



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE  
FEIRA DE SANTANA  
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM  
RECURSOS GENÉTICOS VEGETAIS**



**JOSÉ LUIZ CARNEIRO DA ROCHA**

**Determinação quantitativa por CLAE-DAD de salicilato de metila e atividade antinociceptiva em espécies do gênero *Polygala* (Polygalaceae) ocorrentes no semiárido e cultivadas.**

FEIRA DE SANTANA - BA  
2012  
**JOSÉ LUIZ CARNEIRO DA ROCHA**

**Determinação quantitativa por CLAE-DAD de salicilato de metila e atividade antinociceptiva em espécies do gênero *Polygala* (Polygalaceae) ocorrentes no semiárido e cultivadas.**

FEIRA DE SANTANA - BAHIA

2012

**JOSÉ LUIZ CARNEIRO DA ROCHA**

# **Determinação quantitativa por CLAE-DAD de salicilato de metila e atividade antinociceptiva em espécies do gênero *Polygala* (Polygalaceae) ocorrentes no semiárido e cultivadas.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais, da Universidade Estadual de Feira de Santana, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Recursos Genéticos Vegetais.

Orientador: Prof. Dr. Hugo Neves Brandão

Co-orientador: Prof. Dr. Lenaldo Muniz de Oliveira

FEIRA DE SANTANA – BAHIA  
2012

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Juceni Pereira de Lima David

---

Prof. Dr. Jorge Maurício David

---

Prof. Dr. Hugo Neves Brandão (Orientador)

FEIRA DE SANTANA – BAHIA

2012

### **AGRADECIMENTO**

A Deus, pela proteção e saúde, por iluminar meus caminhos em busca do conhecimento e da realização pessoal.

À minha família, em especial a minha mãe e minha irmã, pelo amor e incentivo durante toda minha vida, e por estarem presentes no decorrer de todo este jornada.

A Gil, pelo companheirismo, paciência, ajuda e apoio durante todo o processo de realização deste trabalho.

Ao amigo e professor orientador Hugo Neves Brandão que vem me acompanhado desde a monografia e continua, em mais uma etapa da minha carreira acadêmica, contribuindo de forma exemplar com ensinamentos transmitidos, paciência, confiança e pelo exemplo de dedicação à ciência. E principalmente por ter se tornado não só um orientador, mas um grande amigo.

Aos professores Lenaldo Muniz de Oliveira, Antonio Azeredo e José Floriano Pastore por todos os conhecimentos transmitidos e pela ajuda durante toda a realização do trabalho.

As minhas colegas de laboratório Danielle Figuerêdo, Mayane Neves e a mais nova integrante do grupo Carol Issler que contribuíram muito na realização deste trabalho e o tornaram muito mais divertido.

A todos os meus amigos que sempre me deram apoio e acreditaram em mim durante toda essa jornada.

Às outras pessoas que direta ou indiretamente participaram deste projeto, seja ajudando ou dando apoio e incentivo.

À CAPES pelo apoio financeiro.

À todos colegas e docentes do curso de Pós-graduação em Recursos Genéticos Vegetais da UEFS, pelo respeito, amizade e conhecimento transmitidos.

## RESUMO

No setor farmacêutico, as plantas e os extrativos vegetais continuam apresentando grande importância, tendo em vista a utilização das substâncias ativas como protótipos para o desenvolvimento de fármacos. Estudos mostram que espécies do gênero *Polygala* produzem salicilato de metila, sendo este um componente de alguns medicamentos analgésicos. O único relato científico que mostra a quantificação desse componente por CLAE-DAD em espécies de Polygalaceae é do nosso grupo de pesquisa, mas somente com a *Polygala decumbens*. O presente trabalho propõe a determinação quantitativa de salicilato de metila, por CLAE-DAD, em dezessete espécies de Polygalaceae coletadas e cultivadas no semiárido, bem como analisar a atividade antinociceptiva de uma das espécies com maior teor da substância em análise, através dos testes de contorções abdominais e placa quente. Foram encontradas grandes diferenças no teor de salicilato de metila, variando de valores abaixo do limite de quantificação (14,1 µg/g) até valores superiores ao ponto de maior concentração da curva de calibração (126,9 µg/g). Somente a espécie *P. decumbens* conseguiu sobreviver às condições de cultivo em casas de vegetação e, sua análise mostrou que o teor de salicilato de metila foi reduzido a valores abaixo do limite de quantificação e detecção nas partes aéreas, quando comparados aos valores obtidos em espécimes coletados em campo. Não houve alteração significativa nos valores obtidos nas raízes coletadas em campo e cultivadas (99,43±5,93 e 98,24±2,81 µg/g, respectivamente). A avaliação da atividade antinociceptiva mostrou que o extrato bruto de *P. boliviensis*, quando administrado por via oral, conseguiu reduzir a nocicepção tanto nos testes de placa quente quanto no de contorções abdominais, em até 382,79% e 93,59%, respectivamente. Por fim, este estudo corrobora outros dados descritos na literatura, mostrando a importância das espécies de Polygalaceae como fonte de variedade de compostos com potencial atividade biológica.

**Palavras-chave:** Plantas medicinais. CLAE. Polygalaceae. Salicilato de metila. Nocicepção.

## ABSTRACT

In the pharmaceutical field, plants and plant extracts are still highly relevant, owing to the use of their active compounds as prototypes for drug development. Studies show that species of the genus *Polygala* produce methyl salicylate, which is a component of some analgesic. To date, there is just one scientific work describing the quantification of this compound by HPLC-DAD in species of Polygalaceae. It is from our research group, but only with *Polygala decumbens*. So, this work describes the quantitative determination of methyl salicylate, employing HPLC-DAD, in seventeen species of Polygalaceae of Brazil semiarid region, collected or cultivated, besides the determination of antinociceptive activity of one of the species with higher levels of the substance under analysis through application of the abdominal contortions and hot plate tests. Significant discrepancies were found in the concentration of methyl salicylate, varying from values below the limit of quantification (14,1  $\mu\text{g/g}$ ) to values greater than the highest concentration point of the calibration curve (126,9  $\mu\text{g/g}$ ). *P. decumbens* was the unique species that survived the greenhouses cultivation conditions and its analysis showed that the concentration of methyl salicylate was reduced to values below the limit of quantification and detection in aerial parts, when compared with values obtained on specimens collected in the field. On the other hand, there were no significant alteration in the values obtained from the roots collected in the field and cultivated ( $99,43 \pm 5,93$  e  $98,24 \pm 2,81$   $\mu\text{g/g}$ , respectively). The evaluation of the antinociceptive activity showed that the crude extract of *P. boliviensis* when administered orally, has reduced nociception in both abdominal contortions and hot plate tests in up to 382.79% and 93.59% respectively. Finally, this study supports other data in the literature, showing the importance of the species of Polygalaceae as a source of variety of compounds with potential biological activity.

**Keywords:** Medicinal plants. HPLC. Polygalaceae. Methyl salicylate. Nociception.

## SUMÁRIO

**AGRADECIMENTO**

**LISTA DE FIGURAS**

**LISTA DE TABELAS**

**LISTA DE ABREVEATURAS**

<b>1 – INTRODUÇÃO</b>	11
<b>2 – REFERENCIAL TEÓRICO</b>	14
2.1 – PESQUISA COM PLANTAS MEDICINAIS	14
2.2 – CULTIVO DE PLANTAS	18
2.3 – POLYGALACEAE E ESPÉCIES DE GÊNERO POLYGALA	20
2.4 – SALICILATO DE METILA	22
2.5 – TÉCNICAS PARA O DESENVOLVIMENTO DE FÁRMACOS A PARTIR DE PRODUTOS NATURAIS	25
<b>2.5.1 – Cromatografia a Líquidos de Alta Eficiência</b>	28
2.6 – ATIVIDADE ANALGÉSICA	31
<b>2.6.1 – Dor e fármacos analgésicos</b>	31
<b>3 – METODOLOGIA</b>	35
3.1 – COLETA E IDENTIFICAÇÃO DO MATERIAL VEGETAL	35
3.2 – CULTIVO DO MATERIAL VEGETAL	35
3.3 – PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS	35
3.4 – ANÁLISES CROMATOGRÁFICAS	36
3.5 – ANIMAIS UTILIZADOS NOS EXPERIMENTO	37
3.6 – PREPARAÇÃO DO EXTRATO	37
3.7 - AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA	38
3.7.1 – Drogas e soluções utilizadas	38
3.7.2 – Vias de administração	38
3.7.2 – Métodos	38
3.8 – ANÁLISE ESTATÍSTICA	39
<b>4 – RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	41
4.1 – QUANTIFICAÇÃO DE SALICILATO DE METILA DAS ESPÉCIES DE <i>POLYGALA</i> COLETADAS EM CAMPO	41



4.2 – QUANTIFICAÇÃO DE SALICILATO DE METILA DA ESPÉCIE DE <i>POLYGALA</i> CULTIVADA	45
4.3 – PREPARAÇÃO DOS EXTRATOS PARA REALIZAÇÃO DOS TESTES DE ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA	48
4.4 - NOCICEPÇÃO INDUZIDA PELA INJEÇÃO INTRAPERITONEAL DE ÁCIDO ACÉTICO (0,8%) EM CAMUNDONGOS	51
4.5 - EFEITO DO EXTRATO BUTANÓLICO DE <i>POLYGALA BOLIVIENSIS</i> NO TESTE DE PLACA QUENTE, EM CAMUNDONGOS	54
<b>5 – CONSIDERAÇÕES FINAIS</b>	58
<b>REFERÊNCIAS</b>	60
APÊNDICE A - Cromatogramas dos espécimes de Polygalaceae coletadas em campo	67
APÊNDICE B – Espectros de ultravioleta dos espécimes de Polygalaceae coletadas em campo	73

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Fórmula estrutural do salicilato de metila	12
Figura 2 – Novas entidades químicas por fontes 01/1981 – 06/2006	17
Figura 3 – Espécimes do gênero <i>Polygala</i>	21
Figura 4 – Prospecções químicas e de bioatividade de plantas	26
Figura 5 – Espécies do gênero <i>Polygala</i> analisadas (a) <i>P. sericea</i> ; (b) <i>P. poaya</i>	41
Figura 6 – Espécies do gênero <i>Polygala</i> analisadas (c) <i>S. tomentosa</i> ; (d) <i>B. hebeclada</i>	41
Figura 7 – Espécies do gênero <i>Polygala</i> analisadas (e) <i>P. decumbens</i> ; (f) <i>P. boliviensis</i>	42
Figura 8 – Espécies do gênero <i>Polygala</i> analisadas (g) <i>P. trichosperma</i> ; (h) <i>P. paniculata</i>	42
Figura 9 – Cromatograma do extrato das raízes de <i>P. decumbens</i> cultivada	46
Figura 10 – Espectro de UV do pico em 15 minutos do extrato das raízes de <i>P. decumbens</i> cultivada	46
Figura 11 – Cromatograma do extrato bruto de <i>Polygala boliviensis</i>	49
Figura 12 - Identificação de alcalóides	50
Figura 13 - Identificação de cumarinas	50
Figura 14 - Identificação de esteróides e terpenos	50
Figura 15 - Identificação de saponinas	50
Figura 16 - Identificação de taninos	50
Figura 17 - Identificação de fenóis	51
Figura 18 - Identificação de flavonóides por reação de Shinoda	51
Figura 19 - Identificação de flavonóides por reação com hidóxidos alcalinos	51
Figura 20 – Contagem das contorções abdominais e observação do comportamento dos camundongos	52
Figura 21 – Observação do tempo de reação dos camundongos sobre placa quente	55

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Novas Entidades Químicas e Indicações medicinais por fontes de compostos 01/1981 – 06/2006	15
Tabela 2 – Cálculo da exposição total da pele humana a partir do uso de múltiplos produtos cosméticos contendo salicilato de metila	23
Tabela 3 – Aplicações de técnicas hifenadas na área de plantas medicinais	26
Tabela 4 – Método cromatográfico	36
Tabela 5 - Concentração de salicilato de metila das espécies de <i>Polygala</i> coletadas em campo	42
Tabela 6 – Comparação da concentração de salicilato de metila de <i>P. decumbens</i> cultivada e de campo	47
Tabela 7 – Efeito do extrato bruto de <i>P. boliviensis</i> no teste das contorções induzidas por ácido acético (n=3)	52
Tabela 8 – Efeito do extrato etanólico de <i>E. erythropappus</i> no teste das contorções induzidas por ácido acético por Silverio e colaboradores (2008)	53
Tabela 9 – Efeito do extrato hidroalcolico de <i>P. cyparissias</i> no teste das contorções induzidas por ácido acético realizado por Campos e colaboradores (1997)	54
Tabela 10 - Efeito do extrato bruto de <i>Polygala boliviensis</i> no teste de placa quente (n=3).	55
Tabela 11 - Efeito do extrato hidroalcolico de <i>P. cyparissias</i> no teste de placa quente Campos e colaboradores (1997)	56

## LISTA DE ABREVEATURAS

AINEs	Antiinflamatórios Não-Esteroidais
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ATP	Adenosina Trifosfato
CG	Cromatografia Gasosa
CGAR	Cromatografia Gasosa de Alta Resolução
CIR	Cosmetic Ingredient Review
CLAE-DAD	Cromatografia a Líquidos de Alta Eficiência
COX	Ciclooxigenase
DDA	Dose diária admissível
EBPb	Extrato bruto de <i>Polygala boliviensis</i>
EM	Espectrometria de Massas
FDA	Food and Drugs Administration
ICH	International Conference on Harmonization
INMETRO	Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial
I.P.	Intraperitoneal
ISO	International Standard Organization
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry
IV	Infravermelho
JECFA	Joint Expert Committee on Food Additives
LD	Limite de Detecção
LQ	Limite de Quantificação
MRC	Material de Referência Certificado
OMS	Organização Mundial da Saúde
PGE	Prostaglandina
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
S.C.	Subcutâneo
SNC	Sistema Nervoso Central
UV	Ultravioleta
V.O.	Via oral

## 1 – Introdução

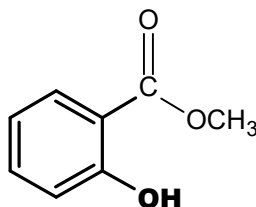
A fitoterapia, apesar de agregar contingente apreciável de trabalhos realizados e publicados, ainda constitui um vasto campo para pesquisa. O interesse pela fitomedicina vem crescendo, devido à busca de novas alternativas terapêuticas para o tratamento de diversas doenças cujos cuidados baseiam-se no uso de medicamentos que apresentam uma série de efeitos colaterais e muitas vezes aliviam parcialmente os sintomas sem tratar a doença (CALIXTO, 2005; LAPA, 2006). Assim, o potencial natural encontrado nos países latino-americanos, principalmente no Brasil, aliado à diversidade de compostos bioativos encontrados, especialmente nas plantas superiores, têm atraído a atenção da comunidade científica e das indústrias farmacêuticas que apostam na produção de fitoterápicos como uma indústria lucrativa, uma vez que a utilização de plantas medicinais atinge um público cada vez maior (CALIXTO, 2005). No entanto, o aumento do emprego dos produtos naturais traz consigo o uso indiscriminado de plantas sem conhecimento fitoquímico, farmacológico e toxicológico, fato preocupante e que chama a atenção dos pesquisadores, já que está acontecendo com a maioria das espécies vegetais consumidas pela população, em todo país (LAPA, 2006).

Entre as várias espécies utilizadas pela população estão as plantas do gênero *Polygala* que são amplamente distribuídas no litoral brasileiro, sendo encontradas principalmente em zonas costeiras de solos arenosos, da Bahia ao Rio Grande do Sul. Inúmeros representantes do gênero *Polygala* contêm altas concentrações de salicilato de metila, que confere odor característico em suas raízes. Nos estados acima da Bahia, são conhecidas popularmente pelo nome de erva-iodex e é utilizada, na forma de aplicações locais, em entorces, machucados ou artropatias crônicas (LORENZI; MATOS, 2002).

Espécies vegetais do gênero *Polygala* (Polygalaceae) são utilizadas tradicionalmente em muitas regiões do mundo. Atividades como expectorante, sedativa, antipsicótica, para neutralizar o veneno de cobras, antifúngicas e analgésicas são atribuídas a essas espécies, o que as torna fonte de interesse para estudos de desenvolvimentos de novos produtos fitoterapêuticos. Estudos anteriores mostram que a atividade analgésica destas espécies deve-se à presença de metabólitos da classe dos salicilatos, incluindo salicilato de metila. (LAPA, 2006; LORENZI; MATOS, 2002; NOGUEIRA et al, 2005).

Os salicilatos e seus derivados são conhecidos como antiinflamatórios não-esteroidais (AINEs). O salicilato de metila possui fórmula molecular  $C_8H_8O_3$ , peso

molecular 152,15, é um líquido incolor com odor característico, e ponto de ebulição de 222°C (Figura 1). (BURKE; SMYTH; FITZGERALD, 2006; FLEMING; GONÇALVEZ, 2006; LAPCZYNSKI et al, 2007).



**Figura 1** – Fórmula estrutural do salicilato de metila

O salicilato de metila é ingrediente em numerosos produtos comercialmente disponíveis, podendo ser encontrado em fragrâncias utilizadas em cosméticos, perfumes finos, xampus, e outros artigos de higiene pessoal, bem como em produtos não-cosméticos, tais como limpeza e detergentes domésticos. Além destes, é encontrado em muitas marcas de cremes, pomadas, loções, linimentos medicamentosos e óleos destinados à aplicação tópica para aliviar dores musculoesqueléticas e dores em geral. (DAVIS, 2007; LAPCZYNSKI et al, 2007).

Em estudos prévios do nosso grupo de pesquisa, Rocha (2009) validou a técnica de Cromatografia a Líquidos de Alta Eficiência com Detector de Arranjo de Diodos (CLAE-DAD), para identificação e quantificação de salicilato de metila. Com a validação, foi possível identificar e quantificar o salicilato de metila nas raízes e partes aéreas de *Polygala decumbens* utilizando CLAE-DAD. Os valores encontrados para raízes e partes aéreas correspondem a 99,4291 e 50,1733 µg de salicilato em cada grama de vegetal fresco. Corresponde, portanto ao primeiro trabalho em que se utilizou CLAE para quantificação de salicilato de metila e o segundo trabalho em que foi utilizada a técnica para identificação de salicilatos em geral, pois Villa e Colaboradores (2007) já haviam identificado salicilato de benzila por CLAE-DAD, porém este não foi quantificado.

Diante da grande aceitação dos produtos fitoterapêuticos pela população, devido não só a cultura popular, mas ao possível custo reduzido, o desenvolvimento destes produtos torna-se importante, sendo fonte de mais fácil acesso principalmente à população carente, para o cuidado de sua saúde. Desta forma, este estudo serve como base para o desenvolvimento de produto fitoterapêutico utilizando espécies deste gênero, que são típicas da região e que possuem relatos de utilização popular como analgésico tópico.

Estabelecendo formas sustentáveis de exploração (cultivo), o presente estudo fornece subsídios para manejo racional dos recursos naturais, visando minimizar o problema de extrativismo e esgotamento de recursos naturais. Além de servir como mais uma ferramenta de integração entre etnofarmacologia e pesquisas laboratoriais, e contribuir para a quimiosistemática do família em estudo.

Diante disto, o presente projeto visa determinar quantitativamente salicilato de metila em diferentes espécies de Polygalaceae ocorrentes no semiárido, por CLAE-DAD, e confirmar a atividade antinociceptiva de uma das espécie de *Polygala*, *Polygala boliviensis*. Objetiva também introduzir espécies coletadas em ambiente de cultivo, com vistas a verificar o potencial de exploração dessas espécies. Dessa forma, embasando trabalhos que visem uma aplicação comercial de derivados de *Polygala*.

Vale ressaltar que o presente trabalho faz parte de outros projetos, os quais foram aprovados pelo Edital n° 001/2009 da Universidade Estadual de Feira de Santana e Universal – CNPq Edital 14/2011, para financiamento.

## 2 – REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 – PESQUISA COM PLANTAS MEDICINAIS

A pesquisa sistemática para a obtenção de novas substâncias com finalidade terapêutica pode ser executada por meio de vários processos. Dentre os mais utilizados encontram-se a síntese de novas moléculas, a modificação molecular de substâncias naturais e/ou sintéticas, com propriedades farmacológicas definidas, e extração, isolamento e purificação de novos compostos, de fontes naturais, principalmente de origem vegetal. No setor farmacêutico, as plantas e os extrativos vegetais continuam apresentando grande importância, tendo em vista a utilização das substâncias ativas como protótipos para o desenvolvimento de fármacos e como fonte de matérias-primas farmacêuticas, tanto para a obtenção de adjuvantes ou, ainda, de medicamentos elaborados exclusivamente à base de extratos vegetais: fitoterápicos (SCHENKEL; GOSMANN; PETROVICK, 2000; DI STASI, 1996).

Sendo assim, a interação entre profissionais na pesquisa de plantas medicinais torna-se um fator de extrema importância, incluindo desde o ponto de vista fitoquímico, até estudos abordando os aspectos agrotecnológico, microbiológico, farmacológico e biotecnológico, de tal forma que esta integração possa propiciar uma ampliação nas possibilidades na busca de novas moléculas ativas. Para a descoberta de princípios ativos naturais é necessário, por exemplo, principalmente, a interação entre a química e a farmacologia. Quanto mais estreita for esta colaboração, mais rápida e consistentemente serão alcançados os objetivos almejados (CECHINEL FILHO; YUNE, 1998; FOGLIO et al, 2006).

Durante muitos anos a pesquisa com plantas medicinais foi subestimada no meio científico, e os preconceitos velados a químicos e farmacologistas, que desenvolviam pesquisas com produtos de origem natural, se verificavam pelos pequenos espaços dentro de congressos, publicações e instituições científicas. Esta situação foi se modificando à medida que os resultados das pesquisas com plantas medicinais mostraram-se promissores em relação à obtenção de novas substâncias com atividade farmacológica definida e com grande potencialidade de transformação em medicamentos (DI STASI, 1996).

Nos últimos anos tem-se verificado um grande avanço científico envolvendo os estudos químicos e farmacológicos de plantas medicinais com objetivo de obter novos



compostos com propriedades terapêuticas. Isto é claramente observado pelo aumento de trabalhos publicados nesta área, tanto em congressos como em periódicos nacionais e internacionais, além do surgimento de novos periódicos específicos sobre produtos naturais ativos, como *Phytomedicine*, *Phytochemical Analysis*, *Natural Product Letter*, entre outros (CECHINEL FILHO; YUNE, 1998).

O interesse da pesquisa nesta área também tem aumentado nos últimos anos no mundo, na qual estão sendo instituídos projetos financiados por órgãos públicos e privados. Nos anos 70, nenhuma das grandes companhias farmacêuticas mundiais mantinha programas nesta linha e atualmente isto tem sido prioridade na maioria delas (FOGLIO et al, 2006).

Por outro lado, no segmento industrial, é nítido o ressurgimento do interesse em produtos naturais como fonte de modelos para fármacos e como matéria-prima para o desenvolvimento de fitoterápicos. A Tabela 1 mostra os novos componentes químicos, em termos de números de drogas aprovadas, com indicações terapêuticas classificados por fonte de compostos, incluindo animal, vegetal e micro-organismos. A Figura 2, por sua vez, representa graficamente a distribuição dos novos componentes por fonte (HARVEY, 2000; SCHENKEL; GOSMANN; PETROVICK, 2000).

