



UNIVERSIDADE FEDERAL DO OESTE DO PARÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA, PÓS-GRADUAÇÃO E INOVAÇÃO TECNOLÓGICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM RECURSOS NATURAIS DA AMAZÔNIA

PADRONIZAÇÃO E ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA DO
EXTRATO AQUOSO DE *Psittacanthus plagiophyllus* Eichl.
(LORANTHACEAE)

ADRIELLE NARA SERRA BEZERRA

Santarém, Pará
Outubro, 2015

ADRIELLE NARA SERRA BEZERRA

**PADRONIZAÇÃO E ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA DO
EXTRATO AQUOSO DE *Psittacanthus plagiophyllus* Eichl.
(LORANTHACEAE)**

ORIENTADORA: PROF^a DR^a ROSA HELENA VERAS MOURÃO

Dissertação apresentada à Universidade Federal do Oeste do Pará - UFOPA, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Ambientais, junto ao Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Recursos Naturais da Amazônia.

Área de concentração: Estudos e Manejos de Ecossistemas Amazônicos. **Linha de Pesquisa:** Bioprospecção de Recursos Naturais da Amazônia.

**Santarém, Pará
Outubro, 2015**

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho ao meu pai,
Nélio Wilson de Menezes Bezerra,
in memoriam.

AGRADECIMENTOS

Às instituições de fomento que possibilitaram o desenvolvimento desta pesquisa: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Fundação Amazônia Paraense de Amparo à Pesquisa (FAPESPA), Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP) e Universidade Federal do Oeste do Pará (UFOPA).

À minha orientadora, Prof^a Dr^a **Rosa Helena Veras Mourão**, meus sinceros agradecimentos pelos valiosos ensinamentos e pela confiança que sempre depositou em mim no decorrer desses 6 anos de orientação. Seu exemplo de pesquisadora foi fundamental para o meu crescimento como estudante, *muito obrigada!*

Ao professor Dr. **Ricardo Bezerra de Oliveira**, por todas as contribuições e ensinamentos dados durante o meu tempo de estágio no LabBBEx.

À **Comissão de Ética no Uso de Animais da UFOPA**, pela avaliação e contribuições ao projeto inicial.

Ao Prof. Dr. **Claudenir Simões Caires** (UESB), pela identificação da espécie botânica estudada, e à curadora do Herbário HSTM, Laboratório de Botânica - UFOPA, Prof^a Dr^a **Thaís Elias Almeida**, pelo registro e depósito das exsiccatas.

À **comunidade de Alter do chão**, especialmente à **Sra Luzia**, pelas informações sobre o uso de plantas medicinais, incluindo a espécie em estudo.

Ao professor **Rodrigo Fadini**, pela ajuda na coleta e identificação de *Psittacanthus plagiophyllus*.

A todos os **amigos do LabBBEx**, especialmente Juliana Raposo, Laís Massing, Diana Santos, Beatriz Viana, Antônio Júnior, Wânia Cristina, Poliane Lopes, Meive Freire, Amanda Azevedo e Norah Costa, que contribuíram muito para a construção desta pesquisa. *Obrigada!*

Ao meu amor **Rômulo**, por todo o apoio durante as coletas, construção dos seminários e também pelo incentivo durante o curso. Muito obrigada meu amor, serei eternamente grata a você.

À **minha família**: minha mãe Ozeneide, meus irmãos Dane, Leno, Bruno e Gabi e aos meus tios Odenildo, Odicléia, Odilson e Ivonilcy, pelo incentivo de sempre. A vocês meu *muito obrigada!*

A todos os **colegas e professores da turma 2014 do PPGRNA**, pelos ensinamentos, contribuições e conselhos.

À **coordenação** e à **secretaria do PPGRNA**, pelo suporte e orientações que fizeram toda a diferença durante este curso de mestrado.

Aos **animais de laboratório** que foram sacrificados em prol dos experimentos, meu respeito e agradecimento.

A **Deus**, pela vida, saúde, força e perseverança que me concedeu.

EPÍGRAFE

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

Albert Einstein

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	vi
LISTA DE FIGURAS	vii
RESUMO	ix
ABSTRACT	x
1 INTRODUÇÃO GERAL	1
1.1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	2
1.1.1 Plantas Medicinais	2
1.1.2 Controle de qualidade em fitoterápicos	3
1.1.3 Família Loranthaceae e gênero <i>Psittacanthus</i>	6
1.1.4 <i>Psittacanthus plagiophyllus</i> Eichler (Loranthaceae)	8
1.1.5 O processo inflamatório	10
1.1.6 Mediadores inflamatórios	12
2 OBJETIVOS	15
2.1 Geral	15
2.2 Específicos	15
3 MATERIAL E MÉTODOS	16
3.1 Coleta e identificação botânica	16
3.2 Obtenção e caracterização da droga vegetal	16
3.2.1 Análise sensorial e organoléptica	16
3.2.2 Determinação de matéria estranha	16
3.2.3 Determinação do teor de umidade	16
3.2.4 Análise granulométrica	17
3.2.5 Determinação do índice de intumescência	18
3.2.6 Determinação de cinzas totais	18
3.3 Obtenção e padronização do derivado vegetal	18
3.3.1 Testes piloto para escolha do líquido extrator	18

3.3.2	Obtenção do extrato aquoso de <i>P. plagiophyllus</i>	19
3.3.3	Caracterização físico-química do extrato aquoso de <i>P. plagiophyllus</i>	19
3.4	Avaliação da atividade anti-inflamatória <i>in vivo</i>	26
3.4.1	Animais.....	26
3.4.2	Edema de pata induzido por carragenina.....	26
3.4.3	Edema de pata induzido por dextrana	27
3.4.4	Inflamação na bolsa de ar subcutânea	27
3.5	Avaliação da capacidade antioxidante <i>in vitro</i>	30
3.6	Análise estatística	30
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	32
4.1	Caracterização da droga vegetal	32
4.1.1	Análise sensorial e organoléptica	32
4.1.2	Matéria estranha	32
4.1.3	Teor de umidade	32
4.1.4	Distribuição granulométrica	33
4.1.5	Índice de intumescência.....	34
4.1.6	Cinzas totais.....	34
4.1.7	Seleção do líquido extrator	35
4.2	Caracterização físico-química do derivado vegetal (extrato aquoso)	38
4.2.1	Perfil cromatográfico por cromatografia em camada delgada.....	38
4.2.2	Conteúdo de fenois totais, taninos e flavonoides	41
4.2.3	Rendimento, resíduo seco, densidade, pH e viscosidade	42
4.3	Atividade anti-inflamatória <i>in vivo</i> do extrato padronizado de folhas de <i>Psittacanthus plagiophyllus</i>	43
4.3.1	Edema de pata induzido por carragenina e por dextrana.....	43
4.3.2	Inflamação na bolsa de ar subcutânea	47
4.4	Capacidade antioxidante <i>in vitro</i> do extrato padronizado de folhas de <i>Psittacanthus plagiophyllus</i>	50

5	CONCLUSÕES.....	53
6	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	54
7	ANEXOS	69

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** - Distribuição granulométrica da droga vegetal de *Psittacanthus plagiophyllus*.33
- Tabela 2** - Perfil cromatográfico do extrato aquoso liofilizado das folhas de *P. plagiophyllus* (EAPp) por Cromatografia em Camada Delgada.38
- Tabela 3** - Conteúdo de fenois totais, de flavonoides totais e de taninos totais, hidrolisáveis e condensados no extrato aquoso liofilizado de *P. plagiophyllus* (EAPp). Os resultados estão expressos como média±desvio padrão (n=3).....41
- Tabela 4** - Parâmetros físico-químicos do extrato aquoso seco e ressuspendido das folhas de *Psittacanthus plagiophyllus* (EAPp). Os resultados estão expressos como média±desvio padrão de três determinações.....42
- Tabela 5** - Capacidade antioxidante do EAPp e do trolox pelo método de sequestro do radical livre DPPH. Os resultados estão expressos como média±desvio padrão (n=3).51

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - *Psittacanthus plagiophyllus* Eichl. na savana de Alter do Chão, Santarém, Pará, Brasil. a) planta jovem; b) *P. plagiophyllus* florida; c) inflorescência; d) infrutescência. Fotos: Adrielle Bezerra. a - c: maio de 2014; d: setembro de 2014. Em todas as imagens a escala indicada corresponde a 5 cm. 9

Figura 2 - Concentração de fenois totais nas folhas secas pulverizadas (droga vegetal) de *Psittacanthus plagiophyllus* submetidas à extração por diferentes solventes - água e soluções hidroalcoólicas em diferentes concentrações. Os resultados foram calculados a partir de uma curva padrão de ácido tânico ($R^2 = 0,9984$) e estão expressos em gramas de equivalentes de ácido tânico (EAT) por 100 gramas de droga vegetal. As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,01$). 35

Figura 3 - Concentração de taninos totais nas folhas secas pulverizadas (droga vegetal) de *Psittacanthus plagiophyllus* submetidas à extração por diferentes solventes - água e soluções hidroalcoólicas em diferentes concentrações. Os resultados foram calculados a partir de uma curva padrão de ácido tânico ($R^2 = 0,9925$) e estão expressos em gramas de equivalentes de ácido tânico (EAT) por 100 gramas de droga vegetal. As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,01$). 36

Figura 4 - Concentração de flavonoides totais nas folhas secas pulverizadas (droga vegetal) de *Psittacanthus plagiophyllus* submetidas à extração por diferentes solventes - água e soluções hidroalcoólicas em diferentes concentrações. Os resultados foram calculados a partir de uma curva padrão de rutina ($R^2 = 0,9942$) e estão expressos em gramas de equivalentes de rutina (ER) por 100 gramas de droga vegetal. As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,01$). 37

Figura 5 - Efeito da administração oral do EAPp - extrato aquoso de folhas de *Psittacanthus plagiophyllus* (250, 500 e 1000 mg/Kg) e da indometacina (10 mg/Kg) no volume do edema de pata induzido por carragenina em ratos. Cada ponto representa a média (n=6) do volume do edema e as barras representam o erro padrão da média. ** indica diferença significativa ($p < 0,01$) entre os grupos tratados e o controle negativo (NaCl 0,9%) pelo teste de Dunnett. . 44

Figura 6 - Efeito da administração oral do EAPp - extrato aquoso de folhas de *Psittacanthus plagiophyllus* (250, 500 e 1000 mg/Kg) e da dexametasona (1 mg/Kg) no volume do edema de pata induzido por dextrana em ratos. Cada ponto representa a média (n=6) do volume do edema e as barras representam o erro padrão da média. ** indica diferença significativa ($p < 0,01$) entre os grupos tratados e o controle negativo (NaCl 0,9%) pelo teste de Dunnett. . 45

Figura 7 - Efeito da administração oral do EAPp - extrato aquoso de folhas de *Psittacanthus plagiophyllus* (250, 500 e 1000 mg/Kg) e da dexametasona (1 mg/Kg) no número total de leucócitos do lavado da bolsa de ar subcutânea de camundongos com inflamação induzida por carragenina. O grupo Naïve recebeu por via oral apenas o veículo (água) e injeção subcutânea de PBS estéril na bolsa. Cada coluna representa a média (n=6) do número de leucócitos e as barras representam o erro padrão da média. ** indica diferença significativa ($p < 0,01$) entre os grupos tratados e o controle negativo (água) pelo teste de Dunnett. 48

Figura 8 - Efeito da administração oral do EAPp - extrato aquoso de folhas de *Psittacanthus plagiophyllus* (250, 500 e 1000 mg/Kg) e da dexametasona (1 mg/Kg) no número de neutrófilos recrutados para a bolsa de ar subcutânea de camundongos com inflamação induzida por carragenina. O grupo Naïve recebeu por via oral apenas o veículo (água) e injeção subcutânea de PBS estéril na bolsa. Cada coluna representa a média (n=6) do número de neutrófilos e as barras representam o erro padrão da média. ** indica diferença significativa ($p<0,01$) entre os grupos tratados e o controle negativo pelo teste de Dunnett...48

Figura 9 - Efeito da administração oral do EAPp - Extrato Aquoso de folhas de *Psittacanthus plagiophyllus* (250, 500 e 1000 mg/Kg) e da dexametasona (1 mg/Kg) na exsudação em resposta à inflamação induzida por carragenina, avaliada por meio da concentração de proteínas totais na bolsa de ar subcutânea. O grupo Naïve recebeu por via oral apenas o veículo (água) e injeção subcutânea de PBS estéril na bolsa. A determinação da concentração de proteínas foi realizada por reação de Bradford, a partir de uma curva padrão de albumina sérica bovina, por meio da equação da reta $y = 0,0102x + 0,301$ ($R^2 = 0,9942$). Cada coluna representa a média (n=6) da concentração de proteínas e as barras representam o erro padrão da média. ** indica diferença significativa ($p<0,01$) entre os grupos tratados e o controle negativo (água) pelo teste de Dunnett.49

BEZERRA, Adrielle Nara Serra. **Padronização e atividade anti-inflamatória do extrato aquoso de *Psittacanthus plagiophyllus* Eichl. (Loranthaceae)**. 2015. 70 p. Dissertação de Mestrado em Ciências Ambientais. Área de concentração: Estudos e Manejos de Ecossistemas Amazônicos - Programa de Pós-Graduação em Recursos Naturais da Amazônia. Universidade Federal do Oeste do Pará - UFOPA, Santarém, 2015.

RESUMO

Abundante em cajueiros das áreas de savana do distrito de Alter do Chão, Santarém, Pará, Brasil, a espécie hemiparasita *Psittacanthus plagiophyllus* Eichl. (Loranthaceae), conhecida como erva-de-passarinho, é utilizada popularmente para tratar gastrite e condições inflamatórias diversas. Considerando a ausência de estudos farmacológicos com essa espécie na literatura e a importância da pesquisa de drogas anti-inflamatórias de origem vegetal, o objetivo do presente estudo foi padronizar o extrato obtido de folhas de *P. plagiophyllus* e avaliar seu potencial anti-inflamatório em modelo animal e sua capacidade antioxidante *in vitro*. O controle de qualidade e a padronização do extrato e da droga vegetal de *P. plagiophyllus* foram realizados de acordo com o preconizado pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária, por meio da Farmacopeia Brasileira, 5ª edição. Para obtenção e padronização do extrato de *P. plagiophyllus*, a droga vegetal foi submetida a testes piloto de extração por diferentes proporções de etanol e água, seguidos do doseamento de fenóis totais, taninos e flavonoides, a fim de selecionar o líquido extrator mais adequado para a obtenção de um extrato rico em compostos bioativos. Após a escolha da água como líquido extrator e produção do extrato aquoso de *P. plagiophyllus* (EAPp) a uma temperatura de 70 °C, este foi liofilizado e submetido a testes de caracterização físico-química preconizados pela ANVISA e à determinação do perfil cromatográfico por cromatografia em camada delgada, o qual indicou a presença de taninos hidrolisáveis e condensados, flavonoides e cumarinas. A quantificação dos compostos fenólicos presentes no extrato evidenciou as concentrações de 12,62±0,18% de fenóis totais, 5,39±0,01% de taninos totais, 12,54±0,24% de taninos hidrolisáveis, 8,37±0,32% de taninos condensados e 1,23±0,02% de flavonoides totais. Para a avaliação da atividade anti-inflamatória *in vivo* do EAPp, foi inicialmente empregado o modelo do edema de pata induzido por carragenina e por dextrana em ratos. Nas doses de 500 e 1000 mg/Kg (v.o), o EAPp apresentou ação antiedematogênica significativa ($p<0,01$) nos dois modelos, o que sugere uma possível ação em eventos vasculares e celulares da resposta inflamatória e um efeito supressivo em relação a mediadores responsáveis pela formação do edema. Visando avaliar o efeito do EAPp na exsudação e no recrutamento de leucócitos em resposta à carragenina, foi utilizado o modelo da bolsa de ar subcutânea. Em todas as doses testadas (250, 500 e 1000 mg/Kg (v.o), o EAPp inibiu significativamente ($p<0,01$) a migração de leucócitos totais e de neutrófilos e reduziu a exsudação na bolsa, de forma dose dependente. Além disso, no ensaio de atividade antioxidante do EAPp *in vitro*, pelo método de sequestro do radical livre DPPH, o extrato (75 µg/mL) foi capaz de reduzir em até 93,13±1,71% o radical testado, o que evidencia seu potencial antioxidante. As ações farmacológicas observadas podem estar relacionadas ao elevado teor de compostos fenólicos presentes no EAPp. Esses resultados fornecem evidências científicas para o uso popular de *P. plagiophyllus* no tratamento de desordens inflamatórias.

Palavras-chave: *Psittacanthus plagiophyllus*; erva-de-passarinho; extrato padronizado; controle de qualidade; atividade anti-inflamatória.

BEZERRA, Adrielle Nara Serra. **Padronização e atividade anti-inflamatória do extrato aquoso de *Psittacanthus plagiophyllus* Eichl. (Loranthaceae)**. 2015. 70 p. Dissertação de Mestrado em Ciências Ambientais. Área de concentração: Estudos e Manejos de Ecossistemas Amazônicos - Programa de Pós-Graduação em Recursos Naturais da Amazônia. Universidade Federal do Oeste do Pará - UFOPA, Santarém, 2015.

ABSTRACT

Abundant in cashew trees of savannah áreas of Alter do Chão district, Santarém, Pará, Brasil, the hemiparasitic species *Psittacanthus plagiophyllus* Eichl. (Loranthaceae), known as erva-de-passarinho, is popularly used to treat gastritis and various inflammatory conditions. Considering the absence of pharmacological studies with this species in the literature and the importance of research into antiinflammatory drugs of plant origin, the aim of this study was to standardize the extract obtained of *P. plagiophyllus* leaves and evaluate their antiinflammatory potential in animal model and their *in vitro* antioxidant capacity. Quality control and standardization of extract and plant drug of *P. plagiophyllus* were performed in accordance with the criteria of the National Health Surveillance Agency (ANVISA), through the Brazilian Pharmacopoeia 5th edition. To obtaining and standardization of *P. plagiophyllus* extract, the plant drug was subjected to extraction pilots by different ratios of ethanol and water, followed by determination of total phenols, tannins and flavonoids, in order to select the extractor liquid most suitable to obtain an extract rich in bioactive compounds. After choosing water as extractor liquid and production of aqueous extract of *P. plagiophyllus* (EAPp) at a temperature of 70 °C, this was lyophilized and subjected to tests of physicochemical characterization recommended by ANVISA and the determination of the chromatographic profile for thin layer chromatography, which indicated the presence of hydrolyzable and condensed tannins, flavonoids and coumarins. The quantification of the phenolic compounds present in the extract showed concentrations of 12,62±0,18% of total phenols, 5,39±0,01% of total tannins, 12,54±0,24% of hydrolysable tannins, 8,37±0,32% of condensed tannins and 1,23±0,02% of total flavonoids. To assess the *in vivo* antiinflammatory activity of the EAPp, was first employed the model of carrageenan- and dextran-induced paw edema in rats. At doses of 500 and 1000 mg/Kg (p.o), EAPp showed significant ($p<0,01$) antiedematogenic action in both models, suggesting a possible action on vascular and cellular events of inflammatory response and a suppressive effect on the mediators responsible for the formation of edema. To evaluate the effect of the EAPp on exudation and leukocyte recruitment in response to carrageenan, was used subcutaneous air pouch model. In all doses tested (250, 500 and 1000 mg/kg, p.o), the EAPp inhibited significantly ($p<0,01$) the total leukocytes and neutrophils migration and reduced exudation in the pouch, at a dose dependent manner. Furthermore, in the *in vitro* antioxidant activity test by free radical DPPH sequestration method, the EAPp (75 µg/mL) was able to reduce up to 93,13±1,71% the tested radical, which highlights its high antioxidant potential. The observed pharmacological actions may be related to the high content of phenolic compounds in EAPp. These results provide scientific evidence for the popular use of *P. plagiophyllus* in the treatment of inflammatory disorders.

Keywords: *Psittacanthus plagiophyllus*; mistletoe; standardized extract; quality control; antiinflammatory activity.

1 INTRODUÇÃO GERAL

A utilização de plantas como recurso para a cura e a prevenção de doenças é uma prática que acompanha a história da humanidade. A partir de sua caracterização química, no século 19, os compostos bioativos derivados de plantas têm alimentado continuamente o desenvolvimento de novos medicamentos (FÜRST e ZÜNDORF, 2014). O Brasil é um dos países mais biodiversos do mundo e, no que concerne a plantas medicinais, já tem mais de 100 mil espécies catalogadas, o que representa um grande potencial para a descoberta de moléculas com importância farmacológica. Esta rica biodiversidade é acompanhada por uma longa aceitação do uso de plantas medicinais e conhecimento tradicional associado. No entanto, a maior parte destas plantas nunca teve sua ação terapêutica estudada cientificamente (CARVALHO, 2011; CARVALHO *et al.*, 2014).

Um dos grandes desafios da pesquisa com plantas medicinais é a dificuldade de padronização e controle de qualidade dos fitoterápicos. A padronização é um processo dinâmico que requer a participação de vários ramos da ciência, incluindo a botânica, a fisiologia vegetal, a farmacologia, a farmacognosia, a bioquímica, a toxicologia e a biotecnologia. Além disso, todas as etapas de produção da droga merecem atenção especial, para que estejam garantidas sua qualidade, segurança e reprodutibilidade (CHAWLA *et al.*, 2013).

Dentre as espécies vegetais nativas do Brasil com potencial terapêutico ainda não estudado, encontra-se a *Psittacanthus plagiophyllus* Eichl. (erva-de-passarinho), que pertence à família botânica Loranthaceae. Esta erva-de-passarinho é utilizada popularmente na vila de Alter do Chão, Santarém, Pará, Brasil, para combater desordens inflamatórias em geral e problemas estomacais, como gastrite e úlceras.

A partir das informações acerca do uso tradicional de *P. plagiophyllus*, foram realizados pelo nosso grupo de pesquisa (Bioprospecção de Recursos Naturais da Amazônia - BIRNA), alguns estudos fitoquímicos e farmacológicos preliminares com os extratos desta espécie (dados não publicados), que evidenciaram, entre outros, o seu potencial anti-inflamatório em modelo animal.

Assim, diante do elevado potencial anti-inflamatório apresentado previamente por *P. plagiophyllus* e do seu uso popular, objetivou-se com este estudo padronizar o extrato obtido das folhas desta espécie, no intuito de assegurar a uniformidade de sua composição química e, conseqüentemente, a constância de sua ação farmacológica, além de elucidar, ao menos em parte, os mecanismos envolvidos em sua ação anti-inflamatória.

1.1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1.1 Plantas Medicinais

Planta medicinal é qualquer espécie vegetal utilizada com propósitos terapêuticos (BRASIL, 2014 a). O tratamento das enfermidades humanas a partir de plantas medicinais, ou de seus derivados, é considerado uma das primeiras formas de cuidado à saúde utilizadas pelo homem e está relacionado aos primórdios da medicina. Ao longo dos séculos, os produtos de origem vegetal constituíram as bases para o tratamento de diversas doenças, seja de forma tradicional, baseado no conhecimento passado de geração a geração, ou pela utilização de espécies vegetais como fonte de moléculas ativas para o desenvolvimento de novos medicamentos (KUNLE *et al.*, 2012; CHAWLA *et al.*, 2013).

Não obstante a medicina moderna estar bem desenvolvida na maioria dos países, estima-se que cerca de 80% da população mundial dependa da medicina tradicional na atenção primária à saúde (KUNLE *et al.*, 2012). A crescente expansão na utilização de medicamentos de origem natural, em especial dos derivados de plantas, deve-se a uma série de fatores, tais como os efeitos colaterais causados pelo uso de medicamentos de origem sintética, a preferência por tratamentos “naturais”, as dificuldades de acesso aos medicamentos de origem sintética, o difícil tratamento de certas doenças, além da crença popular de que os medicamentos de origem natural são inofensivos (PANDEY e TRIPATHI, 2014).

No estudo das plantas medicinais é fundamental o conhecimento e a distinção dos diversos termos relacionados, estabelecidos principalmente pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), e que muitas vezes são utilizados equivocadamente, como os conceitos de droga vegetal, matéria-prima vegetal, derivado vegetal e fitoterápico, dentre outros.

De acordo com a RDC nº 26, de 13 de maio de 2014, da ANVISA, a **droga vegetal** consiste na planta medicinal ou partes dela que contenham as substâncias responsáveis pela ação terapêutica, após os processos de coleta ou colheita, estabilização (quando aplicável) e secagem. Já o termo **derivado vegetal**, é utilizado para designar o produto proveniente da extração da planta medicinal fresca ou da droga vegetal, que contenha as substâncias responsáveis pela ação terapêutica. Pode ser obtido em diversas formas, sendo as principais delas os extratos, os óleos fixos, os óleos voláteis, as ceras e os exsudatos. A **matéria-prima**

vegetal, por sua vez, pode compreender tanto a planta medicinal fresca, como a droga ou o derivado vegetal (BRASIL, 2014 a).

