



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

---

---

**Obtenção e Padronização Química e Biológica de Pós de Plantas  
Medicinais de Diferentes Tamanhos de Partículas**

**Lidiane Pinto Correia**

**Recife-PE  
2011**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

---

---

**Obtenção e Padronização Química e Biológica de Pós de Plantas  
Medicinais de Diferentes Tamanhos de Partículas**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas (PPGCF), do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco, como um dos requisitos para obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Área de Concentração: Produção e Controle da Qualidade de Medicamentos.

Orientador: Prof. Dr. Rui Oliveira Macêdo

Co-Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Horacinna Maria de Medeiros Cavalcante

**Lidiane Pinto Correia**

**Recife-PE  
2011**

Correia, Lidiane Pinto

Obtenção e padronização química e biológica de pós de plantas medicinais de diferentes tamanhos de partículas / Lidiane Pinto Correia. – Recife: O Autor, 2011.

113 folhas: il., fig. ; 30 cm.

Orientador: Rui Oliveira Macêdo

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. CCS. Ciências Farmacêuticas, 2011.

Inclui bibliografia.

1. *Passiflora edulis*. 2. *Erythrina velutina*. 3. Tamanho de partícula. 4. Ensaio do efeito ansiolítico. 5. Citotoxicidade. I. Macêdo, Rui Oliveira. II. Título.

615.190 1

CDD (20.ed.)

UFPE

CCS2011-114

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

---

---

**Obtenção e Padronização Química e Biológica de Pós de Plantas  
Medicinais de Diferentes Tamanhos de Partículas**

**BANCA EXAMINADORA:**

**Membros Internos Titulares**

Prof. Dr. Rui Oliveira Macêdo - UFPB

Prof. Dr. Sérgio Luiz Dalmora - UFSM

**Membro Externo Titular**

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Ana Cláudia Dantas de Medeiros - UEPB

**Membros Suplentes**

Prof. Dr. Fábio Santos de Souza - UFPB

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Ana Paula Barreto Gomes - UFRN

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO**

**REITOR**

Prof. Dr. Amaro Henrique Pessoa Lins

**VICE-REITOR**

Prof. Dr. Gilson Edmar Gonçalves e Silva

**PRÓ-REITOR PARA ASSUNTOS DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO**

Prof. Dr. Anísio Brasileiro de Freitas Dourado

**DIRETOR DO CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE**

Prof. Dr. José Thadeu Pinheiro

**VICE-DIRETOR DO CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE**

Prof. Dr. Márcio Antônio de Andrade Coelho Gueiros

**CHEFE DO DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

Prof. Dr. Dalci José Brondani

**VICE-CHEFE DO DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

Prof. Dr. Antonio Rodolfo de Faria

**COORDENADOR DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM  
CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

Prof. Dr. Pedro José Rolim Neto

**VICE-COORDENADOR DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM  
CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Beate Saegesser Santos



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS  
FARMACÊUTICAS**

Recife, 28 de fevereiro de 2011.

Defesa de Dissertação de Mestrado defendida e **APROVADA**, por decisão unânime, em 28 de fevereiro de 2011 e cuja Banca Examinadora foi constituída pelos seguintes professores:

**PRESIDENTE ORIENTADOR E EXAMINADOR INTERNO: Prof. Dr. Rui Oliveira Macêdo.**

(Deptº de Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal da Paraíba - UFPB).

Assinatura: Rui Oliveira Macêdo

**SEGUNDO EXAMINADOR INTERNO: Prof. Dr. Sérgio Luiz Dalmora.**

(Deptº de Farmácia Industrial da Universidade Federal de Santa Maria – UFSM).

Assinatura: Sérgio Luiz Dalmora

**PRIMEIRO EXAMINADOR EXTERNO: Profª. Drª. Ana Cláudia Dantas de**

**Medeiros.**

(Deptº de Farmácia e Biologia da Universidade Estadual da Paraíba - UEPB).

Assinatura: Ana Cláudia F. de Medeiros

Aos meus pais, Marcondes Fernandes Correia e  
Elvira Izoila Pinto; e minhas irmãs Liliane Pinto  
Correia e Liziane Pinto Correia,dedico.

## Agradecimentos

Agradeço a Deus acima de tudo.

Ao meu pai **Marcondes**, pelo total apoio, confiança e palpites científicos.

A minha mãe **Elvira**, pelo incentivo, confiança e disposição para se adequar aos meus horários de laboratório.

As minhas irmãs **Liliane** e **Liziane**, sinônimo de união, amizade e apoio incondicional.

Aos novos integrantes da família, meus sobrinhos, **Kevin** e **Nicole** que chegaram para movimentar, enaltecer toda família.

Ao meu cunhado **Wendel**, pela constante preocupação e incentivo.

A **Bernardo**, pelo companheirismo e contribuições na fase final do trabalho.

Ao meu super orientador **Prof. Dr. Rui Oliveira Macêdo**, pela oportunidade, paciência e ensinamentos científicos e de vida.

A co-orientadora **Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Horacina Maria de Medeiros Cavalcante**, pela ajuda, companheirismo, orações e amizade.

A **Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Ana Cláudia Dantas de Medeiros**, por conduzir meus primeiros passos na pesquisa.

Ao **Prof<sup>o</sup>. Dr. Fábio Sousa Santos**, pelo companheirismo e disposição para ajudar e solucionar problemas.

Ao **Prof<sup>o</sup>. Dr. Ivan Dantas Coelho** e **Dr. Leonardo Pessoa Félix**, pela identificação botânica das espécies estudadas.

Aos professores que fizeram parte da banca examinadora, pela contribuição científica no aprimoramento do estudo.

Aos amigos dos Laboratórios Unificados de Desenvolvimento e Ensaios de Medicamentos (LUDEM) presentes: **Valmir, Flaviano, Valdilânio, Vinícius, Severino, Tânia, Renata, Wemmerson, Caio, Laís, Agna, Hallison**, por toda colaboração.

Ao trio inigualável **Márcia, Elisana (Larinha também) e Ana Fátima** pela verdadeira amizade, discussões científicas e momentos de pura descontração.

A **Valdilânio** por sempre estar disposto a ajudar, tirar dúvidas e pelo envolvimento com todas as etapas do projeto.

Aos amigos que passaram pelo laboratório e tive o prazer de conviver: **Ana Paula, Irinaldo, Júlia, Lousiane, Ticiano, Francinalva, Aline, Nadália, João Paulo, Agner, Rodrigo e Antonileni**.

Aos amigos do programa de pós- graduação, em especial **Thays, Thiago e Evelyn Mirella**.

Ao pessoal da temporada Recife – 2009 (**Joelma, Fernanda, Graziela, Thomas, Joan, Telma, Liliana, Bárbara, Kahori, etc**) por compartilhar momentos de responsabilidade e lazer.

Aos amigos **Camilla, Túlio, Ricardo, Larisa, Edson, Fagner e Alan** pela energia positiva transmitida.

Ao apoio técnico da Emater- PB, representado por **Francisco de Assis Vilar e Jácome Suelinton Coelho Jácome**.

Ao espaço concedido pelo Laboratório de Psicofarmacologia Prof. Elizaldo A. Carlini (LTF-UFPB) e pelo Laboratório de Controle da Qualidade de Produtos Biológicos (UFSM), bem como toda a assistência e disposição dos professores **Prof. Dr. Reinaldo Almeida** e o **Prof. Sérgio Luiz Dalmora**, em especial a mestranda **Paula Salgado**.

A **José Crispim Duarte** e ao Biotério Prof. Dr. Thomas George do Laboratório de Tecnologia Farmacêutica pelo fornecimento dos animais.

A todos os **professores e funcionários** do Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Pernambuco.

Ao Departamento de Farmácia da Universidade Estadual da Paraíba e a **Profª. Drª. Rosemary Sousa Cunha Lima**, pela compreensão e incentivo.

Aos alunos de farmácia **Cleildo, Felipe e Alessandra** pela ajuda e palavras de motivação.

A todos **amigos** que perto ou longe torceram para a realização desse trabalho.

A todos **familiares** pelo apoio constante.

Ao **Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)** pelo apoio financeiro.

Enfim, **a todos** que direta ou indiretamente contribuíram com a execução dessa dissertação.