**Tabela 1** – Novas Entidades Químicas e Indicações medicinais por fontes de compostos  
01/1981 – 06/2006

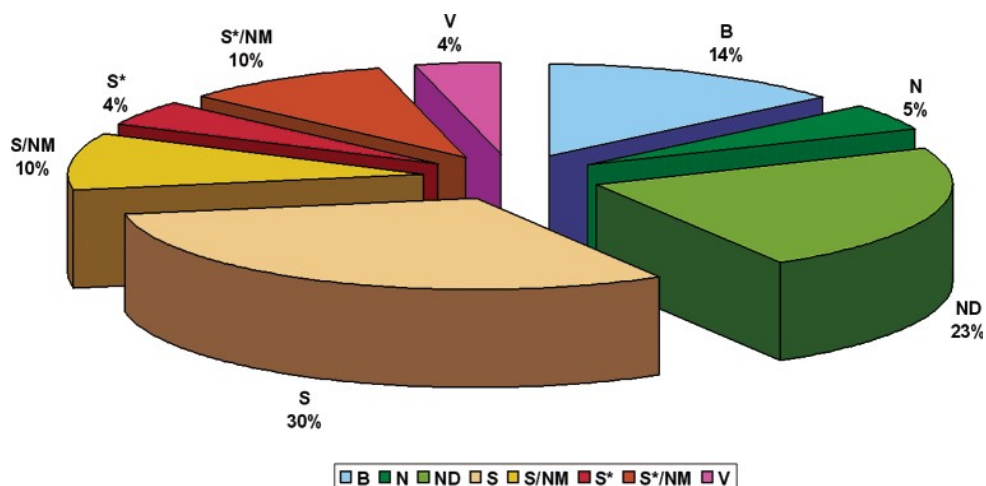
Indicação	Total	Origem da droga							V
		B	N	DN	S	S/NM	S*	S*/NM	
Analgésico	16		1		11	2	2		
Anestésico	5				5				
Anti-Alzheimer	4		1			3			
Anti-parkinsoniano	12			2	1	5		4	
Antialérgico	16		1	3	12				
Anti-anginal	5				5				
Anti-arrítmico	16		1		13			2	
Anti-artrítico	15	5		1	3	6			
Antiasmático	14	1		3	2	6		2	
Antibacteriano	109		10	64	23			1	11
Anticâncer	100	17	9	25	18	12	11	6	2
Anticoagulante	17	4		12			1		
Antidepressivo	22				7	13		2	
Antidiabético	32	18	1	4	4	4	1		
Anti-emético	10				1	1		8	
Anti-epiléptico	11			2	6		2	1	
Antifúngico	29	1		3	22	3			

Antiglaucoma	13			4		5	1	3
Anti-histamínico	12				12			
Anti-hiperprolactinemia	4			4				
Anti-hipertensivo	77			2	27	14	2	32
Antiinflamatório	51	1		13	37			
Antiexaureca	10				2	1		7
Antiobesidade	4			1		3		
Antiparasitário	14		2	5	4		2	1
Antipsoriático	7	2		3			1	1
Antipsicótico	7				3	2		2
Antitrombótico	28	13	1	5	2	5		2
Antiulceroso	32	1	1	12	18			
Antiviral	78	12		2	7	1	20	11
Ansiolítico	10				8	2		
Hipertrofia benigna da próstata	4		1	1	1	1		
Broncodilator	8			2				6
Metabolismo de cálcio	17			8	8	1		
Cardiotônico	13			3	2	3		5
Quelante e antídoto	5				4	1		
Contraceptivo	7			7				
Diurético	5				4	1		
Gastroprocinético	4				1	2		1
Hematopoiese	6	6						
Hemofilia	11	11						
Hormônio	22	12		10				
Terapia de reposição hormonal	8				8			
Hipnótico	12					12		
Hipocolesterolêmico	11		3	1	2			5
Hipolipidêmico	8		1		7			
Imunomodulador	4	2	1	1				
Imunoestimulante	10	4	3	2	1			
Imunosupressor	12	4	5	3				
Disfunção sexual masculina	4							4
Esclerose múltipla	4	3					1	
Relaxante muscular	10			4	2	1	3	
Neuroléptico	9				1	6		2
Nootrópico	8			3	5			
Osteoporose	4	2		1	1			
Inibidor de agregação plaquetária	4		3		1			
Síndrome do desconforto	6	3	1		1	1		

respiratório										
Incontinência urinária	4				2	2				
Vasodilatador	5			3	2					
Total	1005	122	43	230	309	108	47	107	39	

B: produtos biológicos; N: produtos naturais; DN: derivados de produtos naturais; S: totalmente sintéticos; S\*: produtos feitos sinteticamente, mas farmacóforo é/ou foi natural; V: vacina; NM: produtos naturais mimetizados.

Fonte: NEWMAN; CRAGG, 2007 (adaptada)



**Figura 2** – Novas entidades químicas por fontes 01/1981 – 06/2006

Fonte: NEWMAN; CRAGG, 2007

Provavelmente, o principal fator a contribuir consideravelmente para o crescimento em questão consiste na evolução dos estudos científicos, particularmente os estudos químicos e farmacológicos, que comprovam, cada vez mais, a eficácia das plantas medicinais, principalmente aquelas empregadas na medicina popular com finalidades terapêuticas (CECHINEL FILHO; YUNE, 1998).

Contudo, grande parte das plantas nativas brasileiras, por exemplo, ainda não tem estudos para permitir a elaboração de monografias completas e modernas. Muitas espécies são usadas empiricamente, sem respaldo científico quanto à eficácia e segurança, o que demonstra que em um país como o Brasil, com sua biodiversidade, ainda existe uma lacuna entre a oferta de plantas e as poucas pesquisas. Porém, com o desenvolvimento de novas técnicas espectroscópicas, os químicos orgânicos têm conseguido elucidar rapidamente estruturas moleculares complexas de constituintes naturais, até há pouco tempo difíceis de serem identificados. A cada momento são relatadas na literatura novas moléculas, algumas de relevante ação farmacológica. Neste contexto é importante mencionar que as plantas, além de seu uso na medicina popular com finalidades terapêuticas comprovadas, têm

contribuído, ao longo dos anos para a obtenção de vários fármacos, até hoje amplamente utilizados na clínica (FARNSWORTH, 1998; CORDELL, 1995; FOGLIO et al, 2006).

Ainda assim, a escassa inovação tecnológica em pesquisa e exploração de produtos naturais é uma das características marcantes de países em desenvolvimento. No Brasil, as inovações têm sido de baixa ou média intensidade, sendo os fitoterápicos mais vendidos no mercado brasileiro produzidos a partir de espécies estrangeiras (WAGNER, 2002 apud FUNARI; FERRO, 2005). Por outro lado, grandes empresas sediadas em países industrializados, como Alemanha, França, Estados Unidos e Japão, vêm aplicando competências científicas e tecnológicas no desenvolvimento de produtos derivados de plantas medicinais, muitas vezes oriundas dos países em desenvolvimento e com emprego tradicional, e se consolidando como líderes neste crescente e promissor mercado (YUNES; PEDROSA; CECHINEL FILHO, 2001).

## 2.2 – CULTIVO DE PLANTAS

Desde o século 4 a.C. existem relatos de normas para a coleta de plantas medicinais. Os carrascos gregos, por exemplo, coletavam suas amostras do veneno cicuta (*Conium maculatum*) pela manhã, quando os níveis de coniina são maiores. Variações temporais e espaciais no conteúdo total, bem como as proporções relativas de metabólitos secundários em plantas ocorrem em diferentes níveis (sazonais e diárias; intraplanta, inter- e intraespecífica) e, apesar da existência de um controle genético, a expressão pode sofrer modificações resultantes da interação de processos bioquímicos, fisiológicos, ecológicos e evolutivos. De fato, os metabólitos secundários representam uma interface química entre as plantas e o ambiente circundante, portanto, sua síntese é freqüentemente afetada por condições ambientais. (DARROW; BOWERS, 1997; KUTCHAN, 2001).

Fatores como sazonalidade, ritmo circadiano e desenvolvimento podem coordenar ou alterar a taxa de produção de metabólitos secundários. A época em que uma droga é coletada é um dos fatores de maior importância, visto que a quantidade e, às vezes, até mesmo a natureza dos constituintes ativos não é constante durante o ano. São relatadas, por exemplo, variações sazonais no conteúdo de praticamente todas as classes de metabólitos secundários, como óleos essenciais, lactonas sesquiterpênicas, ácidos fenólicos, flavonóides, cumarinas, saponinas, alcalóides, taninos, graxas epicuticulares, iridóides, glucosinolatos e glicosídeos cianogênicos. (GOBBO-NETO, LOPES, 2006).

Existem, também, cada vez mais estudos mostrando que a composição de metabólitos secundários de uma planta pode variar apreciavelmente durante o ciclo dia/noite, tendo sido descritas, por exemplo, variações circadianas nas concentrações de óleos voláteis, iridóides, alcalóides, glucosinolatos, glicosídeos cianogênicos e tiocianatos. (GOBBO-NETO, LOPES, 2006).

A ontogenia também é de considerável importância e podem influenciar não só a quantidade total de metabólitos produzidos, mas também as proporções relativas dos componentes da mistura. É o caso, por exemplo, das lactonas sesquiterpênicas produzidas em *Arnica montana*, consideradas os principais princípios ativos desta planta utilizada como antiinflamatório; enquanto plantas jovens acumulam majoritariamente derivados da helenalina, a concentração destes compostos é reduzida para praticamente zero após aproximadamente seis semanas contadas a partir da formação das folhas; por outro lado, os níveis de compostos do tipo diidrohelenalina aumentam muito e então se mantêm constantes por um longo período. (SCHMIDT; BOMME; ALFERMANN, 1998).

Outro fator que influencia na produção de metabólitos secundários é a temperatura. Apesar de cada espécie ter se adaptado ao seu habitat, as plantas frequentemente são capazes de existir em considerável faixa de temperatura. A faixa em que ocorrem as variações anuais, mensais e diárias na temperatura é um dos fatores que exerce maior influência em seu desenvolvimento, afetando, portanto, a produção de metabólitos secundários. No entanto, talvez pelo fato da temperatura ser, de modo geral, uma consequência de outros fatores, como altitude e sazonalidade, não existem muitos estudos sobre sua influência isoladamente na produção de metabólitos secundários. (GOBBO-NETO, LOPES, 2006).

Além disso, fatores fisiológicos críticos, tais como fotossíntese, comportamento estomatal, mobilização de reservas, expansão foliar e crescimento, podem ser alterados por estresse hídrico e, conseqüentemente, levar a alterações no metabolismo secundário. Os efeitos da chuva na vegetação devem ser considerados em relação ao índice anual, sua distribuição pelo ano, seu efeito na umidade e seu efeito conjunto com a capacidade de absorção de água do solo. (GOBBO-NETO, LOPES, 2006).

As diferentes espécies de plantas estão adaptadas a uma enorme variação na intensidade e quantidade de incidência luminosa. Além disso, existe crescente preocupação com os efeitos do aumento de radiação ultravioleta (UV-B, 280–320 nm), decorrente da depleção da camada de ozônio. Existe correlação positiva bem estabelecida entre

intensidade de radiação solar e produção de compostos fenólicos<sup>101</sup>, tais como flavonóides, taninos e antocianinas. Isso pode ser explicado, principalmente no caso de flavonóides e fenilpropanóides correlatos, pela proteção contra a foto-destruição proporcionada por estes metabólitos ao absorver e/ou dissipar a energia solar, dificultando assim a danificação dos tecidos mais internos pela radiação UV-B. (GRACE; LOGAN, 2000; JEONG et al, 2004).

Na agricultura, a adição de nutrientes, particularmente nitrogênio, é geralmente empregada para aumentar a produção de biomassa. No entanto, os nutrientes afetam não somente o metabolismo primário, mas também influenciam a produção de diferentes metabólitos secundários. Estes efeitos, de certo modo, não são totalmente previsíveis; tendências podem ser reconhecidas, mas não é possível estabelecer regras sólidas e estáveis. (GOBBO-NETO, LOPES, 2006).

Diante disso, a produção de biomassa e princípios ativos nas plantas medicinais, aromáticas e condimentares depende de vários fatores dentre eles o fator genético, clima, condições edáficas e manejo fitotécnico. Dentre os insumos que maximizam a produção das culturas, a adubação é uma das responsáveis pela elevação da produtividade e qualidade dos produtos obtidos. As plantas medicinais e aromáticas como qualquer outra cultura, dependem de suprimento adequado de nutrientes para boas produtividades agrícolas. Neste sentido, a adubação orgânica é fonte de nutrientes para as plantas que além de permitir suprimento adequado contribui para a melhoria das qualidades físicas, químicas e biológicas do solo. (CORRÊA et al, 2010).

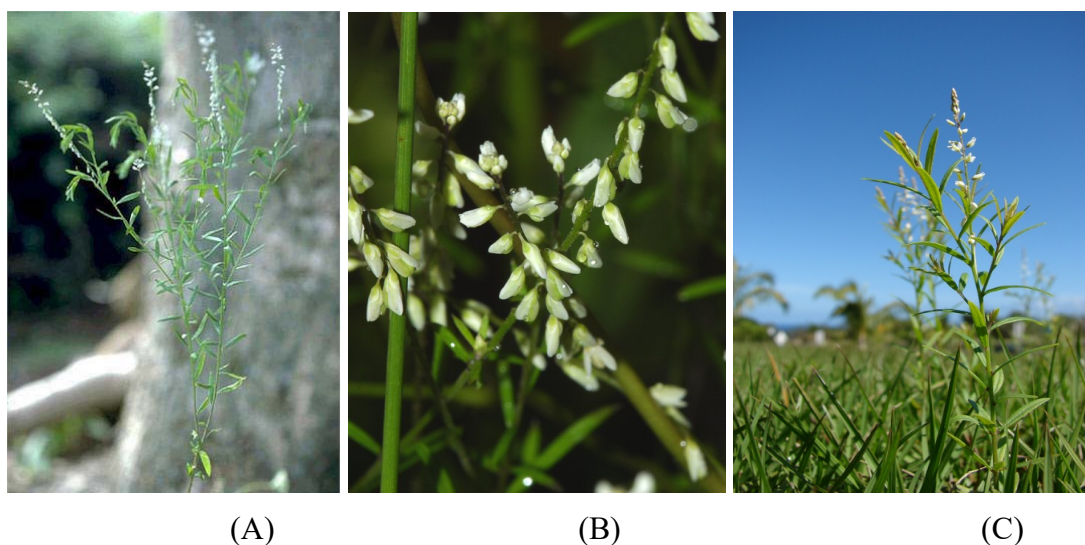
### 2.3 – POLYGALACEAE E ESPÉCIES DO GÊNERO *POLYGALA*

Diversas espécies da família Polygalaceae Hoffmannseg & Link são conhecidas por conter grande diversidade de compostos químicos, muitos dos quais exibem significativa atividade biológicas, incluindo atividade analgésica, expectorante, sedativa, antifúngica entre outras. (LAPA, 2006).

Atualmente esta família compreende 19 gêneros e cerca de 1.300 espécies com ampla distribuição no mundo (MARQUES; PEIXOTO, 2007) sendo as regiões temperadas quentes e tropicais seus principais centros de diversidade. (FURNESS; STAFFORD, 1995). No Brasil, está representada por oito gêneros e cerca de 250 espécies, dos quais o gênero *Polygala* é o mais representativo, com cerca de 140 táxons (110 espécies e 30 variedades). (MARQUES; PASTORE, 2006). O gênero *Polygala*, responsável pela distribuição

cosmopolita da família, compreende atualmente cerca de 725 espécies e 11 subgêneros, dos quais quatro têm representantes no Brasil: *Gymnospora* (Chodat) Paiva, *Hebeclada* (Chodat) S. F. Blake, *Ligustrina* (Chodat) Paiva e *Polygala*. (PAIVA, 1998).

As plantas do gênero *Polygala* apresentam-se, a maior parte das vezes, na forma de arbustos ou de pequenas trepadeiras que cobrem galhos de árvores. Suas flores apresentam cor rosa ou branca e variam entre as espécies (Figura 3). (GENTRY, 1996 apud LAPA, 2006).



**Figura 3** – Espécimes do gênero *Polygala*  
 Fonte: (A) LAPA, 2006; (B) FOREST; STARR, 2007; (C) FOREST; STARR, 2007

O gênero *Polygala*, bem como os subgêneros que ocorrem no território brasileiro, já foi alvo de muitos estudos taxonômicos (MARQUES; PEIXOTO, 2007), os quais servem como base para os diversos trabalhos que vem sendo realizados com biologia floral, fitoquímica, palinotaxonomia, sistemática molecular e citogenética dentro da família Polygalaceae nas últimas décadas. (LÜDTKE; AGUIAR, 2008).

A família também tem sido alvo de diversos estudos fitoquímicos, nos quais algumas classes de compostos já foram detectadas, tais como: saponinas, xantonas, derivados de pironas, cumarinas, ácidos graxos, fenóis e alcalóides. (HAMBURGER; GUPTA; HOSTETTMANN, 1985; PINHEIRO et al, 1998; PIZZOLATTI et al. 2004; SILVEIRA et al. 1995 apud LUDTKE; MIOTO, 2008; OLIVEIRA et al. 2000 apud LUDTKE; MIOTO, 2008). Alguns compostos já foram isolados como: dihidroxi-2,3-dimetoxi xantona e 1,7-dihidroxi-2,3-dimetoxi xantona da *P. cyparissias*; dihidrostiril-2-pirona e estiril-2-pirona da *P. sabulosa*; 1,5-dihidroxi-3,2-dimetoxixantona e 1-hidroxi-2,3,5-trimetoxixantona, espinasterol e delta 25-espinasterol, rutina da *P. paniculata*. (LAPA, 2006,

SOARES, 2008). As espécies de *Polygala* caracterizam-se também pela presença de salicilato de metila, encontrado principalmente em suas raízes. (MATOS, 2000 apud COELHO; AGRA; BARACHO, 2008).

Várias espécies apresentam atividade farmacológica, dentre as quais destacam-se: *Polygala cyparissias* A. St.-Hil. & Moq., cujo extrato possui efeito antinociceptivo (CAMPOS et al, 1997); *P. paniculata* L. e *P. sabulosa* A.W. Benn., como tripanossomicidas (PIZZOLATTI et al, 2002); *P. senega* L. e *P. tenuifolia* Willd., como adjuvantes imunológicos. (ESTRADA et al, 2000); *P. paniculata* L. com efeito antinociceptivo opióide, por sinergismo de seus componentes (LAPA et al, 2009).

#### 2.4 – SALICILATO DE METILA

O salicilato e seus derivados são conhecidos como antiinflamatórios não-esteroidais (AINEs). Essas propriedades estão relacionadas à inibição do sistema enzimático das cicloxigenases (COX-1 e COX-2) que converte ácido araquidônico em prostaglandinas, tromboxanos e prostaciclina, no local de lesão na periferia, diminuindo assim a formação de mediadores da dor no sistema nervoso periférico. Juntamente com outros antiinflamatórios não-esteróides, os salicilatos evitam a sensibilização dos receptores da dor. Além disso, sugere-se que haja efeito analgésico independente da inibição de síntese de prostaglandinas, incluindo efeitos antinociceptivos em neurônios centrais e periféricos (BURKE; SMYTH; FITZGERALD, 2006; FLEMING; GONÇALVEZ, 2006; RANG et al, 2004; WANNMACHER; FERREIRA, 2006; WELCH; MARTIN, 2005).

O salicilato de metila é também conhecido como éster metílico do ácido 2-hidroxi-benzóico; 2-carbometoxifenol; éster metílico do ácido salicílico; entre outros. É uma molécula com ligação de hidrogênio intramolecular entre os seus grupos hidroxil e carbonil. (LAPCZYNSKI et al, 2007; MITSUZUKA et al, 1998 apud VARGHESE et al, 2007).

Os salicilatos nas suas formas derivadas são amplamente utilizados na medicina. O salicilato de metila é utilizado para aliviar dores musculares e dores em geral, aplicado externamente na área afetada (FREW et al, 1989 apud VARGHESE et al, 2007; KAKKER; MAYERSOHN, 1998).

Seu uso mundial é de cerca de 10-100 toneladas por ano. Além destes, é encontrado em muitas marcas de cremes, pomadas, loções, linimentos medicamentosos e óleos destinados à aplicação tópica para aliviar dores musculoesqueléticas e dores em geral (DAVIS, 2007; LAPCZYNSKI et al, 2007).



O nível máximo de absorção pela pele resultante da utilização de salicilato de metila, em fórmulas contendo fragrâncias finas é de 0,29%, assumindo utilização em níveis de até 20% no produto final. O nível de uso percentual de 97,5% de salicilato de metila em fórmulas cosméticas em geral tem sido relatado como 0,13%, resultando em máximo de exposição diária na pele de 0,0034 mg/kg (Tabela 2) (IFRA, 2002).

**Tabela 2** – Cálculo da exposição total da pele humana a partir do uso de múltiplos produtos cosméticos contendo salicilato de metila

<b>Tipo de produtos cosméticos</b>	<b>Gramas aplicadas</b>	<b>Aplicação diária</b>	<b>Fator de retenção</b>	<b>Mistura/ produto</b>	<b>Ingrediente/ mistura<sup>a</sup></b>	<b>Ingrediente (mg/kg/dia)<sup>b</sup></b>
Loção corporal	8.00	0.71	1.000	0.004	0.13	0.0005
Creme facial	0.80	2.00	1.000	0.003	0.13	0.0001
Eau de toilette	0.75	1.00	1.000	0.080	0.13	0.0013
Fragrância em creme	5.00	0.29	1.000	0.040	0.13	0.0013
Anti transpirante	0.50	1.00	1.000	0.010	0.13	0.0001
Shampoo	8.00	1.00	0.010	0.005	0.13	0.0000
Produtos de banho	17.00	0.29	0.001	0.020	0.13	0.0000
Gel de banho	5.00	1.07	0.010	0.012	0.13	0.0000
Sabonete	0.80	6.00	0.010	0.015	0.13	0.0000
Spray de cabelo	5.00	2.00	0.010	0.005	0.13	0.0000
<b>Total</b>						<b>0.0034</b>

<sup>a</sup> Níveis de ingrediente fragrante acima de 97,5% em mistura de fragancias usada nestes produtos

<sup>b</sup> Baseado em adultos de 60kg

Fonte: LAPCZYNSKI et al, 2007 (adaptada)

O Joint Expert Committee on Food Additives (JECFA, 2001) afirma que há preocupações quanto à segurança dos níveis atuais de consumo, quando usado como agente flavorizante. Dose diária admissível (DDA) de 0-0,5 mg/kg de peso corporal foi estabelecido para o salicilato de metila. Estima-se que o consumo diário per capita de salicilato de metila é de 0,7 mg/kg de peso corporal quando calculada em uma proporção usual de 10% de consumidores. Entretanto, de acordo com uma análise de ingestão espera-se que mais de 50% da população consuma salicilato de metila. A ingestão calculada com esta medida de proporção é de 0,1 mg / kg de peso corporal.

Cosmetic Ingredient Review Panel, Cosmetic, Toiletry and Fragrance Association (CIR, 2003), afirma que o salicilato de metila é seguro quando utilizado para evitar

irritação da pele, quando formulado para evitar o aumento da sensibilidade da pele do sol, ou, quando o aumento da sensibilidade ao sol é esperada.

Devido ao seu potencial de toxicidade grave, o Food and Drugs Administration (FDA) regulamentou que o rótulo de qualquer medicamento que contenha mais de 5% de salicilato de metila deve apresentar uma advertência contra a sua utilização, exceto quando indicado apenas para uso tópico, e uma advertência para manter o produto fora do alcance das crianças (US-FDA, 2004).

Uma das mais perigosas formas de salicilato de metila é o óleo de “wintergreen”, constituído de aproximadamente 98% de salicilato de metila. Apenas 1 mL deste óleo é equivalente a 1400 mg de aspirina (JOHNSON; WELCH, 1984). Dado que um comprimido adulto contém 325 mg de aspirina, uma simples colher de chá deste óleo é toxicologicamente semelhantes à ingestão de quase 22 comprimidos de aspirina (WOLOWICH et al, 2003). Contextualizando, os quadros de intoxicação aguda por aspirina se dá pela ingestão de aproximadamente 150 mg/kg, com possíveis efeitos tóxicos graves na faixa de 300-500 mg/kg (ou cerca de um comprimido de aspirina para adulto/kg) (DONOVAN; AKHTAR, 2001 apud DAVIS, 2007). Desta forma, uma colher de chá do óleo de “wintergreen” (equivalente a 7000 mg de aspirina) pode possivelmente resultar em efeitos tóxicos graves em crianças com peso inferior a cerca de 23 kg, aproximadamente 6 anos de idade (DAVIS, 2007).