Dentre os derivados vegetais mais comuns, estão os **extratos vegetais**, que consistem em preparações obtidas a partir de material vegetal por meio de métodos apropriados e validados, como a percolação, a maceração e a decocção, utilizando como solventes álcool etílico, água ou outros solventes adequados. Podem apresentar consistência fluida, sólida ou intermediária. Os extratos vegetais secos são aqueles obtidos por eliminação do solvente utilizado na sua preparação (BRASIL, 2010) e são empregados como produtos finais e intermediários na obtenção de diferentes formas farmacêuticas, por serem preparações em geral duas a seis vezes mais potentes do que as drogas que os originaram. A grande vantagem destes extratos é proporcionar a ação farmacológica da planta com pequenas quantidades e em uma forma física estável e conveniente (COSTA *et al.*, 2009).

Outro conceito importante é o de **fitoterápicos**, que segundo a ANVISA, são qualquer produto obtido de planta medicinal, utilizado com fins curativos ou paliativos, seja ele manipulado, industrializado ou produzido de maneira caseira. É importante ressaltar que os fitoterápicos só podem ser constituídos de insumos farmacêuticos ativos vegetais (IFAV), ou seja, matérias-primas ativas vegetais, que podem ser tanto a droga vegetal como um derivado vegetal (BRASIL, 2014 a, b).

1.1.2 Controle de qualidade em fitoterápicos

Os fitoterápicos, assim como qualquer outro tipo de medicamento, podem causar danos à saúde caso sejam utilizados de maneira indevida. É completamente equivocada, portanto, a ideia de que “o que é natural não faz mal”. Qualquer medicamento, seja de origem natural ou não, deve preencher requisitos básicos de qualidade que garantam a eficácia e a segurança de seu uso (KALYANKAR *et al.*, 2014).

No Brasil, durante muito tempo, os fitoterápicos foram negligenciados, resultando em produtos pouco confiáveis e sem atualização técnica. Somente a partir da década de 90 do século passado, começou a haver maior rigor por parte dos órgãos oficiais em relação à produção de fitoterápicos, com normatizações exclusivas para este fim. Atualmente, pela legislação brasileira, fitoterápico é considerado medicamento e, como tal, deve ser assegurada a qualidade suficiente para que a eficácia e a segurança de seu uso sejam fatores controlados e constantes (BORELLA e CARVALHO, 2011; HENRIQUE *et al.*, 2014).

Para Kalyankar *et al.*, (2014), a análise da qualidade de drogas de origem vegetal deve basear-se em três princípios: **identidade** - a certeza de tratar-se de determinada espécie;

conteúdo - a quantidade de princípios ativos presentes dentro do limite definido; e **pureza** - a condição de ser livre de contaminantes ou adulterantes. As metodologias empregadas nos procedimentos de controle de qualidade devem estar presentes em farmacopeias reconhecidas ou ser validados.

O controle de qualidade de um fitoterápico inicia-se com a identificação botânica correta da planta medicinal utilizada, passando pelas condições adequadas de cultivo, coleta/colheita e secagem, até a obtenção do derivado vegetal. As variações climáticas, as características do solo, a época de coleta ou colheita, a temperatura e o método de secagem, as condições de armazenamento, o método e os solventes empregados na extração são alguns dos principais fatores que influenciam na qualidade final da droga vegetal e de seus derivados (GARG *et al.*, 2012; KUNLE *et al.*, 2012; CHAWLA *et al.*, 2013; MARTINS *et al.*, 2014).

Além disso, muitos problemas que não se aplicam aos medicamentos de origem sintética podem influenciar a qualidade dos medicamentos à base de plantas, o que torna mais difícil o controle de qualidade das drogas e derivados vegetais. Não bastasse a grande variabilidade natural apresentada pelas plantas em decorrência de interações ambientais, a fonte e a qualidade da matéria prima muitas vezes são inconsistentes, os princípios ativos são desconhecidos, além do que os fitoterápicos geralmente consistem em combinações complexas de vários constituintes (BELE e KHALE, 2011; CHAWLA *et al.*, 2013; KALYANKAR *et al.*, 2014).

A qualidade da matéria-prima não garante a eficácia, a segurança e a qualidade final do produto, mas é fator determinante da mesma. O atendimento às exigências de qualidade para a matéria-prima, atrelado ao controle do processo de produção do fitoterápico, assegura, em grande parte, a qualidade do produto final. No que concerne a drogas vegetais, os principais procedimentos de controle de qualidade recomendados pela ANVISA são a determinação da umidade, do índice de intumescência, de cinzas, do teor de matéria estranha e da granulometria. Em relação ao controle de qualidade dos derivados vegetais, a ANVISA, da mesma forma, exige a realização de uma série de ensaios de caracterização físico-química. Os principais testes preconizados são a análise do pH, da densidade relativa, do resíduo seco e da viscosidade (BRASIL, 2014 b).

Outros procedimentos de controle de qualidade são as análises qualitativas e quantitativas de marcadores químicos, impurezas, falsificações e contaminantes microbiológicos, obedecendo aos parâmetros de qualidade para fins farmacêuticos estabelecidos nas Farmacopeias, Códigos Oficiais e/ou publicações científicas (MICHELIN *et al.*, 2010; PATRA *et al.*, 2010; GARG *et al.*, 2012; CHAWLA *et al.*, 2013).

Atualmente, a regra tem sido a utilização de extratos padronizados, os quais consistem em extratos de alta qualidade que contêm níveis relativamente constantes de compostos especificados e que são sujeitos a um controle de qualidade bastante rigoroso em todas as fases de produção, desde o cultivo até a obtenção do produto final. Assim, a padronização de um extrato compreende não somente o ajuste e a quantificação do teor de um ou mais de seus constituintes químicos, mas também a confirmação da identificação botânica, a observância das boas práticas de cultivo, fabricação e a realização dos ensaios de caracterização físico-química preconizados pelas farmacopeias reconhecidas (KUNLE *et al.*, 2012).

De acordo com Kunle *et al.*, (2012), a padronização de um extrato pode ocorrer de duas formas. Um dos métodos consiste em concentrar um constituinte ou um grupo de constituintes conhecido como responsável pela atividade farmacológica da planta, que muitas vezes é mais eficaz do que a planta inteira. A outra forma de padronização é baseada na presença de certo percentual de compostos marcadores que não são indicadores da atividade terapêutica do fitoterápico.

A vantagem da padronização é conferir ao fitoterápico qualidade, eficácia e confiabilidade, a partir da uniformidade e da maior estabilidade dos seus princípios ativos, além de possibilitar um melhor rendimento do processo extrativo. Porém, não se trata de um procedimento simples, visto que uma série de fatores bióticos e abióticos interferem nos teores dos compostos bioativos e, conseqüentemente, na qualidade e estabilidade do produto final (GARG *et al.*, 2012).

No Brasil há uma série de fitoterápicos comercializados que compreendem extratos padronizados, tais como os extratos de *Passiflora incarnata* L. e de *Calendula officinalis* L., padronizados em flavonoides totais (BORELLA e CARVALHO, 2011; ZILLOTTO *et al.*, 2012), o de *Maytenus ilicifolia* (Schrad.) Planch., padronizado em taninos (SILVA *et al.*, 2012), os extratos de *Mikania glomerata* Sprengel e *Mikania laevigata* Sch. Bip. ex Baker, padronizados em cumarina (ALVARENGA *et al.*, 2009) e o extrato de *Ginkgo biloba* L., padronizado em ginkgoflavonoides e terpenoides (MOSCHEN *et al.*, 2013).

Com isso, fica evidente a importância da produção de extratos vegetais padronizados para a pesquisa farmacológica e fitoquímica de plantas medicinais. Dentre as inúmeras famílias botânicas com grande potencial terapêutico, muito pouco estudada no que concerne ao controle de qualidade, encontra-se Loranthaceae Juss., frequentemente citada em levantamentos etnomedicinais no mundo inteiro, na qual se inclui a espécie foco deste trabalho (PATEL e PANDA, 2014).

1.1.3 Família Loranthaceae e gênero *Psittacanthus*

A espécie *Psittacanthus plagiophyllus* Eichl., estudada neste trabalho, pertence à família monofilética Loranthaceae, a qual compreende plantas hemiparasitas aéreas de ervas e arbustos. O termo “hemiparasita” designa plantas que absorvem água e sais minerais diretamente do caule ou ramos de seus hospedeiros, mas são capazes de realizar fotossíntese, metabolizando as substâncias orgânicas necessárias para o seu desenvolvimento, diferentemente das plantas denominadas “holoparasitas”, as quais não realizam fotossíntese, retirando da planta hospedeira todos os nutrientes que necessitam (NICKRENT *et al.*, 2010; ARRUDA *et al.*, 2012).

As plantas da família Loranthaceae, e de outras da ordem Santalales, são em geral conhecidas no Brasil como ervas-de-passarinho, por serem dispersas principalmente por pássaros, que se alimentam de seus frutos e regurgitam ou defecam as suas sementes sobre a planta hospedeira. Ao caírem sobre os galhos de uma planta, as sementes das ervas-de-passarinho fixam-se devido à presença de uma substância denominada viscina, e quando o embrião germina, emite uma radícula que se transforma em haustório, o qual penetra na casca do hospedeiro, alcançando o xilema para retirar a seiva bruta (VIDAL-RUSSELL e NICKRENT, 2008).

A despeito de as hemiparasitas em geral retirarem apenas água e sais minerais de seu hospedeiro, sua presença pode causar danos à reprodução das plantas. Elas podem prejudicar a quantidade e a qualidade dos frutos produzidos e ocasionar diminuição no crescimento, podendo levar à morte do vegetal hospedeiro. Entretanto, são importantes elementos de comunidades vegetais, pois atuam como recurso-chave para polinizadores, consumidores secundários e dispersores de sementes (ARRUDA *et al.*, 2012; WATSON e HERRING, 2012).

Ademais, muitas espécies pertencentes à família Loranthaceae são detentoras de propriedades terapêuticas. Elas apresentam amplo uso popular no mundo inteiro (ALONSO-CASTRO *et al.*, 2011; FREIRE *et al.*, 2011; SCARPA e MONTANI, 2011; WONG e KADIR, 2011; PATIL *et al.*, 2011; NUMAN, 2012; ADESINA *et al.*, 2013; ATEWOLARA-ODULE e AIYELAAGBE, 2013; PATEL e PANDA, 2014) e prospecções fitoquímicas com seus extratos já revelaram a presença de muitos metabólitos com importância farmacológica, como flavonoides, taninos (WALY *et al.*, 2012), terpenoides (LEITÃO *et al.*, 2013), antraquinonas e alcaloides (OGBOLE *et al.*, 2013).

Ensaios farmacológicos já comprovaram em espécies dessa família uma gama de atividades, como antimicrobiana (ATEWOLARA-ODULE e AIYELAAGBE, 2013;

PUNEETHA *et al.*, 2014), antidiabética (TARFA *et al.*, 2012), anti-hipertensiva (OUEDRAOGO *et al.*, 2011), antitumoral (ALONSO-CASTRO *et al.*, 2011; NUMAN, 2012), antioxidante, neuroprotetora (WONG e KADIR, 2011; WONG *et al.*, 2012), anti-inflamatória (PATIL *et al.*, 2011), analgésica (MOTHANA *et al.*, 2013) e gastroprotetora (FREIRE *et al.*, 2011).

Dentre as Loranthaceae ocorrentes no Brasil, o gênero *Psittacanthus* Mart. é o segundo mais representativo, com 42 espécies distribuídas nos mais variados domínios fitogeográficos brasileiros (ARRUDA *et al.*, 2012), e também apresenta espécies promissoras para a farmacologia. Em diversos levantamentos etnobotânicos realizados, espécies pertencentes ao gênero *Psittacanthus* são citadas como detentoras de propriedades medicinais, algumas já comprovadas cientificamente e relacionadas à presença de importantes classes de princípios ativos em seus extratos. Não obstante *Psittacanthus* apresentar grande potencial terapêutico, estudos farmacológicos com este gênero são escassos. A maior parte dos trabalhos existentes concentra-se na erva-de-passarinho *Psittacanthus calyculatus* (DC.) G. Don, muito utilizada na medicina tradicional mexicana.

Psittacanthus calyculatus é utilizada popularmente sobretudo para o tratamento de hipertensão, cicatrização de feridas, como agente purgante e como hipoglicemiante. Já foram comprovados cientificamente em estudos pré-clínicos *in vivo* e *in vitro*, seus efeitos hipoglicemiante (AVILA-ACEVEDO *et al.*, 2012), vasodilatador (IBARRA-ALVARADO *et al.*, 2010) e citotóxico/antitumoral (ALONSO-CASTRO *et al.*, 2011), dentre outros.

Outras hemiparasitas pertencentes ao gênero *Psittacanthus* também têm sido alvo de estudos farmacológicos preliminares. Os extratos aquoso e hidroalcolico de *Psittacanthus acinarius* (Mart.) Mart. mostraram significativo potencial antioxidante e antidiabético (RODRÍGUEZ *et al.*, 2008). As frações butanólica e aquosa obtidas a partir do extrato etanólico das folhas da espécie *Psittacanthus cucullaris* (Lam.) Blume também exibiram alto poder antioxidante (MARÍN-CANCHALA *et al.* 2013). Já os extratos aquosos, obtidos por infusão e por decocção, e a tintura de *Psittacanthus cuneifolius* (Ruiz e Pav.) apresentaram atividade antibacteriana comparável à de fármacos comerciais (SOBERÓN *et al.*, 2006).

No entanto, há várias espécies de ervas-de-passarinho do gênero *Psittacanthus* citadas em estudos etnomedicinais que ainda não foram alvo de pesquisas farmacológicas. *Psittacanthus americanus* (L.) Mart., por exemplo, é conhecida na medicina tradicional maia para o tratamento de sintomas de câncer, como abscessos (CAMAL-FUENTES *et al.*, 2011). Já *Psittacanthus cordatus* (Hoffmanns. ex Schult. f.) Blume. é bastante indicada na Argentina para o tratamento de hipertensão e fraturas (SCARPA e MONTANI, 2011).

Como contribuição aos estudos fitoquímicos e farmacológicos com as ervas-de-passarinho do gênero *Psittacanthus*, neste trabalho a espécie estudada foi a *Psittacanthus plagiophyllus* Eichl., a qual ainda não dispõe de estudos na literatura que evidenciem experimentalmente as suas ações terapêuticas, apesar de ter seu uso indicado na medicina popular de Santarém, Pará, Brasil.

1.1.4 *Psittacanthus plagiophyllus* Eichler (Loranthaceae)

Psittacanthus plagiophyllus (**Figura 1**) é nativa do Brasil, apesar de não ser endêmica, e ocorre nas regiões Norte (Roraima, Amapá, Pará, Amazonas e Rondônia) e Nordeste (Piauí), nos domínios fitogeográficos da Amazônia e do Cerrado (CAIRES e DETTKE, 2010). A seguir, a classificação da espécie segundo APG III (2009) e NICKRENT *et al.*, (2010):

- Angiospermas
- Clado das Eudicotiledôneas
- Ordem: Santalales
- Família: Loranthaceae Juss.
- Tribo: Psittacanthae Horan.
- Subtribo: Psittacanthinae Engl.
- Gênero: *Psittacanthus* Mart.
- Espécie: *P. plagiophyllus* Eichl.

Nas áreas de savana localizadas no distrito de Alter do Chão, Santarém, Pará, Brasil, o único hospedeiro de *P. plagiophyllus* é o cajueiro *Anacardium occidentale*. A distribuição desta erva-de-passarinho nos cajueiros segue um padrão agregado, onde poucos hospedeiros apresentam muitas hemiparasitas, enquanto a maioria das árvores possui pouca ou nenhuma infecção (FADINI *et al.*, 2009; FADINI, 2011).

Psittacanthus plagiophyllus produz frutos a partir de meados de junho até o início de outubro. Os frutos maduros possuem um visco pegajoso aderido à semente e são localmente consumidos e dispersos principalmente por um pequeno pássaro da família Tyrannidae, a guaracava-de-topete-uniforme (*Elaenia cristata*), que regurgita as sementes intactas, as quais, caso sejam depositadas no cajueiro, germinam entre 1 e 3 meses após a dispersão (FADINI *et al.*, 2009; FADINI, 2011).

Não há na literatura estudos farmacológicos, toxicológicos ou fitoquímicos envolvendo *P. plagiophyllus*. Porém, esta erva-de-passarinho é utilizada popularmente na vila de Alter do Chão, Santarém, Pará, Brasil, para combater inflamações em geral e problemas

estomacais, como gastrite e úlceras. A população normalmente faz uso do decocto ou do infuso preparados a partir de suas folhas (Comunicação Pessoal)¹.

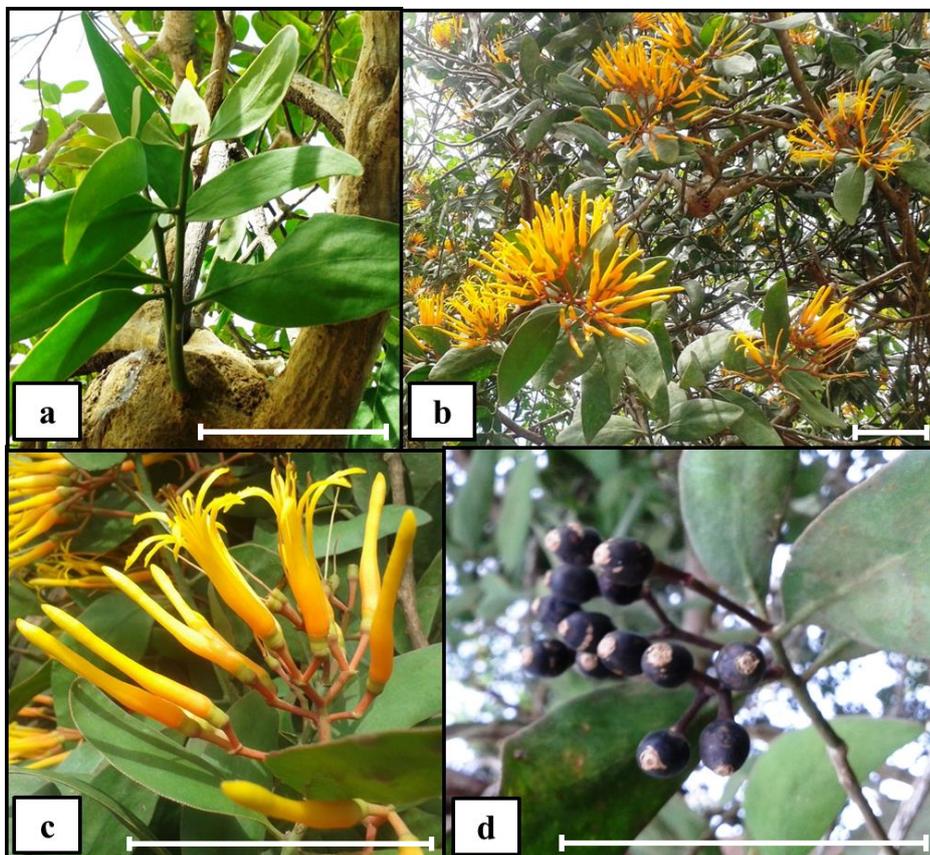


Figura 1 - *Psittacanthus plagiophyllus* Eichl. na savana de Alter do Chão, Santarém, Pará, Brasil. a) planta jovem; b) *P. plagiophyllus* florida; c) inflorescência; d) infrutescência. Fotos: Adrielle Bezerra. a - c: maio de 2014; d: setembro de 2014. Em todas as imagens a escala indicada corresponde a 5 cm.

Com base nos estudos de Efuntoyee *et al.*, (2010) e de Hu *et al.*, (2011), que evidenciaram a influência do hospedeiro nas propriedades farmacológicas de algumas ervas-de-passarinho, faz-se mister mencionar que o cajueiro *A. occidentale*, hospedeiro local de *P. plagiophyllus*, possui, entre outras, atividades anti-inflamatória e gastroprotetora comprovadas em ensaios pré-clínicos (MORAIS, 2010; SANTOS, 2011). Trata-se de mais um caso em que a utilização medicinal de uma erva-de-passarinho pela população é semelhante à de seu hospedeiro.

A utilização popular de *P. plagiophyllus* como recurso terapêutico, aliada ao grande potencial farmacológico apresentado pelas ervas-de-passarinho do gênero *Psittacanthus* e de

¹ Comunicação pessoal de Sr^a Luzia Silva, moradora de Alter do Chão, em 10 de setembro de 2011.

outros gêneros da família Loranthaceae, motivou a realização de alguns estudos preliminares (dados não publicados) por nosso grupo de pesquisa (BIRNA), com extratos obtidos das folhas desta espécie. Os resultados revelaram potencial gastroprotetor e antiedematogênico dos extratos, além da ausência de toxicidade aguda em ratos. Adicionalmente, estudos fitoquímicos qualitativos indicaram em *P. plagiophyllus* a presença de importantes classes de compostos fenólicos nos extratos, como flavonoides, taninos e cumarinas, os quais têm sido associados ao efeito anti-inflamatório apresentado por muitas plantas.

O notável potencial anti-inflamatório apresentado por *P. plagiophyllus* motivou o prosseguimento dos estudos com esta espécie, principalmente no intuito de compreender melhor a ação dos seus extratos na supressão da resposta inflamatória.

1.1.5 O processo inflamatório

Diversos componentes da resposta inflamatória são compartilhados por todos os vertebrados, e algumas formas de resposta adaptativa a condições adversas, como infecção e lesão, estão presentes em todos os animais e plantas. No entanto, a complexidade dos vertebrados e, particularmente, dos mamíferos, exigiu o desenvolvimento de uma capacidade de adaptação e de proteção especializada. Para combater a diversidade de agressões, como infecções bacterianas, virais, parasitárias e lesões teciduais, sofridas ao longo de toda a sua vida, os mamíferos desenvolveram um sistema imune com complexos mecanismos de defesa (MEDZHITOV, 2008; MANSELL e JENKINS, 2013).

A arma primária deste arsenal, que permite responder rapidamente a eventos microbianos e não microbianos e restaurar a homeostase tecidual, é a inflamação. Porém, a despeito deste papel crucial na fisiologia dos mamíferos, a resposta inflamatória possui um potencial patológico inédito para um processo fisiológico. Embora a capacidade destrutiva da inflamação induzida por infecções seja compreensivelmente inevitável, a capacidade patogênica de outros tipos de inflamação é muito pouco compreendida (MEDZHITOV, 2008).

O processo inflamatório é extremamente complexo. Consiste em um evento intrinsecamente benéfico, desencadeado, em geral, por estímulos nocivos, tais como infecção e lesão tecidual, que ocorre de maneira rigorosamente controlada. É importante destacar que muito do que se sabe sobre o processo inflamatório tem como base os mecanismos da inflamação induzida por infecções, principalmente bacterianas, que são mais bem compreendidos do que aqueles de outros processos inflamatórios. Não está bem esclarecido

ainda, até que ponto o conhecimento sobre a inflamação induzida por infecção é aplicável a outros tipos de inflamação (ASHLEY *et al.*, 2012; MANSELL e JENKINS, 2013).

Em linhas gerais, a resposta inflamatória é desencadeada por receptores do sistema imune inato, tais como os receptores do tipo TOLL (TLRs) e os receptores do tipo NOD (NLRs), que fazem o reconhecimento inicial da infecção, mediado por macrófagos residentes e mastócitos. Isto leva à produção de uma variedade de mediadores inflamatórios, incluindo quimiocinas, citocinas, aminas vasoativas, eicosanoides e produtos de cascatas proteolíticas, cujo principal e mais imediato efeito é a formação de um exsudato inflamatório local. Este é composto por proteínas plasmáticas e leucócitos, sobretudo neutrófilos, que deixam os vasos sanguíneos através das vênulas pós-capilares, as quais, ao passo que permitem o extravasamento seletivo dos neutrófilos, impedem a saída de eritrócitos (RICCIOTTI e FITZGERALD, 2011; ASHLEY *et al.*, 2012).

Quando os neutrófilos chegam ao local da infecção ou lesão, são ativados pelo contato direto com os patógenos ou pela ação de citocinas secretadas por células residentes, e liberam o conteúdo tóxico de seus grânulos, incluindo espécies reativas de oxigênio, espécies reativas de nitrogênio, proteinase 3, catepsina G e elastase, na tentativa de matar os agentes invasores. Porém, esses efetores altamente potentes não são capazes de diferenciar os alvos microbianos e as células do hospedeiro, ocasionando, inevitavelmente, danos ao tecido. Todo este processo é responsável pelos clássicos sinais cardinais da inflamação aguda: rubor (vermelhidão), calor (aumento da temperatura), tumor (edema) e dor (MEDZHITOV, 2008; RICCIOTTI e FITZGERALD, 2011).

Tão relevante quanto o início do processo inflamatório é o seu término, pois é crucial que a reação inflamatória não seja maximizada e que outros danos tissulares não sejam desencadeados. Uma resposta inflamatória aguda bem sucedida resulta na eliminação dos agentes infecciosos, seguida por uma fase de resolução e de reparação, a qual é mediada principalmente por macrófagos residentes e recrutados. Assim, a resolução da inflamação consiste em um processo endógeno ativo, que protege o hospedeiro de uma resposta inflamatória exacerbada (BARBALHO *et al.*, 2011; SORDI *et al.*, 2012; MOHAMMED *et al.*, 2014).