***MUITO OBRIGADA!***

## Resumo

A RDC 10/10, visa à padronização e o aumento da qualidade do uso popular de drogas vegetais, a exemplo da *Passiflora edulis* e da *Erythrina mulungu*, que são plantas utilizadas no tratamento da ansiedade. A distribuição granulométrica das drogas vegetais em pós deve ser considerada para caracterização física, química e biológica. O objetivo desse trabalho foi obter e padronizar pós de plantas medicinais com diferentes tamanhos de partículas de *P. edulis* e *E. velutina* e compará-los através de ensaios analíticos e bioensaios. Utilizou-se a microscopia eletrônica de varredura (MEV), termogravimetria (TG), análise térmica diferencial (DTA) e pirólise acoplada à cromatografia gasosa/espectrometria de massa (Pir-CG/EM), para caracterizar a morfologia e tamanho de partículas de drogas vegetais, decomposição térmica e análise da impressão digital. Para observar a atividade farmacológica do efeito ansiolítico do pó das drogas em diferentes tamanhos de partícula foi utilizado o ensaio de labirinto em cruz elevado. A citotoxicidade foi avaliada através do teste de vermelho neutro, investigando-se a viabilidade celular da linhagem celular NCTC 929. As imagens obtidas através da MEV detectaram divergências do resultado esperado pelo processo de granulometria. Os valores medianos e os limites inferiores e superiores mostraram a seguinte distribuição de tamanhos de partículas por amostra, MUF 01 (mulungu folha) 573,1  $\mu\text{m}$ , variando de 234,2-1000  $\mu\text{m}$ ; MUF03 307,8  $\mu\text{m}$ , variando de 236,2-854,1  $\mu\text{m}$  e MUF05 62,3  $\mu\text{m}$ , variando de 44,3-89,5  $\mu\text{m}$ , respectivamente. Os perfis das curvas TG dinâmicas para MUF01, 03 e 05 foram distintas, para as partículas de diferentes tamanhos em atmosfera de  $\text{N}_2$  e de ar sintético, decompondo-se em três e quatro etapas, respectivamente. A perda de massa final foi crescente com a diminuição do tamanho das partículas para análises em  $\text{N}_2$ , sendo de 69%, 79% e 82%, para MUF01, MUF03 e MUF05, respectivamente. As amostras MA01 e MA04 apresentaram três etapas de decomposição em atmosfera inerte. A 900 °C em atmosfera de nitrogênio a amostra MA04 manteve o resíduo em um valor maior que MA01. A média das energias obtidas por DTA para MA01 e MA04 foi de 8,7 e 11,5  $\mu\text{V}$ . As temperaturas e as energias observadas por DTA para MUF e MUC foram: 335; 344; 354; 363 e 380 °C, com energias de 8,3; 9,3; 9,7, 10,1 e 9,7 uV para MUF01; 1,8; 2,5; 3,4; 3,7 e 4,15 uV para MUF 03 e 10,2; 11,3; 12,5, 14,0 e 13,4 uV para MUF05. Os pirogramas relativos às diferentes temperaturas e amostras de *E. velutina* mostraram-se possíveis de identificar cada uma das substâncias através dos seus tempos de retenção, conforme dados a seguir: Limoneno de 4,3-4,3 min; 1-Nonadeceno de 10,5-10,5 min; Neoftadieno 2,6,10-Trimetil, 14 de 11,3-11,3 min e 3- Eicosino de 11,6-11,6 min. As citotoxicidades dos pós das folhas de *Passiflora edulis* e folhas e cascas de *Erythrina velutina* demonstraram que as partículas apresentaram DL50 de 62,4; 42,5; 29,9 e 29,7  $\text{mg mL}^{-1}$  para MA01,02,03 e 04, respectivamente. Para MUF 01,03 e 05 a DL50 foi de 50,08; 49,01 e 37,38  $\text{mg mL}^{-1}$ ; e para MUC (mulungu casca) 02, 04 e 05 foi de 72,5; 66,7 e 53,0  $\text{mg mL}^{-1}$ , demonstrando citotoxicidade crescente de acordo com a diminuição do tamanho das partículas do pó. Quanto ao efeito ansiolítico, o ensaio de labirinto em cruz elevado demonstrou diferenças entre as amostras MA01 e MA04, nos tempos de permanência e número de entradas nos braços abertos e fechados. Os dados farmacológicos da *E. velutina* folhas e cascas mostraram diferentes atividades ansiolíticas para os diferentes tamanhos de partículas. Amostras de drogas vegetais em diferentes granulometrias demonstraram diferenças físicas, químicas e biológicas entre as amostras, de acordo com os parâmetros estudados.

*Palavras chave: Passiflora edulis, Erythrina velutina, tamanho de partícula, ensaio do efeito ansiolítico e citotoxicidade*

## Abstract

Herbal medicines are medicinal plants or its parts, which contain therapeutic action substances. RDC 10/10 deals to standardize and ensure the quality assurance of herbal medicine species used in traditional medicine, for example *Passiflora edulis* and *Erythrina mulungu* which are used in the anxiolytic treatment. Particle size of herbal medicine powder should be considered for physical, chemical and biological characterization. The objective of this work was to obtain and standardize different particle size of herbal medicine powder (*P. edulis* and *E. velutina*) and compare them through analytical and bioanalytical assays. Scanning electron microscopy (SEM), thermal analysis such as thermogravimetry (TG) and differential thermal analysis (DTA) together with pyrolysis coupled to gas chromatography/mass spectrometry; were used to particle morphology and size characterization, thermal decomposition and finger print identification, respectively. The pharmacological evaluation was through the elevated plus maze test and the cytotoxicity assay was the neutral red uptake, using NCTC 929 cells. SEM enabled us to detect the existence of divergences from the expected results from the granulometry process. The medians, lowers and higher size values showed the following particle size distribution for sample MUF (Mulungu leaves) 01 573.14 $\mu\text{m}$ , varying of 234.2-1000 $\mu\text{m}$ ; MUF03 307.8  $\mu\text{m}$ , varying of 236.2-854.1  $\mu\text{m}$  and MUF05 62,3  $\mu\text{m}$ , varying from 44.3-89.5  $\mu\text{m}$ , respectively. The TG dynamic curves decomposition profile were distinct for nitrogen ( $\text{N}_2$ ) and synthetic air atmosphere, presented three and four steps, respectively. The total mass loss ( $\text{N}_2$ ) during the three stages were, respectively; 69%; 79% and 82% for MUF01, MUF03 and MUF05, which were crescent according to the reduction of the particle sizes. The samples MA01 and MA04 in nitrogen atmosphere showed three decomposition stages. MA04 presented residue values bigger than MA01, at 900 $^\circ\text{C}$ . The DTA energies obtained were: 8,7 e 11,5  $\mu\text{V}$ , to MA01 and MA04, respectively. The observed temperatures and corresponding height peaks were: 335  $^\circ\text{C}$ ; 344  $^\circ\text{C}$ ; 354  $^\circ\text{C}$ ; 363  $^\circ\text{C}$  and 380  $^\circ\text{C}$ ; 8.3; 9.3; 9.7, 10.1 and 9.6  $\mu\text{V}$  for MUF01; 1.8; 2.5; 3.4 ; 3.7 and 4.1  $\mu\text{V}$  for MUF 03; 10.2 ; 11.3; 12.5, 14.0 e 13.4  $\mu\text{V}$  for MUF05. The identification of each compound presented in the chromatographic peaks relative to the different temperature and samples were done according to its retention time, which were in the following time range: Limonene of 4,3-4,3 min.; 1-Nonadeceno of 10,5-10,5 min.; Neophytadiene 2,6,10-Trymetil, 14 of 11,28-11,35 min and 3-Eicosyne de 11,6-11,6 min. The cytotoxicity of different size particles samples of *Passiflora edulis* (MA01, 02, 03 and 04) and *Erythrina velutina* (MUF 01, 03 and 05/ MUC (mulungu bark) 02, 04 and 05) showed the following DL50: 62.4, 42.5, 29.8 and 29.7  $\text{mg mL}^{-1}$ ; 50.1, 49.0 and 37.9  $\text{mg mL}^{-1}$ / 72.5; 66.7 e 53.0  $\text{mg mL}^{-1}$ , respectively. The anxiolytic effect was different to MA01 and MA04, according to the number arm entries and time spent in the open and closed arms. The pharmacological data of *E. velutina* leaves and bark showed different anxiolytic activities for different particle sizes. Herbal medicine samples in different granulometries demonstrated physical, chemical and biological differences among the samples according to the studied parameters.

*Keywords: Passiflora edulis, Erythrina velutina, particle size, anxiety animal model and citotoxicity*

## Lista de Siglas e Abreviações

$\mu\text{g}$	-	Micrograma
$\mu\text{m}$	-	Micrometro
$\Delta T$	-	Variação de Temperatura
$^{\circ}\text{C}$	-	Graus Celsius
ANVISA	-	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
BPFC	-	Boas Práticas de Fabricação e Controle
CAPES	-	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
CG/EM	-	Cromatografia Gasosa/Espectrometria de Massas
CNPq	-	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
CPG	-	Cromatografia de Permeação em Gel
DL50	-	Dose Letal Média
DSC	-	Calorimetria Exploratória Diferencial
DTA	-	Análise Térmica Diferencial
DTG	-	Termogravimetria Derivada
EMATER-PB	-	Empresa de Assistência Técnica e Extensão Rural da Paraíba
ES	-	Elétron Secundário
eV	-	Elétron volts
FTIR	-	Infravermelho com Transformada de Fourier
GABA	-	Ácido $\gamma$ -aminobutírico
HEC	-	Hidroxietilcelulose
IR	-	<i>Infra red</i>
Kg	-	Quilograma
Km	-	Quilômetro
L	-	Litro

LCE	-	Labirinto em Cruz Elevado
m/z	-	Relação massa/carga elétrica
MEV	-	Microscópio Eletrônico de Varredura
Mg	-	Miligrama
Min	-	Minuto
mL	-	Mililitro
MUC	-	Mulungu Casca
MUF	-	Mulungu Folha
MA	-	Maracujá Folha
NMDA	-	N-metil-D-aspartato
OMS	-	Organização Mundial de Saúde
PNPIC	-	Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares
PNPMF	-	Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos
OS	-	Poliestireno
PTZ	-	Pentileno tetrazol
PVC	-	Cloreto de Vinilo
Pir-CG/EM	-	Pirólise acoplada à cromatografia gasosa e espectrometria de massa
RDC	-	Resolução da Diretoria Colegiada
RMN	-	Ressonância Magnética Nuclear
SNC	-	Sistema Nervoso Central
SUS	-	Sistema Único de Saúde
T	-	Temperatura
T	-	Tempo
TG	-	Termogravimetria
TMAH-GC	-	Análise Termoquímica acoplada à Cromatografia Gasosa

## Lista de Figuras

Capítulo I: <i>Revisão Bibliográfica</i> .....	22
Figura I-1: Ilustração do Labirinto em cruz elevado .....	42
Capítulo II: <i>Artigo I</i> .....	44
Figura II-1: Eletromicrografias de varredura dos pós da planta em três diferentes tamanhos de partículas: MUF01, MUF03 e MUF05, correspondendo a 710, 180 e 75 µm, respectivamente .....	49
Figura II-2: Curvas termogravimétricas dinâmicas em atmosfera de nitrogênio dos pós das folhas de <i>Erythrina velutina</i> .....	51
Figura II-3: Curvas termogravimétricas dinâmicas em atmosfera de ar sintético dos pós das folhas de <i>Erythrina velutina</i> .....	51
Figura II-4: Curvas térmicas diferenciais dos pós das folhas de <i>Erythrina velutina</i> .....	52
Figura II-5: Altura dos picos das amostras MUF01, MUF03 e MUF05 .....	53
Figura II-6: Pirogramas das amostras MUF01, MUF03 e MUF05 a 300 °C .....	54
Figura II-7: Pirogramas das amostras MUF01, MUF03 e MUF05 a 450 °C .....	55
Figura II-8: Pirogramas das amostras MUF01, MUF03 e MUF05 a 600 °C .....	56
Capítulo III: <i>Artigo II</i> .....	59
Figura III-1: Eletromicrografias de varredura dos pós da planta em dois tamanhos de partículas 710 e 150 µm, correspondendo a MA 01 e MA 04, respectivamente .....	66
Figura III-2: Curvas termogravimétricas dinâmicas em atmosfera de nitrogênio dos pós das folhas de <i>Passiflora edulis</i> .....	67
Figura III-3: Curvas termogravimétricas dinâmicas em atmosfera de ar sintético dos pós das folhas de <i>Passiflora edulis</i> .....	68
Figura III-4: Altura dos picos das amostras MA01 e MA04 .....	69
Figura III-5: Número de entradas nos braços abertos dos animais tratados com infuso de <i>Passiflora edulis</i> (MA01 e MA04) no teste de labirinto em cruz elevado .....	70
Figura III-6: Tempo de permanência nos braços abertos dos animais tratados com infuso de <i>Passiflora edulis</i> (MA01 e MA04) no teste de labirinto em cruz elevado .....	70
Figura III-7: Número de entradas nos braços fechados dos animais tratados com infuso de <i>Passiflora edulis</i> (MA01 e MA04) no teste de labirinto em cruz elevado .....	71
Figura III-8: Tempo de permanência nos braços fechados dos animais tratados com infuso de <i>Passiflora edulis</i> (MA01 e MA04) no teste de labirinto em cruz elevado .....	71
Figura III-9: Percentual de mortalidade celular após 24h de incubação com infuso de <i>Passiflora edulis</i> (MA01, 02, 03 e 04), a altura cada ponto representa a média da triplicata .....	73
Capítulo IV: <i>Artigo III</i> .....	77