Numerosos produtos comercialmente disponíveis contêm salicilato de metila em sua composição. Porém, alguns vendidos para uso tópico para tratamento de dores musculoesqueléticas, dor ou o resfriado comum, contêm concentrações potencialmente perigosas de salicilato de metila. Em Hong Kong, medicamentos contendo óleos de salicilato de metila representam quase 50% dos quadros de intoxicação aguda por salicilatos (CHAN, 1995; CHAN, 1996; HOFMAN; DIAZ; MARTELLA, 1998).

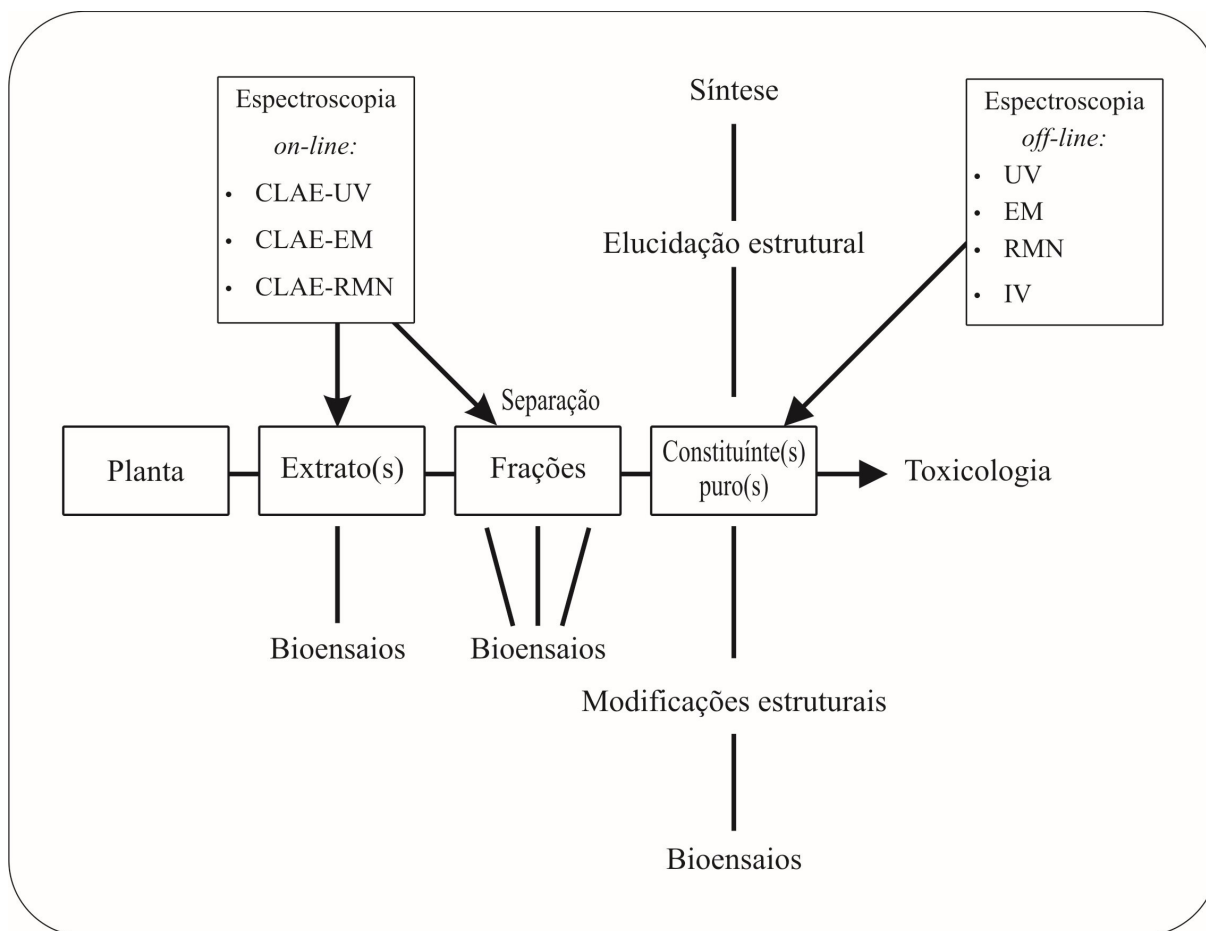
Na África, formulações de salicilato de metila administradas tanto por via oral e quanto tópica têm sido usadas como remédios caseiros para o tratamento das infecções respiratórias agudas em crianças (IYUN; TOMSON, 1996). Envenenamento por salicilato também tem sido relatado após a ingestão de óleo de “wintergreen” vendido como um tempero para doces caseiros (HOWRIE; MORIARTY; BREIT, 1985). Além disso, tem sido observada toxicidade de salicilato através de absorção percutânea após o uso de preparações tópicas (ABDEL-MAGID; AHMED, 1994).

A disponibilidade, odor agradável, e palatabilidade do salicilato de metila muitas vezes podem levar a uma subestimação grosseira do seu potencial de efeitos graves, até mesmo fatais, de toxicidade (DAVIS, 2007).

## 2.5 – TÉCNICAS PARA IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE COMPONENTES EM PRODUTOS NATURAIS

Extratos com solventes orgânicos são preparados a partir da seleção de espécies vegetais para o estudo. Estes podem ser avaliados em ensaios biológicos *in vitro* e submetidos a fracionamento biomonitorado. Para o fracionamento empregam-se técnicas cromatográficas variadas, com diferentes graus de inovação tecnológicas, desde colunas abertas com suportes cromatográficos diversos até técnicas instrumentais, como cromatografia a líquidos de alta eficiência (CLAE) e cromatografia em contracorrente de alta velocidade, seja em escala preparativa ou semipreparativa (BRAGA, 2009).

Após o isolamento das substâncias constituintes do extrato vegetal, o trabalho fitoquímico prossegue com a elucidação da estrutura química das moléculas. Assim, são empregados métodos espectroscópicos, incluindo ultravioleta (UV), infravermelho (IV), ressonância magnética nuclear (RMN) e espectrometria de massas (EM). Comumente a elucidação estrutural é realizada após o isolamento das substâncias. Contudo, atualmente, a possibilidade do emprego de técnicas hifenadas ou técnicas acopladas pode ajudar, em parte, os estudos em produtos naturais. Apesar de extratos vegetais serem misturas complexas de diferentes metabólitos, a análise de frações voláteis ou materiais apolares de superfícies foliares já é, há muito tempo realizada, não sendo necessário muitas vezes, nenhum fracionamento para a total caracterização química do material em estudo. O grande avanço na análise destas misturas decorreu do desenvolvimento de aparelhos de cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM). O uso de diferentes técnicas para a elucidação estrutural de constituintes de plantas pode ser visto na Figura 4 (BRAGA, 2009; PINTO et al, 2002; RODRIGUES et al, 2006).



**Figura 4** – Prospecções químicas e de bioatividade de plantas.

Fonte: BRAGA, 2009 (adaptada)

A principal vantagem das técnicas hifenadas em comparação com as técnicas espectroscópicas sem hifenação deve-se ao fato de não necessitar de uma grande quantidade de amostra na sua forma purificada, o que acontece com as técnicas sem hifenação, que só são válidas após um tedioso protocolo de purificação (RODRIGUES et al, 2006).

As principais características e usos das técnicas hifenadas na análise de plantas estão representadas na Tabela 3.

**Tabela 3** – Alguns exemplos de aplicações de técnicas hifenadas na área de plantas medicinais

<b>Técnicas hifenadas</b>	<b>Características</b>	<b>Exemplos de aplicação na área de plantas medicinais</b>
CG-EM	Separação e identificação de compostos voláteis. Fornece informação estrutural da molécula. Permite comparação com bibliotecas espectrais.	Estudo da sazonalidade de algumas classes de metabólitos secundários, caracterização de aromas, identificação de terpenóides (BRANCO; PIZZOLATTI,

		2002) Análise de flavonóides (FIAMEGOS et al, 2004)
CG-EM-EM	Confirmação estrutural de moléculas.	Análise de fragrâncias (GRANERO et al, 2004)
CLAE-DAD	Separação e identificação de compostos conhecidos, através da comparação do tempo de retenção e espectro UV com o padrão analítico. Não fornece informação estrutural.	Análise de flavonóides (LI; FITZLOFF, 2001) Controle de qualidade de plantas medicinais, busca de metabólitos ativos, estudos de ecologia química e quimiossistemáticos (BRANCO; PIZZOLATTI, 2002)
CLAE-EM	Raramente resulta na identificação definitiva. Muitas vezes acoplado com LC-DAD para fornecer informações estruturais complementares.	Análise de antocianinas (COSTA; HORTON; MARGOLIS, 2000)
CLAE-EM-EM	Determinação de novos compostos, com a incrível vantagem da simplicidade no preparo da amostra e rapidez na obtenção dos resultados.	Determinação de flavonóides, saponinas (WOLFENDER; RODRIGUEZ; HOSTETTMANN, 1998)
CLAE-RMN	Fornece informações estruturais (espectro RMN-H). Constitui-se a técnica mais poderosa na determinação estrutural de substâncias inéditas com novos esqueletos e em misturas biologicamente ativas. (BRANCO; PIZZOLATTI, 2002)	Determinação de alcalóides (ZANOLARI, 2003), flavonóides (FERRARI, 2000)

Fonte: RODRIGUES, 2006 (adaptada)

Neste contexto, o desenvolvimento do estudo fitoquímico está diretamente relacionado à utilização e ao desenvolvimento de técnicas rápidas e precisas, que permitam o isolamento de compostos de interesse, normalmente presente em pequenas quantidades, concomitantemente com constituintes químicos já conhecidos e de grande ocorrência em plantas (FERRI, 1996).

Desta forma, a tendência futura é de que novas técnicas hífenadas surgirão devido ao avanço tecnológico, permitindo acoplamentos mais sofisticados, através de interfaces modernas e otimizadas, aliando métodos de separação altamente eficientes e de amplo

domínio, como a cromatografia, com um ou mais detectores espectroscópicos (RODRIGUES et al, 2006).

### **2.5.1 – Cromatografia a Líquidos de Alta Eficiência**

Os métodos cromatográficos são os procedimentos de separação e isolamento mais amplamente utilizados atualmente. Além disso, esses métodos servem também para fins de identificação e análise de misturas e de substâncias isoladas. A cromatografia está fundamentada na migração diferencial dos componentes de uma mistura, que ocorre devido a diferentes interações, entre duas fases imiscíveis, a fase móvel e a fase estacionária. A grande variedade de combinações entre fases móveis e estacionárias a torna uma técnica extremamente versátil e de grande aplicação (DEGANI; CASS; VIEIRA, 1998; FALKENBERG; SANTOS; SIMÕES, 2000).

A cromatografia pode ser utilizada para a identificação de compostos, por comparação com padrões previamente existentes, para a purificação de compostos, separando-se as substâncias indesejáveis e para a separação dos componentes de uma mistura (DEGANI; CASS; VIEIRA, 1998).

A sensibilidade, velocidade, exatidão, e simplicidade para separação, identificação e determinação de substâncias, resultaram em grande desenvolvimento desse método. As diferentes modalidades de cromatografia são responsáveis por cerca de 70% da Química Analítica (AQUINO NETO; NUNES, 2003).

O conceito de cromatografia a líquidos abrange diversidade de técnicas de separação, todas com envolvimento de uma fase móvel líquida. As substâncias são separadas por partição entre um líquido móvel e uma fase estacionária sólida, finamente dividida, ou um líquido imobilizado em superfície sólida. Os componentes de uma mistura a ser analisada distribuem-se entre duas fases, de acordo com a afinidade que têm pelas mesmas (AQUINO NETO; NUNES, 2003).

A cromatografia a líquidos de alta eficiência (CLAE) é uma técnica de separação que, em menos de trinta anos, passou a ser um dos métodos analíticos mais utilizados para fins qualitativos e quantitativos. As razões para esta evolução estão relacionadas à sua adaptabilidade para determinações quantitativas com boa sensibilidade, a possibilidade de separar espécies não voláteis e termicamente instáveis, com destaque para a indústria farmacêutica, bem como as suas aplicações em determinações ambientais e em muitos outros campos da ciência, como o da medicina (TONHI et al, 2002).

A CLAE torna-se uma técnica importante à medida que a maioria dos compostos não são suficientemente voláteis para a cromatografia a gás. Esta técnica usa pressões elevadas para forçar a passagem do solvente através de colunas fechadas que contêm partículas muito finas capazes de proporcionar separações muito eficientes (HARRIS, 2005).

O dispositivo para a CLAE consiste em sistema de distribuição de solvente, válvula de injeção de amostra, coluna de alta pressão, detector e computador para controlar o sistema e apresentar os resultados. Muitos dispositivos, ainda, incluem um forno para o controle de temperatura da coluna (HARRIS, 2005).

A bomba de alta pressão é um dispositivo que está relacionado ao tempo de retenção, a reprodutibilidade e a sensibilidade do detector. Este sistema é composto por bomba e controladores de pressão e de vazão. De maneira geral, a bomba deve ter capacidade de impulsionar a fase móvel e de proporcionar ao sistema vazão contínua sem pulsos com alta reprodutibilidade, possibilitando a eluição da fase móvel a um fluxo adequado (AQUINO NETO; NUNES, 2003; DEGANI; CASS; VIEIRA, 1998; GONÇALVES, 2001; HARRIS, 2005).

A introdução da amostra pode ser realizada por meio de válvula de amostragem ou por meio de seringa de injeção. As válvulas de injeção usadas possuem alça de amostragem para a introdução da amostra com seringa e duas posições, uma para o preenchimento da alça e outra para sua liberação para a coluna (AQUINO NETO; NUNES, 2003; DEGANI; CASS; VIEIRA, 1998).

Antes de serem injetadas, as amostras passam através de filtro com 0,5  $\mu\text{m}$  de porosidade para remover as impurezas. Além disso, a agulha da seringa deve ser cega (não pontuda) para não danificar a entrada de injeção (HARRIS, 2005).

As colunas são feitas geralmente, de aço inoxidável polido, com comprimento de 5 a 30 cm e diâmetro de 1 a 5 mm. Essas colunas têm custo elevado e se degradam com facilidade pela ação da poeira e pela adsorção irreversível de impurezas, também provenientes da amostra ou do solvente. Sendo assim, a entrada da coluna principal é protegida por pequena pré-coluna (ou coluna de guarda), com 1 a 4 cm de comprimento, contendo a mesma fase estacionária presente na coluna principal. As partículas finas e os solutos fortemente adsorvidos são retidos pela pré-coluna, que é substituída periodicamente. As colunas são reaproveitáveis, sendo empacotadas com suportes de alta resolução, não sendo necessária sua regeneração após cada separação. Além disso, os

solventes devem ter alto grau de pureza para evitar a degradação das colunas por impurezas e para minimizar o sinal de fundo do detector causado por contaminantes (AQUINO NETO; NUNES, 2003; DEGANI; CASS; VIEIRA, 1998; HARRIS, 2005).

O suporte/fase estacionária é formado por partículas extremamente finas, normalmente se situando na faixa de 3-10  $\mu\text{m}$ , esféricas ou irregulares, homogêneas e densamente compactadas. A eficiência destas colunas aumenta com a diminuição do tamanho das partículas da fase estacionária. Uma razão pela qual as partículas pequenas propiciam melhor resolução é que elas promovem uma vazão mais uniforme através da coluna. Uma segunda razão é que a distância através da qual o soluto tem que se difundir na fase móvel entre as partículas é da ordem de grandeza do tamanho da partícula. Quanto menores as partículas, menor a distância através da qual o soluto tem que se difundir na fase móvel. Além disso, as partículas menores propiciam uma resolução maior e tempos menores de corrida (FALKENBERG; SANTOS; SIMÕES, 2000; HARRIS, 2005).

O detector monitora a fase móvel à medida que elui da coluna. O detector deve ser sensível a pequenas concentrações de todos os analitos, fornecer uma resposta linear e não causar alargamento nos picos eluídos. Além disso, deve ser insensível às variações de temperatura e de composição do solvente. O detector mais utilizado para separações por CLAE é o de ultravioleta. O monitoramento realizado pelo detector é efetuado pela detecção propriamente dita, associada a uma transdução para um sinal elétrico que pode ser registrado ou arquivado eletronicamente (AQUINO NETO; NUNES, 2003; HARRIS, 2005).

As vantagens da CLAE que merecem ser destacadas, de acordo com Aquino Neto e Nunes (2003), são:

- O procedimento é simples e razoavelmente rápido;
- A análise instrumental permite maior resolução, automação de operações, registro e processamento da informação obtida;
- São requeridas apenas pequenas quantidades de material, sendo permitidas quantidades maiores;
- O método tem sido utilizado com êxito em separações e isolamento de grupos de metais difíceis de tratar pela análise qualitativa de rotina;
- Isolamento de frações isofuncionais para posterior análise;
- Isolamento de frações enriquecidas em certos analitos para posterior recristalização, purificação e análise.



Diante de questões como as inerentes aos extratos vegetais, os quais abrangem análise de misturas complexas de diferentes metabólitos, análise de frações voláteis ou materiais apolares de superfícies foliares, o acoplamento de técnicas tem sido realizado, não sendo necessário muitas vezes, nenhum fracionamento para a total caracterização química do material em estudo. A CLAE-EM é um método sensível de análise e um dos mais empregados em quantificação, atualmente. Por outro lado, a técnica mais poderosa para determinação estrutural de substâncias inéditas com novos esqueletos e, principalmente, em misturas biologicamente ativas é a CLAE-RMN (PINTO et al, 2002; WOLFENDER; RODRÍGUES; HOSTETTMANN, 1998).

Vale ressaltar, que a aplicação da CLAE para a análise de compostos voláteis ainda é limitado. Porém, em análise realizada por Villa e colaboradores (2007), foi demonstrada que, apesar de a CG-EM ser a técnica de escolha para este tipo de análise, a CLAE também é eficiente na análise deste tipo de compostos. Contudo, essa técnica poderia superar alguns problemas relacionados à preparação de amostras, ponto crítico do procedimento analítico, em termos de perda ou degradação de analitos. Além disto, a capacidade de multi-sinais do DAD pode otimizar a seletividade tanto na identificação quanto na quantificação dos analitos, na presença de picos de co-eluição. O estudo de Villa também demonstrou que a CLAE pode ser considerada uma técnica simples, rápida, econômica e reprodutível, mesmo para este tipo de análise.

## 2.6 - ATIVIDADE ANALGÉSICA

### 2.6.1 – Dor e fármacos analgésicos

A dor é um efeito secundário, incapacitante, de muitas condições médicas, que afeta grande parte da população e, o controle da dor é uma das prioridades terapêuticas mais importantes. Ela é uma característica fundamental dos mecanismos protetores fisiológicos normais e uma das suas funções é preservar o organismo, evitando o dano tecidual (DRAY, 1997 apud LAPA, 2006; RANG et al, 2004; WANNMACHER; FERREIRA, 2006).

Apesar de ser experiência universal e que todos conhecem suas propriedades aversivas, as tentativas de definir o termo dor não tem sido inteiramente satisfatórias. Os diversos tipos de causas e o componente psicológico envolvido são motivos para essa dificuldade. Por isso, a Associação Internacional para o Estudo da Dor propôs sua

definição como uma experiência sensorial e emocional, relacionada com a lesão tecidual real ou potencial, ou descrita em termo de tal lesão (FLEMING; GONÇALVES, 2006; HANSON, 2004; WANNMACHER; FERREIRA, 2006; WELCH; MARTIN, 2005).

Embora a dor seja uma reação do corpo a estímulos nocivos, constituindo um sistema de alerta precoce e protetor, a sensação de dor em determinados casos, como em pacientes com câncer ou outros tipos de dores crônicas tem pouco efeito positivo (WELCH; MARTIN, 2005).

A dor é tipicamente uma resposta direta a um evento desfavorável, associado a dano tecidual, como lesão, inflamação ou câncer. Contudo, uma dor intensa pode surgir de modo independente de qualquer causa predisponente óbvia ou persistir por longo tempo, após lesão precipitante ter sido curada. Pode ainda ocorrer como consequência de lesão cerebral ou nervosa (RANG et al, 2004).

Existe diferença entre os termos nocicepção e dor. A nocicepção refere-se a manifestações neurofisiológicas, geradas por estímulos nocivos. A dor envolve a percepção de um estímulo aversivo e requer a capacidade de abstração e elaboração do impulso sensorial (MELZACK; LOESER, 1999; ALMEIDA et al, 2004).

Em condições normais, a dor está associada com a atividade elétrica em fibras aferentes primárias de pequeno diâmetro dos nervos periféricos. Estes nervos têm terminações sensoriais nos tecidos periféricos e são ativados por estímulos de vários tipos (mecânico, térmico, químico ou biológico) através de receptores (nociceptores) amplamente encontrados na pele, membranas, tecidos conectivos de órgãos viscerais, ligamentos, cápsulas articulares, periósteo, músculos, tendões e vasos sanguíneos (RANG et al, 2004; WANNMACHER; FERREIRA, 2006).

Os neurônios aferentes primários podem ser ativados por uma gama de mediadores, liberados pelo endotélio vascular, mastócitos e outros leucócitos, pelos próprios terminais nervosos e pelas células lesadas. Os mediadores químicos liberados são: cininas, histamina, serotonina, adenosina trifosfato (ATP), prótons, peptídeos, citocinas e prostaglandinas. Estes mediadores promovem a despolarização das fibras aferentes primárias que irão conduzir o impulso doloroso, iniciado em diferentes tecidos, para o Sistema Nervoso Central (SNC), que, por sua vez, modula a dor, mediante vias eferentes inibitórias (CRAIG, 2003; FLEMING; GONÇALVES, 2006; SAWYNOK, 2003; WANNMACHER; FERREIRA, 2006).

Os analgésicos, por sua vez, são agentes que aliviam a dor por elevarem o limiar da dor sem perturbar o nível de consciência ou alterar outras modalidades sensoriais. São medicamentos sintomáticos cujo uso está condicionado ao diagnóstico estabelecido, às características da dor e ao comportamento do paciente frente à dor (HANSON, 2004; WANNMACHER; FERREIRA, 2006).

Um mecanismo através do qual alguns analgésicos atenuam a dor é baseado na existência de receptores opióides em porções selecionadas do Sistema Nervoso Central (SNC) relacionadas à regulação da dor. Os agentes que ativam certos receptores opióides podem ser potentes analgésicos (HANSON, 2004).

Os receptores opióides são encontrados tanto em neurônios de transmissão da dor na medula espinhal quanto nos aferentes primários que transmitem a mensagem da dor. Os agonistas opióides inibem a liberação de transmissores excitatórios a partir desses aferentes primários e inibem diretamente o neurônio transmissor de dor da medula espinhal. (SCHUMACHER; BASBAUM; WAY, 2005; WANNMACHER; FERREIRA, 2006).

Desta forma, o mecanismo de ação dos opióides é fundamentalmente central. A ligação inicial dos opióides no cérebro desencadeia a liberação do neurotransmissor inibitório, a serotonina, que, por sua vez, induz a inibição dos neurônios no corno dorsal da medula. Os opióides também suprimem a percepção da dor ao eliminar ou alterar os aspectos emocionais da dor e ao induzir euforia e sono com doses mais altas. Os analgésicos opióides também podem produzir analgesia periférica em locais fora do SNC (FLEMING; GONÇALVES, 2006; WELCH; MARTIN, 2005).

Existem também os analgésicos não-opióides que além de propriedades analgésicas, apresentam propriedades antitérmicas e antiinflamatórias, fármacos também conhecidos como antiinflamatórios não-esteroidais (AINEs). Essas propriedades estão relacionadas à inibição do sistema enzimático das cicloxigenases (COX-1 e COX-2) que converte ácido araquidônico em prostaglandinas, tromboxanos e prostaciclina, no local de lesão na periferia, diminuindo assim a formação de mediadores da dor no sistema nervoso periférico. As prostaglandinas, especialmente PGE<sub>2</sub>, sensibilizam o nociceptor periférico às ações de histamina e bradicinina. A primeira promove a reação inflamatória local, e a última estimula as terminações nervosas, levando a nocicepção (FLEMING; GONÇALVEZ, 2006; RANG et al, 2004; WANNMACHER; FERREIRA, 2006; WELCH; MARTIN, 2005).