Para que esta transição da inflamação para a reparação aconteça, é primordial que ocorra uma mudança nos mediadores lipídicos de prostaglandinas para lipoxinas, compostos anti-inflamatórios que atuam ativamente na resolução da inflamação, por inibirem o recrutamento de neutrófilos, ao mesmo tempo em que promovem a migração de monócitos para o local lesado, os quais agem removendo células mortas e iniciando o processo de

reestruturação tecidual. As lipoxinas ainda ativam a fagocitose de microorganismos e de células apoptóticas por macrófagos. Também desempenham um papel fundamental na resolução da inflamação e na iniciação do reparo tecidual, as resolvinas e as protectinas, que constituem outra classe de mediadores lipídicos, bem como o fator de crescimento transformante- β e os fatores de crescimento produzidos por macrófagos (BARBALHO *et al.*, 2011; SORDI *et al.*, 2012; LEVY e SERHAN, 2014).

Caso a resposta inflamatória aguda falhe em eliminar o agente patogênico, o processo inflamatório irá persistir, adquirindo características novas, como a substituição dos neutrófilos por macrófagos e, no caso de infecção, também por células T. Porém, se os efeitos combinados destas células não forem suficientes, um estado inflamatório crônico será instalado, o que envolve a formação de granulomas e de tecidos linfoides terciários. Os granulomas podem ser formados por camadas de macrófagos “emparedando” o agente invasor, como uma última tentativa de proteger o hospedeiro, caso a tentativa de destruição dos patógenos ou corpos estranhos fracasse. Além da persistência dos patógenos, a inflamação crônica pode ainda resultar de outras causas de dano tecidual, como a resposta autoimune (devido à persistência de auto-antígenos) ou corpos estranhos não-degradáveis (MEDZHITOV, 2008; MOHAMMED *et al.*, 2014).

Os eventos que conduzem à inflamação crônica localizada são em parte esclarecidos, especialmente no que tange às doenças autoimunes e às infecções crônicas. Os mecanismos e as causas de estados inflamatórios crônicos sistêmicos, no entanto, ainda são mal compreendidos, mas está claro que eles não parecem se encaixar no padrão clássico de transição da inflamação aguda para a inflamação crônica. Esses estados inflamatórios crônicos sistêmicos, que ocorrem nas doenças cardiovasculares e no diabetes tipo 2, entre outras, não parecem ser causados pelos indutores clássicos da inflamação (infecção e lesão), mas sim pelo funcionamento inadequado do tecido, ou seja, pelo desequilíbrio homeostático de um dos muitos sistemas fisiológicos, não relacionados funcionalmente, de forma direta, com a defesa do hospedeiro ou a com reparação tecidual (MEDZHITOV, 2008; RICCIOTTI e FITZGERALD, 2011; SORDI *et al.*, 2012; LEVY e SERHAN, 2014).

1.1.6 Mediadores inflamatórios

Conforme já mencionado, os indutores da inflamação levam à produção e liberação de uma série de mediadores inflamatórios, que por sua vez são responsáveis por alterações na funcionalidade de muitos tecidos e órgãos. Tais mediadores são derivados de proteínas do plasma ou secretados por células e podem agir tanto nas alterações vasculares quanto no

recrutamento de leucócitos. Com base em suas propriedades bioquímicas, é possível classificá-los em sete grupos: aminas vasoativas, peptídeos vasoativos, fragmentos de componentes do complemento, mediadores lipídicos, citocinas, quimiocinas e enzimas proteolíticas (MEDZHITOV, 2008; CRUVINEL *et al.*, 2010).

As **aminas vasoativas** (histamina e serotonina), liberadas principalmente por mastócitos e plaquetas, são responsáveis pelo aumento imediato da permeabilidade vascular e pela vasodilatação durante a resposta inflamatória (CRIADO *et al.*, 2010; QIN *et al.*, 2013). De forma similar agem os **peptídeos vasoativos**, como a bradicinina, que medeia o aumento do fluxo sanguíneo e da permeabilidade vascular, a broncoconstrição e a estimulação de receptores algésicos, e os neuropeptídios, tais como a substância P e as neurocininas (CRUVINEL *et al.*, 2010). Já os **fragmentos de componentes do complemento**, C3a, C4a e C5a, também denominados anafilatoxinas, agem no processo inflamatório ao promoverem o recrutamento de monócitos e de granulócitos e induzirem a degranulação de mastócitos, também afetando a vasculatura (RICKLIN e LAMBRIS, 2013). **As enzimas proteolíticas**, incluindo a elastina, as catepsinas e as metaloproteases de matriz, por sua vez, também possuem diversos papéis na inflamação, atuando na defesa do hospedeiro, na reestruturação tecidual e na migração de leucócitos (MEDZHITOV, 2008).

Faz-se mister mencionar também, outro potente vasodilatador, o **óxido nítrico**, uma molécula sinalizadora solúvel que desempenha um papel chave na patogênese da inflamação, atuando como agente pró-inflamatório, quando em níveis aumentados, em determinadas desordens inflamatórias pulmonares, intestinais e das articulações. Praticamente todas as células humanas têm a capacidade de produzir óxido nítrico a partir do aminoácido L-arginina, uma reação mediada pela enzima óxido nítrico sintetase (NOS). Esta enzima existe em 3 isoformas, sendo duas constitutivas e uma cuja síntese é induzida por estímulos inflamatórios, denominada iNOS. Os inibidores do óxido nítrico representam um avanço terapêutico importante no tratamento das doenças inflamatórias (HANDA *et al.*, 2011; SAMPAIO *et al.*, 2013; CANEBA *et al.*, 2014).

Os **mediadores lipídicos**, como as prostaglandinas, os leucotrienos e o fator de ativação plaquetária, são derivados do ácido araquidônico a partir da ação de fosfolipases. A síntese das prostaglandinas é significativamente aumentada no tecido inflamado, pois elas desempenham funções-chave na geração da resposta inflamatória, como a indução da vasodilatação, da hiperalgesia e da febre (RICCIOTTI e FITZGERALD, 2011).

Por sua vez, as **citocinas** são pequenas proteínas moduladoras produzidas por diversos tipos celulares, principalmente por leucócitos, que regulam uma grande variedade de funções

fisiológicas e patológicas, como a imunidade inata e adaptativa e as respostas inflamatórias. A rede de citocinas é um sistema altamente regulado, que pode suscitar respostas pró- e anti-inflamatórias, dependendo dos níveis de produção, da fonte celular, etc. Essas proteínas, quando liberadas, interagem com receptores celulares transmembrana e produzem o seu efeito biológico, que pode ocorrer de maneira autócrina, parácrina ou endócrina. Cada uma delas possui múltiplas ações (efeito pleiotrópico), podendo agir em sinergismo ou antagonismo. Dentre as principais citocinas pró-inflamatórias estão incluídos o Fator de Necrose Tumoral- α (TNF- α), a Interleucina-1 β e a Interleucina-6 (OLIVEIRA *et al.*, 2011; ASHLEY *et al.*, 2012; VAZQUEZ-LOMBARDI *et al.*, 2013; AVAU *et al.*, 2014; NEURATH, 2014).

Outra grande família de citocinas é a das **quimiocinas**, pequenos polipeptídeos quimiotáticos, que agem como mensageiros intercelulares e são produzidos por vários tipos de células, constitutivamente ou em resposta a estímulos inflamatórios. Os receptores de quimiocinas são expressos em leucócitos, células dendríticas e células de Langerhans, e quando ativados, dão início a uma complexa cascata de sinalização, que gera respostas quimiotáticas, degranulação, liberação de espécies reativas de oxigênio e alteração na afinidade das integrinas presentes na superfície. A interleucina-8 (IL-8), por exemplo, é uma quimiocina presente em níveis elevados no tecido e no líquido sinovial de pacientes com artrite reumatoide e também em várias condições inflamatórias sistêmicas (CRUVINEL *et al.*, 2010; GUERREIRO *et al.*, 2011).

Portanto, com esta revisão ficou bem demonstrado que apesar de o processo inflamatório ser crucial para manutenção da homeostase corporal, em determinadas situações está associado a importantes condições patológicas crônicas, dentre as quais merecem destaque as doenças autoimunes, o diabetes tipo 2, algumas doenças neurodegenerativas e cardiovasculares e o câncer. A terapia com as drogas anti-inflamatórias atualmente disponíveis, que consistem principalmente em anti-inflamatórios não-estereoidais, glicocorticoides e drogas imunossupressoras, nem sempre é bem sucedida ou resulta em efeitos secundários intoleráveis. Por isso, ainda é constante a busca por novas substâncias com propriedades anti-inflamatórias e, neste contexto, as plantas medicinais representam uma fonte interessante para o desenvolvimento de drogas mais toleráveis e eficazes para o tratamento de doenças associadas a processos inflamatórios (FÜRST e ZÜNDORF, 2014).

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

Obter um extrato padronizado a partir de folhas de *Psittacanthus plagiophyllus* Eichl. e avaliar seu potencial anti-inflamatório.

2.2 Específicos

- Caracterizar a droga vegetal obtida de *P. plagiophyllus*;
- Obter e padronizar um extrato a partir da droga vegetal de *P. plagiophyllus*;
- Avaliar a atividade antiedematogênica *in vivo* do extrato padronizado de folhas de *P. plagiophyllus* frente à inflamação aguda induzida por carragenina e por dextrana;
- Investigar o efeito do extrato padronizado de *P. plagiophyllus* sobre a exsudação e a migração de leucócitos *in vivo* em modelo de inflamação aguda induzida por carragenina;
- Avaliar a capacidade antioxidante *in vitro* do extrato padronizado de *P. plagiophyllus*.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Coleta e identificação botânica

A coleta dos espécimes de *P. plagiophyllus* foi realizada no mês de outubro de 2014, período seco da região, entre 08:00h e 09:00h, em uma área de savana localizada na vila de Alter do Chão (2°31' S, 59°00' W), Santarém, Pará, Brasil, onde ocorrem parasitando cajueiros (*Anacardium occidentale*). A confirmação da espécie foi feita pelo Dr. Claudenir Simões Caires, da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia (UESB) e as exsicatas estão depositadas no Herbário HSTM, do Laboratório de Botânica da Universidade Federal do Oeste do Pará (UFOPA), com o número de registro HSTM 000074 (**Anexo I**), sob responsabilidade da curadora Prof^a Dr^a Thaís Elias Almeida.

3.2 Obtenção e caracterização da droga vegetal

As folhas de *P. plagiophyllus* foram separadas, lavadas com água corrente, pesadas em balança comercial (Balmak® - MP-5), armazenadas em sacos de papel e desidratadas em estufa com circulação forçada de ar a 40 °C (LICit® - LC-E80) até peso constante (aprox. 4 dias). Após secagem do material vegetal, o mesmo foi pulverizado em liquidificador industrial (Tron®) e o pó obtido foi acondicionado à temperatura ambiente, ao abrigo de luz e umidade. A caracterização da droga vegetal (pó) foi realizada de acordo com o preconizado pela Farmacopeia Brasileira, 5ª edição (BRASIL, 2010).

3.2.1 Análise sensorial e organoléptica

A droga vegetal de *P. plagiophyllus* foi caracterizada quanto à cor, ao odor e ao sabor, conforme estabelecido pela Farmacopeia Brasileira, 5ª edição (BRASIL, 2010).

3.2.2 Determinação de matéria estranha

Para determinação do percentual de matéria estranha, 250 g das folhas inteiras e 25 g da droga pulverizada foram espalhados sobre uma superfície plana e a presença de material estranho foi averiguada inicialmente a olho nu e, em seguida, com o auxílio de lentes de aumento (cinco e dez vezes), em triplicata (BRASIL, 2010).

3.2.3 Determinação do teor de umidade

Para determinação do teor de umidade da droga vegetal de *P. plagiophyllus*, foi empregado o método gravimétrico, ou da perda por dessecação. Exatamente 5 g da droga

vegetal pulverizada foram transferidos para uma placa de Petri previamente tarada e dessecada nas mesmas condições a serem adotadas para a amostra, durante 30 minutos. Após, a droga vegetal foi dessecada em estufa a 105 °C durante 5 horas, resfriada em dessecador sob sílica e pesada em balança analítica (Shimadzu® - AY220). Foram realizadas pesagens adicionais em intervalos de 1 hora para garantir pelo menos três pesos constantes e a porcentagem de água presente foi calculada a partir da média de três determinações individuais (BRASIL, 2010).

3.2.4 Análise granulométrica

A determinação do grau de divisão ou granulometria da droga vegetal pulverizada em estudo foi feita com o auxílio de tamises de aço inoxidável (Bertel®), operados por um agitador eletromagnético para peneiras (Bertel®), dispositivo que reproduz os movimentos horizontais e verticais da operação manual, por meio de ação mecânica uniforme (BRASIL, 2010).

Foi montado um conjunto com 6 tamises com aberturas de malha descritas na 5ª edição da Farmacopeia Brasileira (600, 425, 250, 180, 125 e 75 µm), os de maior abertura colocados sobre os de abertura menor, e armados sobre o receptor de tamises. Exatamente 25 g da amostra foram distribuídos uniformemente sobre o tamis superior e o conjunto foi tampado. O tamisador foi acionado por 15 minutos, utilizando o reostato nº 7 - amplitude das vibrações de 1,4 mm. Ao fim da tamisação, com o auxílio de um pincel adequado, toda a amostra retida na superfície superior de cada malha foi cuidadosamente removida para um recipiente limpo e pesada, assim como o pó retido no coletor. Para calcular o percentual retido em cada tamis, foi utilizada a seguinte fórmula:

$$\% \text{ retida pelo tamis} = \frac{P_1}{P_2} \times 100$$

Onde:

P_1 = Peso da amostra retida em cada tamis (g).

P_2 = Soma dos pesos retidos nos tamises e no coletor (g).

100 = Fator de conversão para porcentagem.

O percentual retido em cada tamis foi utilizado para o cálculo do percentual de pó que passou por cada tamis, para classificação do pó obtido das folhas secas de *P. plagiophyllus* como pó grosso, moderadamente grosso, semifino, fino ou finíssimo, de acordo com a Farmacopeia Brasileira, 5ª edição. A determinação granulométrica foi realizada em triplicata.

3.2.5 Determinação do índice de intumescência

Para avaliação do índice de intumescência, foi utilizada uma proveta de 25 mL, com tampa, com comprimento da parte graduada de 125 mm e diâmetro interno de 16 mm, subdividido em 0,1 mL e marcado de 0 a 25 mL, de forma ascendente. Exatamente 1 g da droga vegetal pulverizada foi pesado e transferido para a proveta, adicionando, em seguida, 25 mL água destilada e agitando a cada 10 minutos, durante 1 hora, de forma padronizada. Após repouso da mistura por 3 horas, à temperatura ambiente, foi medido o volume, em mL, ocupado pela droga vegetal, subtraído do volume inicial da droga. Foi calculado o valor médio obtido a partir de três determinações individuais e relacionado a 1 g de material vegetal (BRASIL, 2010).

3.2.6 Determinação de cinzas totais

Na mensuração das cinzas totais (fisiológicas e não fisiológicas), 3 g da droga pulverizada foram pesados e transferidos para um cadinho de alumina limpo, previamente dessecado em estufa a 105 °C por 1 hora e tarado. A amostra vegetal, distribuída uniformemente no recipiente, foi calcinada em mufla (Jung® - 0612) até que todo o carvão fosse eliminado. O equipamento foi programado para atingir 600±25 °C, com rampa de 100 °C por minuto. Decorridas 3 horas (contadas após o forno atingir a temperatura de 200 °C), a amostra foi retirada da mufla, resfriada em dessecador com sílica e a sua massa obtida em balança analítica. A porcentagem de cinzas foi então calculada em relação à massa inicial da droga, em triplicata (BRASIL, 2010).

3.3 Obtenção e padronização do derivado vegetal

3.3.1 Testes piloto para escolha do líquido extrator

Foram realizados testes piloto com a droga vegetal (100 mg/mL) diluída em água destilada e misturas de etanol 95% e água em diferentes proporções (30:70; 40:60; 50:50; 60:40; 70:30 e 80:20 (v/v)). Após homogeneização, cada solução foi submetida a banho ultrassom (Branson® – 3510) por 30 minutos, seguida de filtração em filtro de papel quantitativo (porosidade 90 mm e gramatura 80). As extrações hidroalcoólicas foram realizadas a uma temperatura de 25 °C e as extrações aquosas foram feitas a 25 °C e a 70 °C.

Para escolha do líquido extrator que proporcionasse maiores concentrações de compostos bioativos, os extratos obtidos foram submetidos ao doseamento de fenois totais, taninos totais e flavonoides totais, conforme metodologias descritas mais adiante nos itens [3.3.3.2](#), [3.3.3.3](#) e [3.3.3.6](#), respectivamente.

3.3.2 Obtenção do extrato aquoso de *P. plagiophyllus*

Após escolha da água como líquido extrator (conforme resultados mostrados adiante), o extrato para utilização nos testes foi preparado a partir da diluição de 100 g da droga vegetal em 500 mL de água destilada, mantidos em uma placa aquecedora a 70 ± 5 °C por 30 minutos, sob agitação constante. Em seguida, a mistura foi filtrada e, para obtenção do extrato seco, as moléculas de água foram removidas por sublimação, utilizando um liofilizador (LIOTOP® - L101).

A partir do extrato aquoso liofilizado das folhas de *P. plagiophyllus* (EAPp), a densidade aparente e o resíduo seco foram determinados, conforme preconizado pela Farmacopeia Brasileira, 5ª edição (BRASIL, 2010). Foi obtido ainda o perfil cromatográfico deste extrato por cromatografia em camada delgada (CCD) e realizado o doseamento de fenóis totais, taninos totais, taninos hidrolisáveis, taninos condensados e flavonoides totais, além da avaliação da atividade anti-inflamatória *in vivo* e da capacidade antioxidante *in vitro*.

Parte do extrato liofilizado foi ressuspensa em água mili-Q a uma concentração de 25 mg/mL para determinação da densidade relativa, da densidade de massa, da viscosidade e do pH, de acordo com a Farmacopeia Brasileira, 5ª edição (BRASIL, 2010).

3.3.3 Caracterização físico-química do extrato aquoso de *P. plagiophyllus*

3.3.3.1 Determinação do perfil cromatográfico por CCD

A obtenção do perfil cromatográfico do EAPp foi realizada por Cromatografia em Camada Delgada, que consiste na separação dos componentes de uma mistura por meio da migração diferencial sobre uma camada delgada de adsorvente retido sobre uma superfície plana. O processo de separação está fundamentado principalmente no fenômeno da adsorção (COLLINS, 2010; BRAZ *et al.*, 2012).

A fase estacionária utilizada foi a sílica gel G60 F₂₅₄ (adsorvente), depositada em placas cromatográficas pré-fabricadas de alumínio (Macherey-Nagel®). Como fase móvel, foram utilizados diferentes sistemas de eluição, adequados a cada grupo de metabólitos secundários pesquisados (**Quadro 1**). Alíquotas do EAPp diluído em metanol 80% m/v (10 mg/mL), foram aplicadas nas cromatoplasmas para a investigação qualitativa da presença de flavonoides, taninos, cumarinas e terpenos. Para cada sistema de eluição, foram utilizados reveladores específicos e padrões (amostras de referência) para a identificação dos metabólitos, sob luz ultravioleta ($\lambda = 365$ nm) e no visível ($\lambda = 400-700$ nm), conforme

elencado no **quadro 1**. Todos os reagentes utilizados nos sistemas de eluição, assim como os reveladores e os padrões, foram obtidos da Sigma-Aldrich®.

Quadro 1 - Protocolo para análise fitoquímica qualitativa do extrato aquoso liofilizado de folhas de *Psittacanthus plagiophyllus* por Cromatografia em Camada Delgada (MARINI-BETTÒLO *et al.*, 1981).

ELUENTE (fase móvel)	REVELAÇÃO	PADRÃO UTILIZADO	RESULTADOS ESPERADOS
Apolar hexano:acetato de etila:ácido fórmico (85:10:5)	VAS 1% Visível	Timol	Terpenoides (rosa intenso) Ácidos graxos (azul)
Polar ácido acetato de etila:ácido fórmico: ácido acético:H ₂ O (67,5:7,5:7,5:17,5)	VAS 1% Visível	Rutina hidratada	Ácidos graxos (azul) Terpenoides (rosa intenso) Cumarinas glicosiladas (azul, verde) Flavonoides (amarelo)
	AlCl ₃ UV 365 nm	Rutina hidratada	Flavonoides totais (laranja) Cumarinas glicosiladas (azul, verde)
	KOH 5% UV 365 nm	Esculina	Cumarinas glicosiladas (azul, verde)
Média polaridade tolueno:éter etílico (50:50)	KOH 5% UV 365 nm	1,2 - benzopirona	Cumarinas simples (verde-amarelo)
Polar butanol: ácido acético:H ₂ O (40:10:50)	FeCl ₃ 1% Visível	Ácido gálico	Taninos hidrolisáveis (azul) Taninos condensados (verde)
	VAS 1% Visível	(+)-catequina hidratada	Taninos condensados (vermelho) Flavonoides (amarelo claro)

VAS= Vanilina sulfúrica; AlCl₃= Cloreto de alumínio; KOH= Hidróxido de potássio; FeCl₃= Cloreto férrico; UV= Ultravioleta.

3.3.3.2 Doseamento de fenois totais

O doseamento dos fenois totais presentes no extrato aquoso liofilizado de folhas de *P. plagiophyllus* (e na droga vegetal) foi realizado por meio do método de Hagerman e Butler (MOLE e WATERMAN, 1987 a, b), que se baseia na reação de complexação dos compostos fenólicos presentes na amostra com uma solução de cloreto férrico, que por ser cromogênica, pode ser medida em espectrofotômetro em um comprimento de onda de 510 nm.

Para a análise de fenois totais, 0,5 mL do EAPp diluído em água mili-Q (3 mg/mL) foram adicionados a tubos de ensaio contendo 1 mL de solução de LSS/trietanolamina (lauril sulfato de sódio 1% (m/v), trietanolamina 5% (v/v) e isopropanol 20% (v/v) e 0,5 mL de solução de cloreto férrico diluído em HCl 0,01 M.

A concentração de fenois totais presentes no EAPp foi quantificada por meio de uma curva de calibração de ácido tânico, preparada a partir das concentrações: 0,1 - 0,2 - 0,3 - 0,4 - 0,5 - 0,6 e 0,8 mg/mL. O mesmo procedimento realizado com o EAPp foi feito para as soluções padrões de calibração de ácido tânico nas concentrações de 0,1 a 0,8 mg/mL.

O branco da curva padrão, utilizado para eliminar interferências colorimétricas das amostras, foi preparado em tubo de ensaio contendo 1 mL de solução de LSS/trietanolamina, 0,5 mL de solução de cloreto férrico e 0,5 mL de água mili-Q. O branco da amostra foi preparado com 1,5 mL de LSS/trietanolamina e 0,5 mL do EAPp.

Todas as soluções foram agitadas manualmente e mantidas em repouso por 15 minutos antes da medição da absorbância em espectrofotômetro (Quimis®) em comprimento de onda de 510 nm. No início das leituras, a absorbância do aparelho foi zerada com água mili-Q. Os resultados foram expressos em gramas de equivalentes de ácido tânico por 100 gramas de extrato (g EAT/100 g). As análises foram realizadas em triplicata e os reagentes utilizados foram obtidos da Sigma-Aldrich®.

3.3.3.3 *Doseamento de taninos totais*

O método de Hagerman e Butler (MOLE e WATERMAN, 1987 a, b) foi adotado para o doseamento de taninos totais presentes no EAPp e na droga vegetal. Tal metodologia baseia-se na propriedade dos taninos de precipitar em solução aquosa na presença de proteínas. Os taninos complexam-se com a proteína e são separados dos outros fenois por centrifugação. A adição de cloreto férrico ao precipitado produz coloração roxa, que pode ser medida a 510 nm.

Em tubo de ensaio foram adicionados 0,5 mL do EAPp diluído em água mili-Q (3 mg/mL) e 1 mL de uma solução de albumina sérica bovina diluída em acetato de sódio (1 mg/mL, pH 4.9), que foram agitados manualmente e, após repouso de 15 minutos, foram centrifugados a 3.000 rpm por 15 minutos em centrífuga de tubos (Centribio® - 80-2B HT). Após a centrifugação, o sobrenadante foi cuidadosamente desprezado e o precipitado foi ressuspensionado em 2 mL de LSS/trietanolamina. A solução foi agitada e uma alíquota de 0,5 mL de solução de cloreto férrico foi adicionada aos tubos.

A concentração de taninos totais do EAPp foi quantificada por meio de uma curva padrão de ácido tânico, nas seguintes concentrações: 0,3 - 0,4 - 0,5 - 0,6 e 0,8 mg/mL. Todas as etapas seguidas para o EAPp foram realizadas com as soluções padrão de calibração nas concentrações de 0,3 a 0,8 mg/mL.

O branco da curva padrão foi preparado com 2 mL de LSS/trietanolamina e 0,5 mL de cloreto férrico. Não foi necessário preparar branco para o EAPp.