Figura IV-1: Eletromicrografias de varredura dos pós da planta correspondendo a MUC e MUF em diferentes tamanhos de partícula .....	84
Figura IV-2: Curvas termogravimétricas dinâmicas em nitrogênio e ar sintético das amostras MUC e MUF em diferentes tamanhos de partícula .....	85
Figura IV-3: Altura dos picos das amostras MUC e MUF em diferentes tamanhos de partícula.....	87
Figura IV-4: Número de entradas nos braços abertos dos animais tratados com decocto da casca de <i>Erythrina velutina</i> , partículas 01 e 05, no teste de labirinto em cruz elevado .....	89
Figura IV-5: Tempo de permanência nos braços abertos dos animais tratados com decocto da casca de <i>Erythrina velutina</i> , partículas 01 e 05, no teste de labirinto em cruz elevado.....	89
Figura IV-6: Número de entradas nos braços fechados dos animais tratados com decocto da casca de <i>Erythrina velutina</i> , partículas 01 e 04, no teste de labirinto em cruz elevado .....	90
Figura IV-7: Tempo de permanência nos braços fechados dos animais tratados com decocto da casca de <i>Erythrina velutina</i> , partículas 01 e 04, no teste de labirinto em cruz elevado .....	90
Figura IV-8: Número de entradas nos braços abertos dos animais tratados com infuso das folhas de <i>Erythrina velutina</i> , partículas 01 e 04, no teste de labirinto em cruz elevado .....	91
Figura IV-9: Número de entradas nos braços abertos dos animais tratados com infuso das folhas de <i>Erythrina velutina</i> , partículas 01 e 04, no teste de labirinto em cruz elevado .....	91
Figura IV-10: Número de entradas nos braços fechados dos animais tratados com infuso das folhas de <i>Erythrina velutina</i> , partículas 01 e 04, no teste de labirinto em cruz elevado .....	92
Figura IV-11: Tempo de permanência nos braços fechados dos animais tratados com infuso das folhas de <i>Erythrina velutina</i> , partículas 01 e 04, no teste de labirinto em cruz elevado.....	92
Figura IV-12: Mortalidade celular após 24 h de incubação com decocto das cascas de <i>Erythrina velutina</i> , a altura de cada ponto representa a média da triplicata.....	93
Figura IV-13: Mortalidade celular após 24 h de incubação com infuso das folhas de <i>Erythrina velutina</i> , a altura de cada ponto representa a média da triplicata.....	93

## Sumário

<i>INTRODUÇÃO</i> .....	18
1. Introdução .....	19
<i>OBJETIVOS</i> .....	21
2. Objetivos.....	22
2.1. Objetivo Geral .....	22
2.2. Objetivos Específicos .....	22
<i>CAPÍTULO I: Revisão Bibliográfica</i> .....	23
3. Revisão Bibliográfica .....	24
3.1. Uso Popular de Plantas Medicinais .....	24
3.2. Regulamentação .....	25
3.3. Plantas com Atividade Ansiolítica .....	27
3.3.1. <i>Erythrina velutina</i> .....	28
3.3.2. <i>Passiflora edulis</i> .....	31
3.4. Padronização das Partículas de Drogas Vegetais .....	33
3.4.1. <i>Granulometria de Pós</i> .....	33
3.4.2. <i>Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)</i> .....	34
3.5. Análise térmica.....	36
3.5.1. <i>Termogravimetria (TG)</i> .....	36
3.5.2. <i>Análise térmica diferencial (DTA)</i> .....	36
3.5.3. <i>Análise térmica aplicada a drogas vegetais</i> .....	37
3.6. Pirólise acoplada a CG/EM .....	39
3.6.1. <i>Aplicações da pirólise acoplada a CG/EM</i> .....	40
3.7. Ensaio Farmacológicos: Ansiedade .....	41
3.7.1. <i>Labirinto em Cruz Elevado</i> .....	42
3.8. Ensaio de Citotoxicidade .....	43
3.8.1. <i>Ensaio do Vermelho Neutro</i> .....	44
<i>CAPÍTULO II: Artigo I</i> .....	45
Caracterização de drogas vegetais com diferentes tamanhos de partículas utilizando diferentes técnicas analíticas .....	46
Resumo .....	46
1. Introdução .....	47
2. Materiais e Métodos.....	47
2.1. Material Botânico .....	47
2.2. Preparação dos Pós .....	48
2.3. Determinação do Tamanho de Partículas .....	48
2.4. Estudos de Análise Térmica .....	48
2.4.1. <i>Termogravimetria (TG)</i> .....	48
2.4.2. <i>Análise Térmica Diferencial (DTA)</i> .....	49
2.5. Pirólise acoplada a CG/EM (Pir-CG/EM).....	49
3. Resultados e Discussões .....	50
3.1. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) .....	50
3.2. Estudos de Análise Térmica .....	51
3.2.1. <i>Termogravimetria (TG)</i> .....	51
3.2.2. <i>Análise Térmica Diferencial (DTA)</i> .....	53
3.3. Pirólise acoplada a CG/EM .....	55
4. Conclusões .....	59

5. Agradecimentos .....	59
6. Referências.....	59
<i>CAPÍTULO III: Artigo II</i> .....	61
Estudos de correlação da atividade farmacológica e toxicidade de pós das folhas de <i>Passiflora edulis Sims</i> em diferentes tamanhos de partículas .....	62
Resumo .....	62
1. Introdução .....	63
2. Materiais e Métodos.....	64
2.1. Animais .....	64
2.2. Material Botânico .....	64
2.3. Preparação dos Pós .....	64
2.4. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) .....	65
2.5. Estudos de Análise Térmica .....	65
2.5.1. <i>Termogravimetria (TG)</i> .....	65
2.5.2. <i>Análise Térmica Diferencial (DTA)</i> .....	65
2.6. Labirinto em Cruz Elevado .....	66
2.7. Cultura Celular L929 .....	66
2.8. Ensaio de Citotoxicidade: Vermelho Neutro .....	67
2.9. Tratamento dos Dados .....	67
3. Resultados e Discussões .....	67
3.1. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) .....	67
3.2. Estudos de Análise Térmica .....	68
3.2.1. <i>Termogravimetria (TG)</i> .....	68
3.2.2. <i>Análise Térmica Diferencial (DTA)</i> .....	70
3.3. Estudo da atividade ansiolítica .....	71
3.4. Estudo da citotoxicidade .....	74
4. Conclusões .....	75
5. Agradecimentos .....	76
6. Referências.....	76
<i>CAPÍTULO IV: Artigo III</i> .....	79
Estudos de correlação da atividade farmacológica e toxicidade de pós das folhas e cascas de <i>Erythrina velutina Willd</i> em diferentes tamanhos de partículas .....	80
Resumo .....	80
1. Introdução .....	81
2. Materiais e Métodos.....	82
2.1. Animais .....	82
2.2. Material Botânico .....	82
2.3. Preparação dos Pós .....	83
2.4. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) .....	83
2.5. Estudos de Análise Térmica .....	83
2.5.1. <i>Termogravimetria (TG)</i> .....	83
2.5.2. <i>Análise Térmica Diferencial (DTA)</i> .....	83
2.6. Labirinto em Cruz Elevado .....	84
2.7. Cultura Celular L929 .....	84
2.8. Ensaio de Citotoxicidade: Vermelho Neutro .....	85
2.9. Tratamento dos Dados .....	85
3. Resultados e Discussões .....	85
3.1. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) .....	85
3.2. Estudos de Análise Térmica .....	86
3.2.1. <i>Termogravimetria (TG)</i> .....	86

3.2.2. <i>Análise Térmica Diferencial (DTA)</i> .....	88
3.3. Estudo da atividade ansiolítica .....	89
3.4. Estudo da citotoxicidade .....	94
4. Conclusões .....	95
5. Agradecimentos .....	95
6. Referências.....	96
<i>CONCLUSÕES</i> .....	99
4. Conclusões Gerais.....	100
<i>PERSPECTIVAS</i> .....	101
5. Perspectivas .....	102
<i>REFERÊNCIAS</i> .....	103
Referências .....	104

# ***INTRODUÇÃO***

---

## 1. Introdução

O conhecimento histórico do uso de plantas medicinais nos mostra ao longo da História da Humanidade que, pela própria necessidade humana, as plantas foram um dos primeiros recursos terapêuticos utilizados para aumentar sua chance de sobrevivência. O uso da medicina tradicional e das plantas medicinais, nos países em desenvolvimento, tem sido amplamente observado como base normativa para a manutenção da saúde [1].

A Organização Mundial de Saúde (OMS) define saúde como sendo o estado completo de bem estar físico, mental e social e não meramente a ausência de doença ou enfermidade [2], razão pela qual as tradições e crenças locais nas plantas medicinais fazem parte do suporte nos cuidados à saúde.

A partir de 1978, a OMS reconheceu oficialmente o uso de fitoterápico com finalidade profilática, curativa, paliativa ou para fins diagnósticos e recomendou a difusão mundial dos conhecimentos necessários para seu uso. Ressalte-se que 67% das espécies vegetais medicinais do mundo são originárias dos países em desenvolvimento [3].

O Brasil é o país com a maior biodiversidade do mundo, contando com um número estimado de mais de 20% do número total de espécies do planeta. O País possui a mais diversa flora, número superior a 55 mil espécies descritas, o que corresponde a 22% do total mundial [4]. Esta rica biodiversidade é acompanhada por uma longa aceitação de uso de plantas medicinais e conhecimento tradicional associado [5].

