – Revista da Rede de Ensino FTC**. 12, 2007.

ALVES, N. D. C; SANTOS, T. C. dos; RODRIGUES, C. R; CASTRO, H. C; LIRA, L. M; DORNELAS, C. B; CABRAL, L. M. Avaliação da adequação técnica de indústrias de medicamentos fitoterápicos e oficinais do Estado do Rio de Janeiro. **Ciência e Saúde Coletiva**. V. 13 (supl), p. 745-753, 2008.

ALZORIKY, N. S.; NAKAHARA, K. Antibacterial activity of extracts from some plants commonly consumed in Asia. **International Journal of Food Microbiology**. V. 80, n. 3, p. 223-230, 2003.

AMOROZO, M. C. M; GÉLY, A. Uso de plantas medicinais por caboclos do Baixo Amazonas. **Boletim do Museu Paraense Emílio Goeldi, Série Botânica**. V. 4, n. 1, 2006.

ANDERSEN, O. M.; MARKHAM, K. R. **Flavonoids: Chemistry, Biochemistry and Applications**. 1^a ed. New York: CRC Press, 2005.

ANKIER, S. I. New hot plate test to quantify antinociceptive and narcotic-antagonist activities. **European Journal Pharmacology**. V. 27, p. 1-4, 1974.

ANTUNES R. M. P; LIMA E. O; PEREIRA, M. S. V; CAMARA, C. A; ARRUDA, T. A; CATÃO, R. M. R; BARBOSA, T. P; NUNES, X. P; DIAS, C. S; SILVA, T. M. S. Atividade antimicrobiana “in vitro” e determinação da concentração inibitória mínima (CIM) de fitoconstituintes e produtos sintéticos sobre bactérias e fungos leveduriformes. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. V. 16, p. 517-524, 2006.

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/6805ba804f5ea576920df79a71dcc661/ConsolidadoVersaoIVpublicar.pdf?MOD=AJPERES>. Acesso em 04/06/2013.

ARAÚJO, P. W. B.; QUITANS JÚNIOR, L. J.; VASCONCELOS, H. D.; ALMEIDA, J. R. S. Flavonoides e hipertensão. **Revista Brasileira de Hipertensão**. V. 12, n. 3, p.188-189, 2005.

ARGENTINA. ANMAT. **Resolución 144**. Establécense normas reglamentarias que contemplen la importación, elaboración, fraccionamiento, depósito, comercialización y publicidade de drogas vegetales, medicamentos fitoterápicos y las personas físicas y jurídicas que intervengan em dichas actividades. 1998.

ARGENTINA. ANMAT. **Disposición 2673**. Solicitud de inscripción medicamentos fitoterápicos. 1999a.

ARGENTINA. ANMAT. **Disposición 2671**. Habilitación establecimientos elaboradores, envasadores, fraccionadores e importadores de medicamentos fitoterápicos. 1999b.

ARGENTINA. ANMAT. **Disposición 1788/00**. Listado de drogas vegetales a excluirse como constituyentes de medicamentos fitoterápicos, em razón de que poseen efectos tóxicos para los seres humanos. 2000.

ARRÚA, R. L. D; VILLALBA, Y. P. G; AMARILLA, A. Legislación sobre Plantas Medicinales y Fitoterápicos en Paraguay: una tarea pendiente. **Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas**. V. 8, n. 1, p. 12 – 16, 2009.

BARROSO, G. M. **Sistemática das Angiospermas do Brasil**. Vol. 3. Viçosa, Universidade Federal de Viçosa Imprensa. 1991.

BERTOLDI, A. D; BARROS, A. J. D; HALLAL, P. C; LIMA, R. C. Utilização de medicamentos em adultos: prevalência e determinantes individuais. **Revista de Saúde Pública**. V. 38, n. 4, p. 228-238, 2004.

BOLZANI, V. S.; TREVISAN, L. M. V.; YOUNG, M. C. M. Triterpenes of *Palicourea rigida* H. B. K. **Revista Latinoamericana de Química**. V. 23, n. 1, p. 20-21, 1992.

BOLZANI, V. S.; YOUNG, M. C. M.; FURLAN, M.; CAVALHEIRO, A. J.; ARAÚJO, A. R.; SILVA, D. H. S.; LOPES, M. N. Secondary Metabolites from Brazilian Rubiaceae Plant Species: Chemotaxonomical and biological significance. **Recent Research Development in Phytochemistry**. V. 5, p.19-31, 2001.

BOKESCH, H. R.; PANNELL, L. K.; COCHRAN, P. K.; SOWDER, R. C.; MCKEE, T.C.; BOYD, M. R. A novel anti-HIV macrocyclic from *Palicourea condensata*. **Journal of Natural Products**. V. 64, p. 249-250, 2001.

BORSATO, M. L. C., GRAEL, C. F. F., SOUZA, G. E. P., LOPES, N. P. Analgesic activity of the lignans from *Lychnophora ericoides*. **Phytochemistry**. V. 55, p. 809-813, 2000.

BRANDÃO, M. G. L; COSENZA, G. P.; MOREIRA, R. A; MONTE-MOR, R. L. M. Medicinal plants and other botanical products from the Brazilian Official Pharmacopoeia. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. V. 16, n 3, p. 408-420, 2006.

BRASIL. Congresso Nacional. **Portaria 22 de 30 de outubro de 1967**. Estabelece normas para o emprego de preparações fitoterápicas. 1967.

BRASIL. **Constituição Federal**. Brasília: Congresso Nacional. 1988.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de vigilância Sanitária. **Portaria 06 de 31 de janeiro de 1995**. Institui e normatiza o regulamento e produtos fitoterápicos junto à Secretaria de Vigilância Sanitária. 1995.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância Sanitária. **Portaria 116 de 08 de agosto de 1996**. Estabelece as normas para estudo da toxicidade de produtos fitoterápicos. 1996a.

BRASIL. Ministério da Saúde. Conselho Nacional de Saúde. **Resolução 196 de 10 de outubro de 1996**. Aprova as diretrizes e normas regulamentadoras de pesquisa envolvendo seres humanos. 1996b.

BRASIL. Ministério da Saúde. Conselho Nacional de Saúde. **Resolução 251 de 07 de agosto de 1997**. Aprova normas de pesquisa envolvendo seres humanos para a área temática de pesquisa com novos fármacos, medicamentos, vacinas e testes diagnósticos. 1997.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Portaria 3916 de 30 de outubro de 1998**. Aprova a Política Nacional de Medicamentos, cuja íntegra consta do anexo desta Portaria. 1998.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **RDC 17 de 24 de fevereiro de 2000**. Aprova o regulamento técnico de medicamentos fitoterápicos junto ao Sistema de Vigilância Sanitária. 2000.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **RE 899 de 29 de maio de 2003**. Determina a publicação do “Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos”. 2003a.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **RDC 210 de 04 de agosto de 2003**. Determina a todos os estabelecimentos fabricantes de medicamentos, o cumprimento das diretrizes estabelecidas no Regulamento técnico das boas práticas para a fabricação de medicamentos. 2003b.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **RDC 48 de 16 de março de 2004**. Aprova o regulamento técnico de medicamentos fitoterápicos junto ao Sistema Nacional de Vigilância Sanitária. 2004a.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **RE 88 de 16 de março de 2004**. Dispõe sobre a “Lista de referências bibliográficas para avaliação de segurança e eficácia de fitoterápicos”. 2004b.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **RE 89 de 16 de março de 2004**. Dispõe sobre a Lista de Registro Simplificado de Fitoterápicos. 2004c.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **RE 90 de 16 de março de 2004**. Dispõe sobre o “Guia para os estudos de toxicidade de medicamentos fitoterápicos” 2004d.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **RE 91 de 16 de março de 2004**. Dispõe sobre o “Guia para realização de alterações, inclusões, notificações e cancelamento pós-registro de fitoterápicos”. 2004e.