As soluções foram agitadas, mantidas em repouso por 15 minutos e absorvância foi medida a 510 nm no espectrofotômetro, cuja absorvância foi zerada com água mili-Q no início das leituras. Os resultados foram expressos em gramas de equivalentes de ácido tânico por 100 gramas de extrato seco (g EAT/100 g). As análises foram realizadas em triplicata e os reagentes utilizados foram obtidos da Sigma-Aldrich®.

3.3.3.4 Doseamento de taninos hidrolisáveis

Para o doseamento dos taninos hidrolisáveis presentes no extrato aquoso liofilizado de folhas de *Psittacanthus plagiophyllus*, foi empregado o método do iodato de potássio (WILLIS e ALEN, 1998), o qual baseia-se no fato de os taninos hidrolisáveis (galotaninos e elagitaninos) formarem um complexo colorido vermelho-castanho em meio aquoso com KIO_3 , que pode ser medido em um comprimento de onda de 550 nm.

Nesta análise, o ácido tânico também foi utilizado para preparo da curva padrão de calibração por absorvância, nas seguintes concentrações: 0,05 - 0,1 - 0,2 - 0,3 - 0,4 - 0,5 - 0,6 e 0,8 mg/mL.

Inicialmente, 2,5 mL de uma solução de KIO_3 2,5% (m/v) diluído em água foram adicionados a tubos de ensaio e mantidos em banho de água a 25 °C, por 10 minutos. Em seguida, em intervalos de 1 minuto, 0,5 mL do EAPp diluído em água mili-Q (3 mg/mL) foram adicionados aos tubos e mantidos no banho de água por mais 5 minutos. O mesmo processo foi seguido para as soluções padrão de calibração nas concentrações de 0,05 a 0,8 mg/mL e a absorvância foi então medida em espectrofotômetro a um comprimento de onda de 550 nm.

Para preparar o branco da curva padrão, foram adicionados em tubo de ensaio 2,5 mL da solução de KIO_3 2,5% e 0,5 mL de água mili-Q. Já o branco da amostra, foi preparado com 2,5 mL de água mili-Q e 0,5 mL do EAPp.

A absorvância do espectrofotômetro foi zerada no início das medições com água mili-Q e os resultados foram expressos em gramas de equivalentes de ácido tânico por 100 gramas de extrato (g EAT/100 g). As análises foram realizadas em triplicata e os reagentes utilizados foram obtidos da Sigma-Aldrich®.

3.3.3.5 Doseamento de taninos condensados

Para o doseamento de taninos condensados ou proantocianidinas (polímeros de flavan-3-ol) presentes no EAPp foi utilizado o método da vanilina em meio ácido, de Mole e Waterman (1987 a, b), com modificações.

A (+)-catequina hidratada foi a substância utilizada no preparo da curva padrão por absorvância, nas concentrações 0,1 - 0,2 - 0,3 - 0,4 - 0,5 - 0,6 e 0,8 mg/mL.

Após a adição de 2,5 mL de uma solução recém-preparada de vanilina a 1% m/v (diluída em ácido sulfúrico) em tubos de ensaio, estes foram pré-aquecidos em banho-maria (Branson® – 3510) a 30 °C por 30 minutos. Em seguida, 0,5 mL do EAPp diluído em metanol 80% v/v (3 mg/mL) foram adicionados em cada tubo, agitados em vortex por 30 segundos e depois mantidos em banho-maria a 30 °C por mais 15 minutos. Por fim, foi realizada a leitura da absorvância em espectrofotômetro em um comprimento de onda de 500 nm, dentro de no máximo 10 minutos. O mesmo procedimento foi realizado com as soluções padrão de calibração nas concentrações de 0,1 a 0,8 mg/mL.

O branco da curva padrão foi preparado adicionando-se 2,5 mL de vanilina a 0,5 mL de metanol. Para o preparo do branco da amostra, 0,5 mL do EAPp foram adicionados a 2,5 mL de HCl 4% v/v (diluído em metanol). A absorvância do espectrofotômetro foi zerada com metanol.

Visando manter a estabilidade das reações, os tubos de ensaio foram protegidos da luz e os experimentos foram realizados sob luz difusa. A concentração de taninos condensados no EAPp foi expressa em gramas de equivalentes de catequina por 100 g de extrato (g EC/ 100 g). As análises foram realizadas em triplicata e os reagentes utilizados foram obtidos da Sigma-Aldrich®.

3.3.3.6 Doseamento de flavonoides totais

Para o doseamento dos flavonoides totais presentes no extrato aquoso obtido de folhas de *P. plagiophyllus* foi utilizado o método espectrofotométrico baseado na complexação destes compostos com alumínio (III), conforme descrito por Chabariberi *et al.*, (2009), com modificações. A mesma metodologia foi empregada para análise de concentração de flavonoides totais na droga vegetal.

Em tubos de ensaio foram adicionados 0,5 mL do EAPp (diluído em metanol 80% (v/v)), 0,5 mL de uma solução de AlCl₃ 2% (v/v) (diluído em metanol) e 4 mL de metanol.

A quantificação dos flavonoides totais presentes no EAPp foi mensurada a partir de uma curva padrão por absorvância de rutina hidratada, nas concentrações: 0,03 - 0,04 - 0,05 -

0,06 - 0,07 - 0,08 e 0,1 mg/mL, as quais passaram pelo mesmo procedimento realizado com o EAPp.

Após agitação manual das soluções e repouso de 30 minutos, foi efetuada a leitura da absorbância em espectrofotômetro em um comprimento de onda de 425 nm. No início das leituras a absorbância do espectrofotômetro foi zerada com metanol.

Para leitura do branco da curva padrão, 0,5 mL de AlCl_3 2% foram adicionados a 4,5 mL de metanol. Já o branco da amostra foi preparado com 0,5 mL do EAPp e 4,5 mL de metanol. Os resultados foram expressos em gramas de equivalentes de rutina por 100 gramas de extrato seco (g ER/100 g). As análises foram realizadas em triplicata e os reagentes utilizados foram obtidos da Sigma-Aldrich®.

3.3.3.7 *Determinação da densidade aparente*

A densidade aparente ou massa específica aparente é a massa média de um sólido por volume. A densidade aparente do EAPp foi mensurada a partir do preenchimento de um tubo Eppendorf de 2 mL (previamente pesado), com o extrato, com relativa acomodação por vibração, sem compactar forçadamente. Em seguida, o tubo de Eppendorf foi pesado novamente em balança analítica para obtenção da massa ocupante daquele volume. A densidade aparente foi então calculada dividindo-se a massa do extrato pelo volume ocupado por ele. Foi utilizada a média de três determinações e o resultado foi expresso em g/cm^3 (BRASIL, 2010).

3.3.3.8 *Determinação do resíduo seco*

Para determinação do resíduo seco do extrato aquoso liofilizado de folhas de *P. plagiophyllus*, 0,5 g do extrato foram pesados em placa de Petri medindo aproximadamente 5 cm de diâmetro e 1 cm de altura. O extrato foi então dessecado em estufa a 105 °C por 3 horas, resfriado em dessecador sob sílica e pesado em balança analítica. Após a obtenção de 3 pesos constantes, com intervalos de 1 hora em estufa, o resíduo seco foi calculado em porcentagem sobre a massa inicial do extrato. A determinação do resíduo seco foi realizada em triplicata (BRASIL, 2010).

3.3.3.9 *Determinação da densidade relativa e da densidade de massa*

A densidade relativa do EAPp ressuspenso em água mili-Q (25 mg/mL) foi determinada utilizando um picnômetro limpo e seco, com capacidade para 25 mL, previamente calibrado. Para calibração, foi determinada a massa do picnômetro vazio e a

massa de seu conteúdo com água, recentemente destilada e fervida, com a temperatura ajustada para 20 °C.

Após a transferência do EAPp líquido para o picnômetro, este foi pesado e a massa do extrato foi obtida por meio da diferença de massa do picnômetro cheio e vazio. A densidade relativa foi calculada pela razão entre a massa da amostra líquida e a massa da água, ambas a 20 °C, utilizando a média de três determinações (BRASIL, 2010).

O valor da densidade relativa do EAPp (d_{20}^{20}) foi utilizado para o cálculo da sua densidade de massa (ρ), expressa em g/cm^3 , por meio da fórmula:

$$\rho_t = d_{\text{água}} \times d_t^t + 0,0012$$

Onde:

d= densidade

t= temperatura (neste caso, 20 °C)

0,0012 = densidade do ar na pressão atmosférica (g/cm^3)

3.3.3.10 Determinação do pH

O pH do extrato aquoso obtido de folhas de *P. plagiophyllus* ressuspendido em água mili-Q (25 mg/mL) foi determinado utilizando um medidor de pH (TecnoPON® - MPA 210), previamente calibrado com soluções tampão de pH 7,0 e pH 4,0 e o resultado foi expresso pela média de três determinações (BRASIL, 2010).

3.3.3.11 Determinação da viscosidade

A viscosidade do extrato aquoso liofilizado de *P. plagiophyllus*, previamente ressuspendido em água mili-Q (25 mg/mL), foi determinada por meio de um viscosímetro Brookfield (Brookfield® - LVDV-E), que mede a viscosidade pela força necessária para girar um eixo metálico no líquido testado.

Primeiramente, o extrato líquido em temperatura ambiente foi adicionado a um Erlenmeyer com capacidade para 250 mL e o sensor de cisalhamento (spindle) do viscosímetro foi imergido na amostra. O equipamento então foi programado com um número de spindle e uma velocidade de rotação e acionado, aguardando-se cerca de 3 minutos até a estabilização dos valores no display do viscosímetro. Foram testados 5 sensores de cisalhamento diferentes (61, 62, 63, 64 e 65), nas seguintes velocidades: 6, 10, 12, 20, 30, 50, 60 e 100 rpm. A análise foi realizada em triplicata e os resultados foram expressos em centipoise (cP) (BRASIL, 2010).

3.4 Avaliação da atividade anti-inflamatória *in vivo*

3.4.1 Animais

Para a realização dos experimentos *in vivo* foram utilizados camundongos (*Mus musculus*) da variedade Swis e ratos (*Rattus norvegicus*) da variedade Wistar, machos, com aproximadamente 2 meses de idade. Os animais foram provenientes da Unidade de Experimentação Animal do Laboratório de Bioprospecção e Biologia Experimental (LabBBEx) da UFOPA, na qual foram mantidos em estantes ventiladas Insight®, providas de dutos para a retirada de odores e sistemas independentes de insuflamento e exaustão de ar, proporcionando baixo índice de infecções, eliminação de odores provenientes das excreções e baixo volume de ruídos que pudessem estressar os animais. A temperatura foi controlada (22 ± 1 °C), e o ciclo claro/escuro regulado para 12/12 horas. Os animais receberam água e ração à vontade.

O projeto foi avaliado e aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFOPA e protocolado sob o número 03005/2015 (**Anexo II**). O trabalho foi desenvolvido de acordo com os princípios éticos recomendados pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e seguindo as diretrizes da Lei Federal nº 11.794/2008 (BRASIL, 2008), a qual estabelece procedimentos para o uso científico de animais.

3.4.2 Edema de pata induzido por carragenina

O experimento de edema de pata induzido por carragenina foi realizado conforme metodologia de Winter *et al.*, (1962), com algumas modificações.

Antes dos experimentos, os animais foram mantidos em jejum de sólidos por um período de 12 horas e divididos em grupos (n=6), que receberam por via oral:

Grupo Controle Negativo: Veículo (NaCl 0,9% - 1 mL/Kg)

Grupo Controle Positivo: Droga Padrão (Indometacina - 10 mg/Kg)

Grupo Teste 1: EAPp 250 mg/Kg

Grupo Teste 2: EAPp 500 mg/Kg

Grupo Teste 3: EAPp 1000 mg/Kg

Após 1 hora da administração dos tratamentos, foi induzido o edema de pata por 0,1 mL de carragenina (Sigma® - Tipo I/ grau comercial) a 1% (m/v) diluída em NaCl 0,9% (m/v), injetada na região sub-plantar da pata posterior direita de todos os animais. O volume da pata de cada rato foi tomado imediatamente após a administração do agente flogístico (tempo zero), e com intervalos de 1, 2, 3 e 4 horas após a injeção da carragenina, por meio do

deslocamento de água registrado em pletismômetro de pata digital (Insight® - EFF 304). A ação supressiva (antiedematogênica) do extrato de *P. plagiophyllus* e da droga padrão foi expressa usando como unidade de medida a quantidade em mL de água deslocada pelo edema no pletismômetro. O volume do edema equivale à diferença entre o volume da pata em cada medição e o volume tomado imediatamente após a injeção do agente flogístico.

3.4.3 Edema de pata induzido por dextrana

Foi utilizada a metodologia proposta por Nishida *et al.*, (1978), com as modificações descritas por Sousa *et al.*, (2005). Após jejum de sólidos por 12 horas, os animais, divididos em 5 grupos (n=6), receberam por via oral os seguintes tratamentos:

Grupo Controle Negativo: Veículo (NaCl 0,9% - 1 mL/Kg)

Grupo Controle Positivo: Droga Padrão (Dexametasona - 1 mg/Kg)

Grupo Teste 1: EAPp 250 mg/Kg

Grupo Teste 2: EAPp 500 mg/Kg

Grupo Teste 3: EAPp 1000 mg/Kg

Passados 60 minutos da administração dos tratamentos, 0,1 mL de dextrana (Sigma® - 150.000 Da) a 1% (m/v) diluída em NaCl 0,9% (m/v) foram injetados na região sub-plantar da pata posterior direita de cada animal, para indução do edema. O volume da pata foi tomado imediatamente após a administração do agente flogístico (tempo zero), e com intervalos de 30, 60, 90 e 120 minutos após a injeção da dextrana, por meio do deslocamento de água registrado em pletismômetro de pata digital (Insight® - EFF 304). A ação antiedematogênica do EAPp e da indometacina foi calculada conforme descrito no item 3.4.2.

3.4.4 Inflamação na bolsa de ar subcutânea

A inflamação na bolsa de ar subcutânea, modelo proposto por Edwards *et al.*, (1981), foi realizada conforme as modificações descritas por Benincá *et al.*, (2007).

Neste teste, primeiramente os camundongos receberam injeção subcutânea de 2 mL de ar estéril no dorso durante três dias alternados para formação de uma bolsa de ar subcutânea. No sexto dia, os animais foram divididos em 6 grupos (n=6), que, após jejum de sólidos por 12 horas, receberam por via oral os seguintes tratamentos:

Grupo Controle Negativo: Veículo (H₂O - 5 mL/Kg)

Grupo Controle Positivo: Droga Padrão (Dexametasona - 1 mg/Kg)

Grupo Teste 1: EAPp 250 mg/Kg

Grupo Teste 2: EAPp 500 mg/Kg

Grupo Teste 3: EAPp 1000 mg/Kg

Grupo Naïve: Veículo (H₂O - 5 mL/Kg) - sem estímulo inflamatório.

Uma hora após receberem os tratamentos, 0,25 mL de uma solução de carragenina a 1% (m/v) diluída em tampão fosfato salina (PBS - pH 7.4) estéril foi injetada no interior da cavidade, exceto no grupo Naïve, o qual recebeu apenas uma injeção de 0,25 mL de PBS. Quatro horas após o estímulo inflamatório, os animais foram sacrificados por superdosagem de anestésico (40 mg/Kg de xilazina e 300 mg/Kg de quetamina, i.p) e a bolsa lavada com 2 mL de PBS estéril contendo EDTA a 0,1% (m/v). Em seguida, com o auxílio de uma pipeta Pasteur descartável, o lavado foi coletado por meio de uma pequena incisão na bolsa, para avaliação da exsudação e da migração de leucócitos.

3.4.4.1 Avaliação da Exsudação

O exsudato foi centrifugado a 2.000 rpm, por 10 minutos, em centrífuga de tubos (Centribio® - 82-B HT) e o sobrenadante foi coletado e armazenado a 4 °C para posterior determinação indireta da exsudação, por meio da concentração de proteínas totais, utilizando o método de Bradford (1976), que baseia-se na interação entre o corante Coomassie brilliant blue (BG-250) e macromoléculas de proteínas que contêm aminoácidos de cadeias laterais básicas ou aromáticas. Tal interação desloca o equilíbrio do corante para a forma aniônica, que absorve em 595 nm.

Em tubos de ensaio foram adicionados 1.250 µL do reagente de Bradford, 250 µL de água mili-Q e 1.000 µL do sobrenadante coletado de cada animal. Em seguida, as misturas foram homogeneizadas e, após incubação a temperatura ambiente por 5 minutos, a absorbância de cada solução foi medida em espectrofotômetro (Quimis® - UV-VIS) a 595 nm. O branco das amostras foi preparado com 1.250 µL do sobrenadante e 1.250 µL de água mili-Q.

A quantificação das proteínas totais presentes nas bolsas foi realizada a partir de uma curva padrão de albumina sérica bovina (Sigma®), preparada a partir das seguintes concentrações: 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 e 50 µg/mL. Em tubos de ensaio contendo 1.250 µL de reagente de Bradford, foram adicionados 1.250 µL das soluções de albumina sérica bovina nas concentrações de 5 a 50 µg/mL e, após homogeneização e incubação por 5 minutos, a absorbância foi medida a 595 nm. A curva padrão de albumina foi plotada e a equação da reta obtida foi utilizada para quantificação da concentração de proteínas totais presentes nas amostras estudadas, expressa em µg/mL. O branco da curva padrão foi preparado com 1.250 µL de reagente de Bradford e 1.250 µL de água mili-Q.

A redução significativa da concentração de proteínas totais nos animais tratados com o EAPp foi considerada como indicativo de atividade anti-inflamatória do extrato.

3.4.4.2 Contagem do número total de leucócitos na bolsa de ar

Após centrifugação (descrita acima), os *pellets* foram ressuspensos em 1 mL de uma solução de albumina sérica bovina a 3% (m/v), diluída em PBS, para contagem do número total de leucócitos na bolsa de ar. A contagem foi realizada sob microscopia óptica, utilizando uma câmara de Neubauer, previamente montada com uma lamínula colocada sobre a área demarcada na câmara de contagem. Uma alíquota de 10 µL do lavado foi diluída em 200 µL de líquido de Turk (Fator de diluição = 20) e após homogeneização, um dos lados da câmara foi cuidadosamente preenchido com a solução, com o auxílio de uma pipeta.

Foram contados os quatro quadrantes laterais maiores da câmara de contagem, que juntos, com a lamínula colocada, correspondem a um volume de 0,1 mm³. O número de leucócitos por mL foi então obtido a partir da fórmula:

$$\text{N}^\circ \text{ de leucócitos/mL} = \frac{\text{N}^\circ \text{ total de leucócitos}}{4} \times 20 \times 10.000$$

Onde:

4 = n° de quadrantes contados

20 = fator de diluição

10.000 = correção para mL (pois 0,1 mm³ x 10.000 = 1000 m³ = 1 mL).

A redução significativa do número total leucócitos foi considerada como indicativo de atividade anti-inflamatória do EAPp.

3.4.4.3 Contagem diferencial de leucócitos

Uma alíquota de 50 µL de cada amostra - após ressuspensão dos *pellets* em 1 mL solução de albumina a 3% (m/v) - foram fixados em lâminas e corados com panótico rápido. Foram contadas cem células por lâmina e os neutrófilos, eosinófilos, basófilos, monócitos e linfócitos foram diferenciados de acordo com suas características morfológicas, sob microscopia óptica, em objetiva de imersão. A leitura das lâminas foi realizada em linhas gregas, ao longo dos bordos do esfregaço e a redução significativa do número de neutrófilos foi considerada como indicativo de atividade anti-inflamatória do EAPp.

3.5 Avaliação da capacidade antioxidante *in vitro*

A atividade antioxidante do extrato aquoso padronizado de *P. plagiophyllus* foi avaliada pelo método do sequestro do radical livre DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazil), conforme metodologia descrita por Miliauskas *et al.*, (2004), com modificações. O método baseia-se na capacidade do DPPH de reagir com doadores de hidrogênio, sendo reduzido e passando da coloração púrpura para a amarela, que pode ser medida em espectrofotômetro a um comprimento de onda de 517 nm.

Alíquotas de 50 µL do EAPp solubilizado em etanol 80% (v/v) foram adicionadas a 1.950 µL de uma solução etanólica de DPPH (60 µM), com absorbância inicial entre 0,6 e 0,7, à temperatura ambiente. O EAPp foi testado nas concentrações finais de 10, 25, 50, 75 e 100 µg/mL. O mesmo procedimento foi realizado para o controle (etanol) e para o trolox (Sigma®), utilizado como padrão antioxidante para comparação dos resultados, nas concentrações finais de 1, 2, 3, 4 e 5 µg/mL. As misturas reacionais foram agitadas, protegidas da luz e do oxigênio e a absorbância foi lida a 517 nm em espectrofotômetro (Quimis® - UV-VIS). Com o objetivo de definir o tempo necessário para a estabilização da reação do EAPp com o DPPH, a absorbância foi lida aos 5, 15, 30, 45 e aos 60 minutos de reação.

A atividade de sequestro do radical DPPH foi expressa por meio do percentual de inibição (%I), onde A_c é a absorbância do controle e A_m a absorbância da amostra, segundo a equação:

$$\%I: (A_c - A_m) / A_c \times 100$$

Utilizando os valores de concentração da amostra versus o percentual de inibição, foi determinada a IC₅₀, concentração mínima do EAPp capaz de reduzir 50% do radical DPPH, obtida por regressão linear. O ensaio foi realizado em triplicata.

3.6 Análise estatística

Neste trabalho, nos testes de atividade anti-inflamatória *in vivo*, a variável independente consistiu na administração oral do EAPp aos animais experimentais, nos níveis (doses): 250, 500 e 1000 mg/Kg. Já as variáveis resposta ou dependentes obtidas foram: o volume do edema da pata inflamada de ratos; a concentração de proteínas totais; o nº de leucócitos totais e o nº de neutrófilos no exsudato inflamatório formado na bolsa de ar em camundongos. No teste de atividade antioxidante *in vitro*, a variável independente consistiu nas concentrações do EAPp (10 a 100 µg/mL) e a variável resposta foi a capacidade de redução do radical DPPH.

Os resultados quantitativos foram expressos como médias \pm erro padrão das médias. As análises estatísticas foram realizadas por meio de análise de variância, seguida do teste de Dunnett, para comparação entre os grupos-teste e os controles, ou do teste de Tukey, para comparação múltipla de médias, ao nível de 5% de probabilidade, utilizando o software ASSISTAT® 7.7. Valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Caracterização da droga vegetal

4.1.1 Análise sensorial e organoléptica

O pulverizado obtido das folhas da erva-de-passarinho *Psittacanthus plagiophyllus* apresentou cor verde musgo, cheiro levemente apimentado, fraco e sabor amargo.

4.1.2 Matéria estranha

Não foram detectados, a olho nu e com lentes de aumento de 5 e de 10 vezes, materiais estranhos à droga, o que indica que o processo de coleta e obtenção da droga vegetal de *P. plagiophyllus* seguiu rigorosamente às boas práticas preconizadas pela ANVISA, que determina o percentual máximo de 2% (m/m) de matéria estranha à droga (BRASIL, 2010).

A matéria estranha à droga vegetal pode ser classificada em três tipos, de acordo com a 5ª edição da Farmacopeia Brasileira: partes da planta da qual a droga deriva, com exceção daquelas incluídas na definição e descrição da droga; organismos, porções ou produtos de organismos além daqueles especificados na definição e descrição da droga; e impurezas de natureza mineral ou orgânica, não inerentes à droga vegetal (BRASIL, 2010). A presença desses materiais estranhos é relativamente frequente nos fitoterápicos comercializados, e se deve à falta de cuidados na coleta, ao tratamento inadequado do material coletado e até mesmo a adulterações intencionais, com a finalidade de aumentar o rendimento do produto a ser vendido (KUNLE *et al.*, 2012; KALYANKAR *et al.*, 2014).

No processo de obtenção de drogas a base de plantas deve ser garantida, portanto, a ausência de outras partes da mesma planta ou de outra planta, além de fungos, insetos, areia, pedras e outros contaminantes que sejam prejudiciais ao usuário (KALYANKAR *et al.*, 2014).

4.1.3 Teor de umidade

A média (n= 3) do teor de umidade da droga vegetal obtida de *P. plagiophyllus* foi de 6,55±0,2% (m/m), valor este que está dentro dos limites estabelecidos pela Farmacopeia Brasileira, 5ª edição, a qual determina que o teor máximo de água aceitável para drogas vegetais varia de 6 a 15% (BRASIL, 2010).

O teor de umidade em drogas vegetais deve ser muito bem controlado, pois, acima dos níveis aceitáveis para drogas vegetais, a água acelera a atividade enzimática, ocasionando a degradação de constituintes químicos, e favorece o desenvolvimento de bactérias e fungos

(GARG *et al.*, 2012; BRASIL, 2014 b). Além disso, a determinação do teor de umidade é importante para reduzir erros na estimativa do peso real da droga vegetal (KUNLE *et al.*, 2012; CHAWLA *et al.*, 2013).