Até a metade do século XX, o Brasil era essencialmente rural e usava amplamente a flora medicinal nativa e aclimatada, e mesmo se tornando urbano nas últimas décadas continua mantendo sua tradição no uso das plantas medicinais.

Como resultado de uma série de ações do Ministério da Saúde, desde 2003, foi instituída a Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares ao Sistema Único de Saúde (SUS), pactuada na Comissão Intergestores Tripartite e aprovada após longo processo de discussão pelo Conselho Nacional de Saúde em 15 de dezembro de 2005. Tal política foi instituída através da Portaria nº 971 do Gabinete do Ministro da Saúde, de 03 de maio de 2006, publicada no Diário Oficial da União em 04 de maio de 2006 [6].

No contexto da Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares ao SUS está a proposta de Plantas Medicinais e Fitoterapia no SUS, a qual tem como objetivo ampliar as opções terapêuticas aos usuários do sistema, com garantia de acesso a plantas medicinais,

fitoterápicos e serviços relacionados à Fitoterapia, com segurança, eficácia e qualidade na perspectiva da integralidade da atenção à Saúde [6].

Os conhecimentos científicos e tecnológicos sobre a intervenção de produtos com atividade terapêutica mostram que matérias-primas e medicamentos devem ser produzidos de forma a garantir a qualidade, segurança e eficácia terapêutica do usuário. Atualmente, verificam-se práticas agrícolas bastante diferenciadas devido à falta de educação científica e tecnológica dos agricultores, que não diferenciam no modo de cultivar a planta como alimento de subsistência daquela que será utilizada como matéria-prima vegetal para uso medicamentoso. Além do mais o uso como remédio popular deve ser respaldado por critérios científicos que garantam o mínimo de segurança de uso e eficácia terapêutica.

Em março de 2010, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) regulamentou, o uso de drogas vegetais, através da Resolução RDC 10 publicada no Diário Oficial da União [7]. Esta resolução teve como objetivo causar impacto positivo no mercado de plantas medicinais e fitoterápicos, tornando-se uma alternativa terapêutica mais barata e segura à população, bem como promovendo a utilização de drogas vegetais de forma segura, eficaz e de qualidade [8].

Neste sentido, este trabalho teve como objetivo geral avaliar parâmetros físicos e químicos, bem como a atividade farmacológica/toxicológica das drogas vegetais *Passiflora edulis* e *Erythrina velutina*, utilizando a tecnologia de obtenção dos pós da planta em diferentes tamanhos de partículas.

## ***OBJETIVOS***

---

## **2. Objetivos**

### **2.1. Objetivo Geral**

Obter e padronizar drogas vegetais com atividades sobre o sistema nervoso central.

### **2.2. Objetivos Específicos**

- ✓ Obter tamanhos de partículas variados para as drogas vegetais estudadas;
- ✓ Caracterizar os pós das drogas vegetais morfológicamente através da Microscopia Eletrônica de Varredura;
- ✓ Avaliar o perfil térmico dos pós obtidos das drogas vegetais em diferentes tamanhos de partícula;
- ✓ Avaliar o perfil pirolítico dos pós obtidos das drogas vegetais em diferentes tamanhos de partícula;
- ✓ Obter o produto (infuso e decoctos) das drogas vegetais estudadas de acordo com o preconizado pela RDC 10/2010 - ANVISA;
- ✓ Realizar ensaio farmacológico sobre o sistema nervoso central dos produtos obtidos em diferentes tamanhos de partícula, de acordo com a RDC 10/2010 - ANVISA, com a finalidade de avaliar sua potência farmacológica relativa;
- ✓ Realizar ensaio citotóxicológico dos produtos obtidos com diferentes tamanhos de partícula, de acordo com a RDC 10/2010 - ANVISA para a toxicidade aguda das drogas vegetais.

# ***CAPÍTULO I: Revisão Bibliográfica***

---

### **3. Revisão Bibliográfica**

#### **3.1. Uso Popular de Plantas Medicinais**

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), a medicina popular ou tradicional refere-se às práticas de saúde, conceitos, crenças e conhecimentos que incorporam medicamentos à base de plantas, animais ou minerais, terapias espirituais, técnicas manuais e exercícios aplicados singularmente ou em combinação, com o fim de tratar, diagnosticar e prevenir doenças ou manter o bem-estar [9].

O uso de plantas para fins terapêuticos é uma prática antiga, herdada principalmente da cultura indígena. Nos dias atuais, a busca pela fitoterapia resulta da procura por tratamentos que associem eficácia e baixa incidência de efeitos colaterais, o que mobiliza iniciativas públicas e privadas [10].

As plantas medicinais sempre foram utilizadas, sendo no passado o principal meio terapêutico conhecido para tratamento da população. A partir do conhecimento e uso popular, foram descobertos alguns medicamentos utilizados na medicina tradicional [10].

As principais características desejáveis das plantas medicinais são: eficácia, baixo risco de uso, assim como reprodutibilidade e constância de sua qualidade [11]. As informações técnicas acerca da maioria das plantas medicinais ainda são insuficientes no que tange as características acima citadas [12].

Pode-se dizer que, a utilização de plantas na medicina oficial se dá predominantemente de duas maneiras: através da homeopatia (tratamento de doenças através do uso de medicamentos capazes de produzir efeitos semelhantes aos da doença em questão, com o mínimo de efeitos colaterais possíveis) ou da alopatia (sistema de combate de doenças por meios contrários aos seus sintomas e causas) [13].

O advento das terapias alternativas nos últimos anos se deve a diversos fatores, entre eles a busca, da parte dos usuários, por terapias mais humanas e integrais. Diversos obstáculos impostos pela medicina tradicional incentivam a procura por essas “novas” terapias que, paradoxalmente, remontam antigos saberes populares, contrastando, assim, com o caráter tecno-científico da medicina moderna [14].

Com o desenvolvimento da ciência e da tecnologia as plantas medicinais estão tendo seu valor terapêutico pesquisado e ratificado e vem crescendo sua utilização recomendada por profissionais de saúde [15].

Em países como o Brasil, diversos fatores levam à busca pela fitoterapia: as dificuldades de uso do Sistema Único de Saúde (SUS) e a deficiência deste em prover o acesso a medicamentos tradicionais; a própria falta de acesso a estes devido a fatores econômicos ou simplesmente a indisponibilidade destes serviços em diversas regiões do país. A partir do momento em que se demonstra, por parte da população um grande interesse por terapias à base de plantas medicinais, e conhecendo-se a colossal diversidade de flora existente no Brasil, é evidente a necessidade de se incorporar a prática da fitoterapia ao sistema de saúde [14].

O valor comercial desse mercado está cada vez maior, fazendo a segurança, eficácia e qualidade dos produtos se tornarem preocupações constantes das autoridades reguladoras [16].

O Ministério da Saúde estabeleceu a Política Nacional de Plantas Mediciniais e Fitoterápicos (PNPMF) e a Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares (PNPIC) no Sistema Único de Saúde (SUS), que tratam da implementação de Ações e serviços relativos a práticas medicinais complementares, que abrangem fitoterapia, medicina tradicional chinesa ou acupuntura, homeopatia e termalismo social. A PNPIC tem papel importante na saúde pública brasileira, pois fortalece e amplia as ações voltadas para a utilização racional das práticas complementares [6, 8, 17].

Em março de 2010, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) regulamentou, o uso de drogas vegetais, através da Resolução RDC 10 publicada no Diário Oficial da União [7].

### **3.2. Regulamentação**

As drogas vegetais não podem ser confundidas com os medicamentos fitoterápicos. Ambos são obtidos de plantas medicinais, porém elaborados de forma diferenciada. Enquanto as drogas vegetais são constituídas da planta seca, inteira ou rasurada (partida em pedaços menores) utilizadas na preparação dos populares “chás”, os medicamentos fitoterápicos são produtos tecnicamente elaborados, apresentados na forma final de uso (comprimidos, cápsulas e xaropes) [7].

Para classificar os produtos iniciais usados na produção de medicamentos fitoterápicos, dá-se a denominação geral de matéria-prima vegetal, que compreende tanto a planta medicinal como a droga vegetal [18].

Diante do aumento crescente do uso de drogas vegetais e a inexistência de requerimentos legais os quais abrangessem os requisitos de qualidade, segurança e eficácia, a ANVISA publicou uma norma para a notificação de drogas vegetais, a RDC 10/10 [7].

A RDC 10/10 foi elaborada de acordo com a normativa alemã para os “Chás Medicinais”, e engloba 66 drogas vegetais. Nesta norma estas drogas estão padronizadas quanto à forma de uso, posologia, alegações terapêuticas embasadas no uso tradicional, possíveis reações adversas e contra-indicações.

Esta resolução veio regulamentar a produção de drogas vegetais no Brasil, estando voltada à indústria farmacêutica, e para os produtores e distribuidores de drogas vegetais, bem como a população em geral. Com esta RDC, as empresas vão precisar notificar à ANVISA sobre a fabricação, importação e comercialização dessas drogas vegetais no mínimo de cinco em cinco anos [8].

Com a nova resolução, a produção de drogas vegetais deve obedecer às Boas Práticas de Fabricação e Controle (BPF), reduzindo desse modo, a possibilidade da ocorrência de falsificações e contaminações. Os produtos também vão passar por testes que garantam que eles estão livres de microrganismos como bactérias e sujidades, além da qualidade e da identidade.

As drogas vegetais industrializadas e notificadas pela ANVISA, conforme essa norma, são destinadas ao uso episódico, oral ou tópico, para o alívio sintomático das doenças, devendo ser disponibilizadas exclusivamente na forma de droga vegetal para o preparo de infusões, decocções e macerações. Sendo a forma de uso de cada droga vegetal também pré-determinada [18].

As drogas vegetais foram classificadas como produtos de venda livre, isentos de prescrição médica, e com indicação para doenças consideradas de baixa gravidade. O tempo de uso das drogas vegetais também foi determinado, sendo a orientação geral de não usar o produto por mais de uma semana a não ser por orientação de profissionais da saúde.

Outro aspecto importante é que a droga deve ser embalada, e nesta embalagem deve ser inserido um folheto informativo sobre as drogas vegetais. De acordo com a Resolução da Diretoria Colegiada (RDC 10/10), a embalagem deve garantir a proteção da droga vegetal contra contaminações e efeitos da luz e umidade e apresentar lacre ou selo de segurança que garanta a inviolabilidade do produto.