BRASIL. Ministério da Saúde. Conselho Nacional de Saúde. **Resolução 338 de 06 de maio de 2004**. Política Nacional de Assistência Farmacêutica. 2004f.

BRASIL. Presidência da República. **Decreto de 17 de fevereiro de 2005**. Cria o Grupo de Trabalho Interministerial para formular propostas da Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos e sugerir seus instrumentos de regulamentação. 2005.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Portaria 971 de 03 de maio de 2006**. Aprova a Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares (PNPIC) no Sistema Único de Saúde. 2006a.

BRASIL. **Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares no SUS**. Atitude de Ampliação de Acesso. Brasília: Ministério da Saúde. 2006b.

BRASIL. Presidência da República. **Decreto 5813 de 22 de junho de 2006**. Aprova a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos e dá outras providências. 2006c.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **RDC 67 de 08 de outubro de 2007**. Dispõe sobre boas práticas de manipulação de preparações magistrais e oficinais para uso humano em farmácias. 2007.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **RDC 87 de 21 de novembro de 2008**. Altera o regulamento técnico sobre boas práticas de manipulação em farmácias. 2008a.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Portaria GM/MS 2960 de 09 de dezembro de 2008**. Define o Programa da Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos. 2008b.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **IN 05 de 11 de dezembro de 2008**. Determina a publicação da “Lista de Medicamentos Fitoterápicos de Registro Simplificado”. 2008c.

BRASIL. **Plantas de interesse ao SUS**. Brasília: Ministério da Saúde. 2009a. Disponível em: http://portal.saude.gov.br/portal/saude/profissional/visualizar_texto.cfm?idtxt=30277&janela=1. Acesso em 08 de junho de 2012.

BRASIL. **Relação de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS**. Brasília. Ministério da Saúde. 2009b. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/RENISUS.pdf>. Acesso em 06 de junho de 2012.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **CP 03 de 13 de janeiro de 2009**. Proposta de Resolução – RDC que dispõe sobre boas práticas de fabricação de medicamentos. 2009c.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **CP 31 de 26 de maio de 2009**. Proposta de Resolução – RDC que dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos junto à ANVISA. 2009d.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **RDC 47 de 08 de setembro de 2009**. Estabelece regras para elaboração, harmonização, atualização, publicação e disponibilização de bulas de medicamentos para pacientes e para profissionais de saúde. 2009e.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **RDC 10 de 10 de março de 2010**. Dispõe sobre a notificação de drogas vegetais junto à Agência Nacional de Vigilância Sanitária. 2010a.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **RDC 14 de 30 de março de 2010**. Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos. 2010b.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **RDC 17 de 16 de abril de 2010**. Dispõe sobre as boas práticas de fabricação de medicamentos. 2010c.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Portaria 1102 de 12 de maio de 2010**. Constitui comissão técnica e multidisciplinar de elaboração e atualização da Relação Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos – COMAFITO. 2010d.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Formulário de Fitoterápicos da Farmacopéia Brasileira** / Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brasília: ANVISA. 126p. 2011.

BREMER, B. A review of molecular phylogenetic studies of Rubiaceae. **Annals of the Missouri Botanical Garden**. V. 96, p. 4-26, 2009.

BUER, C. S.; IMIN, N.; DJORDJEVIC, M. A. Flavonoids: new roles for old molecules. **Journal of Integrative Plant Biology**. V. 52, n. 1, 98-111, 2010.

BURT, S. Essential Oils: their antibacterial properties and potential applications in foods – a review. **International Journal of Food Microbiology**. V. 94, n. 3, p. 223-253, 2004.

CANADA. **Natural health products regulations**. Health Canada. 2003. Disponível em: <http://www.hc-sc.gc.ca/dhp-mps/prodnatur/index-eng.php>. Acesso em 16 de junho de 2012.

CANADA. **Evidence for safety and efficacy of finished natural health products**. Health Canada. 2006. Disponível em: <http://www.hc-sc.gc.ca/dhp-mps/prodnatur/legislation/docs/efe-paie-eng.php>. Acesso em 16 de junho de 2012.

CANADA. **Evidence for quality of finished natural health products**. Health Canada. 2007. Disponível em:

<http://www.hc-sc.gc.ca/dhp-mps/prodnatur/legislation/docs/eq-paq-eng.php>. Acesso em 16 de junho de 2012.

CARPES, S. T. **Estudo das características físico-químicas e biológicas do pólen apícola de *Apis mellifera* L. da região sul do Brasil.** (Tese) Doutorado em Tecnologia de Alimentos. Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2008.

CARVALHO, J. C. T.; GOSMANN, G.; SCHENKEL, E. P. Compostos fenólicos simples e heterosídicos. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento.** 3ª ed., Porto Alegre/Florianópolis, Ed. Universidade/UFRGS/ Ed. UFSC, p. 443-459, 2000.

CARVALHO, A. C. B; SANTOS, L. A. dos; SILVEIRA, D. La regulación de los medicamentos herbários em Brasil. **Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromaticas.** V. 8, n. 1, p. 7-11, 2008.

CASTELLANOS, J. R. G. El ambiente regulatorio de los medicamentos herbolarios en México. Antecedentes, situación actual y perspectivas al año 2025. **Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas.** V. 8, n. 1, p. 33-40, 2009.

CASTRO, M. S; BARROS, N. F; ALEGRE, S. M; HOEHNE, E. L. O uso de terapia alternativa e complementar por pacientes diabéticos do tipo2. **Brasília Médica.** V. 47, n. 1, p. 17-25, 2010.

CHANG, C. H.; WANG, Y. M.; YANG, A. H.; CHIANG, S. S. Rapidly progressive interstitial renal fibrosis associated with Chinese herbal medications. **American Journal of Nephrology.** V. 21, n. 6, p. 441-448, 2000.

CIOFFI, G.; D'AURIA, M., BRACA, A.; MENDEZ, J.; CASTILLO, A.; MORELLI, I.; DE SIMONE, F.; DE TOMMASI, N. Antioxidant and free-radical scavenging activity of constituents of the leaves of *Tachigalia paniculata*. **Journal of Natural Products.** V. 65, p. 1526-1529, 2002.

COELHO, C. P.; BARBOSA, A. A. A. Biologia reprodutiva de *Palicourea macrobotrys* Ruiz & Pavon (Rubiaceae): um possível caso de homostilia no gênero *Palicourea* Aubl. **Revista Brasileira de Botânica.** V. 26, n. 3, p.403-413, 2003.

COELHO, E. G; AMARAL, A. C. F; FERREIRA, J. L. P; SANTOS, A. G. dos; PINHEIRO, M. L. B; SILVA, J. R. A; Calcium oxalate crystals and methyl salicylate as toxic principles of the fresh leaves from *Palicourea longiflora* , an endemic species in the Amazonas state. **Toxicon.** V. 49, p. 407 – 409, 2007.

COELHO, C. F. **Avaliação do efeito anti-inflamatório do óxido nítrico administrado por via inalatória no modelo experimental de edema de pata induzido por carragenina em camundongos.** (Tese) Doutorado em Ciências Biomédicas. Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

COLLIER, H. O.; DINNEEN, L. C; JOHNSON, C. A.; SCHNEIDER, C. The abdominal constriction response and its suppression by analgesic drugs in the mouse. **British Journal of Pharmacology and Chemotherapy.** V. 32, n. 2, p. 295-310, 1968.