A dor que acompanha a inflamação e a lesão tecidual provavelmente resulta da estimulação local de fibras nervosas e da excitabilidade aumentada de neurônios da medula espinhal. Salicilatos e outros antiinflamatórios não-esteróides evitam a sensibilização dos receptores da dor. Além disso, sugere-se que haja efeito analgésico independente da inibição de síntese de prostaglandinas, incluindo efeitos antinociceptivos em neurônios centrais e periféricos (BURKE; SMYTH; FITZGERALD, 2006; RANG et al, 2004; WANNMACHER; FERREIRA, 2006).

### 3 – METODOLOGIA

#### 3.1 – COLETA E IDENTIFICAÇÃO DO MATERIAL VEGETAL

As plantas utilizadas nos experimentos foram coletadas em municípios da Chapada Diamantina – BA e no campus da UEFS nos períodos de junho de 2009; setembro e outubro de 2010, respectivamente. A coleta e identificação dos espécimes contou com a colaboração do especialista nesta família botânica José Floriano B. Pastore. Todos os materiais coletados para análise fitoquímica tiveram material testemunho depositado no Herbário da Universidade Estadual de Feira de Santana – HUEFS.

#### 3.2 – CULTIVO DO MATERIAL VEGETAL

Durante as expedições foram coletadas mudas das plantas que foram transferidas para a Unidade Experimental Horto Florestal - UEFS, nos períodos de setembro e outubro de 2010, e dezembro de 2011. Estas foram plantadas em vasos plásticos com capacidade de 5 litros preenchidos com uma mistura de terra vegetal e esterco bovino curtido (5:1) e fertilizante superfosfato simples (18% de  $P_2O_5$ ) na proporção de 1kg por  $m^3$  da mistura. Os sacos foram alocados em casa de vegetação desta unidade, com irrigação diária e 70% de luminosidade. Dois meses após a transferência para casa de vegetação foi coletado a parte aérea e raízes para quantificação do teor do salicilato de metila nos órgãos vegetais.

#### 3.3 – PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS

O material coletado ou cultivado, destinado à análise fitoquímica foi submetido à seleção para que as impurezas, como terra e folhas de outras plantas, fossem retiradas. As raízes também foram separadas das partes aéreas para a realização da análise separadamente. Alguns espécimes, devido à pequena quantidade de material vegetal conseguido, foram analisados por inteiro, sem separação das suas partes. Tanto as raízes quanto as partes aéreas foram rasuradas, pesadas e transferidas para erlenmeyer, contendo o solvente extrator (hexano), numa proporção de 10 mL para cada 1 g de material vegetal. Os recipientes foram devidamente vedados e submetidos à extração por ultrassom por 1 hora, à temperatura ambiente.

O material vegetal foi filtrado, e submetido à filtração em cartucho de Extração em Fase Sólida (Solid-Phase Extraction - SPE), com acetonitrila grau HPLC (J. T. Baker). A solução de acetonitrila foi novamente filtrada através de membrana micro porosa (0,22  $\mu\text{m}$ ) diretamente para um vial, que foi submetido ao cromatógrafo para separação, identificação e quantificação do composto de interesse.

### 3.4 – ANÁLISES CROMATOGRÁFICAS

Os experimentos cromatográficos foram realizados com sistema HPLC EZChrom Elite, consistindo de bomba VRW HITACHI L-2130, equipado com auto-injetor e detector de arranjo de diodo (DAD) VRW HITACHI L-2455, e forno de colunas VRW HITACHI L-2300.

A separação cromatográfica foi realizada por meio de coluna LiChroCART Purospher Star® RP18-e (50 mm x 4,0 mm i.d.) (3  $\mu\text{m}$ ) (Merck, Darmstadt, Germany) combinado com pré-coluna LiChroCART 4-4 LiChrospher 100RP18 (5  $\mu\text{m}$ ) da Merck.

As condições de análise foram com gradiente de eluição conduzido com fase móvel de acetonitrila (MeCN) e água (H<sub>2</sub>O) e o volume de injeção foi de 20  $\mu\text{L}$ . O método utilizado foi desenvolvido e validado em trabalho anterior (ROCHA, 2009), com temperatura de 25°C nas condições descritas na tabela 4:

**Tabela 4 - Método cromatográfico**

<i>Tempo (min)</i>	<i>Fluxo (mL/min)</i>	<i>MeCN (%)</i>	<i>H<sub>2</sub>O (%)</i>
0,0	0,7	50,0	50,0
5,0	0,7	50,0	50,0
15,0	1,0	60,0	40,0
15,1	1,0	90,0	10,0
18,0	1,0	90,0	10,0
18,1	1,0	50,0	50,0
22,0	1,0	50,0	50,0

A leitura do detector de arranjo de diodo foi na faixa de 210 a 400 nm e a aquisição cromatográfica definida em 236 nm. A identificação do salicilato foi conduzida pela comparação dos tempos de retenção e dos espectros de ultra-violeta com o padrão de

referência (Salicilato de Metila Vetec®, dosagem mínima 99%), além de dados de literatura.

A quantificação do salicilato de cada amostra foi feita por correlações com curvas de calibração com padrão externo por meio de injeções duplicatas sob as melhores condições cromatográficas.

### 3.5 – ANIMAIS UTILIZADOS NOS EXPERIMENTO

Os animais utilizados foram camundongos Swiss adultos machos pesando aproximadamente 30 g, provenientes do Biotério Central da Universidade Estadual de Feira de Santana.

Os animais foram mantidos em temperatura constante ( $21\pm 2^{\circ}\text{C}$ ), ciclo claro-escuro de 12 horas e tratados com água e ração *ad libitum*. Os animais foram colocados em jejum de pelo menos 12 horas antes do experimento. Os animais permaneceram no laboratório para sua adaptação por um período de pelo menos 1 hora antes da realização dos experimentos, os quais foram conduzidos entre no período da manhã à temperatura de  $22\pm 2^{\circ}\text{C}$ . Os procedimentos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética do Uso de Animais (CEUA) da UEFS sob protocolo nº 002/2011. Os experimentos foram conduzidos de acordo com as normas internacionais para o estudo com os animais de laboratório (ZIMMERMANN, 1983). A quantidade de animais que foram utilizados para a realização das atividades está descritas na tabela abaixo:

TESTES	QUANTIDADE
Contorções abdominais – grupo teste	3 camundongos/ concentração do extrato
Contorções abdominais – grupos controle	3 camundongos/ grupo
Placa quente – grupo teste	3 camundongos/ concentração do extrato
Placa quente – grupos controle	3 camundongos/ grupo

### 3.6 – PREPARAÇÃO DO EXTRATO

A coleta da espécie *Polygala boliviensis* foi realizada nos meses de agosto e setembro de 2010, pelo período da manhã, no Campus Universitário da Universidade Estadual de Feira de Santana e sua exsicata depositada no Herbário da mesma universidade (HUEFS).

O material vegetal foi seco em estufa a  $(45\pm 3)^{\circ}\text{C}$ , durante 15 dias, até peso constante. Após a secagem, o material foi moído e, posteriormente, pesado e colocado em um erlenmeyer para extração. O material vegetal utilizado foi constituído de partes aéreas e raízes. O método de extração utilizado foi maceração, a qual foi realizada por cinco vezes consecutivas, com duração de uma semana cada, utilizando metanol como solvente extrator. Os filtrados obtidos em cada etapa foram reunidos e concentrados em rotaevaporador sob pressão reduzida.

A padronização do extrato por quantificação de salicilato de metila em CLAE-DAD não foi possível, pois os resultados encontrados estavam abaixo do LQ. Optou-se por realizar triagem fitoquímica qualitativa para estabelecer as classes de compostos químicos característicos da espécie. A triagem foi realizada com base na metodologia descrita previamente por Matos (1997), utilizando uma série de colorimétricas e de precipitação, resultantes da adição ao extrato de reagentes específicos para cada classe de metabólito secundário.

### 3.7 - AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA

#### 3.7.1 – Reagentes e soluções utilizadas

Foram utilizadas as seguintes drogas e soluções: ácido acético, sulfato de morfina (Cristália), cloridrato de ketamina (König) e cloridrato de xilasina (Vetbrans). O extrato foi diluído em salina (NaCl 0,9%).

#### 3.7.2 – Vias de administração

Para avaliar a atividade antinociceptiva do extrato, de modo sistêmico, o mesmo foi administrado por via oral (v.o.). Os animais foram tratados com diferentes doses do extrato, 90 minutos antes da administração dos agentes indutores da nocicepção, sendo que o agente químico (ácido acético) foi administrado por via intraperitoneal (i.p).

#### 3.7.3 - Métodos

A atividade antinociceptiva foi avaliada pelos métodos das contorções abdominais e da placa quente.



No método de contorções abdominais a resposta nociceptiva foi induzida pela injeção intraperitoneal do ácido acético (0,8%) diluído em solução salina (0,9%). Grupos de animais foram pré-tratados por via oral com os extratos das espécies selecionadas (10, 100, 300, 1000 mg/kg), 1 hora antes da injeção do ácido acético. O grupo controle negativo recebeu o mesmo volume do veículo (10 mL/kg) utilizado para diluir o extrato (salina). Outro grupo foi tratado com morfina como comparativo de resultados. Após a injeção do ácido acético, os camundongos foram colocados em recipientes de vidro individuais e o número de contorções abdominais foi quantificado cumulativamente 5 minutos após a aplicação do ácido acético e durante 15 minutos. A atividade antinociceptiva foi determinada tomando-se como base a inibição do número de contorções abdominais dos animais pré-tratados com os extratos comparados com o número das contorções abdominais dos animais controle (veículo).

No teste de placa quente os animais foram colocados dentro de um cilindro acrílico sobre a superfície de placa quente de metal previamente aquecida a  $55\pm 1^\circ\text{C}$ . O tempo que o animal levou para lamber, morder ou levantar as patas dianteiras sobre a placa previamente aquecida, foi cronometrado e considerado como indicativo de efeito nociceptivo.

Cada animal foi selecionado conforme sua reatividade ao modelo, sendo desprezados aqueles que permaneceram acima de 8 s na placa aquecida sem reagir ao estímulo térmico na temperatura  $55\pm 1^\circ\text{C}$ , respectivamente. O tempo máximo de permanência dos animais no aparelho de placa quente foi de 30 s para evitar danos teciduais aos animais, o qual foi considerado como índice total de analgesia.

Os animais foram pré-tratados 90 minutos antes do experimento com os extratos (10, 100, 300, 1000 mg/kg) ou com morfina (1 mg/kg, s.c., utilizado como controle positivo). Outro grupo foi tratado somente com o veículo (10 mL/kg – controle negativo). Os grupos tiveram seus efeitos comparados para fins de se avaliar a presença de propriedades antinociceptivas para o extrato em estudo e os resultados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (e.p.m) dos tempos de reação ou como % de atividade antinociceptiva em relação ao observado para o grupo controle, nos respectivos tempos.

### 3.8 – ANÁLISE ESTATÍSTICA

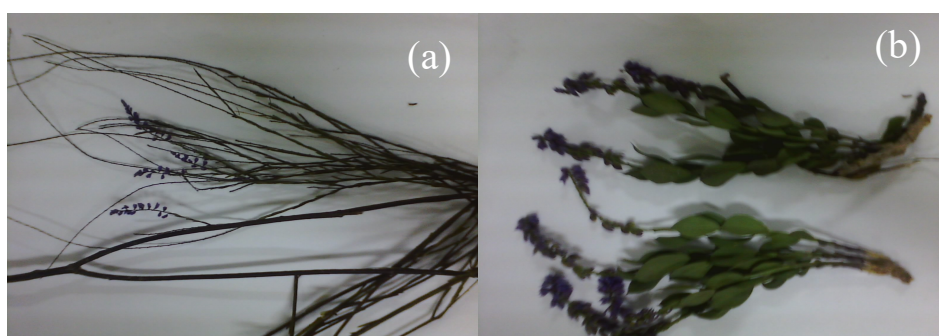
As análises estatísticas dos resultados foram realizadas por meio de análise de variância (ANOVA), utilizando-se o método de Tukey seguido do teste de Scott-Knott,

quando apropriado. Valores de  $p < 0,05$  ou  $p < 0,001$  foram considerados como indicativos de significância.

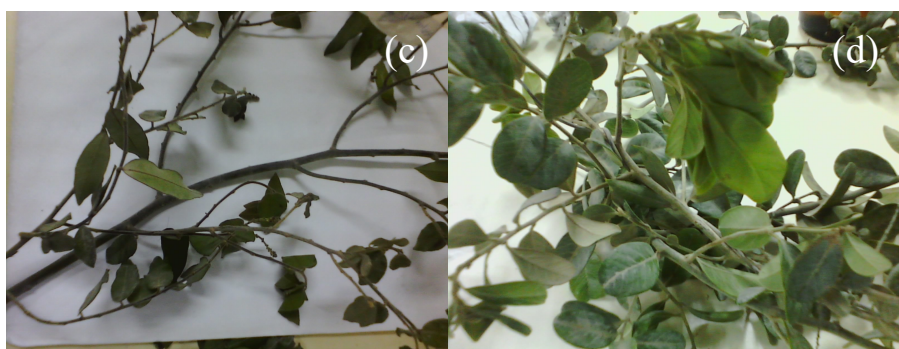
## 4 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 – QUANTIFICAÇÃO DE SALICILATO DE METILA DAS ESPÉCIES DE *Polygala* COLETADAS EM CAMPO

Foram analisadas 17 espécies de Polygalaceae, sendo 2 do gênero *Bredemeyera*, 2 *Securidacas*, e as demais do gênero *Polygala* (Figura 5-8). A análise dos extratos das espécies coletadas apresentaram tempo de retenção do salicilato de metila em aproximadamente 15 minutos (Anexo A). Os espectros de ultravioleta apresentaram-se característicos do salicilato de metila, com lambda máxima em 237 nm e 303 nm (Anexo B).



**Figura 5** – Espécies de Polygalaceae coletadas na Chapada Diamantina (a) *P. sericea*; (b) *P. poaya*



**Figura 6** – Espécies de Polygalaceae coletadas na Chapada Diamantina (c) *S. tomentosa*; (d) *B. hebeclada*



**Figura 7** – Espécies de Polygalaceae coletadas na UEFS (e) *P. decumbens*; (f) *P. boliviensis*



**Figura 8** – Espécies de Polygalaceae coletadas na UEFS (g) *P. trichosperma*; (h) *P. paniculata*

A quantificação do salicilato de metila foi determinada pela média das áreas dos picos das replicatas das amostras, como demonstrado na Tabela 5. A concentração foi determinada a partir do material fresco, pois em avaliações prévias de material seco, não foi possível a quantificação da substância de interesse.

**Tabela 5** - Concentração de salicilato de metila das espécies de Polygala coletadas em campo

Material testemunho	Data	Local de coleta	Espécies	Parte da planta	µg salicilato/g planta
Harley & Pastore 56180	set./out. 2010	Chapada Diamantina	<i>Bredemeyera hebeclada</i> (DC.) J.F.B.Pastore*	Caule	-
Harley & Pastore 56180	set./out. 2010	Chapada Diamantina	<i>Bredemeyera hebeclada</i> *	Folha	-
Pastore et al. 3205	set./out. 2010	Chapada Diamantina	<i>Bredemeyera martiana</i> A.W.Benn.*	Caule	<14,1 µg/g
Pastore et al. 3205	set./out. 2010	Chapada Diamantina	<i>Bredemeyera martiana</i> *	Folha	-

<i>Pastore et al.</i> 3205	set./out. 2010	Chapada Diamantina	<i>Bredemeyera</i> <i>martiana*</i>	Raiz	<14,1 µg/g
<i>Harley &amp; Pastore</i>	set./out. 2010	Chapada Diamantina	<i>Polygala aff. harleyi</i> Marques	Planta inteira	<14,1 µg/g
<i>Pastore et al.</i> 2687	jun. 2009	UEFS	<i>Polygala boliviensis</i> A.W.Benn.	Parte aérea	107,97±7,55
<i>Pastore et al.</i> 2687	jun. 2009	UEFS	<i>Polygala boliviensis</i>	Raiz	>126,9 µg/g
<i>Pastore 2683</i>	jun. 2009	UEFS	<i>Polygala decumbens</i> A.W.Benn	Parte aérea	50,17±5,25
<i>Pastore 2683</i>	jun. 2009	UEFS	<i>Polygala decumbens</i>	Raiz	99,43±5,93
<i>Pastore et al.</i> 2685	jun. 2009	UEFS	<i>Polygala glochidiata</i> Kunth	Parte aérea	-
<i>Pastore et al.</i> 2685	jun. 2009	UEFS	<i>Polygala glochidiata</i>	Raiz	>126,9 µg/g
<i>Harley &amp; Pastore</i>	set./out. 2010	Chapada Diamantina	<i>Polygala harleyi</i> Marques	Planta inteira	<14,1 µg/g
<i>Harley &amp; Pastore</i> 55169	set./out. 2010	Chapada Diamantina	<i>Polygala harleyi</i> var. <i>intermedia</i> Marques	Planta inteira	<14,1 µg/g
<i>Pastore et al.</i> 3209	set./out. 2010	Chapada Diamantina	<i>Polygala obovata</i> A.St.- Hil. & Moq.	Parte aérea	<14,1 µg/g
<i>Pastore et al.</i> 3209	set./out. 2010	Chapada Diamantina	<i>Polygala obovata</i>	Raiz	97,168±0,51
<i>Pastore et al.</i> 2686	jun. 2009	UEFS	<i>Polygala paniculata</i> L.	Parte aérea	24,00±6,57
<i>Pastore et al.</i> 2686	jun. 2009	UEFS	<i>Polygala paniculata</i>	Raiz	>126,9 µg/g
<i>Harley &amp; Pastore</i> 55802	set./out. 2010	Chapada Diamantina	<i>Polygala poaya</i> Mart.	Caule	<14,1 µg/g
<i>Harley &amp; Pastore</i> 55802	set./out. 2010	Chapada Diamantina	<i>Polygala poaya</i>	Flor	<14,1 µg/g
<i>Harley &amp; Pastore</i> 55802	set./out. 2010	Chapada Diamantina	<i>Polygala poaya</i>	Folha	<14,1 µg/g
<i>Harley &amp; Pastore</i> 55802	set./out. 2010	Chapada Diamantina	<i>Polygala poaya</i>	Raiz	<14,1 µg/g

<i>Harley &amp; Pastore</i> 55802	set./out. 2010	Chapada Diamantina	<i>Polygala poaya</i>	Ramos velhos	-
<i>Harley &amp; Pastore</i> 55802	set./out. 2010	Chapada Diamantina	<i>Polygala poaya</i>	Brotos	<14,1 µg/g
<i>Harley &amp; Pastore</i> 55814	set./out. 2010	Chapada Diamantina	<i>Polygala sericea</i> Mart. Ex A.W.Benn.	Parte aérea	<14,1 µg/g
<i>Harley &amp; Pastore</i> 55814	set./out. 2010	Chapada Diamantina	<i>Polygala sericea</i>	Raiz	45,06±0,42
<i>Pastore et al.</i> 3213	set./out. 2010	Chapada Diamantina	<i>Polygala sincorensis</i> Chodat	Parte aérea	<14,1 µg/g
<i>Pastore et al.</i> 3213	set./out. 2010	Chapada Diamantina	<i>Polygala sincorensis</i>	Raiz	217,54±0,22
<i>Pastore et al.</i> 2684	jun. 2009	UEFS	<i>Polygala trichosperma</i> Jacq.	Parte aérea	<14,1 µg/g
<i>Pastore et al.</i> 2684	jun. 2009	UEFS	<i>Polygala trichosperma</i>	Raiz	21,27±0,17
<i>Pastore et al.</i> 2682	jun. 2009	UEFS	<i>Polygala violácea</i> Aubl.	Parte aérea	>126,9 µg/g
<i>Pastore et al.</i> 2682	jun. 2009	UEFS	<i>Polygala violácea</i>	Raiz	>126,9 µg/g
<i>Pastore et al.</i> 3201	set./out. 2010	Chapada Diamantina	<i>Securidaca diversifolia</i> (L.) S.F.Blake*	Caule	<14,1 µg/g
<i>Pastore et al.</i> 3201	set./out. 2010	Chapada Diamantina	<i>Securidaca diversifolia</i> *	Flor	<14,1 µg/g
<i>Pastore et al.</i> 3201	set./out. 2010	Chapada Diamantina	<i>Securidaca diversifolia</i> *	Folha	<14,1 µg/g
<i>Harley &amp; Pastore</i> 55584	set./out. 2010	Chapada Diamantina	<i>Securidaca tomentosa</i> A.St.-Hil. & Moq.*	Caule	<14,1 µg/g
<i>Harley &amp; Pastore</i> 55584	set./out. 2010	Chapada Diamantina	<i>Securidaca tomentosa</i> *	Folha	<14,1 µg/g

\*As espécies dos gêneros *Bredemeyera* e *Securidaca* foram analisadas devido a sua proximidade filogenética com o gênero *Polygala*.

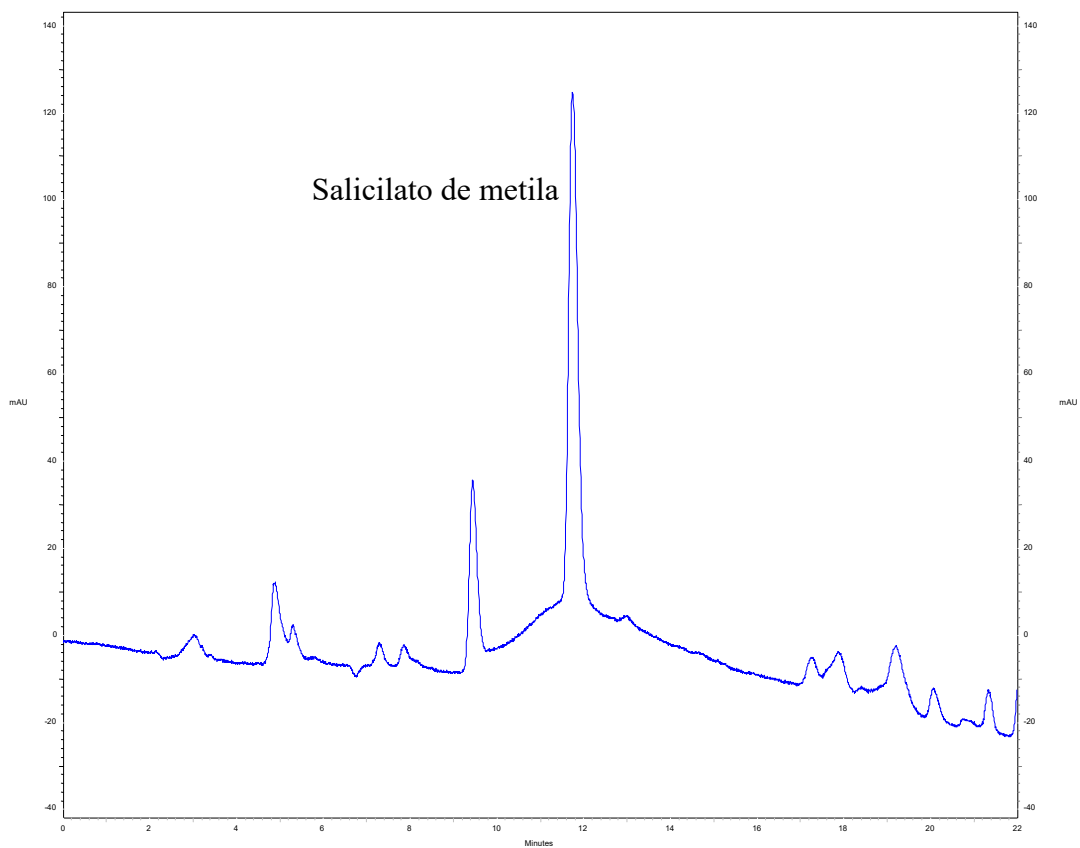
As análises mostraram grande diferença na concentração de salicilato de metila na análise das diferentes partes das amostras e também entre as espécies de Polygalaceae. Estas diferenças podem estar relacionadas a diversos fatores como o tempo de coleta e análise, hábito da planta e parte analisada da planta. O rendimento apresentado pelo

material coletado na UEFS foi maior que o apresentado pelo material coletado na Chapada Diamantina indicando possível perda de salicilato de metila durante o processo de armazenagem até a análise. Entretanto, foi observado notável exceção em *Polygala sincorensis*, que apresentou a maior concentração dentro da faixa analisada ( $217,54 \pm 0,22$   $\mu\text{g/g}$ ). A análise das raízes dessa espécie coletada na região da Chapada Diamantina resultou na maior concentração de salicilato de metila dentre todas as amostras analisadas. Outro fator pode estar relacionado com o hábito das espécies, na qual as anuais, com hábito herbáceo e raízes pouco lignificadas, resultaram em maior concentração de salicilato de metila. E por fim, as raízes de maneira geral possuem maior concentração de salicilato de metila em comparação ao restante da planta, nas amostras que foram avaliadas separadamente tais partes.