4.1.4 Distribuição granulométrica

A partir da análise granulométrica da droga vegetal de *P. plagiophyllus* (Tabela 1), verificou-se que a maior parte (51,04%, m/m) do pó ficou retida no tamis com abertura nominal de malha de 600 μm e menos de 40% (m/m) do pó passou pelo tamis com abertura nominal de malha de 250 μm , o permite classificá-lo como moderadamente grosso, com base na classificação granulométrica sugerida pela Farmacopeia Brasileira, 5ª edição (BRASIL, 2010).

O tamanho das partículas da droga vegetal determina a superfície de contato disponível para a interação com o solvente utilizado no processo de obtenção do derivado vegetal (SILVA *et al.*, 2013; SALEH *et al.*, 2015). Assim, a análise da distribuição granulométrica da droga permite que se faça uma relação com a eficiência extrativa, já que partículas demasiadamente finas podem impedir a absorção do líquido extrator, enquanto que partículas com granulometria alta podem não ser adequadas por não apresentarem grande superfície de contato, da mesma forma, reduzindo a eficiência de extração (BORHAN *et al.*, 2013).

Tabela 1 - Distribuição granulométrica da droga vegetal de *Psittacanthus plagiophyllus*.

Número do tamis (ABNT)	Orifício do tamis (μm)	Pó retido no tamis (%) m/m	Pó que passou pelo tamis (%) m/m
30	600	51,04	48,96
40	425	10,72	38,24
60	250	8,19	30,05
80	180	6,21	23,84
120	125	9,24	14,60
200	75	14,07	0,53

ABNT = Associação Brasileira de Normas Técnicas.

4.1.5 Índice de intumescência

A média (n=3) do índice de intumescência das folhas secas pulverizadas de *P. plagiophyllus* foi de $4,02 \pm 0,02$ mL/g. O volume ocupado pelo pó aumentou 1,79 vezes após o intumescimento por água, o que indica a presença de substâncias capazes de aumentar seu volume em presença de água, tais como gomas, mucilagens, pectina e hemicelulose (OMS, 2011; PEREIRA *et al.*, 2011).

Apesar de a droga vegetal de *P. plagiophyllus* apresentar um índice de intumescimento considerável, tal valor é considerado baixo quando comparado ao de espécies conhecidamente ricas em mucilagens nas folhas, como a *Cecropia glaziovii* Snethl., que apresenta índice de intumescência de $11,4 \pm 0,4$ mL/g (LUENGAS-CAICEDO, 2005).

Muitos materiais obtidos de plantas são de utilidade farmacêutica ou terapêutica específica devido às suas propriedades de intumescimento (GARG *et al.*, 2012). Além disso, na padronização de um processo industrial, especialmente quando a água é empregada como solvente, o índice de intumescência indica o tamanho dos lotes ou a capacidade requerida para os equipamentos a serem empregados durante o processo, especialmente nas etapas de extração (LUENGAS-CAICEDO, 2005).

4.1.6 Cinzas totais

As folhas secas pulverizadas de *P. plagiophyllus* apresentaram percentual médio (n=3) de cinzas totais de $8,30 \pm 0,11\%$ (m/m), de acordo com o permitido pela Farmacopeia Brasileira 5ª edição, a qual preconiza que as cinzas totais devem compreender de 2 a 20% das drogas vegetais (BRASIL, 2010).

A determinação do resíduo pela incineração ou cinzas é um teste de realização obrigatória, sempre presente nas monografias de plantas, que contribui de maneira eficaz para a certificação da pureza da droga vegetal, pois identifica a presença de impurezas inorgânicas não voláteis que possam contaminá-la (PEREIRA *et al.*, 2011). Isto é possível porque a calcinação droga vegetal a 600 °C transforma toda a matéria orgânica em CO₂, restando apenas os compostos minerais em forma de cinzas. Deste modo é possível quantificar o conteúdo inorgânico na droga, seja ele de origem fisiológica, derivado do próprio tecido vegetal (carbonatos, fosfatos, cloretos, óxidos) ou não fisiológica, proveniente de impurezas aderidas à superfície da planta (areia, pedra, gesso, terra) (BRASIL, 2010; KUNLE *et al.*, 2012; BRASIL, 2014 b; KALYANKAR *et al.*, 2014).

4.1.7 Seleção do líquido extrator

Conforme pode ser analisado nas **figuras 2, 3 e 4**, respectivamente, a concentração de fenois totais, de taninos totais e de flavonoides totais na droga vegetal de *P. plagiophyllus* foi significativamente maior com a extração feita por água a uma temperatura de 70 °C, quando comparada às demais extrações realizadas, pelo teste de Tukey ($p < 0,01$). Além disso, mesmo entre as soluções hidroalcoólicas estudadas, houve diferenças significativas no teor dos grupos de metabólitos estudados, já que a diferença na polaridade do solvente interfere diretamente na interação deste com os compostos presentes no material vegetal.

Tais resultados evidenciam a importância do estudo prévio das melhores condições de extração para a qualidade do derivado vegetal obtido. Dentre os diversos fatores que podem influenciar a concentração dos constituintes químicos de um derivado vegetal, o líquido extrator é um dos mais relevantes (SANTOS *et al.*, 2014).

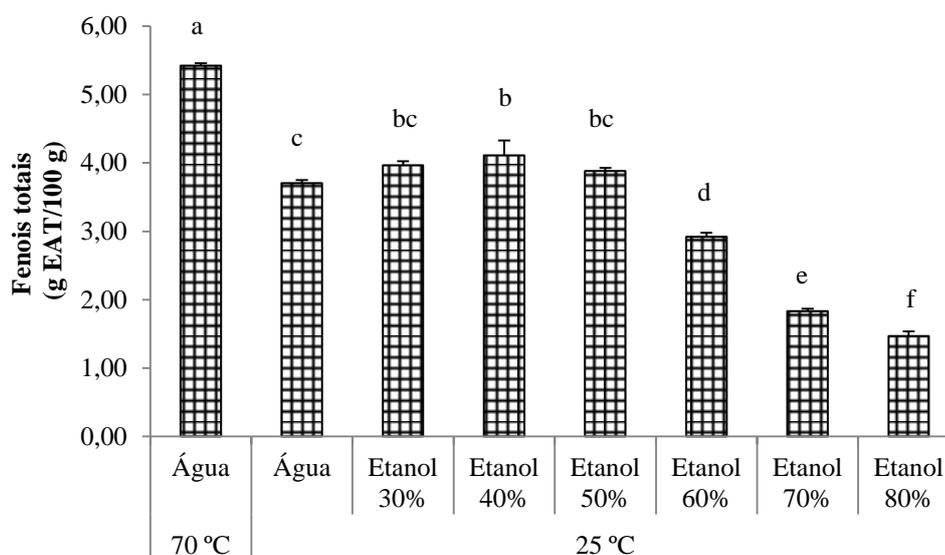


Figura 2 - Concentração de fenois totais nas folhas secas pulverizadas (droga vegetal) de *Psittacanthus plagiophyllus* submetidas à extração por diferentes solventes - água e soluções hidroalcoólicas em diferentes concentrações. Os resultados foram calculados a partir de uma curva padrão de ácido tânico ($R^2 = 0,9984$) e estão expressos em gramas de equivalentes de ácido tânico (EAT) por 100 gramas de droga vegetal. As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,01$).

É importante observar que a extração com água submetida à temperatura de 70 °C foi mais eficiente na obtenção de fenois totais do que a extração com água a 25 °C, que, por sua vez, possibilitou concentração de fenois significativamente inferior à obtida com etanol a

40%, a mais eficiente dentre as soluções hidroalcoólicas estudadas. Isto demonstra que o aumento da temperatura foi fator determinante para a maior solubilidade dos compostos fenólicos na água, maximizando sua extração. Já a extração realizada com etanol a 80% propiciou uma concentração de fenois totais significativamente menor do que todos os demais líquidos extratores utilizados ($p < 0,01$), mostrando-se a menos adequada para extração destes compostos (**Figura 2**).

Resultado semelhante foi obtido por Soberón *et al.*, (2007), que indicou um percentual de 8,8% de fenois totais (expressos em equivalentes de cumarina) na droga vegetal da erva-de-passarinho *Psittacanthus cuneifolius* submetida à decocção, contra apenas 2,4% na extração com etanol. O estudo de Acosta (2013), também demonstrou maior teor de fenois totais (expressos em equivalentes de ácido gálico) e de flavonoides totais (expressos em equivalentes de catequina) em *Psittacanthus calyculatus* utilizando apenas água como líquido extrator, em comparação à extração feita com etanol.

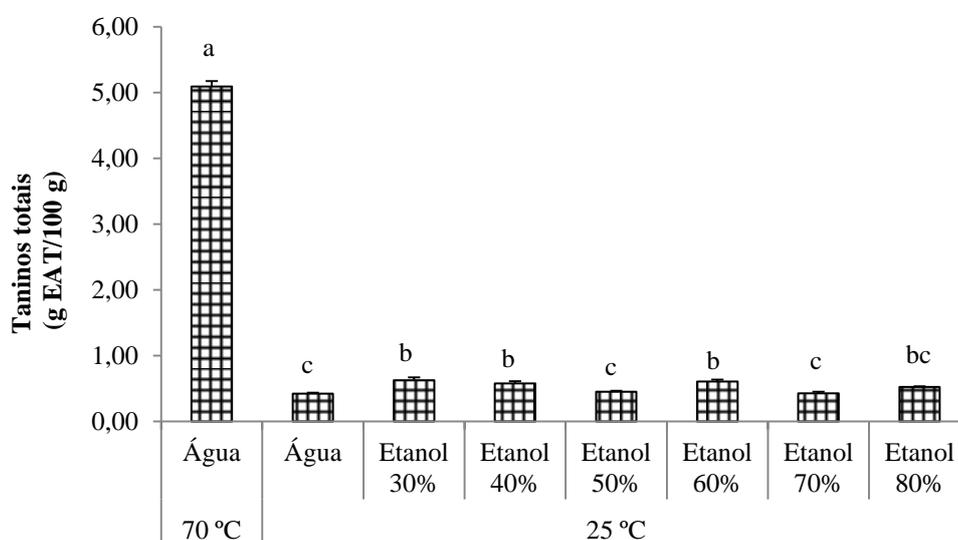


Figura 3 - Concentração de taninos totais nas folhas secas pulverizadas (droga vegetal) de *Psittacanthus plagiophyllus* submetidas à extração por diferentes solventes - água e soluções hidroalcoólicas em diferentes concentrações. Os resultados foram calculados a partir de uma curva padrão de ácido tânico ($R^2 = 0,9925$) e estão expressos em gramas de equivalentes de ácido tânico (EAT) por 100 gramas de droga vegetal. As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,01$).

Em relação à concentração de taninos totais (**Figura 3**), a diferença entre a água a 70 °C e todos os demais líquidos extratores estudados foi ainda mais evidente. A solubilidade de uma substância orgânica está diretamente relacionada com sua a estrutura molecular,

especialmente com a polaridade das ligações e da espécie química como um todo, mas é também muito dependente da temperatura (MARTINS *et al.*, 2013), que no caso da extração de taninos totais de *P. plagiophyllus* foi um fator determinante. Em função da economia e da alta eficiência da extração, a utilização da água em temperaturas elevadas (70 a 105 °C) é o processo mais utilizado para a obtenção de taninos de drogas vegetais (PAES *et al.*, 2013; POYER *et al.*, 2015).

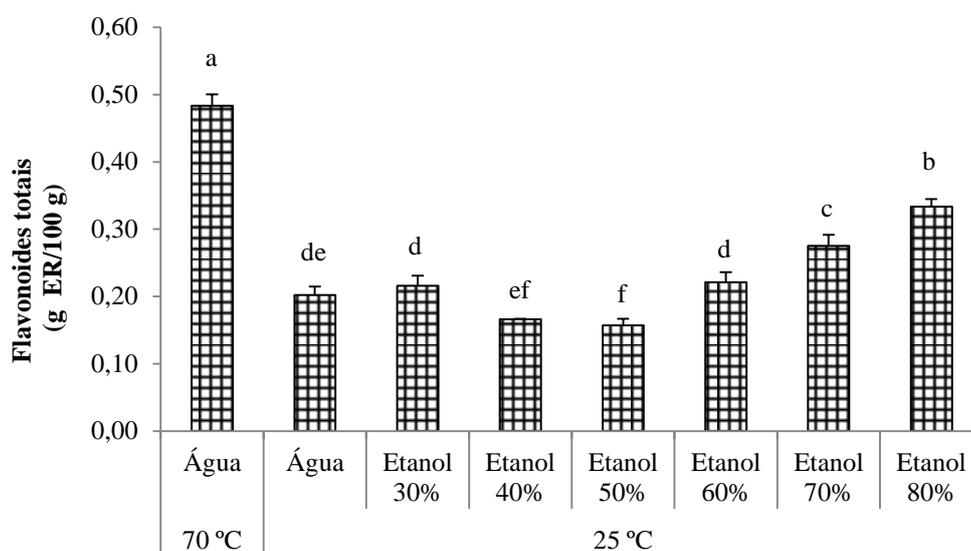


Figura 4 - Concentração de flavonoides totais nas folhas secas pulverizadas (droga vegetal) de *Psittacanthus plagiophyllus* submetidas à extração por diferentes solventes - água e soluções hidroalcoólicas em diferentes concentrações. Os resultados foram calculados a partir de uma curva padrão de rutina ($R^2 = 0,9942$) e estão expressos em gramas de equivalentes de rutina (ER) por 100 gramas de droga vegetal. As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,01$).

Da mesma forma, a extração aquosa à temperatura de 70 °C proporcionou maior concentração de flavonoides totais na droga vegetal de *P. plagiophyllus* (**Figura 4**). Em geral, compostos de alta polaridade são solúveis em solventes também polares, enquanto que compostos apolares ou fracamente polares são solúveis em solventes apolares ou de baixa polaridade (MARTINS *et al.*, 2013). A polaridade dos flavonoides pode variar muito de acordo com a subclasse da qual fazem parte, porém, em geral são extraídos de forma satisfatória com líquidos extratores de natureza menos polar (FLORINDO *et al.*, 2013), o que ocorreu quando a droga vegetal em estudo foi submetida à extração com a solução hidroalcoólica a 80%. Todavia, mais uma vez a elevação da temperatura da água foi um fator determinante, visto que na temperatura de 25 °C, tal solvente mostrou-se significativamente

menos eficiente na extração de flavonoides totais do que as soluções hidroalcoólicas contendo 70 e 80% de álcool.

Além de proporcionar maiores teores das classes de metabólitos aqui pesquisadas, a extração com água a temperaturas elevadas é a mais comumente utilizada pela população, que prepara decocções ou infusões a partir das folhas de *P. plagiophyllus*. Outras vantagens da extração aquosa são o baixo custo e a segurança da utilização do solvente, que não gera resíduos tóxicos e riscos ao consumidor.

Por todas estas razões, a extração com água a 70 °C foi o método selecionado para a produção do extrato aquoso das folhas de *P. plagiophyllus*, o qual foi utilizado nos ensaios de caracterização físico-química, atividade anti-inflamatória *in vivo* e atividade antioxidante *in vitro*.

4.2 Caracterização físico-química do derivado vegetal (extrato aquoso)

4.2.1 Perfil cromatográfico por cromatografia em camada delgada

A Cromatografia em Camada Delgada, um dos mais antigos e simples métodos cromatográficos, é ainda comumente utilizada para a análise de fitoterápicos em diversas farmacopeias, incluindo a brasileira, pois possibilita o eficiente rastreamento inicial dos seus constituintes e contribui para o controle de qualidade, já que permite a identificação de possíveis adulterações na matéria-prima e no derivado vegetal (HENRIQUE *et al.*, 2014; KALYANKAR *et al.*, 2014). A **tabela 2** apresenta o perfil cromatográfico do extrato aquoso de *P. plagiophyllus* por CCD.

Tabela 2 - Perfil cromatográfico do extrato aquoso liofilizado das folhas de *P. plagiophyllus* (EAPp) por Cromatografia em Camada Delgada.

Classe de metabólitos investigada	Resultado
Terpenoides	-
Flavonoides	+
Cumarinas glicosídeas	+
Cumarinas agliconas	-
Taninos hidrolisáveis	+
Taninos condensados	+

+ indica a presença e - indica a ausência das classes de metabólitos secundários nos extratos.

Os extratos de algumas outras espécies de ervas-de-passarinho pertencentes ao gênero botânico *Psittacanthus* já foram submetidos a prospecções fitoquímicas. Marín-Canchala *et al.*, (2013), por exemplo, estudaram o perfil fitoquímico do extrato etanólico obtido das folhas de *Psittacanthus cucullaris* e também detectaram a presença de flavonoides, cumarinas e taninos no extrato. Diferentemente de *P. plagiophyllus*, no entanto, os resultados foram positivos para terpenos. Além destes, foram detectados no extrato de *P. cucullaris* alcaloides, saponinas, antraquinonas e antocianinas.

O perfil cromatográfico por CCD do extrato metanólico de *P. calyculatus*, estudado por Avila-Acevedo *et al.*, (2012), demonstrou a presença de flavonoides, taninos e fenilpropanoides e a ausência de antraquinonas, esteroides e alcaloides no extrato. O seu fracionamento permitiu o isolamento de taninos condensados, do ácido gálico e da (+)-catequina. No extrato aquoso dessa mesma espécie, quatro principais flavonoides tem sido identificados: (+)-catequina, hesperitina, rutina e quercetina (IBARRA-ALVARADO, 2010; BAH *et al.*, 2011). Também foi revelada a presença de ácido gálico livre no extrato aquoso de *P. calyculatus* e, a partir de sua fração solúvel em metanol, foi identificado um glicosídeo da isoramnetina e um glicosídeo da quercetina (BAH *et al.*, 2011)

Já no estudo de Rodríguez *et al.*, (2008) foi evidenciada a presença de alcaloides, secoiridoides e de saponinas no extrato aquoso da espécie *Psittacanthus acinarius*. No extrato etanólico da mesma planta, foram detectados, além dos alcaloides e secoiridoides, triterpenoides e flavonoides.

Esses estudos com outras espécies do gênero *Psittacanthus* evidenciam a presença de vários compostos não pesquisados em *P. plagiophyllus* neste trabalho, como os alcaloides, as antraquinonas e as saponinas, e demonstram a necessidade de uma prospecção fitoquímica mais completa para caracterização do EAPp. No entanto, as classes de compostos fenólicos detectadas em *P. plagiophyllus* nesta análise qualitativa preliminar são suficientes para instigar o interesse por suas propriedades farmacológicas, visto que diversos flavonoides, taninos e cumarinas estão diretamente associados às propriedades terapêuticas de muitas plantas, inclusive no tratamento de desordens inflamatórias (FUNAKOSHI-TAGO *et al.*, 2015; JIA-BAO *et al.*, 2015; YANG *et al.*, 2015).

Os flavonoides compreendem aproximadamente metade das estruturas fenólicas existentes. Quimicamente, caracterizam-se pela presença de um núcleo comum de fenilcromanona (C6-C3-C6), que consiste de três anéis fenólicos com substituição em uma ou mais hidroxilas, incluindo derivados ligados a açúcares. Dependendo de sua estrutura

química, os flavonoides enquadram-se em diferentes subclasses: flavonois, flavonas, flavanonas, catequinas, antocianinas, isoflavonas, diidroflavonois e chalconas (KUMAR e PANDEY, 2013; YANAGIHARA *et al.*, 2014). O interesse farmacológico nestes compostos é significativo principalmente devido às suas propriedades em combater radicais livres, associados a doenças crônico-degenerativas (CORCORAN *et al.*, 2012). Muitos flavonoides apresentam ação preventiva e no tratamento de doenças cardiovasculares, ação hepatoprotetora, antidiabética, gastroprotetora, anticancerígena, antimicrobiana, antiviral, neuroprotetora, antioxidante e anti-inflamatória (TANWAR e MODGIL, 2012; ROMANO *et al.*, 2013; CHEN *et al.*, 2014; DINIZ *et al.*, 2015; FUNAKOSHI-TAGO *et al.*, 2015; XIE *et al.*, 2015).

Outro relevante grupo de compostos fenólicos detectado no EAPp é o dos taninos, os quais podem ser classificados em hidrolisáveis ou condensados e apresentam importância tanto farmacológica quanto nutricional. Taninos condensados ou proantocianidinas são polímeros de flavonoides unidos por ligações carbono-carbono. Já os taninos hidrolisáveis são constituídos por diversas moléculas de ácidos fenólicos unidas a um resíduo de glicose central. São chamados hidrolisáveis porque suas ligações ésteres são passíveis de sofrer hidrólise por ácidos ou enzimas, produzindo ácido gálico (galotaninos) ou ácido elágico (elagitaninos) (OKUDA e ITO, 2011; POYER *et al.*, 2015). Já foram descritos para os taninos, dentre outros, efeitos antibacteriano (RODRIGUES *et al.*, 2014), antifúngico (LUIZ *et al.*, 2015), cicatrizante (LEAL *et al.*, 2015), antiviral (THEISEN *et al.*, 2014), gastroprotetor (PRADO *et al.*, 2014), antioxidante e anti-inflamatório (PARK *et al.*, 2014; JIA-BAO *et al.*, 2015). Três propriedades comuns aos taninos hidrolisáveis e condensados são responsáveis pela maior parte de suas atividades biológicas: complexação com íons metálicos, atividade sequestradora de radicais livres e habilidade de complexação com proteínas e polissacarídeos (SANTOS e MELLO, 2007).

Por sua vez, as cumarinas consistem estruturalmente em lactonas do ácido o-hidróxi-cinâmico e ocorrem nas plantas como agliconas ou na forma glicosilada, tal como foram detectadas no EAPp. A pesquisa de medicamentos de origem vegetal tem conduzido a um renomado interesse por esses compostos, para os quais muitas atividades farmacológicas já foram descritas, tais como antiviral, antitumoral, antibacteriana, antifúngica, anticoagulante, anti-hipertensiva, anti-hiperglicêmica, neuroprotetora, antioxidante e anti-inflamatória (JAIN e JOSHI, 2012; VENUGOPALA *et al.*, 2013; ASIF, 2015).

4.2.2 Conteúdo de fenois totais, taninos e flavonoides

A **tabela 3** mostra a concentração dos compostos fenólicos totais, dos flavonoides totais e dos taninos hidrolisáveis e condensados do extrato aquoso liofilizado de *P. plagiophyllus*.

Apesar de o teor de compostos fenólicos totais presentes no EAPp ter sido alto (**Tabela 3**), concentrações maiores têm sido encontradas em extratos de outras espécies de ervas-de-passarinho do gênero *Psittacanthus*, produzidos por metodologias diferentes. Marín-Canchala *et al.*, (2013) encontraram 23,5% de fenois totais (expressos em equivalentes de ácido gálico) na fração aquosa obtida do extrato etanólico de folhas de *Psittacanthus cucullaris*. Já no extrato aquoso liofilizado de *P. calyculatus*, Ibarra-Alvarado *et al.*, (2010) encontraram 25,31% de fenois totais (expressos em equivalentes de ácido gálico).

Tabela 3 - Conteúdo de fenois totais, de flavonoides totais e de taninos totais, hidrolisáveis e condensados no extrato aquoso liofilizado de *P. plagiophyllus* (EAPp). Os resultados estão expressos como média±desvio padrão (n=3).

Classe de metabólitos pesquisada	Concentração (g/100 g do EAPp)
Fenois totais (expressos em EAT)	12,62±0,18
Taninos totais (expressos em EAT)	5,39±0,01
Taninos hidrolisáveis (expressos em EAT)	12,54±0,24
Taninos condensados (expressos em EC)	8,37±0,32
Flavonoides totais (expressos em ER)	1,23±0,02

EAT = Equivalentes de Ácido Tânico; EC = Equivalentes de Catequina; ER = Equivalentes de Rutina.

O extrato aquoso de *P. plagiophyllus* apresentou altos teores de taninos, principalmente hidrolisáveis (**Tabela 3**), mas não foram encontrados na literatura estudos de doseamento de taninos em outras espécies do gênero *Psittacanthus* e da família Loranthaceae, o que impossibilita uma análise comparativa. Bah *et al.*, (2011), entretanto, descobriu que a maior parte do ácido gálico identificado no extrato aquoso de *Psittacanthus calyculatus* está na sua forma livre e representa em média 2,66% do extrato.

Flavonoides foram encontrados em maiores concentrações na erva-de-passarinho *Psittacanthus calyculatus*, em comparação aos resultados exibidos neste trabalho para *P. plagiophyllus* (**Tabela 3**). Ibarra-Alvarado *et al.*, (2010), por exemplo, estimaram a presença de flavonoides totais a uma concentração de 3,34% no extrato aquoso liofilizado de *P.*

calyculatus, expressos em equivalentes de (+)-catequina. Bah *et al.*, (2011), por sua vez, quantificaram em 5,93%, o teor de (+)-catequina presente no extrato aquoso de *P. calyculatus*.

4.2.3 Rendimento, resíduo seco, densidade, pH e viscosidade

A **tabela 4** exibe alguns parâmetros físico-químicos do extrato aquoso de *P. plagiophyllus* liofilizado e ressuspendido em água mili-Q (25 mg/mL), determinados de acordo com o preconizado pela Farmacopeia Brasileira, 5ª edição (BRASIL, 2010).