- COMPASSO, F.; DUNN, C. J.; YAMAMOTO, S.; WILLOUGBBY, D. A.; GOROUD, J. P. Further studies on carrageenan-induced pleurisy in rats. **The Journal of Pathology**. V. 116, n. 2, p.117-124, 1975.
- CONNER, D. E.; BEUCHAT, L. R. Effect of essential oils from plants on growth of food spoilage yeasts. **Journal of Food Science**. V. 49, n. 2, p. 429-434, 1984.
- COOK, N. C.; SAMMAN, S. Flavonoids—chemistry, metabolism, cardioprotective effects, and dietary sources. **Nutritional Biochemistry**. V. 7, p. 66-76, 1996.
- CORDELL, G. A.; QUINN-BEATTIE, M, L.; FARNSWORTH, N. R. The potential of alkaloids in drug discovery. **Phytotherapy Research**. V. 15, p. 183-205, 2001.
- CORREA, G. R.; OLIVEIRA, A. C. M. Avaliação Química e biológica de espécies nativas do cerrado-GO frente a bactérias, utilizando-se Bioautografia como método de detecção. **Congresso de Pesquisa, Ensino e Extensão da UFG**. XIII Seminário de Iniciação Científica. Anais eletrônicos. 2005.
- CORRÊA, M. F. P.; MELO, G. O.; COSTA, S. S. Substâncias de origem vegetal potencialmente úteis na terapia da asma. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. V. 18, p. 785-797, 2008.
- COSTA, K. A. **Alodínia mecânica e edema de pata induzidos por um ativador da proteína quinase c, pdd: caracterização e comparação com as respostas induzidas pela carragenina**. (Dissertação) Mestrado em Ciências Farmacêuticas. Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2004.
- COUTINHO, M. A. S.; MUZITANO, M. F.; COSTA, S. S. Flavonoides: Potenciais agentes terapêuticos para o processo inflamatório. **Revista Virtual de Química**. V. 1, n. 3, p.241-256, 2009.
- COWAN, M. M. Plant products as antimicrobial agents. **Clinical Microbiology Reviews**. V. 12, n. 4, p. 564-582, 1999.
- CRUZ, M. Herbario Digital, 1998. Disponível em:
<http://www.pirenopolis.tur.br/portal/index.php?id=herbariodigital&especie=Palicourea%20rigida>>. Acesso em: 26 de julho de 2012.
- CUSHNIE, T. P. T.; LAMB, A. J. Antimicrobial activity of flavonoids. **Journal of Antimicrobial Agents**. V. 26, n. 5, p. 343-356, 2005.
- DAPKEVICIUS, A.; VENSKUTONIS, R. VAN BEEK, T. A., LISSEN, J. P. H. Antioxidant activity of extracts obtained by different isolation procedures from some aromatic herbs grown in Lithuania. **Journal of the Science of Food and Agricultural**. V. 77, p. 140-146, 1999.
- DERAEDT, R.; JOUQUEY, S.; DELEVALLE, F.; FLAHAUT, M. Release of prostaglandins E and F in an algogenic reaction and its inhibition. **European Journal of Pharmacology**. V. 61, p. 17-24, 1980.

DEWICK, Paul M. Medicinal Natural Products: A Biosynthetic Approach. **John Wiley & Sons. 2^a ed.** 2001.

DIETRICH, L. A new approach to practical acute toxicity testing. **Archives of Toxicology**. V. 54, n. 4, p. 275-287, 1983.

DUARTE, J. D. G., NAKAMURA, M., FERREIRA, S. H. Participation of the sympathetic system in acetic acid induced writhing in mice. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**. V. 21, p. 341-343, 1988.

DUARTE, M. C. T; FIGUEIRA, G. M; PEREIRA, B; MAGALHÃES, P. M; DELARMELINA, C. Atividade antimicrobiana de extratos hidroalcoólicos de espécies da coleção de plantas medicinais CPQBA/UNICAMP. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. V. 14, p. 6-8, 2004.

EDDY, N. B.; LEIMBACH, D. Synthetic analgesics. II. Dithienylbutenyl and dithienylbutilamines. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**. V. 107, p. 385-393, 1953.

EMA. **European Parliament and of the Council Directive 2001/83/EC of 6 november 2001**. On the community Code relating to medicinal products for human use. (Consolidated version: 05/10/2009). 2001.

EMA. **European Parliament and of the Council Directive 2004/24/EC of 31 march 2004**. Amending, as regards traditional herbal medicinal products. 2004.

EMA. **Guideline on quality of herbal medicinal products/Traditional herbal medicinal products**. 2006a.

EMA. **Reflection paper on the use of fumigants**. 2006b. Disponível em: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2009/09/WC500003352.pdf. Acesso em 04 de junho de 2012.

EMA. **Guideline on specifications: Test procedures and acceptance criteria for herbal substances, herbal preparations and herbal medicinal products/traditional herbal medicinal products**. 2006c. Disponível em: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2009/09/WC500003393.pdf. Acesso em 06 de junho de 2012.

EMA. **Guideline on good agricultural and collection practice (GACP) for starting materials of herbal origin**. 2006d.

EMA. **Guideline on quality of combination herbal medicinal products/traditional herbal medicinal products**. 2007. Disponível em: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2009/09/WC500003286.pdf. Acesso em 06 de junho de 2012.

EMA. **Concept paper on the development of a guideline on a preparation of herbal teas**. 2008a. Disponível em:

http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2009/09/WC50003167.pdf. Acesso em 04 de junho de 2012.

EMA. **Reflection paper on markers used for quantitative and qualitative analysis for herbal medicinal products and traditional herbal medicinal products.** 2008b. Disponível em:

http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2009/09/WC50003196.pdf. Acesso em 04 de junho de 2012.

EMA. **Reflection paper on stability testing of herbal medicinal products and traditional herbal medicinal products.** 2009. Disponível em:

http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2009/09/WC50003370.pdf. Acesso em 06 de junho de 2012.

EMA: **Reflection paper on the level of purification of extracts to be considered as herbal preparations.** 2010a. Disponível em:

http://www.ema.europa.eu/ema/pages/includes/document/open_document.jsp?webContentId=WC500100375. Acesso em 06 de junho de 2012.

EMA. **Guideline on declaration of herbal substances and herbal preparations in herbal medicinal products/traditional herbal medicinal products.** 2010b. Disponível em:

http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2009/09/WC50003272.pdf. Acesso em 08 de junho de 2012.

EMA. **Guidance for companies seeking scientific support and advice on traditional herbal medicinal products.** Disponível em:

http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Regulatory_and_procedural_guideline/2011/07/WC500109141.pdf. Acesso em 14 de junho de 2012.

EMA. **Concept paper on non-pharmacopoeial reference standards for herbal substances, herbal preparations and herbal medicinal products / traditional herbal medicinal products.** 2012a. Disponível em:

http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2012/06/WC500129237.pdf. Acesso em 14 de junho de 2012.

EMA. **Guideline on the use of the CTD format in the preparation of a registration application for traditional herbal medicinal products.** 2012b. Disponível em:

http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Regulatory_and_procedural_guideline/2012/08/WC500130862.pdf. Acesso em 14 de junho de 2012.