A publicação da RDC 10/10 teve como objetivo causar impacto positivo no mercado de plantas medicinais e fitoterápicos, tornando-se uma alternativa terapêutica mais barata e

segura à população, bem como promovendo a utilização de drogas vegetais de forma segura, eficaz e de qualidade.

Dentre as 66 drogas vegetais encontradas no Anexo I dessa resolução encontram-se: maracujá e mulungu, plantas popularmente utilizadas pela atividade ansiolítica, as quais foram objeto de estudo desse trabalho.

### **3.3. Plantas com Atividade Ansiolítica**

A ansiedade é tida como uma resposta condicionada ao medo, sendo que neste último há uma ameaça definida e na ansiedade o iminente perigo não está bem qualificado, por sua vez, nos estados ansiosos, as reações normais ao medo ocorrem de uma maneira antecipada [19-21].

Os ansiolíticos e hipnóticos são utilizados no tratamento dos sintomas da ansiedade e no tratamento da insônia, respectivamente. Apesar dos objetivos clínicos serem diferentes, as mesmas drogas são frequentemente, usadas para ambas as finalidades. Os principais grupos de drogas utilizados com esta finalidade são os benzodiazepínicos (diazepam e clordiazepóxido), barbitúricos (zolpidem, fenobarbital e pentobarbital), antagonistas dos receptores beta-adrenérgicos (propranolol) e outras drogas (hidrato de cloral e meprobamato) [22-23].

No tratamento do transtorno de ansiedade, diversos obstáculos dificultam a total adesão do paciente ao tratamento, como os efeitos colaterais acarretados pelos tratamentos convencionais, a saber: sedação, amnésia, dependência e transtornos de locomoção provocados por benzodiazepínicos, disfunções sexuais provocadas por antidepressivos, entre outros [24].

O Brasil é um país que possui uma flora bastante diversificada e uma situação geográfica privilegiada, o que justifica a pesquisa de substâncias naturais derivadas de plantas no tratamento de inúmeros distúrbios, como a ansiedade [25]. Desde os tempos antigos, algumas plantas têm sido usadas como alternativa terapêutica, destacando-se entre elas, a *Passiflora incarnata* L. (maracujá), *Valeriana officinalis* L. (valeriana) e *Piper methysticum* (kava-kava) com propriedades sedativas e ansiolíticas comprovadas [26].

É sabido que desde os tempos remotos os chás preparados a partir de plantas de uso popular podem produzir sérios efeitos adversos em animais e em seres humanos. Esses e outros aspectos motivaram a intensificação de pesquisas com plantas usadas na medicina popular, principalmente visando esclarecer os possíveis efeitos tóxicos e histopatológicos. [27-28].

Diversas plantas têm sido relatadas pela literatura como portadoras de atividade ansiolítica. A *Valeriana officinalis* é utilizada não só pela medicina popular, mas também pela indústria farmacêutica, que a inclui em vários de seus produtos com efeitos calmantes. Farmacologicamente, os componentes ativos desta planta agem de modo a estabilizar os centros vegetativos e emocionais, inibir a enzima GABA transaminase (evitando o metabolismo deste transmissor), e induzindo a sedação. Esta planta também já demonstrou sua atividade ansiolítica em diversos estudos [29].

Pesquisas têm sido realizados desde a década de 1960, visando avaliar os efeitos ansiolíticos/ansio gênicos de componentes ativos da *Cannabis sativa*, apontando o canabidiol como metabólito causador de efeitos ansiolíticos e antipsicóticos. Entretanto, a utilização de componentes desta planta ainda é controversa [30].

A ação depressora do Avelós (*Synadenium umbellatum*) foi estudada por Oliveira et al, 2008 [31], que detectaram que o extrato etanólico desta planta induziu efeitos ansiolíticos nos animais testados, sem modificar a capacidade de locomoção, além de potencializar o tempo de sono induzido por barbitúrico. A atividade depressora foi detectada principalmente pela fração hexânica e clorofórmica do extrato.

O estudo de Fiss et al, 2006 [32] comparou a eficácia de dois medicamentos fitoterápicos comerciais, usados no tratamento de ansiedade: Maracugina<sup>®</sup> (uma associação de *P. alata*, *C. oxyacantha* e *E. mulungu*) e Passiflorine<sup>®</sup> (associação de *P. incarnata*, *C. oxyacantha* e *S. alba*), sob a forma farmacêutica de comprimido e solução oral. Os autores observaram que ambos os medicamentos obtiveram resultados aceitáveis em relação à eficácia e tolerabilidade.

Espécies do gênero *Passiflora* são largamente utilizadas por sua ação tranqüilizante, sendo as mais relatadas as espécies *P. incarnata*, *P. edulis* e *P. alata*. Um estudo que avaliou a atividade ansiolítica desta última mostrou que tanto os flavonóides quanto saponinas presentes podem ser responsáveis por sua atividade, que provavelmente se dá através de uma modulação GABAérgica [33].

O gênero *Erythrina* possui cerca de 110 espécies catalogadas. Estas plantas são utilizadas em várias partes do mundo, popularmente para o tratamento de diversos distúrbios do Sistema Nervoso Central (SNC) [34].

### 3.3.1. *Erythrina velutina*

A *Erythrina velutina* é uma planta da família Fabaceae encontrada no vale do Rio São Francisco e regiões semi-áridas do Nordeste brasileiro. Popularmente conhecida como

mulungu, é utilizada na medicina tradicional por seus efeitos no sistema nervoso central como ansiolítico e sedativo [35].

Há muito tempo a *E. velutina* é utilizada para fins medicinais. A medicina tradicional indica seu uso principalmente para ansiedade, infecções, entre outros. Entretanto, diversos pesquisadores buscaram avaliar suas propriedades *in vitro* e *in vivo*.

A atividade antimicrobiana foi avaliada por Virtuoso et al, 2005 [36]. Neste estudo, detectou-se que os compostos contidos numa fração hexânica (de menor polaridade), em relação à fração etanólica (de maior polaridade) do extrato, apresentou atividade frente à *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus pyogenes*. Este resultado demonstra que a propriedade antimicrobiana da *E. velutina* pode estar associada a alguns de seus constituintes apolares (como esteróides e triterpenos).

Entretanto, atividade depressora do sistema nervoso central da *E. velutina*, atribuída aos alcalóides, é a mais frequentemente estudada, por diversos pesquisadores.

No estudo de Vasconcelos et al, 2007 [37], detectou-se que extratos hidroalcoólicos de *E. velutina* teve efeito anticonvulsivante mais significativo que os extratos de *E. mulungu*. Esta atividade foi detectada quando aplicado o modelo de convulsão induzida por estriquinina. Dado o mecanismo de ação desta substância na indução das convulsões, os resultados sugeriram que os constituintes da *E. velutina* atuam sobre os mecanismos inibitórios da glicina. Entretanto, nenhuma das plantas mostrou atividade quando aplicado o modelo de convulsão induzida por PTZ (pentilenotetrazol).

Outra ação destas plantas, detectada no mesmo estudo, foi a potencialização do tempo de sono induzido por pentobarbital. Dantas et al, 2004 [38], ao testar o extrato aquoso de *E. velutina*, também detectou esta ação, caracterizando-a como dose-dependente. Em doses altas, relata-se não só a potencialização do sono, como também uma redução da capacidade de locomoção.

No estudo de Ribeiro et al, 2006 [39], o extrato hidroalcoólico de *E. velutina* demonstrou novamente ação ansiolítica, mostrando porém que, nas doses testadas, o extrato não afetou a capacidade de locomoção dos animais. Outro teste utilizado, o teste de nado forçado, não mostrou resultados que sugerissem a presença de atividade antidepressiva em *E. velutina* ou *E. mulungu*. Estes dados contrastam com os obtidos por Onusic et al, 2003 [40], inferindo que o efeito panicolítico que havia sido detectado para *E. mulungu* é provavelmente independente de uma ação antidepressiva.

Por outro lado, o estudo realizado por Ribeiro et al, 2006 [39], mostrou que a ação ansiolítica do extrato hidroalcoólico de *E. velutina* só foi detectada com o seu uso crônico.

Alcalóides isolados da *E. mulungu* (eritravina e 11- $\alpha$ -hidróxi-eritravina), estudados por Flausino et al, 2007 [41] apresentam potencial efeito ansiolítico semelhante ao de benzodiazepínicos comerciais (como o Diazepam), sem, no entanto, afetar a capacidade de locomoção dos animais testados. A propriedade anticonvulsivante dos mesmos alcalóides foi testada por Faggion et al, 2011 [42]. Neste estudo a eritravina se mostrou eficaz, chegando a impedir convulsões induzidas por PTZ e ácido caínico em 100% dos animais tratados com doses de 2 e 3  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ . Já a 11- $\alpha$ -hidróxi-eritravina impediu 100% das convulsões induzidas por bicuculina e N-metil-D-aspartato (NMDA), nos animais que receberam doses de 1 e 2  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ . Os dois trabalhos demonstram juntos que estes alcalóides possuem uma ótima atividade depressora do SNC, ao mesmo tempo ansiolítica e anticonvulsivante.

Craveiro et al, 2008 [43] avaliaram a toxicidade aguda do extrato aquoso de *E. velutina*, de acordo com as normas estabelecidas pelo Ministério da Saúde, 2004 [44]. Foi constatado que a dose de 5000  $\text{mg kg}^{-1}$  pode ser considerada atóxica, uma vez que não se detectou alterações nos parâmetros de bolos fecais, atividade motora, respiração, reflexo corneal, etc. Também não houve mortalidade dos animais, sugerindo que o uso não-crônico do extrato aquoso de *E. velutina* na medicina tradicional é seguro.

A capacidade anti-nociceptiva das folhas da *E. velutina* foi avaliada por Marchioro et al, 2005 [45]. O estudo utilizou modelo de indução de inflamação por carragenina, e três testes para atividade anti-nociceptiva: chapa quente, formalina e indução de contrações por ácido acético. Os resultados mostraram que o extrato aquoso da *E. velutina* só foi eficaz nos ensaios envolvendo formalina e ácido acético. O fato do extrato não apresentar atividade frente ao modelo de chapa quente, e ser eficaz frente à segunda fase do teste da formalina, permite sugerir a existência de uma capacidade anti-nociceptiva periférica, envolvendo o sistema opióide.