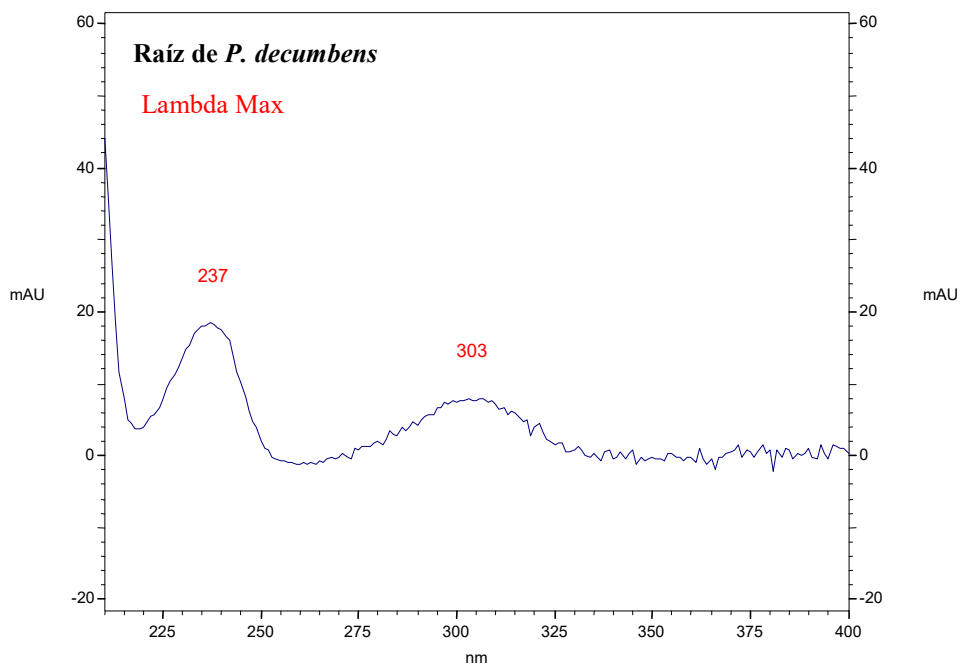
#### 4.2 – QUANTIFICAÇÃO DE SALICILATO DE METILA DA ESPÉCIE EM ESPÉCIE CULTIVADA DE *Polygala*

As espécies *P. decumbens*, *P. boliviensis*, *P. violaceae* e *P. paniculata* foram submetidas às condições de cultivo. Dentre elas, somente a *P. decumbens* conseguiu suportar as condições de cultivo e, portanto, submetida ao CLAE para análises de quantificação.

Os extratos analisados apresentaram cromatogramas com tempo de retenção do salicilato de metila em aproximadamente 15 minutos (Figura 9). Os espectros de ultravioleta apresentaram-se característicos do salicilato de metila, com absorção em  $\lambda_{\text{max}} = 237$  nm e 303 nm (Figura 10).



**Figura 9** – Cromatograma do extrato das raízes de *P. decumbens* cultivada



**Figura 10** – Espectro de UV do pico em 15 minutos do extrato das raízes de *P. decumbens* cultivada



A quantificação do salicilato de metila foi determinada pela média das áreas dos picos das replicatas da amostra, como demonstrado na Tabela 6. Assim como nas espécies coletadas em campo, a concentração foi determinada a partir do material fresco.

**Tabela 6** – Comparação da concentração de salicilato de metila de *P. decumbens* cultivada e de campo

Espécies	Data da coleta	Parte da planta	µg salicilato/g planta
<i>Polygala decumbens</i> (campo)	jun. 2009	Parte aérea	50,17±5,25
<i>Polygala decumbens</i> (campo)	jun. 2009	Raiz	99,43±5,93*
<i>Polygala decumbens</i> (cultivada)	fev. 2012	Parte aérea	<LD
<i>Polygala decumbens</i> (cultivada)	fev. 2012	Raiz	98,24±2,81*

(\*) valores estatisticamente iguais.

As partes aéreas mostraram diferença na concentração do salicilato de metila, visto que as plantas cultivadas não apresentaram produção do mesmo, enquanto que as plantas de campo produziram 50,17±5,25 µg/g. Por outro lado, as análises das raízes de *Polygala decumbens* cultivadas e não cultivadas mostrou que as mesmas produzem quantidade estatisticamente igual de salicilato de metila (Teste de Tukey a 5% de probabilidade).

Tais resultados sugerem que o cultivo influencia na produção de salicilato de metila, especialmente nas partes aéreas, nas quais foram encontrados valores abaixo do limite de detecção e quantificação. Porém, no que diz respeito às raízes, a produção não foi alterada, mantendo valores estatisticamente iguais. Vale ressaltar que os períodos de análise das plantas coletadas em campo e das plantas cultivadas foram diferentes, devido a não disponibilidade de material vegetal em campo no mesmo período de cultivo. Pode-se sugerir que fatores como menor incidência de luz e teoricamente menor exposição a fatores de estresse, como patógenos, déficit hídrico podem ser influenciadores nos resultados obtidos. Desta forma, o período de cultivo/calor, intensidade de luz entre outros devem ser estudados para melhor avaliação da produção de salicilato de metila em condições de cultivo.

Diante da dificuldade de manter espécies de *Polygala* em casa de irrigação, sob condições controladas de cultivo, chegou-se a conclusão que é preciso realizar estudos sobre as condições de cultivo dessas espécies, ou até mesmo outras formas de cultivo,

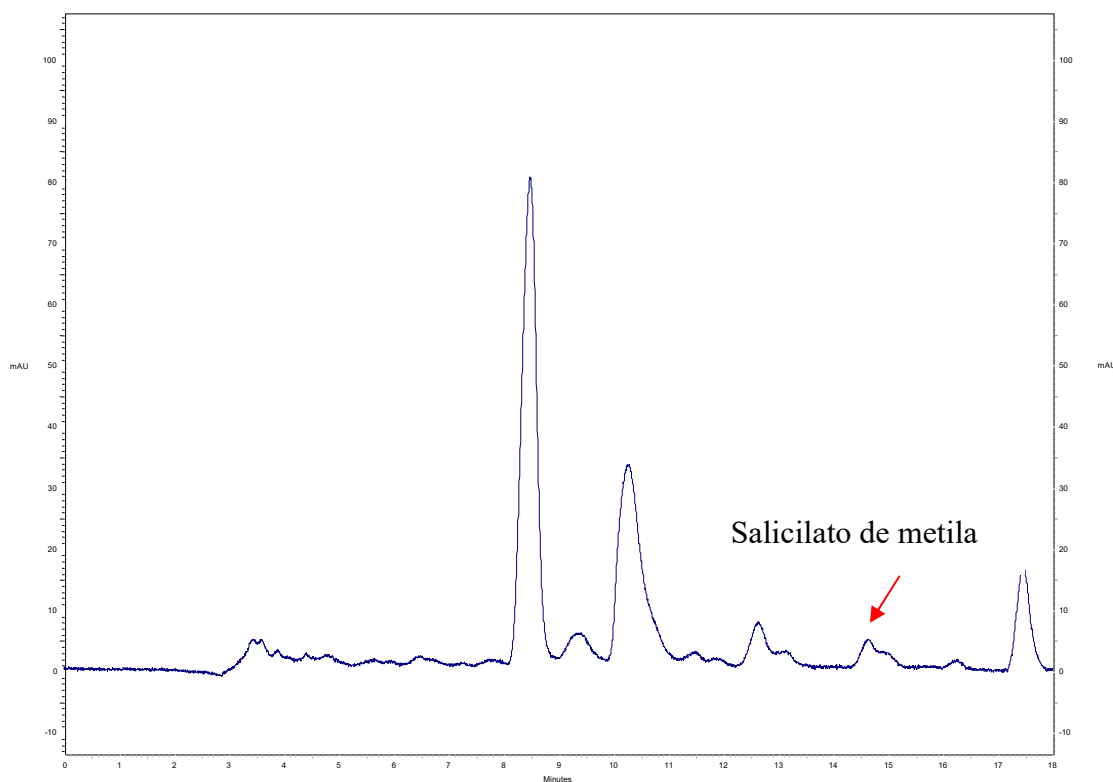
como por exemplo, cultura *in vitro*. Estudo este que será levado adiante pela equipe de pesquisa.

#### 4.3 – PREPARAÇÃO DOS EXTRATOS PARA REALIZAÇÃO DOS TESTES DE ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA

A coleta *P. boliviensis* realizada no Campus da UEFS resultou em material seco e pulverizado de massa 0,240 kg (partes aéreas e raízes), o qual foi submetido à maceração, realizada por cinco vezes consecutivas, com duração de uma semana cada, utilizando metanol como solvente extrator. Após a secagem completa obteve-se massa de 41,1476g, com rendimento equivalente a 17,14%.

A identificação de salicilato de metila no extrato da espécie *P. boliviensis* foi realizada utilizando CLAE-DAD, por metodologia validada por Rocha (2009). Através da análise dos cromatogramas notou-se o desenvolvimento de picos cromatográficos apresentando tempo de retenção de 14,65 minutos e espectros de absorção no ultra-violeta apresentando comprimento de onda máximos de 237 e 303 nm, característicos do salicilato de metila. Interpretando as informações encontradas e comparando com dados do padrão, pôde-se atribuir que os referidos picos cromatográficos obtidos tratavam-se do salicilato de metila presente no referido extrato.

Entretanto, como se pode observar no cromatograma (Figura 11), o pico referente ao salicilato de metila apresenta pequena amplitude, o que impossibilitou sua quantificação, mesmo com o aumento da concentração da amostra. É provável que o teor do salicilato de metila esteja abaixo do limite de quantificação. O baixo teor de salicilato de metila no extrato pode ser resultante da secagem do material para o processo de extração, ou até mesmo por fatores que influenciam na produção deste composto, como sazonalidade, temperatura, disponibilidade hídrica, radiação ultravioleta, nutrientes, entre outros. Devido ao resultado obtido na análise em CLAE não foi possível realizar a padronização do extrato com base no teor de salicilato de metila.

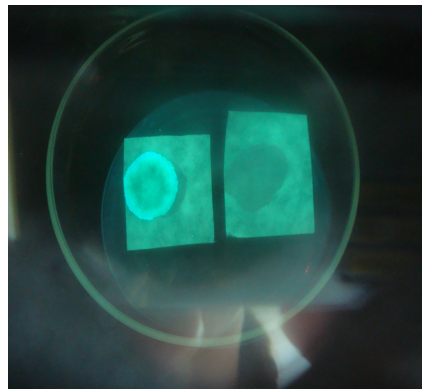


**Figura 11** - Cromatograma do extrato metanólico de *Polygala boliviensis*

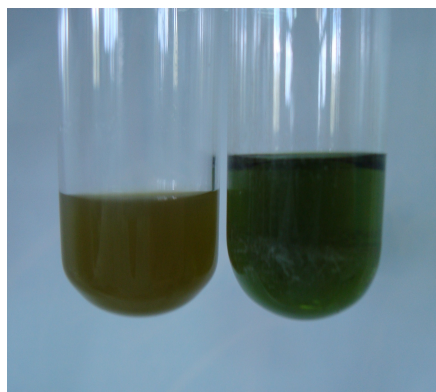
Para fins de maior conhecimento sobre a composição do extrato realizou-se triagem fitoquímica com reações colorimétricas e de precipitação. Tal procedimento permitiu identificar a presença de alcalóides, através do surgimento de precipitado após a adição do reagente de Dragendorff (Figura 12); cumarinas, devido à visualização de fluorescência azulada quando observado em câmara de UV após alcalinização do extrato (Figura 13); esteróides e terpenóides, evidenciado pelo aparecimento de coloração verde após adição do reagente de Linderman-Buchart (Figura 14); saponinas, devido à observação de espuma permanente após agitação do extrato aquoso (Figura 15); taninos, comprovado através da formação de precipitado quando adicionados ao extrato hidroalcoólico acetato de chumbo 10% e acetato de cobre 3% (Figura 16); fenóis, através da reação com cloreto férrico 2%, na qual se observou mudança de coloração (Figura 17); e flavonóides, evidenciado pelo aparecimento de coloração avermelhada na reação de Shinoda (Figura 18), assim como pela coloração amarela intensa adquirida na reação de hidróxidos alcalinos (Figura 19).



**Figura 12** - Identificação de alcalóides



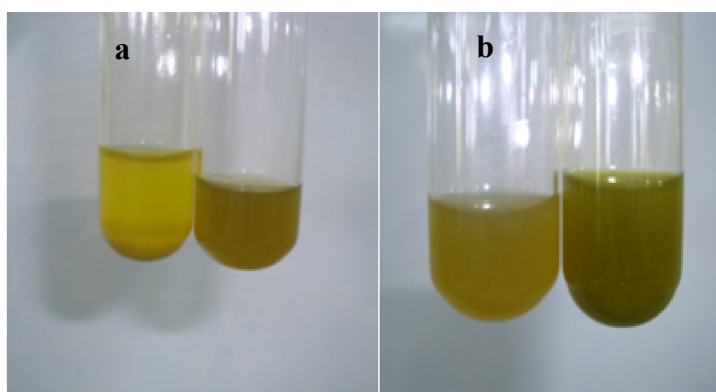
**Figura 13** - Identificação de cumarinas



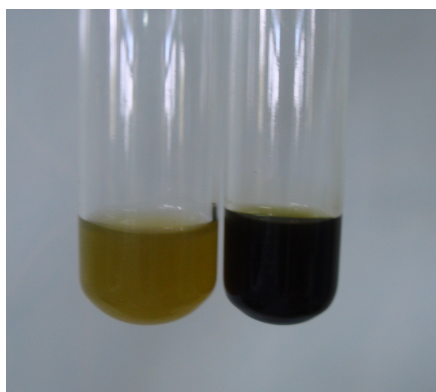
**Figura 14** - Identificação de esteróides e terpenos



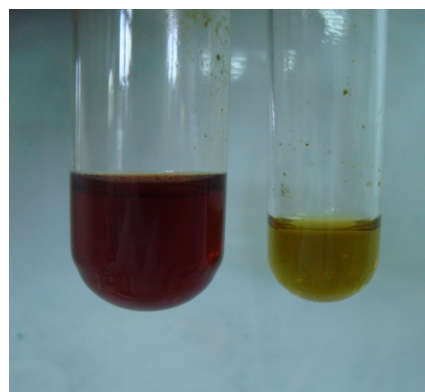
**Figura 15** - Identificação de saponinas



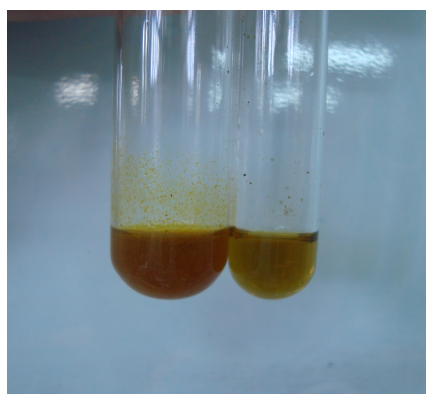
**Figura 16** - Identificação de taninos (a) reação com acetato de chumbo 10%; (b) reação com acetato cobre 3%



**Figura 17** - Identificação de fenóis



**Figura 18** - Identificação de flavonóides por reação de Shinoda



**Figura 19** - Identificação de flavonóides por reação com hidóxidos alcalinos

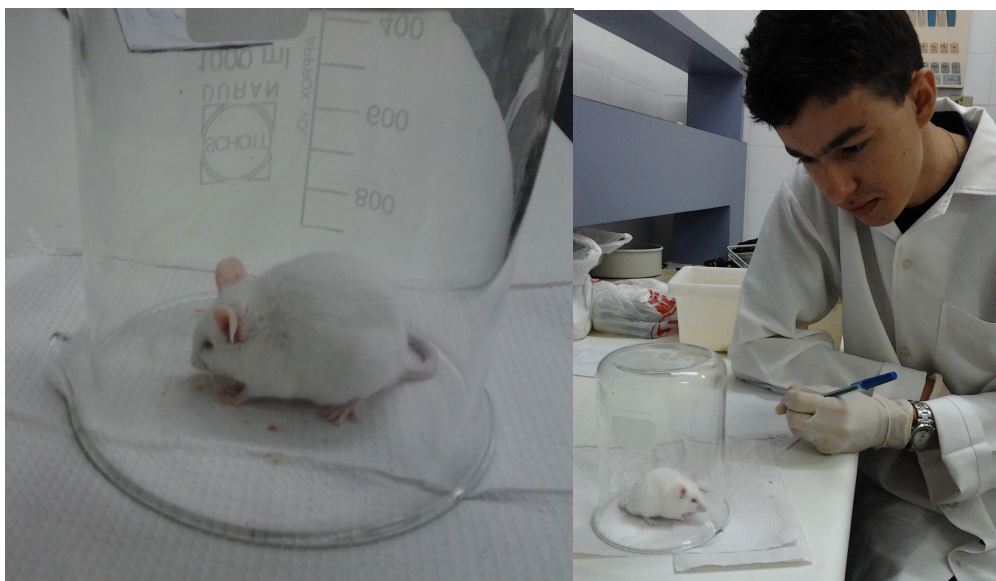
#### 4.4 - NOCICEPÇÃO INDUZIDA PELA INJEÇÃO INTRAPERITONEAL DE ÁCIDO ACÉTICO EM CAMUNDONGOS

O teste das contorções abdominais, induzidas pelo ácido acético, é descrito como típico modelo para avaliar a dor de origem inflamatória, pouco específico, mas com boa sensibilidade, sendo uma ferramenta de triagem para avaliação da atividade analgésica e antiinflamatória de novos agentes. (IKEDA et al., 2001; LE BARS; GOZARIU; CADDEN, 2001).

Neste modelo, a administração de agente irritante para membrana serosa, como o ácido acético, provoca comportamentos estereotipados que são caracterizados por contorções abdominais, redução e incoordenação da atividade motora. Estes comportamentos são considerados reflexos e evidenciam a dor visceral. (LE BARS; GOZARIU; CADDEN, 2001).

Através da realização deste teste, foi possível observar que a administração sistêmica, v.o. do extrato bruto de *Polygala boliviensis* (EBPb) reverteu significativamente

( $p < 0,001$ ), de maneira dependente da dose, o número de contorções abdominais produzidas pela injeção i.p. de ácido acético em camundongos (Figura 20). Foi observado que já na primeira dose (10 mg/kg) o extrato apresentou efeito antinociceptivo significativo, como mostrado na Tabela 6. Pôde-se observar também que EBPb na dose de 1000 mg/kg apresentou efeito estatisticamente igual ao apresentado pela morfina (2,5 mg/kg) (Tabela 7).



**Figura 20** – Contagem das contorções abdominais e observação do comportamento dos camundongos

**Tabela 7** - Efeito do extrato bruto de *P. boliviensis* no teste das contorções induzidas por ácido acético (n=3).

Tratamento	Dose (mg/kg)	Via	Nº de contorções	Inibição (%)
Veículo	-	v.o.	36,33±2,52 a1	-
EBPb	10	v.o.	16,00±1,73 a2	55,96
EBPb	100	v.o.	11,33±0,58 a3	68,81
EBPb	300	v.o.	6,67±1,53 a4	81,64
EBPb	1000	v.o.	2,33±1,53 a5	93,59
Morfina	2,5	i.p.	2,67±1,15 a5	92,65

Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo Teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

Comparando-se os resultados obtidos com trabalhos encontrados na literatura tanto com espécies de Polygalaceae quanto com outras espécies, como o realizado por Silvério e

colaboradores (2008), que utilizou extrato etanólico de *Eremanthus erythropappus* (DC.) McLeisch (Asteraceae) nas doses de 50, 100 e 200 mg/kg pode-se observar que, enquanto tais doses reduziram as contorções abdominais em 41,43, 69,34 e 70,07%, respectivamente (Tabela 8), doses menores de EBPb apresentaram efeito antinociceptivo maior (55,96%) que o apresentado pelo extrato etanólico de *E. erythropappus* (41,43%). Por outro lado, a dose de 100 mg/kg de EBPb apresentou efeito (68,81%) significativamente igual as doses de 100 e 200 mg/kg do extrato de *E. erythropappus* (69,34% e 70,07%, respectivamente).

**Tabela 8** - Efeito do extrato etanólico de *E. erythropappus* no teste das contorções induzidas por ácido acético realizado por Silverio e colaboradores (2008).

Tratamento	Dose (mg/kg)	Via	Nº de contorções	Inibição (%)
Veículo	Salina	v.o.	54,80±6,05 a1	-
Extrato	50	v.o.	31,20±5,45 a2	41,43
Extrato	100	v.o.	16,80±3,39 a3	69,34
Extrato	200	v.o.	16,40±3,37 a4	70,07
Morfina	5	i.p.	- a5	100

Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Outro estudo, realizado por Campos e colaboradores (1997) com extrato hidroalcolólico de *Polygala cyparissias* St. Hillaire & Moquin (Polygalaceae), mostrou que, quando administrado oralmente, causa inibição significativa e dose-dependente das contrações abdominais (Tabela 9). Comparando-se com os resultados obtidos com *P. boliviensis* pode-se inferir que pequenas doses desse extrato (10 mg/kg) tem potencial antinociceptivo significativamente maior (55,96%) que doses mais baixas (25 e 50 mg/kg) de *P. cyparissias* (3,37% e 32,36%, respectivamente). Em contrapartida, doses mais altas de *P. cyparissias* (100 e 200 mg/kg) apresentam potencial maior (87,87% e 97,3%, respectivamente) que doses próximas (100 e 300 mg/kg) de *P. boliviensis* (68,81% e 81,64%, respectivamente). Ambos os estudos mostram o potencial antinociceptivo de espécies da família Polygalaceae e a importância da realização de estudos com as mesmas.

**Tabela 9** - Efeito do extrato hidroalcolico de *P. cyparissias* no teste das contorções induzidas por ácido acético realizado por Campos e colaboradores (1997).

Tratamento	Dose (mg/kg)	Via	Nº de contorções	Inibição (%)
Veículo	Salina	v.o.	44,5±1,7 a1	-
Extrato	25	v.o.	43,0±4,3 a2	3,37
Extrato	50	v.o.	30,1±2,5 a3	32,36
Extrato	100	v.o.	5,4±0,9 a4	87,87
Extrato	200	v.o.	1,2±0,9 a5	97,3
Aspirina	300	v.o.	4,5±1,5 a6	89,89

Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade.

A irritação local, provocada pela administração deste agente na cavidade intraperitoneal desencadeia a liberação de vários mediadores como a bradicinina, substância P e prostaglandinas, principalmente a PGI<sub>2</sub>, bem como algumas citocinas como IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$  e IL-8 (CORREA et al., 1996; RIBEIRO et al., 2000; IKEDA et al., 2001). Estes mediadores ativam nociceptores quimiosensíveis que contribuem com o desenvolvimento da dor de origem inflamatória. Utilizando esse teste foi possível demonstrar, pela primeira vez, que o EBPb administrado por via oral produziu inibição quase que completa (93,59%) e dependente da dose do número das contorções abdominais provocadas pelo ácido acético. Dessa forma, o resultado obtido neste trabalho sugere que o efeito antinociceptivo do EBPb pode estar relacionado à inibição da liberação de mediadores pró-inflamatórios, induzida pelo ácido acético.