ENGLER'S, A. Syllabus der Pflanzenfamilien. Berlin: **Gebrüder Borntraeger**. V. 2, p. 418-421, 1964.

FABRICANT, D. S; FARNSWORTH, N. R. The value of plants used in traditional medicine for drug discovery. **Environmental Health Perspectives**. V. 109, Sup. 1, 2001.

FERREIRA, D. S., CUNHA, W. R., SILVA, M. L. A., TURATTI, I. C., BETARELLO, H. L. Avaliação da atividade analgésica de *Miconia ligustroides* (Melastomataceae) utilizando o teste de contorção abdominal em camundongos. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. N. 84, p. 47-49, 2003.

FERRO, A. F. P.; BONACELLI, M. B. M.; ASSAD, A. L. D. Oportunidades tecnológicas e estratégias concorrenciais de gestão ambiental: o uso sustentável da biodiversidade brasileira. **Gestão e Produção**. São Carlos. V. 13, n. 3, 2006. Disponível em:

<http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0104-530X2006000300011&lng=en&nrm=iso>. Acesso em 09 de junho de 2012.

F'GUYER, S.; AFAQ, F.; MUKHTAR, H. Photochemoprevention of skin cancer by botanical agents. **Photodermatology, Photoimmunology & Photomedicine**. V. 19, n. 2, p. 56-72, 2003.

FIORENTINO, A.; D'ABROSCA, B.; PACIFICO, S.; GOLINO, A.; MASTELLONE, P. O.; MONACO, P. Reactive oxygen species scavenging activity of flavone glycosides from *Melilotus neapolitana*. **Molecules**. V. 12, p. 263-270, 2007.

FRANÇA, D. S.; SOUZA, A. L. S.; ALMEIDA, K. R.; DOLABELLA, S. S.; MARTINELLI, C.; COELHO, M. M. B vitamins induce na antinociceptive effect in the acetic acid and formaldehyde models of nociception in mice. **European Journal of Pharmacology**. V. 421, p. 157-164, 2001.

FRANKEL, E. N.; WATERHOUSE, A. L.; KINSELLA, J. E. Inhibition of human LDL oxidation by resveratrol. **The Lancet**. V. 341, n. 8852, p. 1103-1104, 1993.

FRANKEL, E. N.; MEYER, A. S.; Review. The problems of using one-dimensional methods to evaluate multifunctional food and biological antioxidants. **Journal of the Science of Food Agriculture**. V. 80, p. 1925-1941, 2000.

FUNARI, C. S.; FERRO, V. O. Uso ético da biodiversidade brasileira: necessidade e oportunidade. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. V. 15, n. 2, p. 178-182, 2005.

GANEM, R. S. **Conservação da biodiversidade, legislação e políticas públicas**. Biblioteca Digital da Câmara dos Deputados, 2011. Disponível em: <<http://www.bd.camara.gov.br>>. Acesso em: 15 de julho de 2012.

GARCÍA, L. A. de; TOBÓN, C. F; MORA, C. E. Citotoxicidad de los componentes de *P. ovalis*. **Revista Colombiana de Ciências Químico Farmacêuticas**. N. 26. 1997.

GHAYUR, M. N., KHAN, A. H., GILANI, A. H. Ginger facilitates cholinergic activity possibly due to blockade of muscarinic autoreceptors in rat stomach fundus. **Pakistan Journal of Pharmaceutical Science**. V. 20, n. 3, p. 231-235, 2007.

GONZÁLEZ-BURGOS, E.; GÓMEZ-SERRANILLOS, M.P. Terpene Compounds in Nature: A Review of Their Potential Antioxidant Activity. **Current Medicinal Chemistry**. V. 19, p. 5319-5341, 2012.

HALBERSTEIN, R. A. Medicinal Plants: Historical and Cross-Cultural Usage Patterns. **Annals of Epidemiology**. V. 15, n. 9, p. 686-699, 2005.

HEMAISWARYA, S.; KRUTHIVENTIB, A. K.; DOBLEA, M. Synergism between natural

products and antibiotics against infectious diseases. **Phytomedicine**. V. 15, n. 8, p. 639–652, 2008.

HIROYUKI, T.; TAKEDA, Y.; HIROSHI, N.; KANOMI, A.; OKUDA, T & PUFF, C. Chemotaxonomic studies of Rubiaceae plants containing iridoid glycosides. **Phytochemistry**. V. 27, n. 8, p. 2591-2598, 1988.

HUANG, S-W.; FRANKEL, E. N.; SCHWATZ, K.; AESCHBACH, R.; GERMAN, J. B. Antioxidant activity of carnosic acid and methyl carnosate in bulk oils and oil-water emulsions. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. V. 44, n. 10, p. 2951-2956, 1996.

HUNSKAAR, S.; HOLE, K. The formalin test in mice: dissociation between inflammatory and non-inflammatory pain. **Pain**. V. 30, n. 1, p. 103-114, 1987.

IMAI, H.; OSAKA, K.; YASUDA, H.; HAMASHIRA, H.; ARAI, T. Inhibition by the essential oils of peppermint and spearmint on the growth of pathogenic bacteria. **Microbios**. V. 106, suppl. 1, p. 31-39, 2001.

JONES, S. L. Descending control of nociception. In: **The initial processing of pain and its descending control: spinal and trigeminal systems** (Light AR, ed). New York: Kager, p. 203-277, 1992.

KAMPA, M.; ALEXAKI, V. I.; NOTAS, G.; NIFLI, A. P.; NISTIKAKI, A.; HATZOGLU, A.; BAKOGEORGOU, E.; KOUIMTZOGLU, E.; BLEKAS, G.; BOSKOU, D.; GRAVANIS, A.; CASTANAS, E. Antiproliferative and apoptotic effects of selective phenolic acids on T47 Dhuman breast cancer cells: potential mechanisms of action. **Breast Cancer Research**. V. 6, 2004.

KAROU, D.; SAVADOGO, A.; CANINI, A.; YAMEOGO, S.; MONTESANO, C.; SIMPORE, J.; COLIZZI, V.; TRAORE, A. S. Antibacterial activity of alkaloids from *Sida acuta*. **African Journal of Biotechnology**. V. 5, n. 2, p. 195-200, 2006.

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

KOLEVA, I. I.; VAN BEEK, T. A.; LINSSEN, J. P. H.; GROOT, A.; EVSTATIEVA, L. N. Screening of plant extracts for antioxidant activity: a comparative study on three testing methods. **Phytochemical Analysis**. V. 13, p. 8-17, 2002.

KOSTER, R.; ANDERSON, M.; DE BEER, E. J. Acetic acid for analgesic screening. **Federation Proceedings**. V. 18, p. 412-416, 1959.

KNOBLOCH, K.; PAULI, A.; IBERL, B. Antibacterial and antifungal properties of essential oil components. **Journal of Essential Oil Research**. V. 1, p. 119-128, 1989.

LEAL, A. R. G. **Biomoléculas em cogumelos silvestres do Nordeste de Portugal: função nutricional e medicinal**. (Dissertação) Mestrado em Biotecnologia. Instituto Politécnico de Bragança, Escola Superior Agrária, Bragança, 2012. Disponível em: https://bibliotecadigital.ipb.pt/bitstream/10198/7877/1/tese_ana%20raquel_corrigido.pdf. Acesso em 02 de maio de 2013.

LERSTEN, N. R. Morphology and distribution of colleters and crystals in relation to the taxonomy and bacterial leaf nodule symbiosis of *Psychotria* (Rubiaceae). **American Journal of Botany**. V. 61, n. 9, p. 973-981, 1974.