Entretanto, Carvalho et al, 2009 [46] investigou o mecanismo de ação do extrato aquoso de *E. velutina*. Após o tratamento dos animais com o extrato, a análise de segmentos do tecido do íleo mostrou resposta contrátil a estímulos elétricos, descartando a possibilidade de um mecanismo de ação semelhante a opiáceos. Outros dados mostraram que as contrações induzidas pelo extrato foram reduzidas por atropina e tetrodotoxina (um antagonista muscarínico e um bloqueador de canais de sódio) indicando que o extrato pode atuar por uma via colinérgica. Os tecidos mostraram resposta contrátil a agonistas muscarínicos, especialmente em relação ao mecanismo M3.

Por outro lado, notou-se que as contrações induzidas pelo extrato foram também bloqueadas por bicuculina (um bloqueador  $\text{GABA}_A$ ), ao mesmo tempo em que as contrações

induzidas por GABA e seus agonistas também foram bloqueadas por atropina e tetrodotoxina. Estas informações sugerem que as contrações podem ser mediadas em parte pelo receptor GABA<sub>A</sub>.

Ainda sobre este estudo, vale a pena ressaltar que os receptores GABA<sub>A</sub> encontrados no íleo dos animais é semelhante aos encontrados no seu SNC, e uma vez que os componentes da *E. velutina* provocam sua ativação, isto pode explicar o porquê de seu efeito inibitório sobre o SNC.

### 3.3.2. *Passiflora edulis*

O gênero *Passiflora* pertence à família Passifloraceae que compreende cerca de vinte gêneros e seiscentas espécies [47]. Este é o gênero predominante desta família, representado por aproximadamente quatrocentas espécies, distribuídas especialmente na região centro-norte do Brasil. O nome *Passiflora* é atribuído ao significado místico das características físicas de suas flores, nas quais os escritores do século XVI interpretaram suas diferentes partes como representando os símbolos da Paixão de Cristo. Por esta razão, esses vegetais são conhecidos na Europa e América do Norte como flor-da-paixão [47-48].

Partes aéreas de espécies de *Passiflora*, especialmente *Passiflora alata* Dryander, *Passiflora edulis* Sims e *Passiflora incarnata* Linneaus têm sido tradicionalmente utilizadas na Europa e América para tratar ansiedade e nervosismo [49-50], sendo relatado também, o uso do maracujá contra febres intermitentes, inflamações cutâneas, erisipela e como medicação antigotosa; suas raízes são consideradas anti-helmínticas e antiinflamatórias, e os frutos são utilizados como alimento [51].

As principais substâncias bioativas no gênero *Passiflora* são os flavonóides C-glicosídeos derivados de apigenina e luteolina (vitexina, isovitexina, orientina, isoorientina, entre outros), considerados atualmente a melhor opção de marcadores de qualidade para este gênero [52].

Em *P. edulis*, a presença dos flavonóides vitexina, orientina isovitexina e rutina foi confirmada por Freitas, 1985 e Müller et al, 2005 [48, 53], mas novos flavonóides foram encontrados por Bosque-Pérez; Mareck, 1991 [54]: luteolina 6-C-chinovosídeo e luteolina 6-C-fucosídeo, estes últimos ainda não detectados em outras espécies de *Passiflora*.

Deste modo, embora diversos experimentos *in vivo* tenham sido realizados a fim de precisar a atividade farmacológica de *Passiflora*, ainda não é possível atribuir todos os efeitos a uma classe específica de compostos, sendo a provável ação resultante do efeito conjunto do fitocomplexo constituído principalmente por diversos alcalóides e flavonóides [51].

Lutomski; Malek, 1975 [55], estudando sucos obtidos de *P. edulis* Sims, forma *flavicarpa* e de *P. edulis* Sims, concluíram que após administração oral a camundongos, houve diminuição significativa da movimentação espontânea dos animais, bem como diminuição da irritabilidade e aumento no tempo de busca a alimentos. Este efeito sedativo do suco de *P. edulis* foi atribuído à presença de pequenas quantidades de alcalóides do grupo harmana e flavonóides.

Vale; Leite, 1983 [56] constataram que o extrato aquoso de folhas de *P. edulis* apresenta baixa toxicidade, evidenciada pela elevada DL50 por via intraperitoneal (1000 mg/kg). O extrato de *P. edulis* apresentou atividade depressora geral do SNC, uma vez que ocasionou diminuição na movimentação espontânea de camundongos, potenciou a ação hipnótica do pentobarbital e induziu modificações tais como: prolongamento do tempo de sono barbitúrico, redução da temperatura corporal, potenciação da ação de outros depressores como a morfina, bloqueio parcial do efeito estimulante da anfetamina, catatonía e ptose palpebral. A infusão de folhas (chá) também foi eficiente na potencialização da ação hipnótica do pentobarbital, sendo esta atividade idêntica à do extrato aquoso de folhas. Este fato é de grande relevância, uma vez que esta forma de preparo seria semelhante à empregada com fins terapêuticos. Porém, os autores destacaram não estar completamente elucidado o mecanismo da ação psicofarmacológica do extrato de *P. edulis*.

Porém no estudo realizado por Maluf et al, 1991 [57], a toxicidade de *P. edulis* foi estudada em ratos, camundongos e voluntários saudáveis. Verificou-se que algumas amostras das folhas de *P. edulis* possuem efeito depressor não específico sobre o SNC. Voluntários tratados com chá liofilizado de *P. edulis* a 10% (peso/volume), em geral, não apresentaram mudanças significativas na indução do sono. Já outros, apresentaram mudanças significativas na indução do sono, e outros ainda apresentaram valores aumentados da amilase sérica no dia após a ingestão do chá liofilizado de *P. edulis*, o que indica toxicidade no tecido pancreático. Outros apresentaram modificações diretas nos níveis de bilirrubina, o que indica disfunção hepatobiliar, além de um aumento no nível de ácido úrico.

Em estudos comparativos entre *P. incarnata* e *P. edulis* utilizando extrato metanólico em ratos, *P. incarnata* mostrou-se estatisticamente equivalente ao diazepam, enquanto que *P. edulis* não exibiu efeito. Concluiu-se no estudo que *P. incarnata* é a espécie de interesse medicinal, confirmando a necessidade de discriminá-la claramente da *P. edulis* [60].

Apesar de tantos estudos com as espécies abordadas anteriormente, ainda há necessidade de estudos que caracterizem as drogas vegetais, utilizando tecnologias analíticas,

ensaios farmacológicos e toxicológicos visando assegurar a sua qualidade, eficácia e segurança para uso humano.

### **3.4. Padronização das Partículas de Drogas Vegetais**

A maior parte dos medicamentos disponíveis ao público teve sua origem química a partir de vegetais. Como estes são usados para fins terapêuticos desde o início dos tempos, a utilização de tecnologias para otimizar sua eficácia é um processo natural.

Em consequência disto, a utilização de plantas na medicina tem ganho atenção por todo o mundo [16].

É necessário maior volume de dados científicos a respeito da eficácia e segurança dos fitoterápicos para que estes possam ser largamente incluídos na rotina de prescrição [59].

#### *3.4.1. Granulometria de Pós*

A análise granulométrica consiste na determinação das dimensões das partículas que constituem as amostras e no tratamento estatístico dessa informação. Basicamente, o que é necessário fazer, é determinar as dimensões das partículas e estudar a sua distribuição da seguinte forma [60]:

- ✓ Pelo peso de cada classe dimensional considerada;
- ✓ Pelo volume;
- ✓ Pelo número de partículas integradas em cada classe.

O conhecimento do tamanho e da distribuição do tamanho de partícula é um pré-requisito fundamental para muitas operações de produção e processamento, envolvendo sistemas de materiais particulados [61-63].

A distribuição do tamanho de partícula influi significativamente em várias etapas da produção, portanto a sua determinação é uma etapa crítica em todos os processos que de alguma maneira envolvam materiais na forma de pós. Caso realizada incorretamente, podem ser geradas perdas econômicas decorrentes de produtos de baixa qualidade.

A determinação de valores exatos de tamanho de partícula é extremamente difícil e encontram-se obstáculos diferentes para cada uma das técnicas [62-63].

Como cada técnica de análise é baseada em princípios físicos diferentes, os resultados obtidos por estas análises podem também ser diferentes [62-63].

Na indústria farmacêutica, a determinação da granulometria de pós é feita por meio de tamises (peneiras) com diferentes aberturas nominais de malha ( $\mu\text{m}$ ). Os tamises mais

utilizados são os de abertura 2000, 710, 500, 355, 250, 180, 125 e 90, que são organizados um sobre os outros como uma bateria [64-65].

As aberturas bem definidas entre os furos de tamises e a granulometria do pó são indicadas em mm ou  $\mu\text{m}$ . Outra maneira comum de caracterizar um pó é através do mesh – que designa o número de malhas por polegada do tamis [64].

A granulometria da matéria-prima vegetal é o parâmetro que determina a superfície de contato disponível para a interação com o solvente utilizado na obtenção de preparações intermediárias líquidas, como tintura e extratos [66].

É importante que a matéria-prima vegetal esteja suficientemente pulverizada para que se consiga um rendimento ótimo no processo de extração dos constituintes químicos de interesse farmacêutico [67].

Uma quantidade determinada da droga vegetal em pó é então colocada sobre o primeiro tamis da bateria. A bateria é então agitada (em aparelhos ou mesmo manualmente) com movimentos horizontais rotativos e movimentos verticais, em torno de 15 minutos, no mínimo, de forma a promover a passagem do pó nas diferentes malhas. O material remanescente em cada tamis é pesado e a granulometria calculada como porcentagem da quantidade total. A granulometria do material a ser utilizado vai depender do tipo de extração que será empregado [64-65].

#### 3.4.2. *Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)*

O microscópio eletrônico de varredura (MEV) é um equipamento que pode fornecer rapidamente informações sobre a análise microestrutural de amostras sólidas. Sua utilização é comum em biologia, farmácia, odontologia, engenharia, química, metalurgia, física, medicina e geologia [68].

O princípio de funcionamento de um MEV consiste em utilizar um feixe de elétrons de pequeno diâmetro para explorar a superfície da amostra, ponto a ponto, por linhas sucessivas e transmitir o sinal do detector a uma tela catódica cuja varredura está perfeitamente sincronizada com aquela do feixe incidente [69-70].

O princípio de operação baseia-se fundamentalmente na quantificação dos elétrons secundários emitidos por uma amostra como resposta a uma excitação eletrônica incidente. Esta medida de elétrons secundários (ES) permite uma definição qualitativa da morfologia e topografia da amostra.