Não há na Farmacopeia Brasileira, ou em outro compêndio oficial, limites de valores de resíduo seco, densidade, pH e viscosidade adequados para extratos vegetais. No entanto, a determinação de tais parâmetros é fundamental no processo de padronização dos derivados vegetais, pois contribui para a sua caracterização e, conseqüentemente, para o controle da qualidade e da estabilidade dos mesmos (BORELLA e CARVALHO, 2011).

Tabela 4 - Parâmetros físico-químicos do extrato aquoso seco e ressuspendido das folhas de *Psittacanthus plagiophyllus* (EAPp). Os resultados estão expressos como média±desvio padrão de três determinações.

	PARÂMETRO AVALIADO	RESULTADO
EAPp seco	Rendimento (%)	28,5%
	Densidade aparente (g/cm ³)	0,71±0,01
	Resíduo seco (% - m/m)	91,17±0,16
EAPp ressuspendido (25 mg/mL)	Densidade relativa (d ₂₀ ²⁰) (g/cm ³)	1,01±0,06
	Densidade de massa (g/cm ³)	1,11±0,07
	Viscosidade (cP)	2,50±0,08
	pH	4,80±0,05

O alto percentual de resíduo seco do EAPp liofilizado (**Tabela 4**) deve-se ao fato de tratar-se de um extrato cujo solvente utilizado para a extração já havia sido eliminado. A determinação do resíduo seco em extratos secos é importante por indicar a quantidade de água e voláteis ainda presentes no derivado, neste caso, 8,83±0,16%. Isto indica a quantidade real de substâncias extraídas e também demonstra a adequação das condições de armazenamento do mesmo, o que é fundamental para a sua estabilidade.

A viscosidade é outro parâmetro físico importante para caracterização de um extrato líquido e é variável de acordo com a temperatura e com o líquido extrator empregado na

preparação. A viscosidade do EAPp foi baixa (**Tabela 4**), em função de o extrato ter sido ressuspenso em água e a uma concentração relativamente baixa. Os valores de viscosidade estabilizaram no display do viscosímetro quando foi utilizado o sensor de cisalhamento de nº 61, a 50 rpm, com um torque médio de $2,10 \pm 0,08\%$. Como a temperatura é um fator que influencia diretamente na viscosidade, é importante mencionar que a temperatura do EAPp no momento da análise era de $22,5\text{ }^\circ\text{C}$.

O pH ácido do extrato aquoso líquido de *P. plagiophyllus* (**Tabela 4**) indica a presença de substâncias ácidas no extrato, uma vez que o valor de pH da água mili-Q utilizada na ressuspenção foi menos ácido (5,99) e não justifica a sua acidez, a qual se deve às altas concentrações de compostos fenólicos presentes. A temperatura da amostra no momento da medição do pH era de $22,7\text{ }^\circ\text{C}$.

4.3 Atividade anti-inflamatória *in vivo* do extrato padronizado de folhas de *Psittacanthus plagiophyllus*

4.3.1 Edema de pata induzido por carragenina e por dextrana

A **figura 5** mostra a evolução do volume do edema da pata de ratos da 1ª até a 4ª hora após a injeção do agente flogístico carragenina. O extrato aquoso de folhas de *P. plagiophyllus* reduziu a formação do edema de pata induzido por carragenina em ratos em todas as doses administradas, de maneira dose-dependente. Porém, somente com as duas maiores doses testadas (500 e 1000 mg/Kg) houve redução significativa ($p < 0,01$) no volume do edema, quando comparadas aos animais que receberam por via oral apenas o veículo, a partir da 2ª hora de medição.

A administração do EAPp na dose de 500 mg/Kg suprimiu o edema em $70,23 \pm 12,70\%$; $62,21 \pm 3,16\%$ e $59,07 \pm 4,64\%$, na 2ª, na 3ª e na 4ª hora, respectivamente. Na dose de 1000 mg/Kg, o EAPp foi capaz de reduzir a formação do edema em $69,30 \pm 7,87\%$ na 2ª hora, $80,37 \pm 6,58\%$ na 3ª hora, e em $65,89 \pm 7,66\%$ na 4ª hora após a injeção do agente flogístico.

A indometacina (10 mg/Kg), droga padrão utilizada como controle positivo no experimento, também reduziu significativamente ($p < 0,01$) o volume do edema na 2ª ($95,35 \pm 3,60\%$), na 3ª ($95,09 \pm 2,33\%$) e na 4ª hora ($80,16 \pm 8,64\%$) após a indução por carragenina.

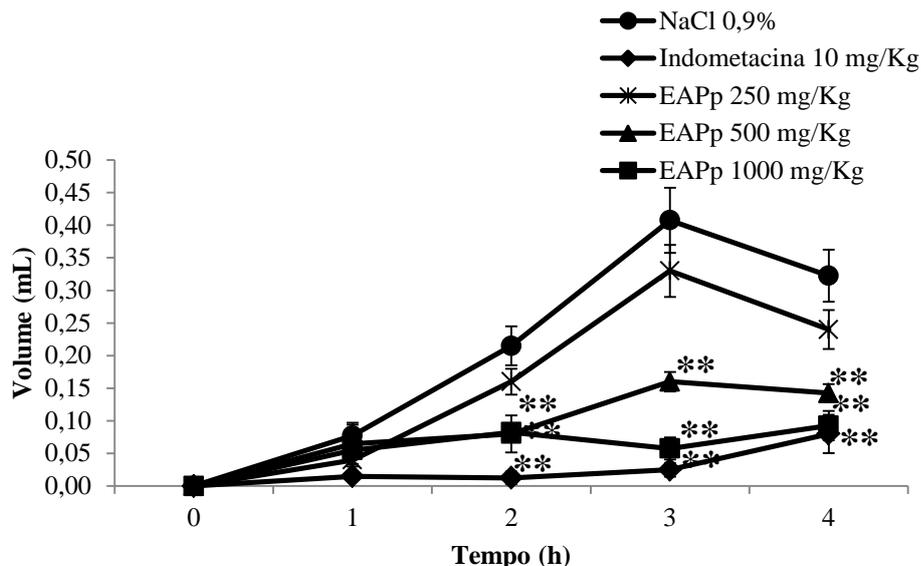


Figura 5 - Efeito da administração oral do EAPp - extrato aquoso de folhas de *Psittacanthus plagiophyllus* (250, 500 e 1000 mg/Kg) e da indometacina (10 mg/Kg) no volume do edema de pata induzido por carragenina em ratos. Cada ponto representa a média (n=6) do volume do edema e as barras representam o erro padrão da média. ** indica diferença significativa ($p < 0,01$) entre os grupos tratados e o controle negativo (NaCl 0,9%) pelo teste de Dunnett.

A carragenina é um polissacarídeo obtido a partir de algas marinhas vermelhas, cuja injeção em ratos induz a liberação de importantes mediadores da resposta inflamatória. O edema de pata induzido por esse agente flogístico é, portanto, um modelo de inflamação aguda amplamente utilizado para a pesquisa de drogas com propriedades anti-inflamatórias. O desenvolvimento do edema na pata de ratos após a injeção da carragenina tem sido descrito como um evento bifásico, no qual vários mediadores atuam em sequência para produzir a resposta edematogênica (NECAS e BARTOSIKOVA, 2013).

A fase inicial (1 h - 3 h) é caracterizada principalmente pela liberação de histamina e serotonina, seguida da liberação de bradicinina. Já na fase tardia (3 h - 4 h), ocorre, sobretudo, o aumento da produção e liberação de prostaglandinas (PATEL e GOWDA, 2012). Esses mediadores induzem o aumento do fluxo sanguíneo para o tecido inflamado devido à vasodilatação e ao aumento da permeabilidade vascular, o que resulta na formação do edema, um dos sinais clássicos da inflamação, utilizado como parâmetro para avaliação da atividade anti-inflamatória do EAPp neste modelo (RICCIOTTI e FITZGERALD, 2011).

Uma vez que o efeito anti-inflamatório da droga testada neste ensaio é associado à inibição dos mediadores responsáveis por cada fase (PATEL e GOWDA, 2012), pode-se sugerir que o EAPp tem ação supressiva sobre os mediadores tanto da fase precoce, quanto da fase tardia da resposta edematogênica, podendo atuar na inibição da liberação das aminas

vasoativas e da bradicinina ou da produção de prostaglandinas e de outros produtos da ciclo-oxigenase. O mecanismo de ação dos anti-inflamatórios não estereoidais (AINEs), como a indometacina, também envolve a inibição da produção de prostaglandinas pelas ciclo-oxigenases (RICCIOTTI e FITZGERALD, 2011). O extrato aquoso das folhas de *Dendrophthoe falcata*, outra erva-de-passarinho pertencente à família Loranthaceae, também suprimiu o edema de pata induzido pela carragenina em ratos na fase tardia, 4 horas após a injeção da carragenina (PATIL *et al.*, 2011).

Como a resposta inflamatória é um evento complexo que envolve a participação de vários mediadores, foram realizados estudos adicionais para melhor compreensão da ação anti edematogênica exibida pelo extrato de *P. plagiophyllus* neste modelo de inflamação.

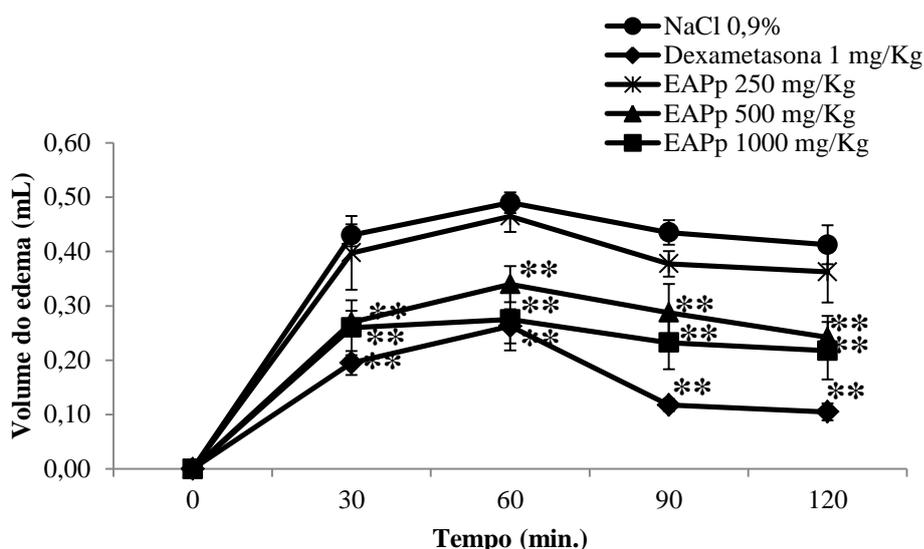


Figura 6 - Efeito da administração oral do EAPp - extrato aquoso de folhas de *Psittacanthus plagiophyllus* (250, 500 e 1000 mg/Kg) e da dexametasona (1 mg/Kg) no volume do edema de pata induzido por dextrana em ratos. Cada ponto representa a média (n=6) do volume do edema e as barras representam o erro padrão da média. ** indica diferença significativa ($p < 0,01$) entre os grupos tratados e o controle negativo (NaCl 0,9%) pelo teste de Dunnett.

No modelo do edema de pata induzido por dextrana em ratos, o EAPp também reduziu, de forma dose-dependente, a formação do edema em todas as doses administradas aos animais (**Figura 6**). No entanto, a redução foi significativa ($p < 0,01$) somente com as doses de 500 e 1000 mg/Kg, em comparação ao grupo controle negativo. Quando administrado na dose de 500 mg/Kg, o EAPp reduziu significativamente a formação do edema em $37,21 \pm 4,93\%$ aos 30 minutos, $30,61 \pm 6,82\%$ aos 60 minutos, $33,91 \pm 12,18\%$ aos 90 minutos e em $41,21 \pm 9,46\%$ aos 120 minutos após a injeção da dextrana. Na dose de 1000

mg/Kg, o extrato aquoso das folhas de *P. plagiophyllus* também atuou aos 30, 60, 90 e 120 minutos após a indução da inflamação, reduzindo de maneira significativa a formação do edema em $39,53 \pm 11,74\%$; $43,88 \pm 11,62\%$; $46,55 \pm 11,28\%$ e $47,27 \pm 12,77\%$, respectivamente.

O edema causado pela dextrana não é suprimido pelos anti-inflamatórios não-estereoidais, como a indometacina (LO *et al.*, 1982), o que explica a utilização do corticosteroide dexametasona (1 mg/Kg) como controle positivo neste ensaio. Conforme esperado, a dexametasona atuou na inibição da formação do edema induzido pela dextrana em todos os tempos avaliados. As inibições foram de $54,65 \pm 5,16$; $46,43 \pm 6,42$; $72,99 \pm 2,55$ e $74,55 \pm 3,77$ aos 30, 60, 90 e aos 120 minutos, respectivamente.

As dextranas são polissacarídeos de alto peso molecular, sintetizados a partir da sacarose processada pela enzima dextranasacarase, a qual é secretada pelas bactérias agrupadas na família Lactobacillaceae, nos gêneros *Lactobacillus*, *Streptococcus* e *Leuconostoc*. A maior parte das dextranas, no entanto, é sintetizada industrialmente pela bactéria *Leuconostoc mesenteroides* (VETTORI, 2011), incluindo a dextrana utilizada nesta pesquisa.

A injeção de dextrana na pata de ratos promove a degranulação parcial de mastócitos, com liberação de histamina e serotonina, que, por sua vez, são responsáveis pela rápida formação de um edema caracterizado pela acumulação de fluido pobre em proteínas e em neutrófilos (NISHIDA *et al.*, 1978; NISHIDA *et al.*, 1979), diferentemente do observado com a administração da carragenina, que ocasiona a formação de um exsudato com alta concentração de proteínas e neutrófilos (LO *et al.*, 1982). O extrato aquoso de *P. plagiophyllus* foi eficiente em inibir a formação do edema pela administração subcutânea da dextrana na pata de ratos, o que, portanto, sugere um possível efeito inibitório na ação da histamina e da serotonina, responsáveis pela formação do edema neste modelo animal.

As diferenças na composição do fluido inflamatório acumulado em resposta à presença da dextrana e da carragenina estão relacionadas a diferentes mecanismos de aumento da permeabilidade vascular e aos mediadores envolvidos. A ação edematogênica causada pela dextrana envolve a ultrafiltração do plasma (transudação), enquanto a causada pela carragenina envolve o vazamento do plasma (exsudação) (LO *et al.*, 1982). Como o EAPP apresentou ação antiedematogênica nos modelos de edema de pata induzido por esses dois agentes, é possível que seu efeito anti-inflamatório envolva a inibição de eventos vasculares e celulares da resposta inflamatória.

4.3.2 Inflamação na bolsa de ar subcutânea

Após a identificação da possível ação inibitória do EAPp sobre os diferentes mediadores da resposta edematogênica causada pela carragenina e pela dextrana (**Figuras 5 e 6**), o próximo passo para a compreensão parcial de seu mecanismo de ação consistiu em avaliar sua ação sobre a alta concentração de proteínas e de leucócitos que caracterizam o exsudato inflamatório formado em resposta à carragenina (LO *et al.*, 1982). Para isto, utilizamos o modelo de inflamação aguda induzida por carragenina na bolsa de ar subcutânea formada no dorso de camundongos.

A bolsa de ar subcutânea é um modelo *in vivo* muito conveniente para o estudo da ação anti-inflamatória aguda e crônica de drogas. A injeção subcutânea de ar no dorso dos animais provoca o rompimento do tecido conectivo subcutâneo, resultando na formação de um revestimento semelhante à membrana sinovial que, após seis dias, fornece um ambiente ideal para a migração do exsudato inflamatório em resposta a agentes irritantes. Esta cavidade possui características semelhantes à sinóvia inflamada de pacientes com artrite reumatoide, o que justifica a utilização deste modelo para a pesquisa de fármacos antiartríticos. A resposta inflamatória ocasionada pela injeção de carragenina na bolsa pode ser quantificada por meio da medição do volume do exsudato, da concentração de proteínas, do recrutamento de neutrófilos e da liberação de mediadores (DUARTE *et al.*, 2012).

Em relação ao recrutamento de células, ficou demonstrado que, em todas as doses administradas, o EAPp foi capaz de inibir significativamente ($p < 0,01$) a migração de leucócitos totais para a bolsa, quando comparado ao grupo controle negativo, que recebeu por via oral apenas água (**Figura 7**). As doses de 250, 500 e 1000 mg/Kg do EAPp reduziram a migração de leucócitos em $87,45 \pm 4,13$; $90,91 \pm 1,59\%$ e $93,94 \pm 1,98\%$, respectivamente. A droga padrão anti-inflamatória utilizada no ensaio - dexametasona na dose de 1 mg/Kg - também reduziu significativamente ($80,52 \pm 3,81\%$) o número total de leucócitos que migraram para a bolsa após a injeção da carragenina na cavidade.

A ação anti-inflamatória do extrato neste modelo é baseada principalmente na redução da migração de neutrófilos para a cavidade, que pôde ser avaliada a partir da contagem diferencial de leucócitos. Conforme pode ser observado na **figura 8**, a administração oral do EAPp reduziu significativamente ($p < 0,01$) o número de neutrófilos recrutados em $90,88 \pm 0,54\%$ com a dose de 250 mg/Kg, $93,24 \pm 0,77\%$ com a dose de 500 mg/Kg e em $96,43 \pm 0,34\%$ com a dose de 1000 mg/Kg do extrato. Já a dexametasona, inibiu a migração de

neutrófilos em $88,75 \pm 2,09\%$, quando comparada ao grupo controle negativo, que recebeu apenas água por via oral.

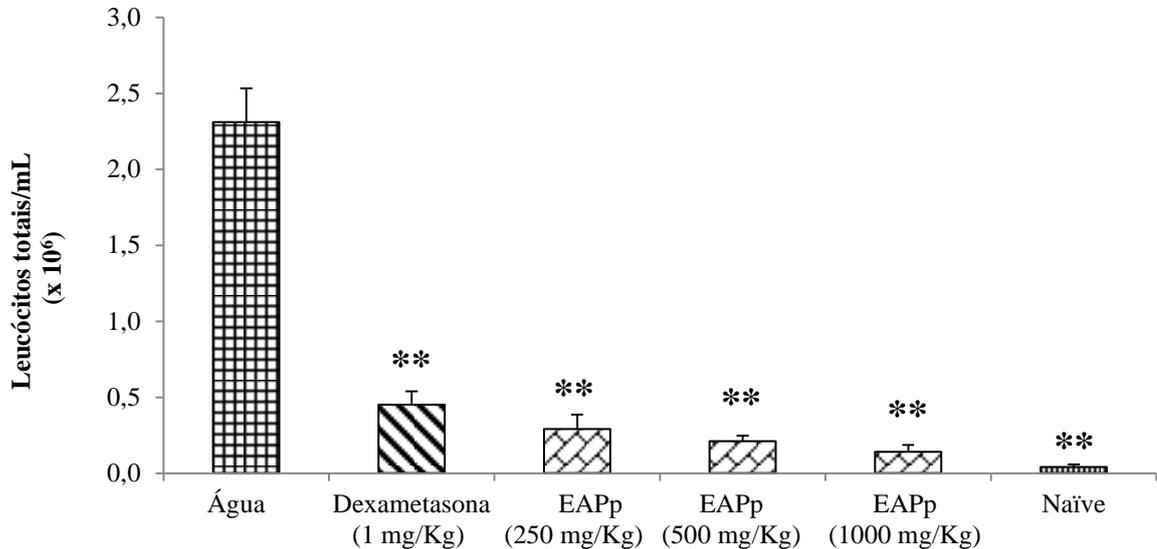


Figura 7 - Efeito da administração oral do EAPp - extrato aquoso de folhas de *Psittacanthus plagiophyllus* (250, 500 e 1000 mg/Kg) e da dexametasona (1 mg/Kg) no número total de leucócitos do lavado da bolsa de ar subcutânea de camundongos com inflamação induzida por carragenina. O grupo Naïve recebeu por via oral apenas o veículo (água) e injeção subcutânea de PBS estéril na bolsa. Cada coluna representa a média (n=6) do número de leucócitos e as barras representam o erro padrão da média. ** indica diferença significativa ($p < 0,01$) entre os grupos tratados e o controle negativo (água) pelo teste de Dunnett.

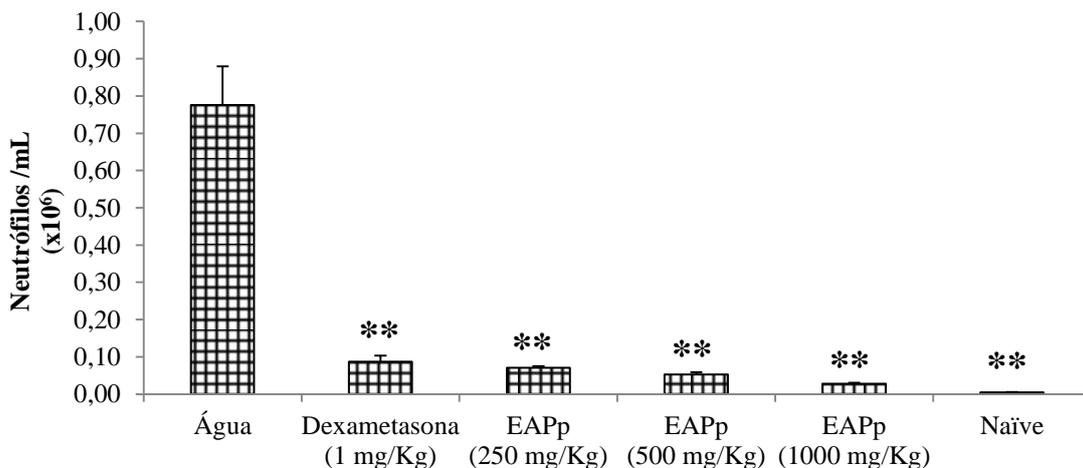


Figura 8 - Efeito da administração oral do EAPp - extrato aquoso de folhas de *Psittacanthus plagiophyllus* (250, 500 e 1000 mg/Kg) e da dexametasona (1 mg/Kg) no número de neutrófilos recrutados para a bolsa de ar subcutânea de camundongos com inflamação induzida por carragenina. O grupo Naïve recebeu por via oral apenas o veículo (água) e injeção subcutânea de PBS estéril na bolsa. Cada coluna representa a média (n=6) do número de neutrófilos e as barras representam o erro padrão da média. ** indica diferença significativa ($p < 0,01$) entre os grupos tratados e o controle negativo pelo teste de Dunnett.

A determinação da concentração de proteínas no lavado da bolsa de ar subcutânea dos camundongos possibilitou quantificar, indiretamente, o exsudato inflamatório presente na cavidade. Na **figura 9**, que exibe a média da concentração de proteínas no exsudato coletado dos grupos teste e controles, é possível observar que, quando comparada ao grupo controle negativo, cujos animais receberam por via oral apenas água, a administração do extrato aquoso de *P. plagiophyllus* possibilitou redução significativa ($p < 0,01$) na formação de exsudato inflamatório nas três doses testadas. As doses de 250, 500 e 1000 mg/Kg inibiram a exsudação em $16,93 \pm 4,55\%$, $18,72 \pm 2,60\%$ e $21,75 \pm 4,21\%$, respectivamente. Por sua vez, a dexametasona (1 mg/Kg) inibiu em média $18,95 \pm 4,54\%$ a exsudação, em comparação ao grupo controle negativo.