LIANDA, R. L. P. **Perfil de substâncias fenólicas de méis brasileiros por cromatografia líquida de alta eficiência e avaliação do potencial antioxidante**. Tese (Doutorado em química). Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro, 2009.

LIMA, K. V. B. **“Estudo da atividade antiinflamatória do extrato hidroalcoólico de *Cissampelos sympodialis* Eich (Menispermaceae) em diferentes modelos experimentais”** Centro de Ciências da Saúde/LTF, UFPB, João Pessoa, p. 14-32, 1999

LIMA, E. S.; ABDALLA, D. S. P. Peroxidação lipídica: mecanismos e avaliação em amostras biológicas. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**. V. 37, n. 3, p. 293-303, 2001.

LIMA, M. R. F; XIMENES, C. P. A; LUNA, J. S; SANT’ANA, A. E. G. The antibiotic activity of some Brazilian medicinal plants. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. V. 16, p. 300-306, 2006.

LITCHFIELD, J. T.; WILCOXON, F. A. A simplified method of evaluating dose-effect experiments. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**. V. 96, n. 2, p. 99-113, 1949.

LÓPEZ, C. A. A. Considerações gerais sobre plantas medicinais. **Ambiente: Gestão e Desenvolvimento**. V. 1, n. 1, p. 19-27, 2006.

LOURENZANI, A. E. B. S; LOURENZANI, W. L; BATALHA, M. O. Barreiras e oportunidades na comercialização de plantas medicinais provenientes da agricultura familiar. **Informações Econômicas**. V. 34, n. 3, p.15-25, 2004.

LUSTOSA, M. C. Industrialização, meio ambiente, inovação e competitividade. In: MAY, Peter; LUSTOSA, Maria Cecília; VINHA, Valéria. Editors. **Economia do meio ambiente**. Rio de Janeiro: Elsevier, 2003.

LYSS, G.; SCHMIDT, T. J.; MERFORT, I.; PAHL, H. L. Helenalin, an anti-inflammatory sesquiterpene lactone from *Arnica*, selectively inhibits transcription factor NF- κ B. **Biological Chemistry**. V. 378, n. 9, p. 951-961, 1997.

MACHADO, P. R. L.; ARAÚJO, M. I. A. S.; CARVALHO, L.; CARVALHO, E. M. Mecanismos de resposta imune às infecções. **Anais Brasileiros de Dermatologia**. V. 79, n. 6, p. 647-664, 2004.

MACHADO, A. O; SILVA, A. P; CONSOLARO, H; BARROS, M. A. G; OLIVEIRA, P. E. Breeding biology and distyly in *Palicourea rigida* H. B. e K (Rubiaceae) in the Cerrados of Central Brazil. **Acta botanica brasílica**. V. 24, n. 3, p. 686-696, 2010.

MACIEL, M. A. M.; PINTO, A. C; VEIGA Jr., V. F. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. **Química Nova**. Vol. 25, n. 3, p. 429-438, 2002.

- MARCO, G. J. A rapid method for evaluation of antioxidants. **Journal of the American Oil Chemists' Society**. V. 45, p. 594-598, 1968.
- MARQUES, G. S.; LEÃO, W. F.; LYRA, M. A. M.; PEIXOTO, M. S.; MONTEIRO, R. P. M.; ROLIM, L. A.; XAVIER, H. S.; NETO, P. J. R.; SOARES, L. A. L. Comparative evaluation of UV/VIS and HPLC analytical methodologies applied for quantification of flavonoids from leaves of *Bauhinia forficata*. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**. V. 23(1), p. 51-57, 2013.
- MARTÍNEZ-FLÓREZ, S; GONZÁLEZ-GALLEGO, J; CULEBRAS, J.M.; TUÑÓN, M. J. Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. **Nutrición Hospitalaria**. V. 17(6), p. 271-278, 2002.
- MATOS, F. J. **Introdução à fitoquímica experimental**. 2.ed., Fortaleza: Edições UFC, 1997.
- MENDES, N. M; PEREIRA, J. P; SOUZA, C. P.; OLIVEIRA, M. L. L; Ensaio preliminares em laboratório para verificar a ação moluscicida de algumas espécies da flora brasileira. **Revista Saúde Pública**. V. 18, p. 348-354, 1984.
- MENSOR, L. L; MENEZES, F. S; LEITÃO, G. G; REIS, A. S; DOS SANTOS, T. C, COUBE, C. S; LEITÃO, S. G. Screening of brazilian plant extracts for antioxidant activity by the use of DPPH free radical method. **Phytotherapy Research**. V. 15, n. 2, p. 127-130, 2001.
- MERCOSUL. **Página brasileira do Mercosul**. 2012. Disponível em: <http://www.mercosul.gov.br/>. Acesso em 17 de junho de 2012.
- METCALF, C. R.; CHALK, L. Anatomy of Dicotyledons. **Oxford: Clarendon Press**, 1979.
- MEXICO: **Ley general de salud**, 1984.
- MEXICO. COFEPRIS. **Reglamento de insumos para la salud**, 1998a.
- MEXICO. Secretaria de Salud. **Norma Oficial Mexicana NOM- 059-SSA1-1993 de 31 julio de 1998**. Buenas prácticas de fabricación para establecimientos de la industria químico farmacéutica dedicados a la fabricación de medicamento, 1998b.
- MEXICO. Secretaria de Salud. **Norma Oficial Mexicana NOM-072-SSA1-1993**. Etiquetado de medicamentos, 2000a.
- MEXICO. Secretaria de Salud. **Norma Oficial Mexicana NOM-164-SSA1-1998**. Buenas prácticas de fabricación para fármacos, 2000b.
- MEXICO. Secretaria de Salud. **Norma Oficial Mexicana NOM-176-SSA1-1998**. Requisitos sanitarios que deben cumplir los fabricantes, distribuidores y proveedores de fármacos utilizados em la elaboración de medicamentos de uso humano, 2001.
- MEXICO. Secretaria de Salud. **Norma Oficial Mexicana NOM-073-SSA1-2005**. Estabilidad de fármacos y medicamentos, 2006.

MICHELIN, D.C; MORESCHI, P.E; LIMA, A.C; NASCIMENTO,G.G.F; PAGANELLI, M.O; CHAUD, M.V. Avaliação da atividade antimicrobiana de extratos vegetais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. V. 15, p. 316-320, 2005.

MILIAUSKAS, G.; VAN BEEK, T. A.; VENSKUTONIS, P. R.; LINSEN, J. P. H.; WAARD, P. Antioxidative activity of *Geranium macrorrhizum*. **European Food Research and Technology**. N. 218, p. 253-261, 2004.

MILLAN, M. J. Descending control of pain. **Progress in Neurobiology**. V. 66, n. 6, p. 355-474, 2002.

MILLER, H. E. A simplified method for the evaluation of antioxidants. **Journal of the American Oil Chemists' Society**. V. 48, 1971.

MOURA, M. D. *et al.* As plantas medicinais nas feiras de saúde da Paraíba. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**. V. 37, n. 2, 2001.

NASCIMENTO, G. G; LOCATELLI J; FREITAS, P. C. Antibacterial activity of plants extracts and phytochemical on antibiotic-resistant bacteria. **Brazilian Journal of Microbiology**. V. 31, p. 247-256, 2000.

NASCIMENTO JUNIOR, J. M; COSTA, K. S; TORRES, K. R; ALVES, R. M. S. Política Nacional de Medicamentos Fitoterápicos, Desafios e Perspectivas. **Revista de Administração Hospitalar e Inovação em Saúde**. V. 5, n. 4, p. 42-49, 2010.