Uma das principais razões da utilidade da microscopia eletrônica de varredura é a alta resolução das imagens que pode ser obtida quando as amostras são observadas [68, 71]. Outra

característica importante do MEV é a aparência tridimensional da imagem da amostra, resultado direto da grande profundidade de campo. Permite, também, o exame em pequenos aumentos e com grande profundidade de foco, o que é extremamente útil, pois a imagem eletrônica complementa a informação dada pela imagem óptica [68].

A imagem formada a partir do sinal captado na varredura eletrônica de uma superfície pode apresentar diferentes características, uma vez que a imagem resulta da amplificação de um sinal obtido de uma interação entre o feixe eletrônico e o material da amostra. Diferentes sinais podem ser emitidos pela amostra. Dentre os sinais emitidos, os mais utilizados para obtenção da imagem são originários dos elétrons secundários e/ou dos elétrons retroespalhados [68, 72].

Os elétrons secundários são bem pouco energéticos. Eles não podem percorrer um trajeto importante dentro do material. Eles provêm, portanto, de uma zona da ordem de alguns angstroms (Å) em torno do feixe incidente. Os elétrons secundários são as interações que permitem obter a melhor resolução [68].

Os elétrons retroespalhados possuem uma energia que é em torno daquela do feixe incidente (choques elásticos). A resolução será, portanto, maior à medida que a tensão for mais fraca. Mas é preciso salientar o fato de que se produzem menos elétrons retroespalhados à medida que a tensão diminui [68].

Os parâmetros que mais influenciam na resolução da imagem em um MEV são:

- ✓ Tensão de aceleração dos elétrons;
- ✓ Corrente da sonda: quanto maior a corrente, maior é o diâmetro do feixe;
- ✓ Distância entre a amostra e a lente objetiva.

No âmbito farmacêutico a microscopia eletrônica de varredura vem sendo utilizada na identificação farmacognóstica das espécies vegetais, bem como na caracterização da morfologia e tamanhos de partículas do pó [73-74].

O diâmetro médio das partículas, para a amostra de carqueja (*Baccharis trimera Less*) moída foi medido através de microscopia eletrônica de varredura, com aumento de 20 vezes, utilizando-se o software Size Meter [74].

A análise morfológica dos pós foliolares de *I. suffruticosa* e *I. truxillensis* mostrou através de MEV que a forma e ornamentação dos tricomas tectores constituem bons caracteres para a diagnose da matéria-prima pulverizada “anileira”, desde que as partículas não sejam menores que 53 µm [75].

### 3.5. Análise térmica

O termo análise térmica refere-se a um grupo de técnicas térmicas através das quais uma propriedade física de uma substância e/ou de seus produtos de reação é medida em função da temperatura e/ou do tempo, enquanto a substância é submetida à programação controlada de temperatura. No setor farmacêutico, as técnicas mais frequentemente utilizadas são a calorimetria exploratória diferencial (DSC), a análise térmica diferencial (DTA) e a termogravimetria (TG)/termogravimetria derivada (DTG) [76-77].

Na indústria farmacêutica a análise térmica vem sendo largamente utilizada com diversos fins: caracterização de sólidos, estudos de estabilidade e de polimorfismo, verificação de formas cristalinas e amorfas, determinação de pureza, interação entre componentes de uma formulação, dentre outros [79-80].

#### 3.5.1. Termogravimetria (TG)

A termogravimetria é a técnica na qual a massa de uma substância é medida em função da temperatura ou do tempo, enquanto a substância é submetida a uma programação controlada de temperatura. Os experimentos são executados por meio de uma termobalança de elevada sensibilidade, reprodutibilidade e resposta rápida às variações de massa [78].

O registro é feito através de uma curva TG ou termogravimétrica que fornece informações relativas à composição e estabilidade térmica da amostra, dos produtos intermediários e do resíduo formado. Dada a natureza dinâmica da variação de temperatura da amostra para originar curvas TG, alguns fatores podem influenciar a natureza, a precisão e a exatidão dos resultados experimentais. Segundo Craig; Reading, 2007; Canevarolo-Junior, 2004 e Wendlandt, 1986 [82-84] entre estes fatores destacam-se:

- ✓ Fatores instrumentais: razão de aquecimento, atmosfera (N<sub>2</sub>, ar ou outros), fluxo do gás, composição e geometria do porta amostra, bem como tamanho e forma do forno;
- ✓ Fatores relacionados às características da amostra: quantidade, granulometria, forma cristalina, empacotamento, condutividade térmica, solubilidade dos gases liberados da amostra e calor de reação envolvido.

#### 3.5.2. Análise térmica diferencial (DTA)

A análise térmica diferencial mede a diferença de temperatura (DT) entre a substância e o material de referência (termicamente estável) em função da temperatura ou do tempo,

enquanto ambos são submetidos a uma programação controlada de temperatura. A temperatura é medida por termopares conectados aos suportes metálicos dos compartimentos onde são acondicionados a amostra e o material de referência, ambos contidos no mesmo forno. As variações de temperatura na amostra são devidas às transições entálpicas, reações endotérmicas e/ou exotérmicas [78].

As curvas DTA representam os registros de  $\Delta T$  em função da temperatura (T) ou do tempo (t), de modo que os eventos são apresentados na forma de picos. Os picos ascendentes caracterizam os eventos exotérmicos e os descendentes os endotérmicos [82, 84-85].

### 3.5.3. *Análise térmica aplicada a drogas vegetais*

Silva; Paola; Matos, 2007 [81] descreveram que a análise térmica representa um conjunto de técnicas importantes para a caracterização de matérias-primas vegetais, podendo ser aplicadas rotineiramente pela indústria farmacêutica.

Diversos estudos utilizando técnicas térmicas para caracterização de matérias-primas vegetais são relatados na literatura. Alguns exemplos são descritos a seguir.

Benício; Neto; Sousa, 2010 [86] empregaram estas técnicas para avaliar o comportamento térmico do óleo extraído de sementes de Nim Indiano (*Azadirachta indica*). O estudo possibilitou a verificação da decomposição do óleo, que ocorre em três etapas. A primeira inicia a 197,18 °C e representa perda de 69,16% de massa (relativa à decomposição de ácidos graxos poliinsaturados), a segunda tem início a 388,39°C, com perda de 14,90% da massa inicial (relativo aos ácidos graxos monoinsaturados) e a terceira etapa, que ocorre a partir de 440,36 °C, representa perda de 14,15% da massa inicial, e é atribuída à decomposição dos ácidos graxos saturados.

Utilizando TG/DTG e DSC Reda et al, 2005 [87] determinaram o comportamento térmico dos óleos provenientes das sementes de limão rosa (*Citrus limonia* Osbeck) e limão siciliano (*Citrus limon*). Através destas técnicas, foi possível detectar que a decomposição térmica desses óleos ocorre à temperatura de 250 °C, caracterizando esses óleos como portadores de uma boa estabilidade térmica. A partir de avaliações termoanalíticas, espectroscópicas e cromatográficas, neste estudo, foi possível concluir que os óleos das sementes de limão rosa e limão siciliano podem ser utilizados como fonte alimentícia.

Araújo et al, 2006 [77] determinaram o teor de umidade e cinzas em várias amostras de guaraná (*Paullinia cupana* Kunth), obtidas comercialmente, através de TG/DTG e DSC, comparando com as metodologias oficiais para estas determinações, previstas na Farmacopéia Brasileira (1988). O estudo obteve resultados satisfatórios, uma vez que ambas as

metodologias levaram a resultados semelhantes de umidade e cinzas totais. Das amostras estudadas, todas estavam dentro do limite aceitável de umidade (abaixo de 14%) e oito delas estavam acima do limite aceitável do teor de cinzas totais (acima de 2%) o que foi considerado como um provável indicador de adulteração.

Percebe-se, portanto, através dos dados desse estudo que o método termogravimétrico apresenta vantagem, uma vez que requer menor gasto de tempo e de materiais, permite a verificação simultânea do teor de umidade e cinzas, permite o acesso a todo o perfil termoanalítico da amostra, além de apresentar menor margem de erro. No estudo realizado por Noriega et al, 2010[88] os métodos de termogravimetria (TG), termogravimetria derivada (DTG) e calorimetria exploratória diferencial (DSC) foram utilizados para avaliar o comportamento térmico de *Passiflora edulis Sims.*, em comparação com sua provável substância marcadora, a rutina. As análises termogravimétricas indicaram que a decomposição térmica das amostras de folhas, galhos, bem como da rutina ocorrem em três etapas. Por outro lado, a curva DSC da amostra de rutina mostrou acentuada diferença entálpica da decomposição desta em relação às amostras de casca e folhas da planta.

Para controle da qualidade de extratos de *Cissampelos sympodialis* Eichl. (milona), Aragão, 2002 [89] utilizaram a termogravimetria. Os autores verificaram que o comportamento térmico dos extratos de raízes e folhas de milona assemelhou-se ao dos alcalóides warifteína e metilwarifteína. Desta forma, detectou-se que devido à alta estabilidade térmica dos componentes do extrato (que se decompõem em temperaturas superiores a 200,00 °C), é possível realizar sua secagem (para melhor aproveitamento industrial) através de métodos que utilizam altas temperaturas a exemplo do *spray dryer*.

Silva-Júnior et al, 2006 [90] utilizaram, também, a termogravimetria para padronizar extratos nebulizados e liofilizados de *Symphytum officinale* L., secos com o adjuvante hidroxietilcelulose (HEC). Novamente, a TG obteve resultados semelhantes aos ensaios gravimétricos de perda por dessecação, mostrando sua exatidão. O estudo detectou que o extrato seco inicia sua decomposição à temperatura de 120,00 °C.

Camelo, 2009 [91] utilizou a termogravimetria e a calorimetria exploratória diferencial para caracterizar o extrato liofilizado de *Vismia guianensis*, mostrando que sua decomposição ocorre em cinco estágios, sendo os dois primeiros relativos à perda de água e compostos voláteis. A partir dos dados provenientes de TG e DSC, pôde-se detectar na amostra um teor de 12,00% de umidade. Foi detectado também que os componentes do extrato sofrem decomposição exotérmica à temperatura a partir de 368,00 °C, resultando numa porcentagem de cerca de 1,64% de cinzas.

Diante dos resultados expostos, podemos afirmar que a análise térmica é uma importante ferramenta, que quando adequadamente utilizada, pode ser utilizada no controle da qualidade de matérias-primas e produtos fitoterápicos na indústria farmacêutica, garantindo maior segurança e eficácia de seu uso.