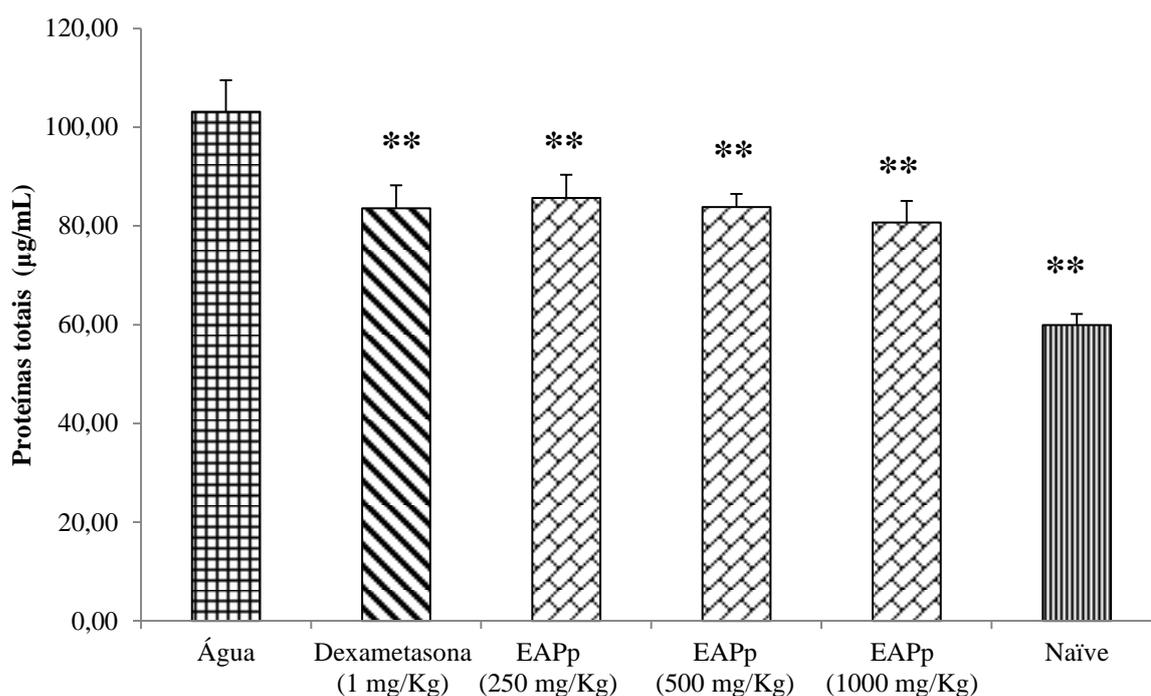


Figura 9 - Efeito da administração oral do EAPp - Extrato Aquoso de folhas de *Psittacanthus plagiophyllus* (250, 500 e 1000 mg/Kg) e da dexametasona (1 mg/Kg) na exsudação em resposta à inflamação induzida por carragenina, avaliada por meio da concentração de proteínas totais na bolsa de ar subcutânea. O grupo Naïve recebeu por via oral apenas o veículo (água) e injeção subcutânea de PBS estéril na bolsa. A determinação da concentração de proteínas foi realizada por reação de Bradford, a partir de uma curva padrão de albumina sérica bovina, por meio da equação da reta $y = 0,0102x + 0,301$ ($R^2 = 0,9942$). Cada coluna representa a média ($n=6$) da concentração de proteínas e as barras representam o erro padrão da média. ** indica diferença significativa ($p < 0,01$) entre os grupos tratados e o controle negativo (água) pelo teste de Dunnett.

Ficou demonstrado com este modelo de inflamação, portanto, que o extrato aquoso padronizado obtido das folhas de *P. plagiophyllus* possui considerável ação anti-inflamatória, atuando de maneira eficiente na redução tanto da exsudação como do recrutamento de leucócitos, sobretudo neutrófilos. Dentre os principais mediadores inflamatórios que possuem papel na vasodilatação e no aumento da permeabilidade vascular, estão o peptídeo vasoativo bradicinina, a amina vasoativa histamina, o óxido nítrico e a prostaglandina E₂. Quanto ao recrutamento de leucócitos para o sítio da inflamação, os mediadores mais relevantes são o eicosanoide Leucotrieno B₄, as citocinas TNF- α e IL-1 β e a quimiocina IL-8 (CRUVINEL *et al.*, 2010). Estudos adicionais envolvendo a ação do EAPp sobre esses e outros mediadores são fundamentais para a elucidação dos mecanismos pelos quais este extrato age na redução da permeabilidade vascular e da migração leucocitária durante a resposta inflamatória aguda.

O alto teor de compostos fenólicos totais e a presença de taninos, cumarinas e flavonoides no EAPp podem estar relacionados à ação anti-inflamatória exibida pelo extrato em todos os modelos de inflamação aguda estudados neste trabalho. Pesquisas *in vitro* e *in vivo* demonstram que alguns compostos fenólicos podem apresentar efeitos anti-inflamatórios devido à capacidade de redução da síntese de eicosanoides, ação supressiva na produção de moléculas pró-inflamatórias, modulação da expressão de genes relacionados à resposta inflamatória, além da possibilidade de atuação direta ou indireta na atividade de células inflamatórias como linfócitos, células natural killer, monócitos, neutrófilos, mastócitos e macrófagos (KUMAR e PANDEY, 2013; ROMANO *et al.*, 2013).

Outro mecanismo de ação anti-inflamatória de derivados vegetais consiste no poder antioxidante atribuído principalmente a seus compostos fenólicos, visto que os radicais livres possuem papel importante na patogênese de doenças associadas a desordens inflamatórias (BREWER, 2011; WALTER e MARCHESAN, 2011). No intuito de avaliar esta hipótese, o EAPp foi submetido a um ensaio de atividade antioxidante *in vitro*.

4.4 Capacidade antioxidante *in vitro* do extrato padronizado de folhas de *Psittacanthus plagiophyllus*

Os radicais livres, especialmente as espécies reativas de oxigênio (ERO), são produtos constantes de alguns processos fisiológicos, como a fosforilação mitocondrial da cadeia transportadora de elétrons. No entanto, em condições patológicas, são produzidos em grandes quantidades, superando a capacidade dos antioxidantes endógenos e exógenos e gerando estresse oxidativo. ERO como o ânion superóxido (O₂^{•-}), o radical hidroxila (HO[•]) e o peróxido de hidrogênio (H₂O₂) são altamente reativas e interagem com macromoléculas

essenciais, como o DNA, proteínas e lipídios, causando danos celulares associados a diversas enfermidades crônicas, tais como o diabetes, as doenças cardiovasculares e o câncer, além de outras desordens inflamatórias (BREWER, 2011).

Neste contexto, a realização de testes *in vitro* para avaliação da ação antioxidante de derivados vegetais com potencial terapêutico é muito útil para a compreensão de suas propriedades farmacológicas. Para a avaliação do poder antioxidante do extrato aquoso padronizado obtido das folhas de *P. plagiophyllus* foi empregado o método de sequestro do radical livre DPPH, o qual é considerado um dos mais simples, precisos e reprodutíveis na avaliação da atividade antioxidante de extratos vegetais e de substâncias puras (ALVES *et al.*, 2010).

O estudo de tempo de reação do EAPp com o radical livre DPPH mostrou estabilidade da reação aos 45 minutos. O percentual de inibição do DPPH chegou a 93,13% com a concentração de 75 µg/mL do EAPp, resultado superior ao do trolox, que foi de 67,26% na maior concentração testada (5 µg/mL), conforme elencado na **tabela 5**.

A concentração do EAPp capaz de reduzir em 50% o radical DPPH foi de 21,70±1,20 µg/mL, evidenciando seu alto potencial antioxidante, o qual pode ser atribuído principalmente à elevada concentração de compostos fenólicos totais no extrato (12,62%), conforme demonstrado anteriormente nesta pesquisa, na **tabela 3**.

Tabela 5 - Capacidade antioxidante do EAPp e do trolox pelo método de sequestro do radical livre DPPH. Os resultados estão expressos como média±desvio padrão (n=3).

Amostra testada	Concentração (µg/mL)	% de Inibição	IC ₅₀ (µg/mL)
EAPp (45 minutos de reação)	10	29,49±1,62	21,70±1,20
	25	63,33±3,71	
	50	80,63±1,49	
	75	93,13±1,71	
	100	91,79±0,41	
Trolox (5 minutos de reação)	1	10,83±0,78	3,52±0,08
	2	32,39±0,53	
	3	44,84±3,70	
	4	59,54±4,83	
	5	67,26±0,63	

EAPp = Extrato aquoso de folhas de *P. plagiophyllus*; DPPH = 2,2-difenil-1-picril-hdrazil; IC₅₀ = Concentração inibitória capaz de reduzir em 50% o radical DPPH.

Os compostos fenólicos agem como antioxidantes principalmente devido à sua habilidade em doar átomos de hidrogênio e, portanto, inibir as reações em cadeia provocadas pelos radicais livres. Ademais, além do sequestro de espécies reativas de oxigênio, esses compostos podem atuar na supressão da peroxidação lipídica, reciclando outros antioxidantes, como o α -tocoferol; no aumento da atividade de enzimas antioxidantes; na ligação a metais pró-oxidantes, como o ferro e o cobre, o que previne a formação de radicais livres; e na indução da síntese de proteínas com propriedades antioxidantes (WALTER e MARCHESAN, 2011). Entretanto, a melhor elucidação dos mecanismos envolvidos no poder antioxidante do extrato aquoso de *P. plagiophyllus* demanda a realização de testes adicionais *in vitro* e também *in vivo*.

O estudo do poder antioxidante de outras espécies do gênero *Psittacanthus* também mostrou boa capacidade sequestradora do radical livre DPPH para o extrato etanólico de *Psittacanthus cucullaris* (MARÍN-CANCHALA *et al.*, 2013) e para os extratos aquoso e etanólico de *Psittacanthus acinarius* (RODRÍGUEZ *et al.*, 2008), resultados que também foram associados sobretudo à alta concentração de fenóis nos extratos.

5 CONCLUSÕES

A extração aquosa a 70 °C mostrou-se mais adequada para a obtenção do extrato a partir da droga vegetal de *P. plagiophyllus*. Tanto a droga vegetal quanto o extrato aquoso de *P. plagiophyllus* foram caracterizados em relação a diversos parâmetros físico-químicos de controle de qualidade e seguiram o preconizado pela ANVISA por meio da 5ª edição da Farmacopeia Brasileira.

A análise fitoquímica qualitativa do EAPp indicou a presença de cumarinas, taninos hidrolisáveis, taninos condensados e de flavonoides e o doseamento de compostos fenólicos demonstrou alto teor de fenóis totais no extrato, principalmente de taninos hidrolisáveis e condensados.

O EAPp suprimiu a formação do edema de pata induzido em ratos tanto por carragenina como por dextrana e foi eficiente na redução da exsudação e do recrutamento de leucócitos totais e de neutrófilos em resposta à injeção de carragenina. O extrato apresentou ainda alta capacidade antioxidante *in vitro*.

A considerável ação anti-inflamatória e antioxidante exibida pelo EAPp nos modelos realizados neste trabalho fornece uma base científica para seu uso etnobotânico no tratamento de desordens inflamatórias. Porém, estudos adicionais são fundamentais para a elucidação do exato mecanismo de ação anti-inflamatória do extrato e para a identificação das substâncias responsáveis por este efeito.

Além de contribuir para a pesquisa de novos anti-inflamatórios de origem natural, o presente estudo representa um importante avanço no estudo farmacológico, fitoquímico e de controle de qualidade dos extratos de espécies de erva-de-passarinho (Loranthaceae) nativas do Brasil e utilizadas para fins terapêuticos pelas comunidades locais.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACOSTA, M. G. R. **Comparación y análisis de extractos de *Psittacanthus calyculatus* y *Phoradendron tomentosum* para su uso en el desarrollo de alimentos funcionales para diabéticos tipo 2**. Tese (Doutorado em Engenharia em Ciência e Tecnologia de Alimentos). Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, Buenavista, México, 67 p., 2013.

ADESINA, S. K.; ILLOH, H. C.; JOHNNY, I. I.; JACOBS, I. E. African mistletoes (Loranthaceae); ethnopharmacology, chemistry and medicinal values: an update. **African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines**, v. 10, n. 4, p. 161-170, 2013.

ALONSO-CASTRO, A. J.; VILLARREAL, M. L.; SALAZAR-OLIVOD, L. A.; GOMEZ-SANCHEZE, M.; DOMINGUEZ, F.; GARCIA-CARRANCA, A. Mexican medicinal plants used for cancer treatment: pharmacological, phytochemical and ethnobotanical studies. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 133, n. 3, p. 945-972, 2011.

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

ALVES, C. Q.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P.; BAHIA, M. V.; AGUIAR, R. M. Métodos para determinação de atividade antioxidante *in vitro*. 2010. **Química Nova**, v. 33, n. 10, p. 2202-2210, 2010.

APG III. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG III. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 161, n. 2, p. 105-121, 2009.

ARRUDA, R.; FADINI, R. F.; CARVALHO, L. N.; DEL-CLARO, K.; MOURÃO, F. A.; JACOBI, C. M.; TEODORO, G. S.; BERG, E.; CAIRES, C. S.; DETTKE, G. A. Ecology of neotropical mistletoes: an important canopy-dwelling component of Brazilian ecosystems. **Acta Botanica Brasilica**, v. 26, n. 2, p. 264-274, 2012.

ASHLEY, N. T.; WEIL, Z. M.; NELSON, R. J. Inflammation: mechanisms, costs, and natural variation. **Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics**, v. 43, p. 385-406, 2012.

ASIF, M. Overview of diverse pharmacological activities of substituted coumarins: compounds with therapeutic potentials. **American Journal of Current Organic Chemistry**, v. 1, n. 1, p. 1-16, 2015.

ATEWOLARA-ODULE, O. C.; AIYELAAGBE, O. O. Antimicrobial properties and phytochemical studies of extracts of *Phragmanthera incana* (Schum) Balle [Loranthaceae] grown in Nigeria. **International Journal of Research in Chemistry and Environment**, v. 3, n. 1, p. 203-207, 2013.

AVAU, A.; PUT, K.; WOUTERS, C. H.; MATTHYS, P. Cytokine balance and cytokine-driven natural killer cell dysfunction in systemic juvenile idiopathic arthritis. **Cytokine & Growth Factor Reviews**, v. 26, n. 1, p. 35-45, 2014.

AVILA-ACEVEDO, J. G.; GARCÍA-BORES, A. M.; MARTÍNEZ-RAMÍREZ, F.; HERNÁNDEZ-DELGADO, C. T.; IBARRA-BARAJAS, M.; ROMO DE VIVAR, A.; FLORES-MAYA, S.; VELASCO-LARA, P.; CESPEDES, C. L. Antihyperglycemic effect and genotoxicity of *Psittacanthus calyculatus* extract in streptozotocin-induced diabetic rats. **Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas**, v.11, n. 4, p. 345-353, 2012.

BAH, M.; GUTIÉRREZ-AVELLA, D. M.; FUENTES-ORDAZ, R.; CASTAÑEDA-MORENO, R.; MARTÍNEZ, M. Chemical constituents of the mexican mistletoe (*Psittacanthus calyculatus*). **Molecules**, v. 16, p. 9397-9403, 2011.

BARBALHO, S. M.; BECHARA, M.D.; QUESADA, K. R.; GOULART, R. A. Papel dos ácidos graxos ômega 3 na resolução dos processos inflamatórios. **Medicina (Ribeirão Preto)**, v. 44, n. 3, p. 234-240, 2011.

BELE, A. A.; KHALE, A. Standardization of herbal drugs: an overview. **International Research Journal of Pharmacy**, v. 2, n. 12, p. 56-60, 2011.

BENINCÁ, J. P., MONTANHER, A. B., ZUCOLOTTI, S. M., SCHENKEL, E. P., FRODE, T. S. Antiinflammatory effects of the *Passiflora edulis*: forma flavicarpa Degener inhibition of leukocytes, enzymes and pro-inflammatory cytokine levels in the air pouch model, in mice. **Food Chemistry**, v. 104, n. 3, p. 1097-1105, 2007.

BORELLA, J. C.; CARVALHO, D. M. A. de. Avaliação comparativa da qualidade de extratos de *Calendula officinalis* L. (Asteraceae) comercializados em farmácias de manipulação em Ribeirão Preto – SP. **Revista Brasileira de Farmácia**, v. 92, n. 1, p. 13-18, 2011.

BORHAN, M. Z.; AHMAD, R.; RUSOP, M.; ABDULLAH, S. Optimization of ball milling parameters to produce *Centella asiatica* herbal nanopowders. **Journal Of Nanostructure in Chemistry**, v. 3, p. 1-8, 2013.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248-254, 1976.

BRASIL. Lei Federal nº 11.794, de 8 de outubro de 2008. Regulamenta o inciso VII do § 1º do art. 225 da Constituição Federal, estabelecendo procedimentos para o uso científico de animais; revoga a Lei nº 6.638, de 8 de maio de 1979; e dá outras providências. Disponível em: < http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2007-2010/2008/lei/111794.htm > Acesso em: 12 ago. 2014.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RDC nº 49, de 23 de novembro de 2010. Aprova Farmacopeia Brasileira, 5ª edição e dá outras providências. 2010. Disponível em: < http://www.anvisa.gov.br/hotsite/cd_farmacopeia/index.htm > Acesso em: 20 out. 2014.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Instrução normativa nº 4, de 18 de junho de 2014. Determina a publicação do Guia de orientação para registro de Medicamento Fitoterápico e registro e notificação de Produto Tradicional Fitoterápico. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/10f7288044703a8bbb8fffe3a642e80/Guia+final+dicol+180614.pdf?MOD=AJPERES>> Acesso em: 15 nov. 2014. (2014 b).

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RDC nº 26, de 13 de maio de 2014. Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos e o registro e a notificação de produtos tradicionais fitoterápicos. (2014 a).

BRAZ, R.; WOLF, L. G.; LOPES, G. C.; MELLO, J. C. P. Quality control and TLC profile data on selected plant species commonly found in the Brazilian market. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 22, n. 5, p. 1111-1118, 2012.

BREWER, M. S. Natural Antioxidants: sources, compounds, mechanisms of action, and potential applications. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 2010, p. 221-247, 2011.

CAIRES, C. S.; DETTKE, G. A. Loranthaceae, p. 1172-1177. In: **Catálogo de plantas e fungos do Brasil 2**. Rio de Janeiro, Andrea Jakobsson Estúdio, Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 1702 p., 2010.

CAMAL-FUENTES, E.; TORRES-TAPIA, L. W.; SIMÁ-POLANCO, P.; PERAZA-SÁNCHEZ, S. R.; MOO-PUC, R. Screening of plants used in Mayan traditional medicine to treat cancer-like symptoms. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 135, p. 719-724, 2011.

CANEBA, C. A.; YANG, L.; BADDOUR, J.; CURTIS, R.; WIN, J.; HARTIG, S., MARINI, J.; NAGRATH, D. Nitric oxide is a positive regulator of the Warburg effect in ovarian cancer cells. **Cell Death and Disease**, v. 5, p. 1-12, 2014.

CARVALHO, A. C. B. **Plantas medicinais e fitoterápicos: regulamentação sanitária e proposta de modelo de monografia para espécies vegetais oficializadas no Brasil**. Tese (Doutorado em Ciências da Saúde). Universidade de Brasília, Brasília, 318 p., 2011.

CARVALHO, A. C. B.; SANTOS, L. A.; SILVEIRA, D. Systematic organization of medicinal plant information: a monograph template proposal. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 24, p. 80-88, 2014.

CHABARIBERI, R. A. O.; POZZI, A. C. S.; ZERAIK, M. L.; YARIWAKE, J. H. Determinação espectrométrica dos flavonoides das folhas de *Maytenus* (Celastraceae) e de *Passiflora* (Passifloraceae) e comparação com método CLAE-UV. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 19, n. 4, p. 860-864, 2009.

CHAWLA, R.; THAKUR, P.; CHOWDHRY, A.; JAISWAL, S.; SHARMA, A.; GOEL, R., SHARMA, J.; PRIYADARSHI, S. S.; KUMAR, V.; SHARMA, R. K.; ARORA, R. Evidence based herbal drug standardization approach in coping with challenges of holistic management of diabetes: a dreadful lifestyle disorder of 21st century. **Journal of Diabetes & Metabolic Disorders**, v. 12, n. 35, p. 1-16, 2013.

CHEN, Z.; ZHENG, S.; LI, L.; JIANG, H. Metabolism of flavonoids in human: a comprehensive review. **Current Drug Metabolism**, v. 15, n. 1, p. 48-61, 2014.

COLLINS, H. C. O Desenvolvimento da Cromatografia em Camada Delgada. **Scientia Chromatographica**, v. 2, n.1, p. 5-12, 2010.

CORCORAN, M. P.; MCKAY, D. L.; BLUMBERG, J. B. Flavonoid basics: chemistry, sources, mechanisms of action, and safety. **Journal of Nutrition in Gerontology and Geriatrics**, v. 31, n. 3, 176-189, 2012.

COSTA, R. S. da; OZELA, E. F.; BARBOSA, W. L. R.; PEREIRA, N. L.; SILVA JÚNIOR, J. O. C. Caracterização física, química e físico-química do extrato seco por nebulização (spray-drying) de *Cynara scolymus* L. (Asteraceae). **Revista Brasileira de Farmácia**, v. 90, n. 3, p. 169-174, 2009.

CRIADO, P. R.; CRIADO, R. F. J.; MARUTA, C. W.; MACHADO FILHO, C. A. Histamina, receptores de histamina e anti-histamínicos: novos conceitos. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 85, n. 2, p. 195-210, 2010.

CRUVINEL, W. M.; MESQUITA JÚNIOR, D.; ARAÚJO, J. A. P.; CATELAN, T. T. T.; SOUZA, A. W. S.; SILVA, N. P.; ANDRADE, L. E. C. Sistema Imunitário – Parte I. Fundamentos da imunidade inata com ênfase nos mecanismos moleculares e celulares da resposta inflamatória. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 50, n. 4, p. 434-461, 2010.

DINIZ, T. C.; SILVA, J. C.; LIMA-SARAIVA, S. R. G. de; RIBEIRO, F. P. R. de A.; PACHECO, A. G. M.; FREITAS, R. M. de; QUINTANS-JÚNIOR, L. J.; QUINTANS, J. de S. S.; MENDES, R. L.; ALMEIDA, J. R. G. da S. The role of flavonoids on oxidative stress in epilepsy. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, p.1-9, 2015.

DUARTE, D. B.; VASKO, M. R, FEHRENBACHER, J. C. Models of inflammation: carrageenan air pouch. **Current Protocols in Pharmacology**, cap. 5, un. 5.6, 2012.

EDWARDS, J. C. W.; SEDGWICK, A. D.; WILLOUGHBY, D. A. The formation of a structure with the features of synovial lining by subcutaneous injection of air: an *in vivo* tissue culture system. **The Journal of Pathology**, v. 134, p. 147-156, 1981.

EFUNTOYE, M. O.; AYODELE, A. E.; THOMAS, B. T.; AJAYI, T. O. Does host plant affect the antibacterial activity of *Tapinanthus bangwensis* (Engl. and K. Krause) Danser (Loranthaceae)? **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 4, n. 13, p. 1281-1284, 2010.

FADINI, R. F. Non-overlap of hosts used by three congeneric and sympatric loranthaceous mistletoe species in an Amazonian savanna: host generalization to extreme specialization. **Acta Botanica Brasilica**, v. 25, n. 2, p. 337-345, 2011.

FADINI, R. F.; GONÇALVES, D. C. M.; REIS, R. P. F. Consistency in seed-deposition patterns and the distribution of mistletoes among its host trees in an Amazonian savanna. **Australian Journal of Botany**, v. 57, n. 8, p. 640-646, 2009.

FLORINDO, G. S. R.; DENARDIN, E. L. G.; MOTTA, I. K. R., MOTTA, P. R.; GONÇALVES, M. B.; SOARES, J. J. Otimização de processo extrativo de flavonoides presentes nas folhas de *Syzygium cumini* (L.) Skeels. **Anais do Salão Internacional de Ensino, Pesquisa e Extensão**, v. 5, n. 2, 2013.

FREIRE, S. M. F.; ANDRADE, K. N. S.; ARAGÃO JR, G. A.; NORONHA, E. P.; SILVA, S. N.; CARTÁGENES, M. S. S.; BORGES, M. O. R.; RIBEIRO, M. N. S.; TORRES, L. M. B.; BORGES, A. C. R. Antiulcerogenic activity of the extracts of *Struthanthus marginatus*.

Brazilian Journal of Pharmacognosy, v. 21, n. 6, p. 1089-1095, 2011.

FUNAKOSHI-TAGO, M.; OKAMOTO, K.; IZUMI, R.; TAGO, K. YANAGISAWA, K.; NARUKAWA, Y.; KIUCHI, F.; KASAHARA, T.; TAMURA, H. Antiinflammatory activity of flavonoids in Nepalese propolis is attributed to inhibition of the IL33 signaling pathway. **International Immunopharmacology**, v. 25, n. 1, p. 189-198, 2015.

FÜRST, R.; ZÜNDORF, I. Plant-derived anti-inflammatory compounds: hopes and disappointments regarding the translation of preclinical knowledge into clinical progress. **Mediators of Inflammation**, p.1-9, 2014.

GARG, V.; DHAR, V. J.; SHARMA, A.; DUTT, R. Facts about standardization of herbal medicine: a review. **Jornal of Chinese Integrative Medicine**, v. 10, n. 10, p. 1077-1083, 2012.

GUERREIRO, R.; SANTOS-COSTA, Q.; AZEVEDO-PEREIRA, J. M. As quimiocinas e os seus receptores - características e funções fisiológicas, **Acta Médica Portuguesa**, v. 24, p. 967-976, 2011.

HANDA, P.; TATEYA, S.; RIZZO, N. O.; CHENG, A. M.; MORGAN-STEVENSON, V.; HAN, C.; CLOWES, A. W.; DAUM, G.; O'BRIEN, K. D.; SCHWARTZ, M. W.; CHAIT, A.; KIM, F. Reduced vascular nitric oxide-cGMP signaling contributes to adipose tissue inflammation during high-fat feeding. **Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology**, v. 31, n. 12, p. 2827-2835, 2011.

HENRIQUE, J. R.; VENDRAMINI, E. A.; REIS, R. D.; MARQUES, L. C.; MARCUCCI, M. C. Controle de qualidade de fitoterápicos no Brasil: avaliação diagnóstica e propostas de intervenção. **Revista de Fitoterapia**, v. 14, n. 2, p. 129-136, 2014.