NEPLAME. Disponível em: <http://www.neplame.univasf.edu.br/atividade-antinociceptiva.html>. Acesso em 01 de junho de 2013.

NIJVELDT, R. J.; NOOD, E.; HOORN, D. E. C.; BOELEN, P. G.; NORREN, K.; LEEUWEN, P. A. M. Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. **American Journal of Clinical Nutrition**. V. 74, n. 4, p. 418-425, 2001.

NOVAIS, T. S; COSTA, J. F. O; DAVID, J. P. L; DAVID, J. M; QUEIROZ, L. P; FRANÇA F; GIULIETTI, A. M; SOARES, M. B. P; SANTOS, R. R. Atividade antibacteriana em alguns extratos de vegetais do semi-árido brasileiro. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. V. 13, Supl. 2, p. 5-8, 2003.

OLIVEIRA, F. P; LIMA, E. O; SIQUEIRA JÚNIOR, J. P; SOUZA, E. L; SANTOS, B. H. C; BARRETO H. M. Effectiveness of *Lippia sidoides* Cham. (Verbenaceae) essential oil in inhibiting the growth of *Staphylococcus aureus* strains isolated from clinical material. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. V.16, p. 5-8, 2006.

OLIVEIRA, R. A. G; LIMA, E. O; SOUZA, E. L; VIEIRA, W. L; FREIRE, K. R. L; TRAJANO, V. N; LIMA. I. O; SILVA-FILHO, R. N. Interference of *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng essential oil on the anti-Candida activity of some clinically used antifungals. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. V. 17, p. 186-190, 2007.

OLIVEIRA, A. C.; VALENTIM, I. B. GOULART, M. O. F.; SILVA, C. A.; BECHARA, E. J. H.; TREVISAN, M. T. S. Fontes vegetais naturais de antioxidantes. **Química Nova**. V. 32, n. 3, p. 689-702, 2009.

OMS. **Quality control methods for medicinal plant materials.** Genebra. Organização Mundial da Saúde, 1998

OMS. **General guidelines for methodologies on research and evaluation of traditional medicine.** Genebra. Organização Mundial de Saúde, 2000.

OMS. **Estrategia de la OMS sobre medicina tradicional 2002-2005.** Genebra. Organização Mundial da Saúde, 2002a.

OMS. **The importance of pharmacovigilance – Safety monitoring of medicinal products.** Genebra. Organização Mundial de Saúde, 2002b.

OMS. **WHO guidelines on good agricultural and collection practices (GACP) for medicinal plants.** Genebra. Organização Mundial de Saúde, 2003.

OMS. **WHO guidelines for assessing quality of herbal medicines with reference to contaminants and residues.** Genebra. Organização Mundial de Saúde, 2007.

OMS. **Instruções operacionais: informações necessárias para a condução de ensaios clínicos com fitoterápicos.** Brasília. Ministério da Saúde, 2008.

ONU. **Convenção sobre Diversidade Biológica.** 2002. Disponível em: http://www.onu-brasil.org.br/doc_cdb.php. Acesso em 04 de junho de 2012.

ONWUKAEME, N. D. Anti-inflammatory activities of flavonoids of *Baphia nitida* Lodd. (Leguminosae) on mice and rats. **Journal of Ethnopharmacology.** V. 46, n. 2, p. 121–124, 1995.

OUMZIL, H.; GHOULAMI, S.; RHAJAOU, M.; ILIDRISSI, A.; TETOUAMI, S.; FAID, M.; BENJOUAD, A. Antibacterial and antifungal activity of essential oils of *Mentha suaveolens*. **Phytotherapy Research.** V. 16, n. 8, p.727-731, 2000.

OYAIZU, M. Studies of products browning reaction: antioxidative activity of products of browning reaction prepared from glucosamine. **Japanese Journal of Nutrition.** V. 44, n. 6, p. 307-315, 1986

PAGANGA, G.; AL-HASHIM, H.; KHODR, H.; SCOTT, B. C.; ARUOMA, O. I.; HIDER, R. C.; HALLIWELL, B.; RICE-EVANS, C. A. Mechanisms of antioxidant activities of quercetin and catechin. **Redox Report.** V. 2, n. 6, p. 359-364, 1996.

PANDOLFI, M. B; PIAZZOLLA, L. P; LOUZADA, L. L. Prevalência de Polifarmácia em idosos residentes em instituição de longa permanência de Brasília, Distrito Federal. **Brasília Médica.** V. 47, n. 1, p.53-58, 2010.

PARAGUAI. **Ley 1119.** De produtos para la salud y otros, 1997.

PARAGUAI. **Decreto 7442.** Requisitos para el registro de medicamentos fitoterapéuticos y homeopáticos, 2000.

- PESSINI, G. L.; HOLETZ, F. B.; SANCHES, N. R.; CORTEZ, D. A. G.; DIAS-FILHO, B. P.; NAKAMURA, C. V. Avaliação da atividade antibacteriana e antifúngica de extratos de plantas utilizados na medicina popular. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. V. 13, Supl. 1, p. 21-24, 2003.
- PICHERSKY, E.; GANG, D. R. Genetics and biochemistry of secondary metabolites in plants: an evolutionary perspective. **Trends in Plant Science**. V. 5, n. 10, 2000.
- PIETTA, P. G. Flavonoids as antioxidants. **Journal of Natural Products**. V. 63, n. 7, p. 1035-1042, 2000.
- PINTO, E. P. P.; AMOROZO, M. C. M.; FURLAN, A. Conhecimento popular sobre plantas medicinais em comunidades rurais de mata atlântica – Itacaré, BA, Brasil. **Acta Botanica Brasilica**. V. 20, n. 4, p. 751-762, 2006.
- PINTO, M. F. S. Prospecção biotecnológica de ciclótides provenientes de plantas do cerrado com atividade antimicrobiana. **25º Congresso Brasileiro de Microbiologia**. 2009.
- PLUMB, G. W.; PRICE, K. R.; RHODES, M. J.; WILLIAMSON, G. Antioxidant properties of the major polyphenolic compound in broccoli. **Free Radical Research**. V. 27, n. 4, p. 429-435, 1997.
- PORTER, W. L. **Recent trends in food applications of antioxidants**. In: Autoxidation in Food and Biological Systems. Ed. Simic Plenum, New York, 1980.
- PRIOR, R. L. Fruits and vegetables in the prevention of cellular oxidative damage. **American Journal Clinical Nutrition**. V. 78 (suppl), p. 570S-578S, 2003.
- QUEIROZ, R. B. Evidências pré-clínicas da ação antinociceptiva do 3-fenil-5-(4-etilfenil)-imidazolidina-2,4-diona em estudos psicofarmacológicos. (Dissertação) Mestrado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos. Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2011.
- RAMALHO, V. C.; JORGE, N. Antioxidantes utilizados em óleos, gorduras e alimentos gordurosos. **Química Nova**. V. 24, n. 4, p. 755-760, 2006.
- RAMOS, S. C. S.; OLIVEIRA, J. C. S.; CÂMARA, C. A. G. CASTELAR, I; CARVALHO, A. F. F. U.; LIMA-FILHO, J. V. Antibacterial and cytotoxic properties of some plant crude extracts used in Northeastern folk medicine. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**. V. 19, n. 2A, p. 376-381, 2009.
- RANG, H. P.; DALE, M. M.; RITTER, J. M.; MOORE, P. K. **Farmacologia**. 6.^a ed., Rio de Janeiro: Elsevier, 2007.
- RATTANACHAIKUNSOPON, P.; PHUMKHACHORN, P. Contents and antibacterial activity of flavonoids extracted from leaves of *Psidium guajava*. **Journal of Medicinal Plants Research**. V. 4, n. 5, p. 393-396, 2010.
- RECIO, M. C.; GINER, R. M.; MÁÑEZ, S.; RÍOS, J. L. Structural requirements for the anti-inflammatory activity of natural terpenoids. **Planta Medica**. V. 61, n. 2, p. 182-185, 1995.