#### 4.5 - EFEITO DO EXTRATO BRUTO DE *Polygala boliviensis* NO TESTE DE PLACA QUENTE, EM CAMUNDONGOS

O estímulo térmico do teste da placa quente é utilizado para avaliar a atividade analgésica mediada por mecanismos centrais. É um modelo animal que avalia a atividade antinociceptiva de fármacos opióides, mas outras drogas com atividade central, tais como sedativas e hipnóticas, mostraram atividade no modelo da placa quente. (AL-GHAMDI, 2001) O EBPb aumentou o tempo de permanência dos animais na placa, sugerindo que esse extrato possui efeito analgésico central, já que o bloqueio das respostas na placa quente indica um mecanismo de ação no sistema nervoso central (Figura 21).





**Figura 21** – Observação do tempo de reação dos camundongos sobre placa quente

O EBPb aumentou de forma significativa ( $p < 0,05$ ) o tempo de latência de camundongos expostos à placa quente aos 90 minutos de observação quando comparados ao controle (Tabela 10).

**Tabela 10** - Efeito do extrato bruto de *Polygala boliviensis* no teste de placa quente (n=3).

Tratamento	Dose (mg/kg)	Via	Tempo de reação (90 min)
Veículo	-	v.o.	3,66±0,58 a1
EBPb	10	v.o.	5,33±1,15 a1
EBPb	100	v.o.	8,67±1,15 a2
EBPb	300	v.o.	17,67±1,04 a4
EBPb	1000	v.o.	13,97±0,06 a3
Morfina	1	s.c.	12,66±2,31 a3

Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo Teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

Pode-se observar que o EBPb na dose de 10 mg/kg não apresentou atividade antinociceptiva, visto que o tempo de reação foi estatisticamente igual ao apresentado pelo veículo. O efeito antinociceptivo começou a ser apresentado na dose de 100 mg/kg, o qual aumentou o tempo de permanência na placa em 136,88%. A morfina, como potente analgésico, aumentou o tempo de latência no tempo avaliado em 245,9%. No entanto, dose

de 300 mg/kg superou os resultados obtidos com a morfina (1 mg/kg), a qual aumentou a latência em 382,79%, sugerindo que essa espécie tem forte potencial analgésico.

Outro estudo encontrado na literatura realizado por Nogueira e colaboradores (2005) avaliou a atividade antinociceptiva do extrato etanólico de *Polygala paniculata* frente ao teste de placa quente. Nos resultados foi observado que o efeito dos extratos no modelo de dor provocada por estímulo térmico mostrou-se dependente da dose. Os extratos foram capazes de ampliar significativamente o tempo que os animais permaneciam sobre a placa aquecida, atingindo valor máximo de 67,38%. Comparando-se com os resultados obtidos com *P. boliviensis* realizado pelo presente trabalho, observa-se que seu potencial analgésico é significativamente maior que a *P. paniculata* frente ao estímulo térmico aplicado no teste, atingindo um valor máximo de 382,79%.

Por outro lado, no estudo realizado por Campos e colaboradores (1997) com extrato hidroalcolico de *P. cyparissias*, a amostra não apresentou efetividade no modelo de teste de placa quente utilizado (Tabela 11). Não é possível inferir que a espécie em questão não possui atividade antinociceptiva frente a estímulo térmico sem um estudo mais completo, utilizando variáveis como maior tempo e/ou maiores doses. Assim, percebe-se que diferentes espécies da família Polygalaceae apresentam variação quanto ao seu potencial antinociceptivo, sendo, dessa forma, válido a realização de estudos para averiguação da atividade antinociceptiva das mesmas.

**Tabela 11** - Efeito do extrato hidroalcolico de *P. cyparissias* no teste de placa quente Campos e colaboradores (1997).

Tratamento	Dose (mg/kg)	Via	Tempo de reação (30 min)
Veículo	Salina	v.o.	6,3±1,1 a1
Extrato	100	v.o.	6,8±0,6 a2
Morfina	10	s.c.	19,4±0,6 a3

Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Quando se compara os resultados obtidos pelos dois modelos empregados para avaliação de atividade antinociceptiva de *P. boliviensis*, pode-se observar que doses inferiores de EBPb (10 mg/kg) já são capazes de apresentar efeito antinociceptivo periférico significativo, como observado no teste de contorções abdominais, reduzindo 55,95% das contorções quando comparado com o veículo. Por outro lado, a mesma dose

não é suficiente para apresentar efeito antinociceptivo em nível central, como observado no teste de placa quente, onde o EBPb na dose de 10 mg/kg apresentou resultado estatisticamente igual ao veículo.

Outro fator que pode ser observado é que no teste de contorções abdominais (sistema periférico) o efeito antinociceptivo é dose-dependente, enquanto que no teste de placa quente (sistema central) tal efeito não é observado.

Baseado nos resultados obtidos em ambos os testes, pode-se sugerir que a amostra testada de *P. boliviensis* mostrou propriedades antinociceptiva sobre o Sistema Nervoso Periférico e Central. Os resultados dos testes demonstram que o extrato reduziu as contorções abdominais, sugerindo a inibição da síntese de prostaglandinas pela via da ciclooxigenase (DUARTE; FERREIRA-ALVES; NAKAMURA-CRAIG, 1992). Além disso, a ação central foi confirmada no teste da placa quente, em doses a partir de 100 mg/kg, tendo melhores resultados em 300 mg/kg.

## 5 – CONSIDERAÇÕES FINAIS

A partir destes resultados, as espécies estudadas tornam-se fonte de interesse para realização de estudos complementares que visem à elaboração de algum produto fitoterapêutico. O interesse se deve não somente à concentração de salicilato de metila, mas ao possível sinergismo com outros componentes da matriz biológica, como demonstrado em estudos realizados com outras espécies do gênero, os quais sugerem que o extrato hidroalcoólico apresenta relação com receptores opióides, bem como a abundância desses vegetais na região.

O presente trabalho conseguiu demonstrar que a utilização de CLAE-DAD também pode ser aplicada em compostos voláteis, mesmo sendo pouco usual. Após o levantamento bibliográfico realizado pôde-se perceber que apenas Villa e colaboradores (2007) realizaram estudo semelhante, por analisar salicilato de benzila, porém nenhum outro estudo foi encontrado envolvendo quantificação de salicilato de metila por CLAE. Juntamente a isto, estudos fitoquímicos em espécies do gênero *Polygala* é ainda limitado a algumas poucas espécies, sendo que muitas delas não apresentam nenhum estudo na área. Tais fatores vêm ratificar a importância da realização do presente trabalho.

O cultivo em casas de vegetação de espécies de *Polygala* mostrou-se bastante complexo devido à sazonalidade de algumas delas, o que as tornam bastante sensíveis s mudanças de solo, luminosidade, nutrientes entre outras. Dessa forma, faz-se necessário continuar a realizar estudos nesse sentido para determinar outras condições de cultivo que sejam mais favoráveis a essas espécies, como por exemplo, a elaboração de meios de cultura *in vitro*.

A avaliação da atividade antinociceptiva sugere que a amostra analisada do extrato bruto de *Polygala boliviensis* apresenta atividade antinociceptiva, atuando possivelmente tanto no sistema nervoso periférico quanto no sistema nervoso central. Além disso, pôde-se observar que o EBPb apresentou atividade significativamente igual à dose utilizada de morfina no modelo de contorções abdominais e significativamente maior no modelo de placa quente. Desta forma, novos estudos tornam-se necessários para aprofundar a avaliação da atividade antinociceptiva dessa espécie, como a relação com o sistema opióide e possível atividade antiinflamatória. Também torna-se de grande interesse o estudo do extrato em questão para isolamento e identificação da(s) possível(eis) substância(s) envolvidas na atividade antinociceptiva.

Nesse sentido, os resultados deste trabalho em conjunto com os dados descritos na literatura, mostram nitidamente que as plantas medicinais são fonte de variedade de compostos com potencial atividade biológica que poderão dar origem ou servir de protótipo para o desenvolvimento de novos produtos terapêuticos.

## REFERÊNCIAS

- ABDEL-MAGID, E. H.; AHMED F. E. Salicylate intoxication in an infant with ichthyosis transmitted through skin ointment—a case report. **Pediatrics**, v. 94, p. 939–940, 1994.
- AL-GHAMDI, M. S. The anti-inflammatory, analgesic and antipyretic activity of *Nigella sativa*. **Journal of ethnopharmacology**, v. 76, p. 45-48, 2001.
- ALMEIDA, T. F.; ROIZENBLATT, S.; TUFIK, S. Afferent pain pathways: a neuroanatomical review. **Brain Research**, v. 1000, p. 40-56, 2004.
- AQUINO NETO, F. R.; NUNES, D. S. S. **Cromatografia: princípios básicos e técnicas afins**. Rio de Janeiro: Interciência, 2003.
- BRAGA, F. C. Pesquisa fitoquímica. In: LEITE, J. P. V. **Fitoterapia: bases científicas e tecnológicas**. São Paulo: Atheneu, 2009. cap. 4.
- BURKE, A.; SMYTH, E.; FITZGERALD, G. A. Analgésicos-antipiréticos; farmacoterapia da gota. In: BRUNTON, L. L.; LAZO, J. S.; PARKER, K. L. **Goodman & Gilman: as bases farmacológicas da terapêutica**. 11. ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill, 2006. cap. 26.
- CALIXTO, J.B. Twenty-five years of research on medicinal plants in Latin América. A personal view. **Journal Ethnopharmacology**, v.100, p.131-134, 2005.
- CAMPOS, R. O. P. et al. Antinociceptive properties of the hydroalcoholic extract and preliminary study of a xanthone isolated from *Polygala cyparissias* (Polygalaceae). **Life Sciences**, v. 61, p. 1619-1624, 1997.
- CECHINEL FILHO, V.; YUNE, R. A. Estratégias para a obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais: conceitos sobre modificação estrutural para a otimização da atividade. **Química Nova**, v. 21, p. 99-105, 1998.
- CHAN, T. Y. et al. Poisoning due to Chinese proprietary medicines. **Human & Experimental Toxicology**, v. 14, p. 434-436, 1995.
- CHAN, T. Y. K. Potential dangers from topical preparations containing methyl salicylate. **Human & Experimental Toxicology**, v. 15, p. 748, 1996.
- CIR (Cosmetic Ingredient Review Panel, Cosmetic, Toiletry and Fragrance Association). Safety assessment of salicylic acid, butyloctyl salicylate, calcium salicylate, C12-15 alkyl salicylate, capryloyl salicylic acid, hexyldodecyl salicylate, isocetyl salicylate, isodecyl salicylate, magnesium salicylate, MEA-salicylate, ethylhexyl salicylate, potassium salicylate, methyl salicylate, myristyl salicylate, sodium salicylate, TEA-salicylate, and tridecyl salicylate. **International Journal of Toxicology**, v. 22, p. 1-108, 2003.
- COELHO, V. P. M.; AGRA, M. F.; BARACHO, G. S. Flora da Paraíba, Brasil: *Polygala* L. (Polygalaceae). **Acta Botânica Brasilica**, v. 22, p. 225-239, 2008.

CORDELL, G. A. Changing strategies in natural products chemistry. **Phytochemistry**, v. 40, p. 1585-1612, 1995.

CORREA, C.R.; KYLE, D.J.; CHAKRAVERTY, S. CALIXTO, J.B. Antinociceptive profile of the pseudopeptide B2 bradykinin and receptor antagonist NPC 18688 in mice. **British Journal of Pharmacology**, v.117, n.3, p.552-558, 1996.

CORRÊA, R. M. et al. Adubação orgânica na produção de biomassa de plantas, teor e qualidade de óleo essencial de orégano (*Origanum vulgare* L.) em cultivo protegido. **Revista Brasileira Planta Médica**, v.12, n.1, p. 80-89, 2010.

CRAIG A. D. Pain mechanisms: Labeled lines versus convergence in central processing. **Annual Review Neuroscience**, v. 26, p. 1-30, 2003.

DARROW, K.; BOWERS, M. D. Phenological and population variation in iridoid glycosides of *Plantago lanceolata* (Plantaginaceae). **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 25, 1, p. 1-11, 1997.

DAVIS, J. E. Are one or two dangerous? Methyl salicylate exposure in toddlers. **The Journal of Emergency Medicine**, v. 32, p. 63-69, 2007.

DEGANI, A. L. G.; CASS, Q. B.; VIEIRA, P. C. Cromatografia: um breve ensaio. **Química nova na escola**, v. 7, p. 21-25, 1998.

DI STASI, L. C. **Plantas medicinais: arte e ciência**. São Paulo: Editora da Universidade Estadual Paulista, 1996.

DUARTE, I. D. G.; FERREIRA-ALVES, D. L.; NAKAMURA-CRAIG, M. Possible participation of endogenous opioid peptides on the mechanism involved in analgesia by vouacapan. **Life Science**, v. 50, p. 891-897, 1992.

ESTRADA, A. et al. Isolation and evaluation of immunological adjuvant activities of saponins from *Polygala senega* L. **Comparative Immunology, Microbiology & Infectious Diseases**, v. 23, p. 27-43, 2000.

FALKENBERG, M. B; SANTOS, R. I.; SIMÕES, C. M. O. Introdução a análise fitoquímica. In: SIMÕES, C. M. O. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 2. ed. rev. Porto Alegre: Florianópolis: Ed. da UFRGS; Ed. da UFSC, 2000. cap. 10.

FARNSWORTH, N. R. The development of pharmacological and chemical research for application to traditional medicine in developing countries. **Journal Ethnopharmacology**, v. 2, p. 173-181, 1998.

FERRI, P. H. Química de produtos naturais: métodos gerais. In: DI STASI, L. C. **Plantas medicinais: arte e ciência**. São Paulo: Editora da Universidade Estadual Paulista, 1996. cap. 10.

FLEMING, N. R. P.; GONÇALVES, O. R. Dor: princípios gerais. In: LOPES, A. C. **Tratado de clínica médica**. São Paulo: Roca, 2006. v. 2. cap. 186.

FOGLIO, M. A., et al. Plantas Medicinais como Fonte de Recursos Terapêuticos: Um Modelo Multidisciplinar. **Multiciência**, v. 7, 2006.

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

FURNESS, S H.; STAFFORD, P. J. The Northwest European Pollen Flora, 55 Polygalaceae. **Review of Palaeobotany and Palynology**, v. 88, p. 61-82, 1995.

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

GONÇALVES, M. L. S. S. **Métodos instrumentais para análise de soluções**: análise quantitativa. 4. ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 2001.

GRACE, S. C.; LOGAN, B. A. Energy dissipation and radical scavenging by the plant phenylpropanoid pathway. **Philosophical transaction of the Royal Society**, v. 355, p. 1499-1510, 2000.

HAMBURGER, M.; GUPTA, M.; HOSTETTMANN, K. Coumarins from *Polygala paniculata*. **Planta Medica**, v. 51, p. 215-216, 1985.

HANSON, G. R. Analgésicos, antipiréticos e antiinflamatórios. In: GENARO, A. R. **Remington**: a ciência e a prática da farmácia. 20. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. cap. 83.

HARRIS, D. C. **Análise química quantitativa**. 6. ed. Rio de Janeiro: LTC, 2005.

HARVEY, A. Strategies for discovering drugs from previously unexplored natural products. **Drug Discovery Today**, v. 5, p. 294-300, 2000.

HOFMAN, M.; DIAZ, J. E.; MARTELLA, C. Oil of wintergreen overdose. **Annals of Emergency Medicine**, v. 31, p. 793-794, 1998.

HOWRIE, D .L.; MORIARTY, R.; BREIT, R. Candy flavoring as a source of salicylate poisoning. **Pediatrics**, v. 75, p. 869-871, 1985.

IKEDA, Y et al. Involvement of vaniloid receptor VR1 nd prostanoids in the acid-induced writhing responses of mice. **Life Science**, v. 69, p. 2911-2919, 2001.

International Fragrance Association (IFRA), 2002. Use Level Survey, April 2002.

IYUN, B. F.; TOMSON, G. Acute respiratory infections—mother's perceptions of etiology and treatment in south-western Nigeria. **Social Science and Medicine**, v. 42, p. 437-445, 1996.

JECFA (Joint Expert Committee on Food Additives), Safety evaluation of certain food additives. Who Food Additives Series: 48. Prepared by the Fifty-seventh meeting of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. **World Health Organization**,



Geneva, 2001. Disponível em: <<http://www.inchem.org/documents/jecfa/jecmono/v48je15.htm>>. Acesso em: 15 maio 2009.

JEONG, S. T. et al. Effects of plant hormones and shading on the accumulation of anthocyanins and the expression of anthocyanin biosynthetic genes in grape berry skins. **Plant Science**, v. 162, p. 247-252, 2004.

JOHNSON, P. N.; WELCH, D. W. Methyl salicylate/aspirin (salicylate) equivalence: who do you trust? **Veterinary & Human Toxicology**, v. 26, p. 317-318, 1984.

KAKKER, T.; MAYERSOHN, M. Simultaneous quantitative analysis of methyl salicylate, ethyl salicylate and salicylic acid from biological fluids using gas chromatography–mass spectrometry. **Journal of Chromatography B**, v. 718, p. 69-75, 1998.

KUTCHAN, T. M. Ecological Arsenal and Developmental Dispatcher. The Paradigm of Secondary Metabolism. **Plant Physiology**, v. 125, p. 58-60, 2001.

LAPA, F. R. **Avaliação da Atividade Antinociceptiva, Antiinflamatória e Protetora Gástrica do Extrato Hidroalcoólico Bruto da *Polygala paniculata* L.** 2006. 119 f. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2006. Disponível em: <[http://dspace.c3sl.ufpr.br/dspace/bitstream/1884/4631/1/Lapa\\_FR\\_2006\\_Dissertacao\\_Mestrado.pdf](http://dspace.c3sl.ufpr.br/dspace/bitstream/1884/4631/1/Lapa_FR_2006_Dissertacao_Mestrado.pdf)>. Acesso em: 16 fev. 2009.

LAPA, F. R. et al. Antinociceptive Properties of the Hydroalcoholic Extract and the Flavonoid Rutin Obtained from *Polygala paniculata* L. in Mice. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, v. 104, p. 306–315, 2009.

LAPCZYNSKI, A et al. Fragrance material review on methyl salicylate. **Food and Chemical Toxicology**, v. 45, p. 428-452, 2007.

LE BARS, D.; GOZARIU, M.; CADDEN, S.W. Animals models of nociception. **Pharmacological Reviews**, v.53, p.597-652, 2001.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. Plantas medicinais do Brasil. São Paulo, p. 386, 2002.

LÜDTKE, R.; AGUIAR, A. C. A. Nota sobre a ocorrência de pétalas reduzidas em espécies de *Polygala* L. subgênero *Hebeclada* (Chodat) Blake (Polygalaceae) da Região Sul do Brasil. **Biota Neotropical**, v. 8, p. 239-242, 2008.

LÜDTKE, R.; MIOTO, S. T. S. A família Polygalaceae no Parque Estadual de Itapuã, Viamão, Rio Grande do Sul, Brasil. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 6, p. 245-251, 2008.

MARQUES, M. C. M.; PASTORE, J. F. B. Duas espécies novas de *Polygala* L. (Polygalaceae) para o Brasil. **Rodriguésia**, v. 57, p. 99-102, 2006.

MARQUES, M. C. M.; PEIXOTO, A. L. Estudo taxonômico de *Polygala* subgênero *Ligustrina* (Chodat) Paiva (Polygalaceae). **Rodriguésia**, v. 58, p. 95-146, 2007.

MATOS, F. J. A. **Introdução a fitoquímica experimental**. Fortaleza: Edições UFC, p. 45-64, 1997.

MELZACK, R.; LOESER, J. D. Pain: an overview. **Pain**, v. 353, p. 1607-1609, 1999.  
Disponível em: <<http://ane-intranet.med.virginia.edu/password/articles/10334273.pdf>>.  
Acesso em: 20 abr. 2009.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural Products as Sources of New Drugs over the Last 25 Years. **Journal of Natural Products**, v. 70, p. 461-477, 2007.

NOGUEIRA, F. L. P. et al. Atividade analgésica e antiedematogênica de *Polygala paniculata* L. (Polygalaceae) selvagem e obtida por micropropagação. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 15, p. 310-315, 2005.

PAIVA, J. A. R. Polygalarum Africanarum et Madagascariensium prodomus atque gerontogæi generis Heterosamara Kuntze, a genere *Polygala segregati* et a nobis denuo recepti, synopsis monographica. **Fontqueria**, v. 50, p. 346, 1998.

PINHEIRO, T. R. et al. Three xanthenes from *Polygala cyparissias*. **Phytochemistry**, v. 48, p. 725-728, 1998.

PINTO, C. A. et al. Produtos naturais: atualidade, desafios e perspectivas. **Química Nova**, v. 25, p. 45-61, 2002.

PIZZOLATTI, M. G. et al. A new styryl-2-pyrone derivative from *Polygala sabulosa* (Polygalaceae). **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 32, p. 603-606, 2004.

PIZZOLATTI, M. G. et al. Trypanocidal activity of extracts from Brazilian Atlantic Rain Forest plant species. **Phytomedicine**, v. 9, p. 422-426, 2002.

RANG, H. P. et al. **Farmacologia**. 5. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2004.

RIBEIRO, R.A.; VALE, M.L.; THOMAZZI, S.M.; PASCHOALATO, A. B.; POOLE, S.; FERREIRA, S.H.; CUNHA, F.Q. Involvement of resident macrophages and mast cells in the writhing nociceptive response induced by zimozan and acetic acid in mice. **European Journal of Pharmacology**, v. 387, p.111-118, 2000.

ROCHA, J. L. C. Validação de Metodologia analítica para quantificação de salicilato de metila por CLAE-DAD em *Polygala decumbens* (Polygalaceae) ocorrente na caatinga. 2009. 63 f. Monografia apresentada como avaliação parcial da disciplina Monografia Aplicada à Farmácia, Curso de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual de Feira de Santana, Bahia, 2009.

RODRIGUES, M. V. N. et al. O emprego de técnicas hifenadas no estudo de plantas medicinais. **Multiciência**, v. 7, 2006.

SAWYNOK, J. Topical and peripherally acting analgesics. **Pharmacological Reviews**, v. 55, n.1, 2003.

SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; PETROVICK, P. R. Produtos de origem vegetal e o desenvolvimento de medicamentos. In: SIMÕES, C. M. O. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 2. ed. rev. Porto Alegre: Florianópolis: Ed. da UFRGS Ed. da UFSC, 2000. cap. 15.

SCHMIDT, T. J.; BOMME, U.; ALFERMANN, A. W. Sesquiterpene Lactone Content in Leaves of *in vitro* and Field Cultivated *Arnica Montana*. **Planta Med**, v. 64, p. 268-270, 1998. p. 268-270.

SCHUMACHER, M. A.; BASBAUM, A. I.; WAY, W. L. Analgésicos e antagonistas opióides. In: KATZUNG, B. G. **Farmacologia: básica e clínica**. 9. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005. cap. 31.

SILVÉRIO, M. S. et al. Propriedades farmacológicas do extrato etanólico de *Eremanthus erythropappus* (DC.) McLeisch (Asteraceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, p. 430-435, 2008.

SOARES, K. C. N. **Estudo do efeito vasorrelaxante e hipotensor do extrato hidroalcoólico da *Polygala paniculata* L. em ratos**. 2008. 85 f. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2008. Disponível em: <<http://dspace.c3sl.ufpr.br:8080/dspace/bitstream/handle/1884/19862/DISSERTACAO%20FINAL.pdf?sequence=1>>. Acesso em: 13 de abr. 2012.

TONHI, E. et al. Fases estacionárias para cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa (CLAE-FR) baseadas em superfícies de óxidos inorgânicos funcionalizados. **Química Nova**, v. 25, p. 616-623, 2002.

UNITED STATES FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (US-FDA), **Code of Federal Regulations**, 21CFR201.314, revised April 1, 2004. Disponível em: <[http://edocket.access.gpo.gov/cfr\\_2004/aprqr/pdf/21cfr201.314.pdf](http://edocket.access.gpo.gov/cfr_2004/aprqr/pdf/21cfr201.314.pdf)>. Acesso em: 15 maio 2009.

VARGHESE, H.T. et al. IR, Raman and SERS studies of methyl salicylate. **Spectrochimica Acta**, Part A, v. 66, p. 959-963, 2007.