HU, K.; LI, Y.; DU, Y.; SU, B.; LU, D. Analysis of 1-deoxynojirimycin component correlation between medicinal parasitic loranthus from Loranthaceae and their mulberry host trees. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 5, n. 17, p. 4326-4331, 2011.

IBARRA-ALVARADO, C.; ROJAS, A.; MENDOZA, S.; BAH, M.; GUTIÉRREZ, D. M.; HERNÁNDEZ-SANDOVAL, L.; MARTÍNEZ, M. Vasoactive and antioxidant activities of plants used in Mexican traditional medicine for the treatment of cardiovascular diseases. **Pharmaceutical Biology**, v. 48, n. 7, p. 732-739, 2010.

JAIN, P. K.; JOSHI, H. Coumarin: chemical and pharmacological profile. **Journal of Applied Pharmaceutical Science**, v. 2, n. 6, p. 236-240, 2012.

JIA-BAO, L.; YA-SI, D.; YING, Z.; JIA-BAO, C.; BAO-SONG, C.; JIN-YE, B.; MING-BAO, L.; QI, H.; PEI-CHENG, Z.; SHUAI, L. Anti-inflammatory hydrolyzable tannins from *Myricaria bracteata*. **Journal of Natural Products**, v. 78, n. 5, p. 1015-1025, 2015.

KALYANKAR, T. M.; WADHER, S. J.; DANGE, S. S.; ATTAR, M. S.; PATTEWAR, A. M. Analysis of Herbal Drugs: a Review. **Asian Journal of Medicinal and Analytical Chemistry**, v. 1, n. 1, p. 12-20, 2014.

KUMAR, S.; PANDEY, A. K. Chemistry and Biological Activities of Flavonoids: An Overview. **The Scientific World Journal**, p. 1-16, 2013.

KUNLE, O. F.; EGHAREVBA, H. O.; AHMADU, P. O. Standardization of herbal medicines - A review. **International Journal of Biodiversity and Conservation**, v. 4, n. 3, p. 101-112, 2012.

LEAL, A. S.; LEAL, L. H. C.; SILVA, D.; NUNES, L. C. C.; LOPES, J. A. D. Incorporation of tannic acid in formulations for topical use in wound healing: A technological prospecting. **African Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 9, n. 26, p. 662-674, 2015.

LEITÃO, F.; MOREIRA, D. L.; ALMEIDA, M. Z.; LEITÃO, S. G. Secondary metabolites from the mistletoes *Struthanthus marginatus* and *Struthanthus concinnus* (Loranthaceae). **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 48, p. 215-218, 2013.

LEVY, B. D.; SERHAN, C. N. Resolution of acute inflammation in the lung. **Annual Review of Physiology**, v. 76, p. 467-492, 2014.

LO, T. N.; ALMEIDA, A. P.; BEAVEN, M. A. Dextran and carrageenan evoke different inflammatory responses in rat with respect to composition of infiltrates and effect of indomethacin. **The Journal of Pharmacology na Experimental Therapeutics**, v.221, n. 1, p., 1982.

LUENGAS-CAICEDO, P. E. **Contribuição para a padronização de extratos de folhas de *Cecropia glaziovii* Snethl: estudos de variação sazonal e intra-específica de flavonoides e proantocianidinas, de metodologias de extração e de atividade vasorelaxante.** Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas). Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 267, 2005.

LUIZ, R. L. F.; VILA, T. V. M.; MELLO, J. C. P. de; NAKAMURA, C. V.; ROZENTAL, S.; ISHIDA, K. Proanthocyanidins polymeric tannin from *Stryphnodendron adstringens* are

active against *Candida albicans* biofilms. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 68, n. 15, p. 1-11, 2015.

MANSELL, A.; JENKINS, B. J. Dangerous liaisons between interleukin-6 cytokine and toll-like receptor families: A potent combination in inflammation and câncer. **Cytokine & Growth Factor Reviews**, v. 24, p. 249–256, 2013.

MARINI-BETTÒLO, G. B.; NICOLETTI, M.; PATAMIA, M.; GALEFFI, C.; MESSANA, I. Plant screening by chemical and chromatographic procedures under field conditions. **Journal of Chromatography**, v. 213, p. 113-127, 1981.

MARÍN-CANCHALA, D. I.; BRANGO-VANEGAS, J.; GALEANO-GARCÍA, P. Caracterización química, evaluación de la actividad antioxidante y antibacterial del extracto crudo de *Psittacanthus cucullaris*. **Momentos de Ciencia**, v. 10, n. 1, 2013.

MARTINS, A. R.; SOARES, M. K. M.; REDHER, V. L. G.; BAJAY, M. M.; VILLELA, P. M. S.; ZUCCHI, M. I.; APPEZZATO-DA-GLÓRIA, B. Use of anatomical, chemical, and molecular genetic characteristics in the quality control of medicinal species: A case study of Sarsaparilla (*Smilax* spp.). **Economic Botany**, v. 68, n. 4, p. 410-425, 2014.

MARTINS, C. R.; LOPES, W. A.; ANDRADE J. B. de. Solubilidade das substâncias orgânicas. **Quimica Nova**, v. 36, n. 8, p. 1248-1255, 2013.

MEDZHITOV, R. Origin and physiological roles of inflammation. **Nature**, v. 454, n. 24, 2008.

MICHELIN, D. C.; FINATI, S. C. G.; SACRAMENTO, L. V. S.; VILEGAS, W. SALGADO, H. R. N. Controle de qualidade da raiz de *Operculina macrocarpa* (Linn) Urb., Convolvulaceae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, n. 1, p. 18-22, 2010.

MILIAUSKAS, G.; VENSKUTONIS, P. R.; van BEEK, T. A. Screening of radical scavenging activity of some medicinal and aromatic plant extracts. **Food Chemistry**, v. 85, p. 231-237, 2004.

MOHAMMED, B. M.; FISHER, B. J.; HUYNH, Q. K.; WIJESINGHE, D. S.; CHALFANT, C. E.; BROPHY, D. F.; FOWLER III, A. A.; NATARAJAN, R. Resolution of sterile inflammation: role for vitamin C. **Mediators of Inflammation**, p. 1-15, 2014.

MOLE, S.; WATERMAN, P. G. A critical analysis of techniques for measuring tannins in ecological studies I: techniques for chemically defining tannins. **Oecologia**, v. 72, p. 137-147, 1987 a.

MOLE, S.; WATERMAN, P. G. A critical analysis of techniques for measuring tannins in ecological studies II: techniques for chemically defining tannins. **Oecologia**, v.72, p. 148-156, 1987 b.

MORAIS, T. C. **Efeito analgésico, antiinflamatório e gastroprotetor dos ácidos anacárdicos, isolados de *Anacardium occidentale* L., em modelos experimentais.** Dissertação (Mestrado em Farmacologia). Universidade Federal do Ceará, Fortaleza. 153 p., 2010.

MOSCHEN, R. C.; PEREIRA, C. C.; OLIVEIRA, J. P.; PRADO, A. R. Controle de qualidade das folhas de *Ginkgo biloba* L. comercializadas para decocção e infusão. **Sapientia**, v. 12, p. 45-49, 2013.

MOTHANA, R. A. A.; ALSAID, M. S.; ALREHAILY, A. J.; THABET, T. M.; AWAD, N. A.; LALK, M.; LINDEQUIST, U. Antiinflammatory, antinociceptive, antipyretic and antioxidant activities and phenolic constituents from *Loranthus regularis* growing in Saudi Arabia. **Planta Medica**, v. 79, p. 66, 2013.

NECAS, J.; BARTOSIKOVA, L. Carrageenan: a review. **Veterinarni Medicina**, v. 58, n. 4, p. 187-205, 2013.

NEURATH, M. Cytokines in inflammatory bowel disease. **Nature (Reviews - Immunology)**, v. 14, p. 329-342, 2014.

NICKRENT, D. L.; MALÉCOT, V.; VIDAL-RUSSELL, R.; DER, J. P. A revised classification of Santalales. **Taxonomy**, v. 59, n. 2, p. 538-558, 2010.

NISHIDA, S.; KAGAWA, K.; TOMIZAWA, S. Correlation between histamine content in exudate and degree of edema produced by dextran. **Biochemical Pharmacology**, v. 27, p. 2641-2646, 1978.

NISHIDA, S.; KAGAWA, K.; TOMIZAWA, S. Dextran-induced paw edema and 5-hydroxytryptamine release (Short communication). **Biochemical Pharmacology**, v. 28, p. 3149-3150, 1979.

NUMAN, I. T. Effects of *Loranthus europaeus* ethylacetate and chloroform extracts on the growth of rhabdomyosarcoma and rat embryo fibroblast cell lines. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 4, n. 5, p. 234-237, 2012.

OGBOLE, O. O.; OSUNGUNNA, M. O.; ABIMBOLA, Y. Phytochemical and antimicrobial screening of *Globimetula oreophila* (Oliv) van Tiegh and *Phragmanthera capitata* (Spreng) Balle. **International Journal of Green Pharmacy**, v. 7, n. 2, p. 127-130, 2013.

OKUDA, T.; ITO, H. Tannins of constant structure in medicinal and food plants - hydrolyzable tannins and polyphenols related to tannins. **Molecules**, v. 16, p. 2191-2217; 2011.

OLIVEIRA, C. M. B. de; SAKATA, R. K.; TSA; ISSY, A. M.; GEROLA, L. R.; R. SALOMÃO. Citocinas e dor. **Revista Brasileira de Anestesiologia**, v. 61, n. 2, p. 255-265, 2011.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. **Quality control methods for herbal materials**. Geneva, World Health Organization, 2^a ed., 173 p., 2011.

OUEDRAOGO, M.; RUIZ, M.; VARDELLE, E.; CARREYRE, H.; COUSTARD, J. M.; POTREAU, D.; SAWADOGO, L. L.; COGNARD, C.; BECQ, F.; VANDEBROUCK, C.; BESCOND, J. 2011. From the vasodilator and hypotensive effects of an extract fraction from *Agelanthus dodoneifolius* (DC) Danser (Loranthaceae) to the active compound dodoneine. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 133, n. 2, p. 345-352, 2011.

PAES, J. B.; DINIZ, C. E. F.; LIMA, C. R. de; BASTOS, P. de M.; MEDEIROS NETO, P. N. de. Taninos condensados da casca de angico-vermelho (*Anadenanthera colubrina* var. Cebil) extraídos com soluções de hidróxido e sulfito de sódio. **Revista Caatinga**, Mossoró, v. 26, n. 3, p. 22-27, 2013.

PANDEY, A.; TRIPATHI, S. Concept of standardization, extraction and pre phytochemical screening strategies for herbal drug. **Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry**, v. 2, n. 5, p. 115-119, 2014.

PARK, M.; CHO, H.; JUNG, H.; LEE, H.; HWANG, K. T. Antioxidant and antiinflammatory activities of tannin fraction of the extract from black raspberry seeds compared to grape seeds. **Journal of Food Biochemistry**, v. 38, n. 3, p. 259-270, 2014.

PATEL, M.; MURUGANANTHAN, G.; GOWDA, K. P. S. *In vivo* animal models in preclinical evaluation of anti-inflammatory activity - a review. **International Journal of Pharmaceutical Research & Allied Sciences**, v. 1, n. 2, p. 1-5, 2012.

PATEL, S.; PANDA, S. Emerging roles of mistletoes in malignancy management. **3 Biotech**, v. 4, p. 13-20, 2014.

PATIL, S.; ANARTHE, S.; JADHAV, R.; SURANA, S. Evaluation of anti-inflammatory activity and *in-vitro* antioxidant activity of *indian mistletoe*, the hemiparasite *Dendrophthoe falcata* L. F. (Loranthaceae). **Iranian Journal of Pharmaceutical Research**, v. 10, n. 2, p. 253-259, 2011.

PATRA, K. C.; PARETA, S. K.; HARWANSH, R. K.; KUMAR, K. J. Traditional Approaches towards Standardization of Herbal Medicines - A Review. **Journal of Pharmaceutical Science and Technology**, v. 2, n. 11, p. 372-379, 2010.

PEREIRA, C. B.; MARIN, A.; MAKI, T. D. T.; NECCHI, R. M. M.; MANFRON, M. P. Physicochemical quality control and dosage of total polyphenols, flavonoids of *Morus Alba* Leaves (Moraceae). **Saúde** (Santa Maria), v.37, n.2, p. 57-68, 2011.

POYER, A.; SCHAEFER, L.; TEIXEIRA, S. D.; ROCHA, R. D. C. da. Obtenção de taninos a partir do extrato hidroalcoólico de folhas e flores de *Lippia alba*. **Synergismus scyentifica - UTFPR**, Pato Branco, v. 10, n. 1, 2015.

PRADO, L. C. S.; SILVA, D. B.; OLIVEIRA-SILVA, G. L. de; HIRAKI, K. R. N.; CANABRAVA, H. A. N.; BISPO-DA-SILVA, L. B. The gastroprotective effects of *Eugenia dysenterica* (Myrtaceae) leaf extract: the possible role of condensed tannins. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v. 37, n. 5, p. 722-730, 2014.

PUNEETHA, G. K.; MURALI, M.; THRIVENI, M. C.; AMRUTHESH, K. N. Phytochemical screening, antioxidant and antibacterial properties of *Taxillus cuneatus* (Roth.) danser - a hemi-parasitic angiosperm. **International Journal of Current Microbiology Applied Sciences**, v. 3, n. 5, p. 702-711, 2014.

QIN, L.; ZHAO, D.; XU, J.; REN, X.; TERWILLIGER, E. F.; PARANGI, S.; LAWLER, J.; DVORAK, H. F.; ZENG, H. The vascular permeabilizing factors histamine and serotonin induce angiogenesis through TR3/Nur77 and subsequently truncate it through thrombospondin-1. **Blood**, v. 121, n. 11, 2013.

RICCIOTTI, E; FITZGERALD, G. A. Prostaglandins and Inflammation. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 31, p. 986-1000, 2011.

RICKLIN, D.; LAMBRIS, J. D. Complement in Immune and Inflammatory Disorders: Pathophysiological Mechanisms. **The Journal of Immunology**, v. 190, p. 3831-3838, 2013.

RODRIGUES, C. G.; FERREIRA, P. R. B.; MENDES, C. S. O.; REIS JR, R.; VALÉRIO, H. M.; BRANDI, I. V.; OLIVEIRA, D. A. de. Antibacterial activity of tannins from *Psidium guineense* Sw. (Myrtaceae). **Journal of Medicinal Plant Research**, v. 8, n. 35, p. 1095-1100, 2014.

RODRÍGUEZ, M.; HASEGAWA, M.; GONZÁLEZ-MÚJICA, F.; MOTTA, N.; CASTILLO, A.; CASTILLO, J.; ZEA, E.; MORA, K.; SOUSA, L.; GONZÁLEZ, A.; CAMEJO, D. Antidiabetic and antiradical activities of plants from Venezuelan Amazon. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 18, n. 3, p. 331-338, 2008.

ROMANO, B.; PAGANO, E.; MONTANARO, V.; FORTUNATO, A. L.; MILIC, N.; BORRELLI, F. Novel insights into the pharmacology of flavonoids. **Phytotherapy Research**, v. 27, n. 11, p. 1588-1596, 2013.

SALEH, I. A.; KAMAL, S. A.; SHAMS, K. A.; ABDEL-AZIM, N. S.; ABOUTABL, E. A.; HAMMOUDA, F. M. Effect of particle size on total extraction yield and silymarin content of *Silybum marianum* L. seeds. **Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences**, v. 6, n. 2, p. 803-809, 2015.

SAMPAIO, A. L. F.; DALLI, J.; BRANCALEONE, V.; D'ACQUISTO, F.; PERRETTI, M.; WHEATLEY, C. Biphasic modulation of NOS expression, protein and nitrite products by hydroxocobalamin underlies its protective effect in endotoxemic shock: downstream regulation of COX-2, IL-1 β , TNF- α , IL-6, and HMGB1 expression. **Mediators of Inflammation**, p. 1-20, 2013.

SANTOS, C. B.; BERNARDINO, G. Z.; SOARES, F. J.; ESPINDOLA, J. D.; ARRUDA, P. M. R.; PAULA, J. R.; CONCEIÇÃO, E. C.; BARA, M. T. F. Preparo e caracterização de tinturas das folhas de chá verde [*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze] Theaceae. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Campinas, v. 16, n. 4, p. 826-831, 2014.

SANTOS, F. O. **Atividades biológicas de *Anacardium occidentale* (Linn)**. Dissertação (Mestrado em Zootecnia). Universidade Federal de Campina Grande. Patos, 57 p., 2011.

SANTOS, S. C.; MELLO, J. C. P. Taninos, p. 615–656. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENZEL, E. P.; GOSMAM, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. (org.). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**, 6ª ed., Porto Alegre, Editora da UFRGS; Florianópolis, Editora da UFSC, 1104 p., 2007.

SCARPA, G. F.; MONTANI, M. C. Etnobotánica médica de las “ligas” (Loranthaceae *sensu lato*) entre indígenas y criollos de Argentina. **Dominguezia**, v. 27, n. 2, p. 5-19, 2011.

SILVA, A. J. da; COSTA, R. S. da; MARIANO, A. S.; SANTOS, K. L. dos S. e S.; JORDÃO, C. O. Análise farmacognóstica de amostras de espinheira santa - *Maytenus ilicifolia* (Schrad.) Planch. (Celastraceae) comercializadas em farmácias e banca popular de Votuporanga – São Paulo. **Revista Brasileira de Farmácia**, v. 93, n. 4, p. 457-462, 2012.

SILVA, R. M. F., RIBEIRO, J. F. A.; FREITAS, M. C. C.; ARRUDA, M. S. P.; NASCIMENTO, M. N.; BARBOSA, W. L. R.; ROLIM NETO, P. J. Caracterização físico-química e análises por espectrofotometria e cromatografia de *Peperomia pellucida* L. (H. B. K.). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Campinas, v. 15, n. 4, p. 717-726, 2013.

SOBERÓN, R. J.; SGARIGLIA, M. A.; SAMPIETRO, D. A.; QUIROGA, E. N.; VATTUONE, M. A. Antibacterial activity of plant extracts from northwestern Argentina. **Journal of Applied Microbiology**, v. 102, p. 1450-1461, 2007.

SOBERÓN, R. J.; SGARIGLIA, M. A.; SAMPIETRO, D. A.; QUIROGA, E. N.; VATTUONE, M. A. *Tripodanthus acutifolius* and *Psittacanthus cuneifolius*: Loranthaceae. Sources of natural antimicrobials. **Molecular Medicinal Chemistry**, v. 11, p. 24-25, 2006.

SORDI, R.; LIMA JR, O. M. de; ASSREUY, J. Biossíntese e funções das lipoxinas na resolução da inflamação. **Publicatio UEPG - Biological and Health Sciences**, v.18, n.1, p.7-13, 2012.

SOUSA, P. J. C.; ROCHA, J. C. S.; PESSOA, A. M.; ALVES, L. A. D.; CARVALHO, J. C. T. Estudo preliminar da atividade antiinflamatória de *Bryophillum calycinum* Salisb. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 15, n. 1, p. 60-64, 2005.

TANWAR, B.; MODGIL, R. Flavonoids: Dietary occurrence and health benefits. **Spatula DD**, v. 2. n. 1, p. 59-68, 2012.

TARFA, F. D.; AMOS, S.; TEMPLE, V. J.; OCHEKPE, N. A.; GAMANIEL, K. S. Hypoglycemic effects of the aqueous extract of african mistletoe, *Tapinanthus sesselifolius* (P. Beauv) van Tiegh (Loranthaceae). **International Journal of Biology and Chemical Sciences**, v. 6, n. 1, p. 408-414, 2012.

THEISEN, L. L.; ERDELMEIER, C. A. J.; SPODEN, G. A.; BOUKHALLOUK, F.; SAUSY, A.; FLORIN, L.; MULLER, C. P. Tannins from *Hamamelis virginiana* bark extract: characterization and improvement of the antiviral efficacy against Influenza A virus and human papillomavirus. **Plos One**, v. 9, n. 1, p. 1-14, 2014.

VAZQUEZ-LOMBARDI, R.; ROOME, B.; CHRIST, D. Molecular engineering of therapeutic cytokines. **Antibodies**, v. 2, p. 426-451, 2013.

VENUGOPALA, K. N.; RASHMI, V.; ODHAV, B. Review on natural coumarin lead compounds for their pharmacological activity. **BioMed Research International**, p. 1-14, 2013.

VETTORI, M. H. P. B. **Estudo e otimização da produção da dextranasacarase e caracterização da dextrana produzida por *Leuconostoc mesenteroides* FT045B**. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas). Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 116 p. 2011.

VIDAL-RUSSELL, R.; NICKRENT, D. L. Evolutionary relationships in the showy mistletoe family (Loranthaceae). **American Journal of Botany**, v. 95, n. 8, p. 1015-1029, 2008.

WALTER, M.; MARCHESAN, E. Phenolic compounds and antioxidant activity of rice. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 54, n. 1, p. 371-377, 2011.

WALY, N. M.; ALI, A. E. E. D.; JRAIS, R. N. Botanical and biological studies of six parasitic species of family Loranthaceae growing in Kingdom of Saudi Arabia. **International Journal of Environmental Sciences**, v. 1, n. 4, p. 196-205, 2012.

WATSON, D. M.; HERRING, M. Mistletoe as a keystone resource: an experimental test. **Proceedings of the Royal Society B**, v. 279, p. 3853-3860, 2012.

WILLIS, R. B.; ALLEN, P. R. Improved method for measuring hydrolyzable tannins using potassium iodate. **Analyst**, v. 123, p. 435-439, 1998.

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 and Medicine**, v. 111, p. 544-547, 1962.

WONG, D. Z. H.; KADIR, H. A. Antioxidative and neuroprotective effects of *Loranthus parasiticus* (L.) Merr (Loranthaceae) against oxidative stress in NG108-15 cells. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 5, n. 27, p. 6291-6298, 2011.

WONG, D. Z. H.; KADIR, H. A.; LING, S. K. Bioassay-guided isolation of neuroprotective compounds from *Loranthus parasiticus* against H₂O₂-induced oxidative damage in NG108-15 cells. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 139, p. 256-264, 2012.

XIE, Y.; YANG, W.; TANG, F.; CHEN, X.; REN, L. Antibacterial activities of flavonoids: structure-activity relationship and mechanism. **Current Medicinal Chemistry**, v. 22, n. 1, p. 132-149, 2015.

YANAGIHARA, N.; ZHANG, H.; TOYOHIRA, Y.; TAKAHASHI, K.; UENO, S.; TSUTSUI, M.; TAKAHASHI, K. New insights into the pharmacological potential of plant flavonoids in the catecholamine system. **Journal of Pharmacological Sciences**, v. 124, p. 123-128, 2014.

YANG, I. J.; LEE, D. U.; SHIN, H. M. Antiinflammatory and antioxidant effects of coumarins isolated from *Foeniculum vulgare* in lipopolysaccharidestimulated macrophages and 12-*O*-tetradecanoylphorbol13acetatestimulated mice. **Immunopharmacology and Immunotoxicology**, v. 37, n. 3, p. 308-317, 2015.

ZILIOTTO, J.; FARINA, C.; SOUZA, K. C. B. de. Validação de método analítico para doseamento de flavonoides totais em cápsulas contendo extrato seco de *Passiflora incarnata* L. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 33, n. 3, p. 341-346, 2012.

7 ANEXOS

ANEXO I - IDENTIFICAÇÃO BOTÂNICA E REGISTRO DAS EXSICATAS

Herbário HSTM Nº 000074

Família: LORANTHACEAE

Espécie: *Psittacanthus plagiophyllus* Eichl.

Det.: Caires, C.S.

Data: 17 dezembro 2012

Localidade: Brasil, Pará, Santarém, Vila de Alter-do-Chão, Em uma casa à margem da Rodovia PA 457, próximo à entrada da vila.
Parasitando *Anacardium occidentale*.

Coordenadas:

Altitude: m

Coletor: Bezerra, A.N.S. s.n.

Data: 23 maio 2015

Notas: Arbusto, hemiparasita aérea (de ramos), inflorescência predominantemente na cor laranja.

ANEXO II - APROVAÇÃO DO PROJETO PELA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS DA UFOPA



UNIVERSIDADE FEDERAL DO OESTE DO PARÁ - UFOPA
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA, PÓS-GRADUAÇÃO E INOVAÇÃO TECNOLÓGICA
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS – CEUA/UFOPA

PARECER DE PROJETO

Título do projeto/aula: Avaliação da atividade anti-inflamatória da erva-de-passarinho *Psittacanthus plagiophyllus* Eichl. (Loranthaceae) em camundongos.
Docente responsável: Profa. Dra. Rosa Helena Veras Mourão

Parecer do relator:

Aprovado Não Aprovado Aprovado com restrições

Descrever as restrições:

Justificar quando não aprovado:

Nome do relator: Prof. Dr. Joacir Stolarz de Oliveira

Assinatura

Data: 26 / 04 / 2015

PARECER DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS – CEUA/UFOPA

Aprovado Não Aprovado Aprovado com restrições

Reencaminhar com o esclarecimento solicitado:

Presidente da CEUA

Aprovado em reunião:

28/04/15