- RICE-EVANS, C. A.; MILLER, N. J.; PAGANGA, G. Structure antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. **Free Radical Biology and Medicine**. V. 20, p. 933-956, 1996.
- ROBBRECHT, E. Tropical woody Rubiaceae. **Opera Botanica Belgica**. V. 1, 1988.
- ROBBRECHT, E. National Botanic Garden of Belgium. **Monographic and systematic studies in Rubiaceae**. Bélgica. Disponível em: <http://www.br.fgov.be/RESEARCH/PROJECTS/rubiaceae.html>. Acesso em: 02 de abril de 2013.
- RODRIGUES, A. G.; SANTOS, M. G.; AMARAL, A. C. F. Políticas Públicas em Plantas Mediciniais e Fitoterápicos. In: AMARAL, A. C. F.; RODRIGUES, A. G.; RIBEIRO, J. E. G.; SANTOS, M. G.; NETTO JUNIOR, N. L. Editors. **A Fitoterapia no SUS e o Programa de Pesquisas de Plantas Mediciniais da Central de Medicamentos**. Brasília: Ministério da Saúde, 2006.
- RODRIGUES, A. G. Fitoterapia no Sistema Único de Saúde. **Anais da V Jornada Catarinense e I Jornada Internacional de Plantas Mediciniais**. Joinville, 2006.
- ROSA, E. A. Contribuição ao estudo químico das espécies vegetais *Palicourea rigida* e *Palicourea coriacea* e avaliação das atividades antioxidante, antiinflamatória e moluscicida de *Palicourea rigida*. Tese (Doutorado) **Universidade Estadual de Maringá**, 2009.
- ROSA, E. A.; SILVA, B. C.; SILVA, F. M.; TANAKA, C. M. A.; PERALTA, R. M.; OLIVEIRA, C. M. A.; KATO, L.; FERREIRA, H. D.; SILVA, C. C. Flavonoides e atividade antioxidante em *Palicourea rigida* Kunth, Rubiaceae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. V. 20, n. 4, p. 484-488, 2010.
- SALES, P. M.; SOUSA, P. M.; SILVEIRA, C. A.; SILVEIRA, D. The use of herbal medicine by AIDS patients from Hospital Universitário de Brasília, Brazil. **Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromaticas**. V. 7, n. 4, p. 208-217, 2008.
- SALVEMINI, D.; WANG, Z.; WYATT, P. S.; BOURDON, D. M.; MARINO, M. H.; MANNING, P. T.; CURRIE, M. G. Nitric oxide: a key mediator in the early and late phase of carrageenan-induced rat paw inflammation. **British Journal of Pharmacology**. N. 118, p. 829-838, 1996.
- SANTANGELO, C.; VARI, R.; SCAZZOCCHIO, B.; DI BENEDETTO, R.; FILESI, C.; MASELLA, R. **Ann Ist Super Sanità**. N. 43, 2007.
- SANTOS G. G. L. dos. **Caracterização farmacológica do efeito antinociceptivo do veneno de *Micrurus lemniscatus* (coral-verdadeira)**. (Dissertação) Mestrado em Biotecnologia. Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, Salvador, Bahia, 2011.
- SARTÓRIO, M. L.; TRINDADE, C.; RESENDE, P.; MACHADO, J. R. **Cultivo Orgânico de Plantas Mediciniais**. Viçosa: Aprenda Fácil Editora, 2000.
- SEPTÍMIO, L. R. **A Fitoterapia Baseada em Ervas Mediciniais do Cerrado**. Brasília: Ministério da Cultura, 1994.

SHARMA, A; SHANKER, C; TYAGI, L. K; SINGH, M; RAO, C. V. Herbal Medicine for Market Potential in India: An Overview. **Academic Journal of Plant Sciences**. V.1, n. 2, p. 26-36, 2008.

SHER, A. Antimicrobial activity of natural products from medicinal plants. **Gomal Journal of Medical Sciences**. V. 7, n. 1, p. 72-78, 2009.

SHIBATA, M.; OHKUBO, T.; TAKAHASHI, H.; INOKI, R. Modified formalin test: characteristic biphasic pain response. **Pain**. V. 38, n. 3, p. 347-352, 1989.

SIDDHURAJU, P.; BECKER, K. The antioxidant and free radical scavenging activities of processed cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) seed extracts. **Food Chemistry**. V. 101, p. 10-19, 2007.

SIKKEMA, J.; BONT, J. A. M.; POOLMAN, B. Interactions of cyclic hydrocarbons with biological membranes. **Journal of Biological Chemistry**, V. 269, n. 11, p. 8022-8028, 1994.

SIKKEMA, J.; DE BONT, J. A. M.; POOLMAN, B. Mechanisms of membrane toxicity of hydrocarbons. **Microbiological Review**. V. 59, n. 2, p. 201-222, 1995.

SINGH, B.; SINGH, S. Antimicrobial activity of terpenoids from *Trichodesma amplexicaule* Roth. **Phytotherapy Research**. V. 17, n. 7, p. 814-816, 2003.

SILVA, F. A. M.; BORGES, M. F. M.; FERREIRA, M. A. Métodos para avaliação do grau de oxidação lipídica e da capacidade antioxidante. **Química Nova**. V. 22, n. 1, p. 94-103, 1999.

SILVA, R. R.; Oliveira, T. T.; Nagem, T. J.; Leão, M. A. Efeito de flavonoides no metabolismo do ácido araquidônico. **Medicina**. N. 35, p. 127-133, 2002

SILVA, F. M.; OLIVEIRA, C. M. A.; KATO, L., FERREIRA, H. D.; CORREA, R. G.; SILVA, C. C. Estudo fitoquímico e atividade antibacteriana de *Palicourea rigida* (Rubiaceae). Congresso de Pesquisa, Ensino e Extensão da UFG; **XIII Seminário de Iniciação Científica; Anais eletrônicos**, 2005.

SILVA, V. C.; ALVES, A. N.; CARVALHO, M. G. Derivados dos ácidos benzóico e cinâmico isolados de *Palicourea coriacea* (Rubiaceae). **29ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, Anais eletrônicos**, 2006.

SILVA, V. C; CARVALHO, M. G; ALVES, A. N. Chemical constituents from leaves of *Palicourea coriacea* (Rubiaceae). **Journal of Natural Medicines**. V. 62, p. 356–357, 2008.

SILVEIRA JÚNIOR, C. E. A; SABA, M. D; JARDIM, J. G. Pollen morphology of Rubiaceae Juss. species occurring in an area of caatinga (dryland) vegetation in Bahia State, Brazil. **Acta Botanica Brasilica**. V. 26, n. 2, p. 444-455, 2012.

SIMÕES, C. O; SCHENKEL, E. P; GOSMANN, G; MELLO, J. C. P; MENTZ, L. A; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia, da planta ao medicamento**. 5ªed. Porto Alegre/Florianópolis: UFRGS/ UFSC, 2004.