VILLA, C. et al. High-Performance liquid chromatographic method for the simultaneous determination of 24 fragrance allergens to study scented products. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 44, p. 755-762, 2007.

WANNMACHER, L.; FERREIRA, M. B. C. Princípios gerais no tratamento da dor. In: FUCHS, F. D.; WANNMACHER, L.; FERREIRA, M. B. C. **Farmacologia clínica: fundamentos da terapêutica racional**. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006.

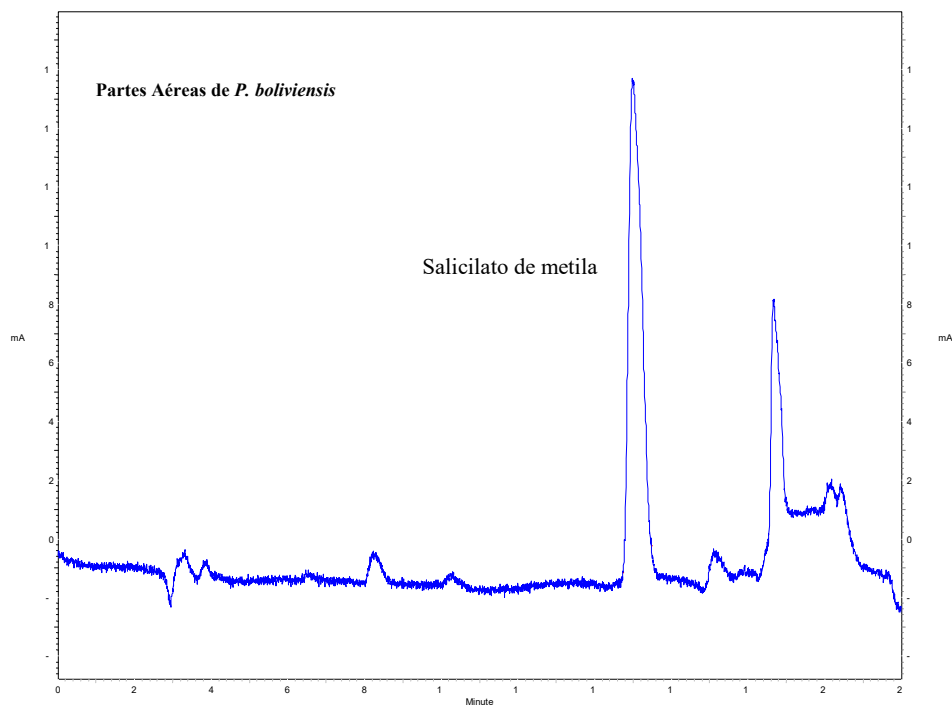
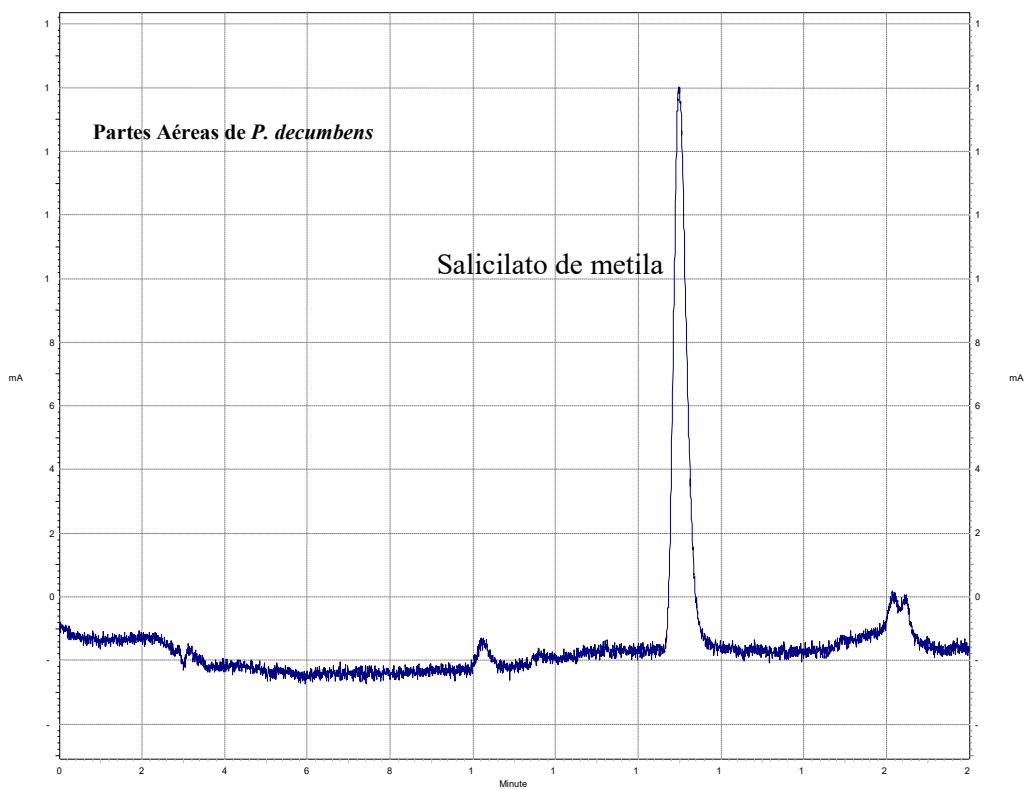
WELCH, S. P.; MARTIN, B. R. Analgésicos opióides e não-opióides. In: CRAIG, C. R.; STITZEL, R. E. **Farmacologia moderna: com aplicações clínicas**. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005. cap. 26.

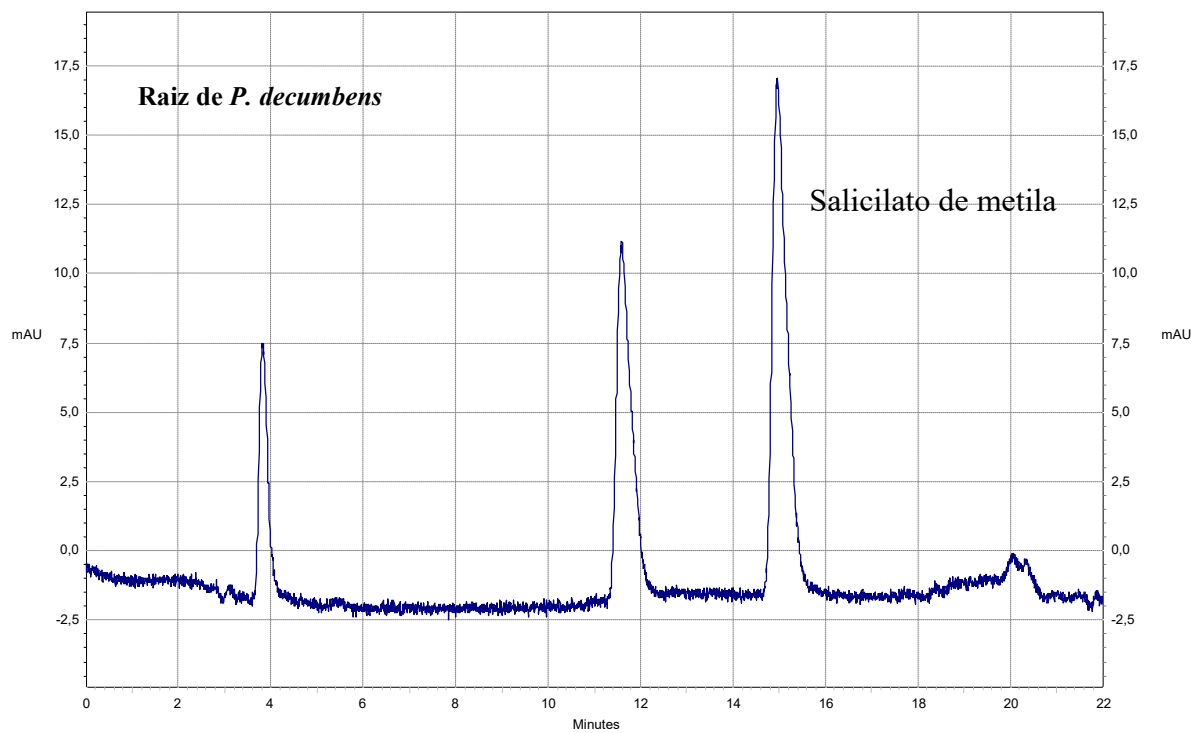
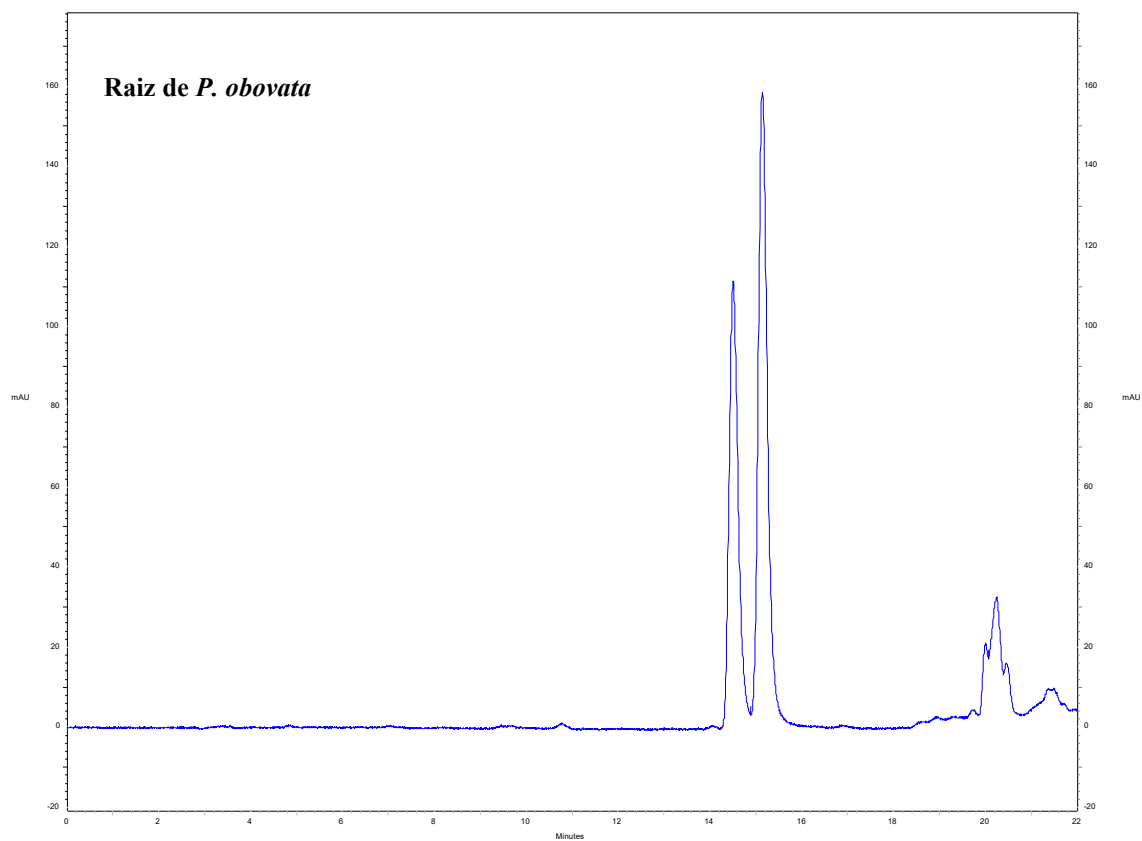
WOLFENDER, J.-L.; RODRÍGUES, S.; HOSTETTMANN, K. Liquid chromatography coupled to mass spectrometry and nuclear magnetic resonance spectroscopy for the screening of plant constituents. **Journal of Chromatography**, v. 794, p. 299-316, 1998.

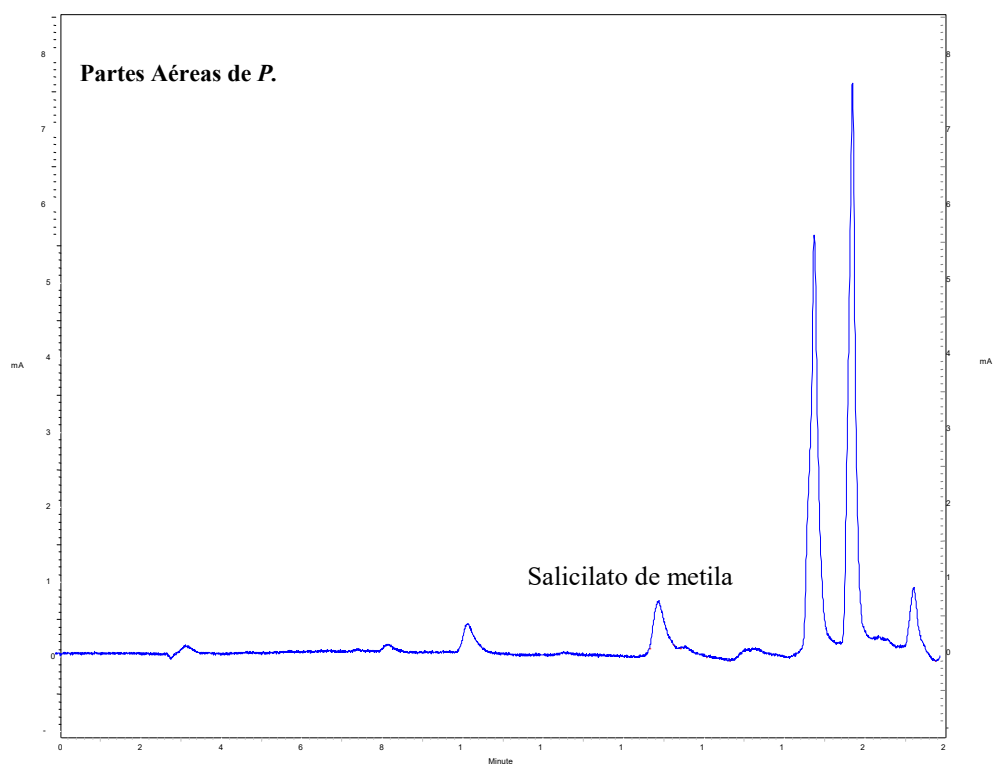
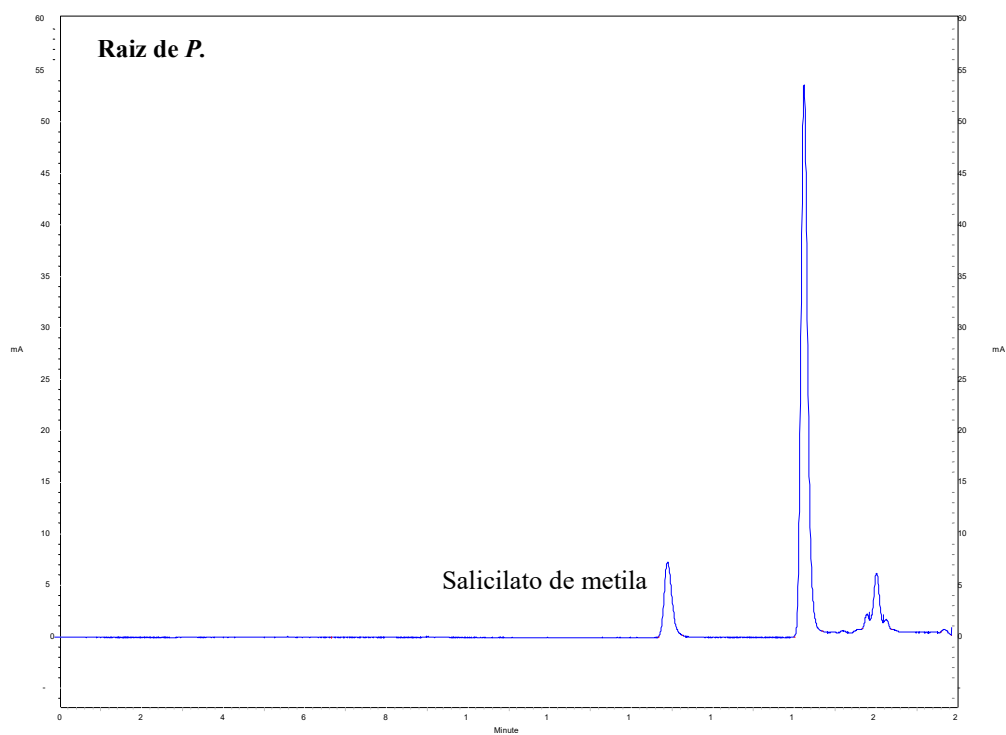
WOLOWICH, W. R.; HADLEY C. M.; KELLEY, M. T.; WALSON P. D.; CASAVANT M. J. Plasma salicylate from methyl salicylate cream compared to oil of wintergreen. **Journal Toxicology Clinical Toxicology**, v. 41, p. 355-358, 2003.

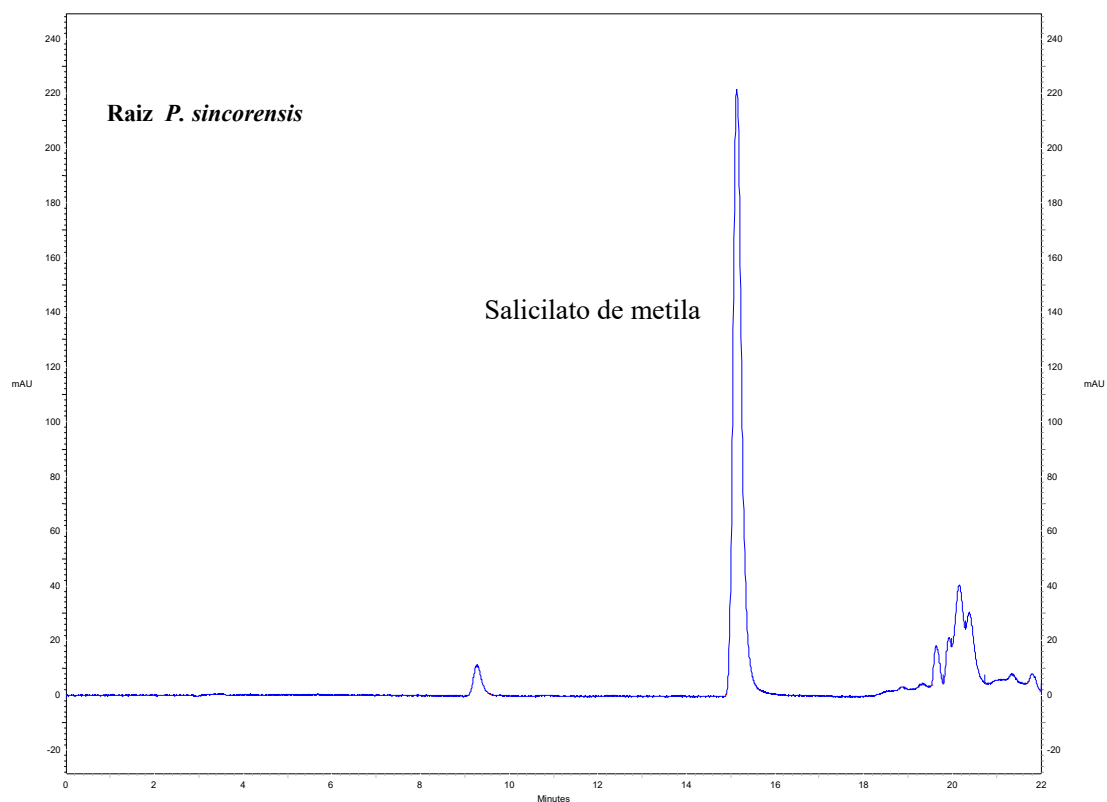
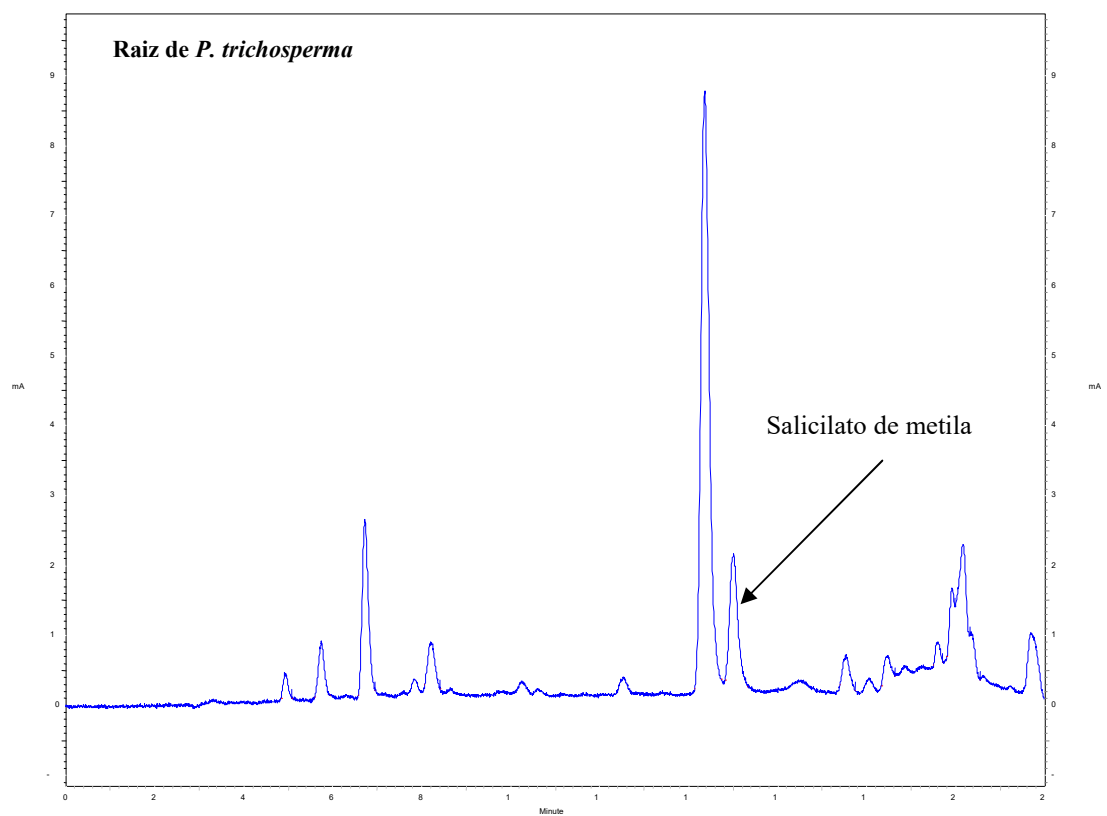
YUNES R. A.; PEDROSA R. C.; CECHINEL FILHO V. Fármacos e fitoterápicos: a necessidade do desenvolvimento da indústria de fitoterápicos e fitofármacos no Brasil. **Química Nova**, v. 24, p. 147-152, 2001.