SOARES, P. R. O. *et al.* In Vitro Antiproliferative Effects of the Indole Alkaloid Vallesiachotamine on Human Melanoma Cells. **Archives of Pharmacal Research**. Vol 35, n. 3, p. 565-571, 2012.

SIQUEIRA JR, J. F; DANTAS, C. J. S. **Mecanismos celulares e moleculares da inflamação**. 1ª ed., São Paulo: MEDSI, 2000.

SOBRINHO, T. J. S. P; SILVA, C. H. T. P.; NASCIMENTO, J. E; MONTEIRO, J. M; ALBUQUERQUE, U. P; AMORIM, E. L. C. Validação de metodologia espectrofotométrica para quantificação dos flavonoides de *Bauhinia cheilantha* (Bongard) Steudel. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**. V. 44, n. 4, p. 683-689, 2008.

SOUSA, F. A. E. F. Dor: o quinto sinal vital. Ribeirão Preto: **Revista Latino Americana de Enfermagem**, V. 10, n. 3, p. 446-447, 2002.

SOUSA, C. M. M; SILVA, H. R; VIEIRA-JUNIOR, G. M; AYRES, C. L. S. C; ARAUJO, D. S; CAVALCANTE, L. C. D; BARROS, E. D. S; ARAUJO, P. B. M; BRANDAO, M. S; CHAVES, M. H. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. **Química Nova**. V. 30, n. 2, p. 351-355, 2007.

SOUSA, J. A.; MIRANDA, E. M. **Plantas medicinais e fitoterápicos: alternativas viáveis**. Embrapa. Acre, 2008.

SOUZA, V. C.; LORENZI, H. **Botânica sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de angiospermas da flora brasileira, baseado em APG II**. Nova Odessa: Editora Plantarum, 2008.

SUZGEÇ, S.; MERİÇLİ, A. H.; HOUGHTON, P. J.; ÇUBUKÇU, B.; Flavonois of *Helichrysum compactum* and their antioxidant and antibacterial activity. **Fitoterapia**. N. 76, p. 269-272, 2005.

TAKAHASKI, R. N.; PAZ, M. M. Influence of naloxone on analgesis effects of antidepressants in mice. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**. V. 20, p. 607-610, 1987.

TALLENT, W. H. Two new antibiotic cyclopentanoid monoterpenes of plant origin. **Tetrahedron**. V. 20, n. 7, p. 1781-1787, 1964.

TAPAS, A. R.; SAKARKAR, D. M.; KAKDE, R. B. Flavonoids as nutraceuticals: a review. **Tropical Journal of Pharmaceutical Research**. V. 7, n. 3, p. 1781-1787, 2008.

TEIXEIRA, M. J. Fisiopatologia da nocicepção e da supressão da dor. **Jornal Brasileiro de Oclusão, ATM e Dor Orofacial**. V. 1, n. 4, p. 329-334, 2001.

THAMBI, P. T.; KUZHIVELIL, B.; SABU, M. C.; JOLLY, C. L. Antioxidant and anti-inflammatory activities of the flowers of *Tabernaemontana coronaria* (L). **Indian Journal of Pharmaceutical Sciences**. V. 68, p. 352-355, 2006.

TOKARNIA, C. H.; DÖBEREINER, J. ; PEIXOTO, P. V. Plantas Tóxicas de Interesse Pecuário. In: **Plantas Tóxicas do Brasil**. Rio de Janeiro, Editora Helianthus, 2000.

TOLEDO, R; CARVALHO, A; HASHIMOTO, D; RODRIGUES, M; FERREGUTI, R; CONSOLARO, H; HAY, J; OLIVEIRA, P. E. Caracterização morfológica de quatro espécies de *Palicourea* Aubl. (Rubiaceae) do cerrado do Brasil central. **Revista Brasileira de Biociências**. V. 5, supl. 1, p. 732-734, 2007.

VEIGA JR, V. F; MELLO, J. C. P. As monografias sobre plantas medicinais. **Revista brasileira de farmacognosia**. João Pessoa, V. 18, n. 3, 2008. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-695X2008000300022&lng=en&nrm=iso>. Acesso em 12 de junho de 2012.

VELIOGLU, Y. S.; MAZZA, G.; GAO, L.; OOMACH, B. D. Antioxidant activity and total phenolics of selected fruits, vegetables, and grain products. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. V. 46, n. 10, p. 4113-4117, 1998.

VENCATO, I; SILVA, F. M; OLIVEIRA, C. M. A; KATO, L; TANAKA, C. M. A; SILVA, C. C; SABINO, J. R. Vallesiachotamine. **Acta Crystallographica**. V. 62, p. 429-430, 2006.

VENNAT, B.; GROSS, D.; POURRAT, H. *Hamamelis virginiana*: identification and assay of proanthocyanidins, phenolic acids and flavonoids in leaf extracts. **Pharmaceutica Acta Helvetiae**. V. 67, n. 1, p. 11-14, 1992.

VERMERRIS, W.; NICHOLSON, R. **Phenolic compound biochemistry**. 1^a ed. New York: Springer, 2007.

VICKERY, M. L.; VICKERY, B. Secondary plant metabolism. London. **Mc Milan**, 1981.

VINEGAR, R.; SCHREIBER, W.; HUGO, R. Biphasic development of carrageenan edema in rats. **Journal of Pharmacological Experimental Therapeutics**. V. 166, n. 1, p. 96-103, 1969.

VINEGAR, R.; TRUAX, J.F.; SELPH, J. L. Some quantitative temporal characteristics of carrageenin induced pleurisy in the rat. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**. V. 143, p. 711-714, 1973.

WAGNER, H. Search for new plant constituents with potential antiphlogistic and antiallergic activity. **Planta Medica**. V. 55, n. 3, p. 235-241, 1989.

WAGNER, H.; ULRICH-MERZENICH, G. Synergy research: Approaching a new generation of phytopharmaceuticals. **Phytomedicine**. V. 16, n. 2-3, p. 97-110, 2009.

WEI, E. T.; KIANG, J. G.; BUCHAN, P.; SMITH, T.W. Corticotropin-releasing factor inhibits neurogenic plasma extravasation in the rat paw. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**. V. 238, p. 783-787, 1986.

WINKEL-SHIRLEY, B. Flavonoid Biosynthesis. A colorful model for genetics, biochemistry, cell biology, and biotechnology. **Plant Physiology**. V. 126, n. 2, p. 485-493, 2001.

WINTER, C. A.; RISLEY, E. A.; NUSS, G. W. Carrageenin-induced edema in hind paw of the rat as an assay for antiinflammatory drugs. **Proceedings of the Society for Experimental Biology Medicine**. V. 111, p. 544-547, 1962.

YILDIRIM, A.; MAVI, A.; KARA, A. A. Determination of antioxidant and antimicrobial activities of *Rumex crispus* L. extracts. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. V. 49, p. 4083 –4089, 2001.

YOUNG, M. C. M.; BRAGA, M. R.; DIETRICH, S. M. C.; BOLZANI, V. S.; TREVISAN, L. M. V. e GOTTLIEB, O. R. Chemosystematic markers of Rubiaceae. **Opera Botanica Belgica**. V. 7, p. 205-212, 1996.

ZUANAZZI, J. A. S; MAYORGA, P. Fitoprodutos e desenvolvimento econômico. **Química Nova**. V. 33, n. 6, 2010. Disponível em:
http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422010000600037&lng=en&nrm=iso>. Acesso em 10 de junho de 2012.