## APÊNDICE A – Cromatogramas dos espécimes de Polygalaceae coletadas em campo

Cromatograma do extrato das partes aéreas de *P. boliviensis*Cromatograma do extrato das partes aéreas de *P. decumbens*

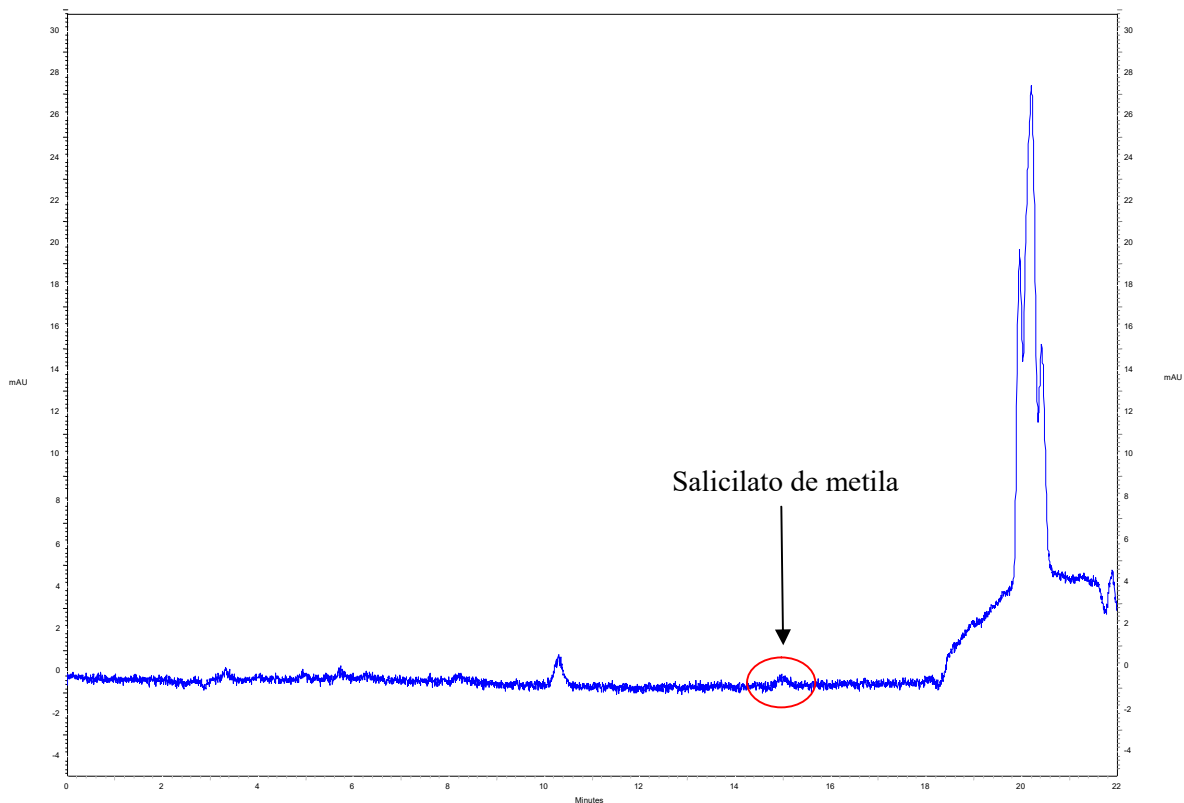
Cromatograma do extrato das raízes de *P. decumbens*Cromatograma do extrato das raízes de *P. obovata*

Cromatograma do extrato das partes aéreas de *P. paniculata*Cromatograma do extrato das raiz de *P. sericea*

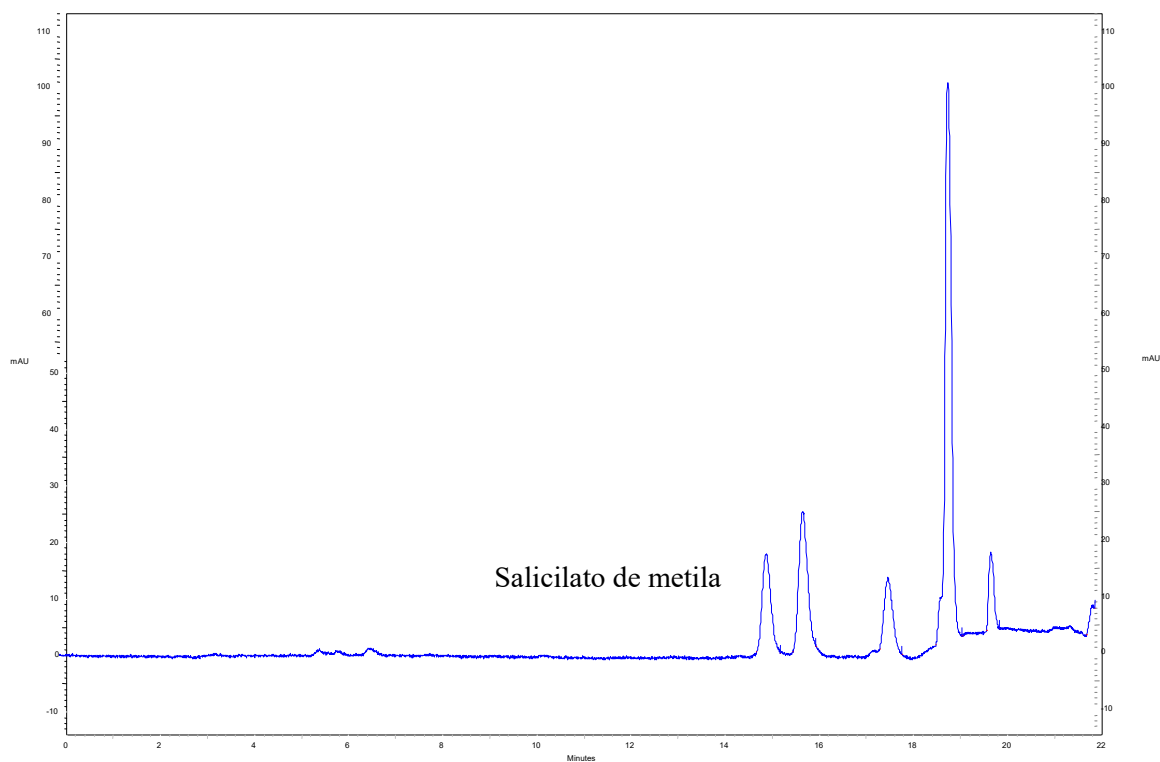
Cromatograma do extrato das raízes de *P. sincorensis*Cromatograma do extrato das raízes de *P. trichosperma*



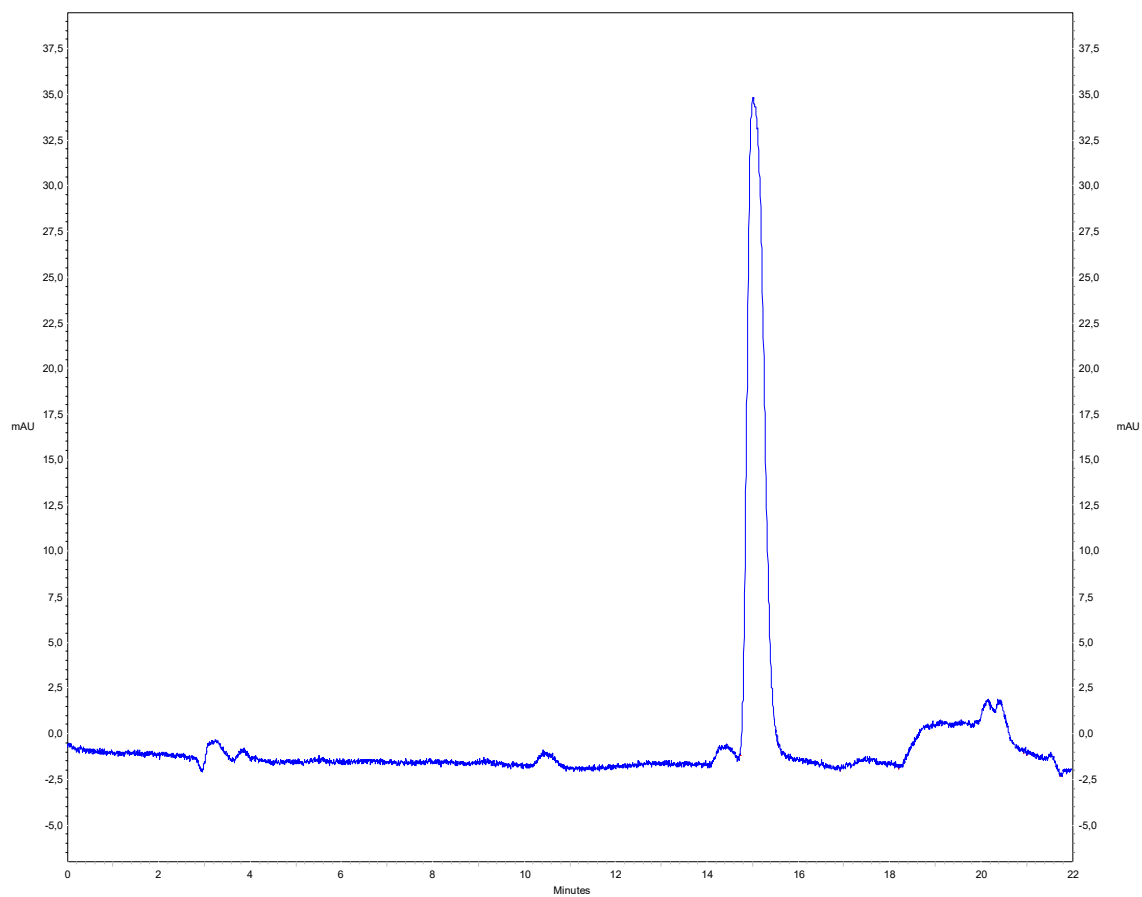
Cromatograma ilustrativo de nível traço de salicilato de metila



Cromatograma ilustrativo de concentração de salicilato de metila abaixo do limite inferior da curva de calibração

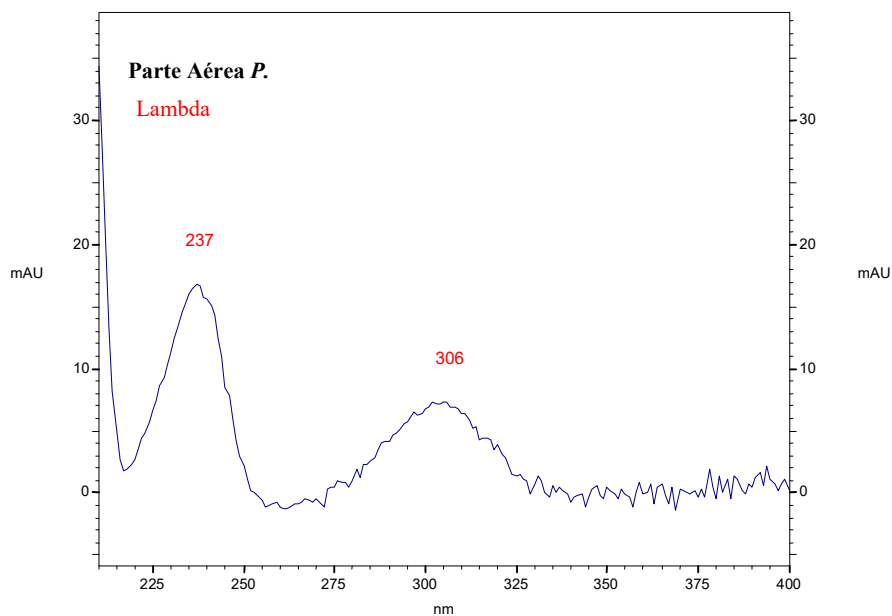


Cromatograma ilustrativo de concentração de salicilato de metila abaixo do limite superior da curva de calibração

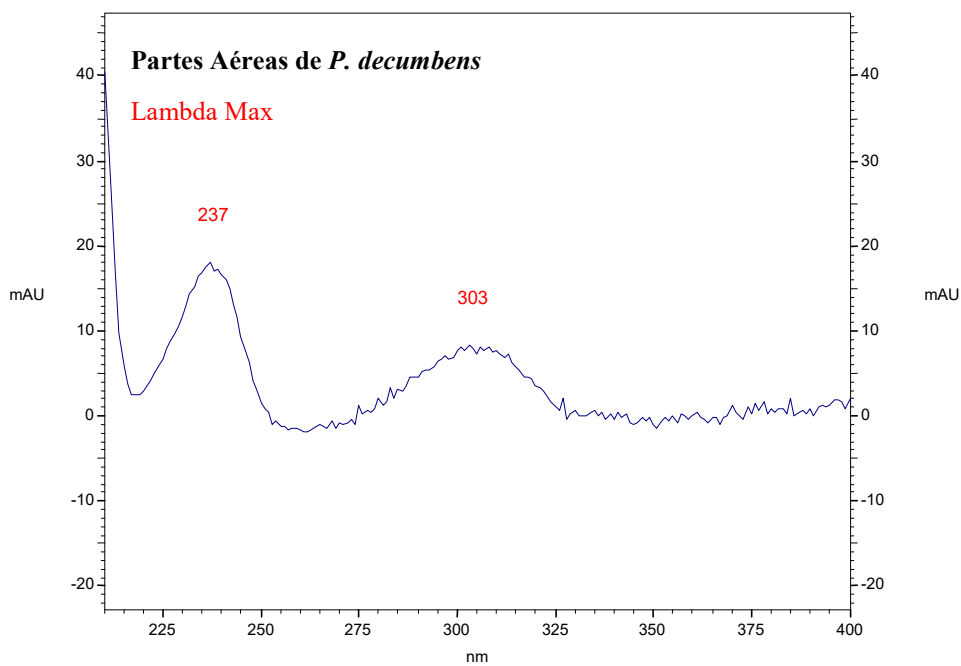


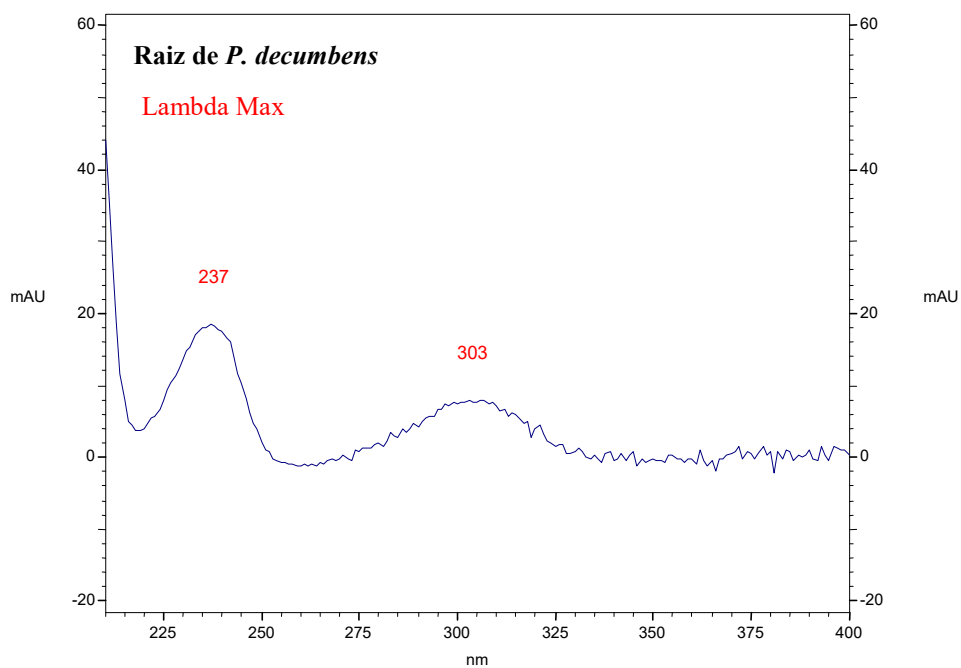
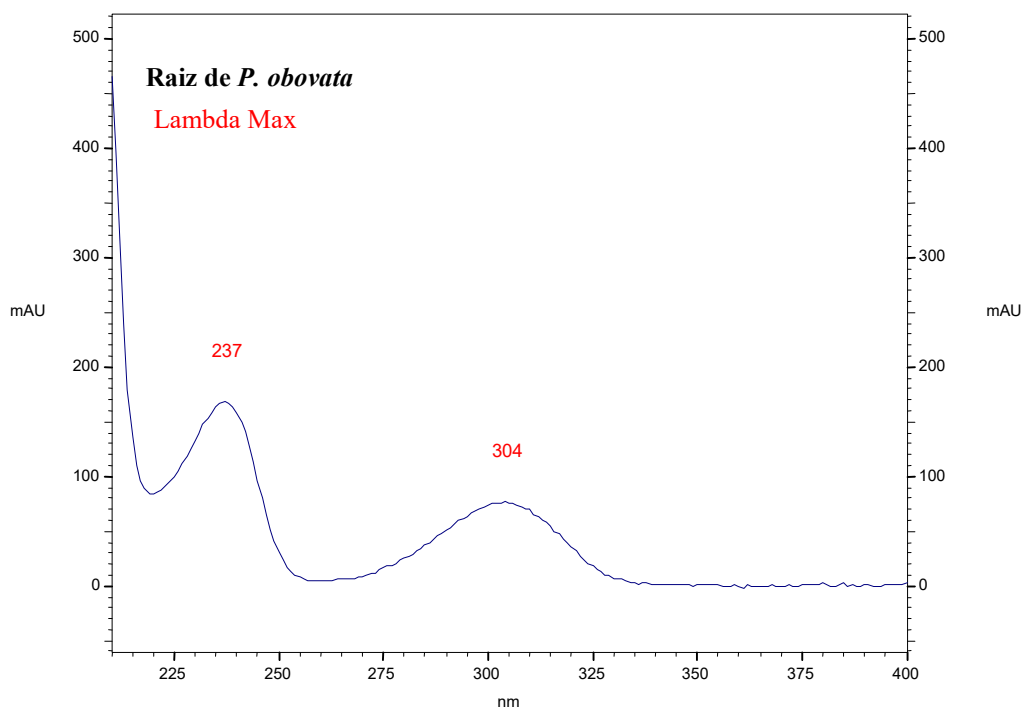
APÊNDICE B – Espectros de Ultravioleta dos espécimes de Polygalaceae coletadas em campo

Espectro de UV do pico em 15 minutos do extrato das partes aéreas de *P. boliviensis*

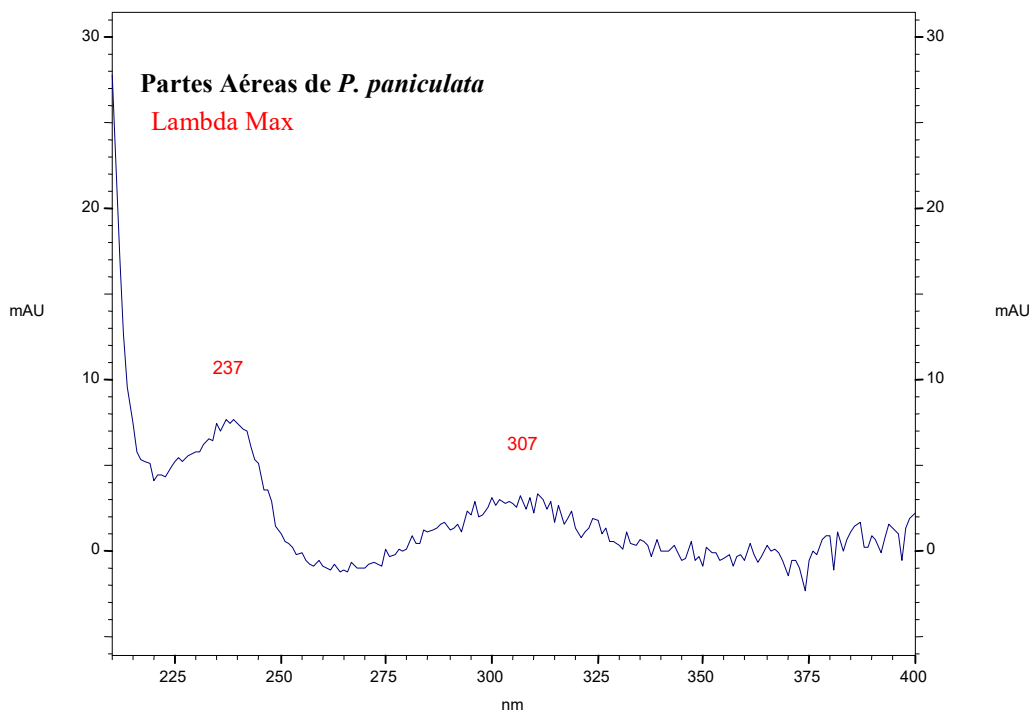


Espectro de UV do pico em 15 minutos do extrato das partes aéreas de *P. decumbens*

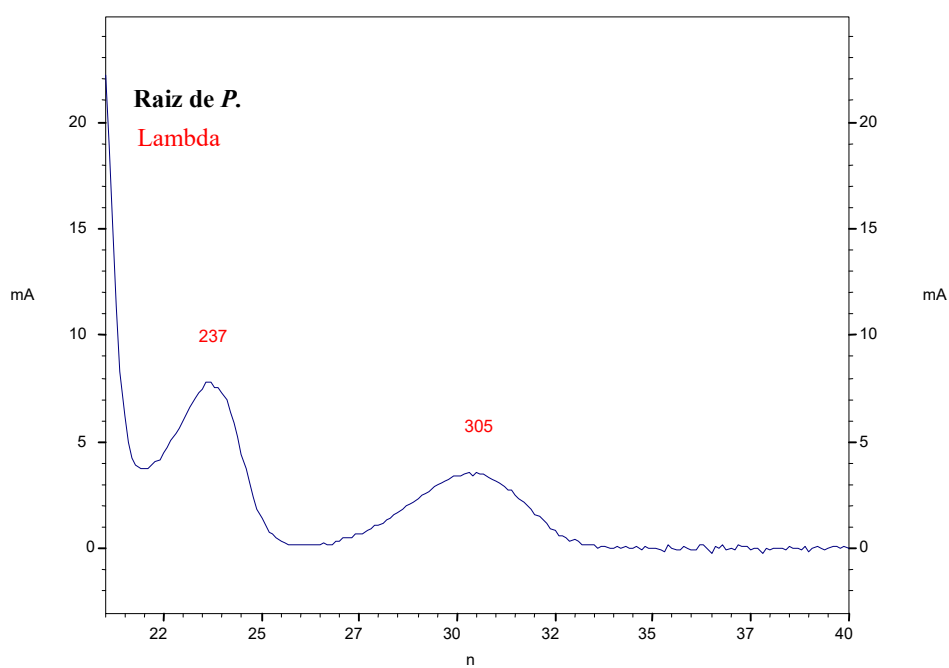


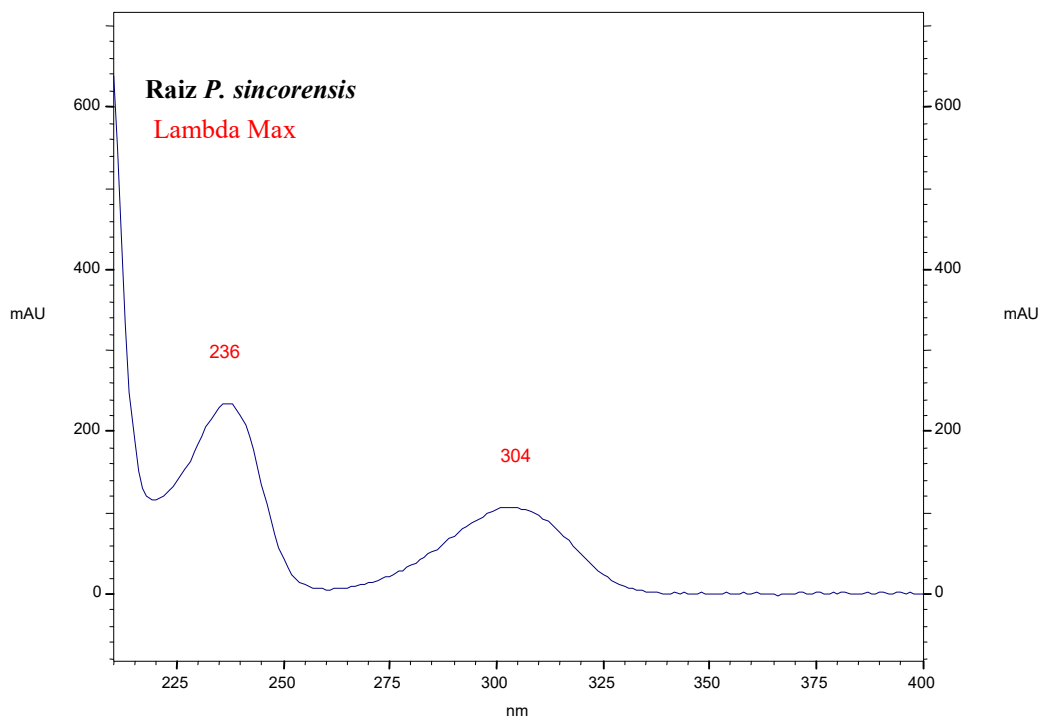
Espectro de UV do pico em 15 minutos do extrato das raízes de *P. decumbens*Espectro de UV do pico em 15 minutos do extrato das raízes de *P. obovata*

Espectro de UV do pico em 15 minutos do extrato das partes aéreas de *P. paniculata*



Espectro de UV do pico em 15 minutos do extrato das raízes de *P. sericea*



Espectro de UV do pico em 15 minutos do extrato da raiz de *P. sincorensis*Espectro de UV do pico em 15 minutos do extrato da raiz de *P. trichosperma*