### **3.6. Pirólise acoplada a CG/EM**

A palavra pirólise possui origem grega e significa “decomposição pelo calor”, ou seja, a degradação de um material por energia térmica. No entanto, a pirólise analítica é uma técnica de caracterização de determinado material, na ausência de oxigênio, pelas reações de degradação químicas induzidas por energia térmica. Esse processo resulta em um conjunto de pequenas espécies moleculares, as quais são relacionadas à composição da amostra original [92-94].

A espectrometria de massa é uma técnica analítica baseada na determinação da massa atômica ou molecular de uma espécie individual numa amostra. O grande desenvolvimento da técnica, resultando no aumento de sua aplicabilidade, ocorreu a partir da década de 70, devido ao acoplamento às técnicas cromatográficas, ao surgimento de novas formas de ionização, e ao desenvolvimento de computadores e aplicativos. A importância do seu acoplamento com técnicas cromatográficas deve-se ao tipo de informação que se obtém, como identificação de compostos, quantificação de compostos conhecidos e elucidação da estrutura e de propriedades químicas de moléculas. Na espectrometria de massa, moléculas gasosas são ionizadas, aceleradas por um campo elétrico para um analisador, numa região de alto vácuo, e então separados de acordo com sua relação massa/carga. A grande quantidade de energia que normalmente é fornecida à molécula para que ocorra a ionização, faz com que esta fragmente, resultando em espectros de massas característicos de cada substância. O espectro de massas corresponde à abundância relativa dos íons em função da razão massa/carga (razão  $m/z$ ) [95].

A cromatografia acoplada à espectrometria de massa é uma técnica usada tanto para a identificação qualitativa e quantitativa quanto para a medição de componentes individuais em misturas complexas. O fato da fase móvel ser um gás cria características únicas adicionais, uma das quais tem a ver com mecanismo da separação, visto que envolve as pressões de vapor relativas dos componentes, pois como a fase móvel é um gás, os componentes da mistura também devem ser gases, ou pelo menos líquidos, com pressões de vapor relativamente alta sendo necessário utilizar temperaturas elevadas para que os componentes da mistura a ser separados se apresentem como uma fase gasosa móvel [96].

Desta forma pode-se associar a pirólise a cromatografia gasosa para obtenção de compostos ou fragmentos na fase gasosa. Quando essa associação ou acoplamento inclui também a espectrometria de massas, as espécies produzidas podem ser identificadas e/ou quantificadas [97].

### 3.6.1. *Aplicações da pirólise acoplada a CG/EM*

A técnica de pirólise isolada, ou associada a outras técnicas pode ser aplicada com diversas finalidades. Alguns exemplos de sua aplicação são mostrados a seguir:

As misturas de poliestireno (PS) usando várias proporções de cloreto de vinilo (PVC) foram analisadas utilizando termogravimetria dinâmica em atmosfera inerte até 800 °C em diferentes razões de aquecimento. Utilizou-se também pirólise acoplada à cromatografia gasosa e espectrometria de massa (Pir-CG/EM) em intervalo de temperatura (330-370 °C) [98].

Em estudo realizado por Ertas; Alma, 2010 [99] foi produzido e caracterizado biocombustível a partir de *Laurus nobilis* L.. Os efeitos de diferentes temperaturas de pirólise, tamanhos de partículas e taxas de fluxo de gás de arraste sobre os rendimento e composição dos produtos de pirólise foram investigados. Verificou-se que a temperatura de pirólise e vazão do gás de arraste teve um forte efeito sobre o rendimento dos produtos da pirólise. O bio-óleo obtido em condições ótimas de pirólise foi analisado através de análise elementar por cromatografia de coluna, Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR), cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (CG-EM) e Cromatografia de Permeação em Gel (CPG).

Em outro estudo, realizado por Acikgoz; Kockar, 2009 [100], a pirólise foi aplicada para caracterização do óleo obtido a partir de sementes de linhaça (*Linum usitatissimum* L.). A composição química do óleo e frações foi investigada através de técnicas cromatográficas e espectroscópicas (RMN 1H, IR). Os resultados da cromatografia de adsorção do óleo mostraram que o mesmo consiste em 88% em peso de n-pentano solúvel.

No estudo realizado por Miranda et al, 2009 [101] três produtos diferentes foram obtidos a partir da pirólise de casca de laranja. O bio-óleo obtido foi caracterizado por CG/EM. A análise termogravimétrica em 1, 5, 10, 20 e 40 °C min<sup>-1</sup>, mostrou três diferentes etapas sobrepostas resultando em uma perda de massa média de 80% na faixa de temperatura de 114 a 569 °C. O bio-óleo caracterizado por CG/EM e FTIR permitiu a identificação de limoneno como seu principal componente enquanto que outros compostos identificados incluíram d-limoneno, álcoois, fenóis, benzeno, tolueno, xileno e ácidos carboxílicos.

As plantas das espécies *Rhus vernicifera*, *Rhus succedanea* e *Melanorrhoea usitate* foram estudadas utilizando pirólise acoplada à cromatografia gasosa/espectrometria de massa (Pir-CG/EM) para a identificação das mesmas. Os resultados mostram que a pirólise é uma técnica alternativa que pode ser eficiente para identificação das espécies [102].

Foi investigada a utilidade da técnica de pirólise acoplada à cromatografia à gás/espectrometria de massas (Pir-CG/EM) na avaliação da identidade e reprodutibilidade de diferentes marcas e lotes de amostras comerciais de *Cymbopogon citratus* Stapf. (comercializado como chá). A análise de componentes principais dos dados de pirólise foi capaz de representar 84,7% da variabilidade total nos dois primeiros componentes calculados e levou a correta classificação das amostras testadas. O método foi capaz de revelar diferenças importantes entre amostras, quando diferentes lotes da mesma marca foram comparados [103].

Análise termoquímica acoplada à cromatografia gasosa e espectrometria de massa (CG/EM), foi aplicada para a determinação de alquilfenóis em folhas de *Ginkgo biloba*. Análise Termoquímica acoplada a Cromatografia Gasosa (TMAH-GC) permitiu determinação altamente sensível de alquilfenóis, incluindo ácidos ginkgolic, ginkgols e seus derivados metílicos nos pirogramas obtidos [104].

A impressão digital (*fingerprint*) de *Dendrobium candidum* Wall. ex Lindl. de três diferentes localizações geográficas e duas outras espécies diferentes foram analisados a partir de pirólise acoplada a cromatografia gasosa. As impressões digitais de 16 amostras de diferentes locais de crescimento e espécies apresentaram boa similaridade e reprodutibilidade. Além disso, a discriminação das amostras de diferentes locais de cultivo e espécies foi obtida por análise de agrupamento hierárquico. Assim, concluiu-se no trabalho, que a impressão digital Pir-CG-EM combinada com enfoque quimiométrico é um método simples, rápido e seletivo que é adequado para o controle de qualidade das matérias-primas de fitoterápicos [105].

### **3.7. Ensaios Farmacológicos: Ansiedade**

Para se estudar os mecanismos neurais envolvidos na ansiedade ou para se determinar a atividade ansiolítica de uma droga, é de fundamental importância a utilização dos chamados modelos experimentais [106].

A maioria dos modelos experimentais que utilizam animais de laboratório para avaliar a ansiedade baseia-se, principalmente, em situações conflitantes, como, por exemplo, colocar

animais em um ambiente estranho (“estressante”) ou em frente a um predador, gerando algumas alterações comportamentais, acompanhadas de desvios fisiológicos [107].

Assim, o que se reproduz nos animais é um estado semelhante à ansiedade no homem, medida através de sinais exteriores, como a atividade exploratória, locomotora e social, que podem ser avaliados por meio de testes relativamente simples de serem realizados [106].

### 3.7.1. *Labirinto em Cruz Elevado*

O Labirinto em Cruz Elevado é comumente usado como modelo não-condicionado de ansiedade em roedores [108-109]. Foi utilizado, inicialmente, por Handley e Mithani em 1984, a partir de um modelo criado por Montgomery em 1955 [110].

Bradley et al, 2007 [109] descrevem que o teste do labirinto em cruz elevado mostra sensibilidade bidirecionada para agentes ansiolíticos e ansiogênicos através do livre acesso que o animal tem a ambiente que provoca e outro que alivia a ansiedade, ou seja, um braço escuro, protegido e fechado ou um braço não protegido, iluminado e aberto. O aparelho é designado, portanto, para diferenciar respostas ansiolíticas e ansiogênicas por meio de efeitos puramente locomotores, examinando a preferência do animal pelo ambiente aberto ou fechado, as medidas comportamentais incluem a frequência de entradas e a duração do tempo gasto nos braços e na plataforma central.

Esta metodologia se baseia no comportamento natural relatado como ansiedade em roedores que preferem permanecer em ambiente escuro, perto de paredes e evitar alturas, e quando, portanto, condicionados a um ambiente aberto, claro e não protegido mostram sinais de ansiedade-congelamento, defecação e micção. Se o agente em estudo possui propriedades ansiolíticas, o animal explora ambos os braços, abertos e fechados, mas tipicamente entrará com maior frequência e permanecerá mais tempo nos braços abertos. Uma maior intensidade de “ansiedade” equivale à maior preferência nos braços fechados [111].

O Labirinto em Cruz Elevado é feito de plástico e consiste em quatro braços, sendo dois braços com paredes laterais e sem cobertura (braços fechados), medindo 30 cm de comprimento por 6 cm de largura e 16 cm de altura, colocados perpendicularmente a dois braços desprovidos de paredes laterais (braços abertos) com o mesmo comprimento e largura. Cada braço é posicionado a 90° do braço adjacente e cruzam-se numa área central onde o animal é posicionado. O labirinto é apoiado sob um suporte com 25 cm elevado em relação ao solo.



**Figura I-1:** Ilustração do Labirinto em cruz elevado.

### 3.8. Ensaios de Citotoxicidade

Com o controle cada vez mais rigoroso em relação ao uso de animais de laboratório, há a necessidade de desenvolver e padronizar testes *in vitro* que possam detectar a toxicidade de dispositivos para uso em seres humanos, principalmente aqueles de aplicação clínica.

Os testes de citotoxicidade consistem em colocar o material a ser testado direta ou indiretamente em contato com uma cultura de células, e em tempo apropriado, observar as alterações celulares que este material ocasionou. As alterações celulares podem ser observadas de diferentes modos, como por exemplo, a incorporação de corantes vitais ou a inibição da formação de colônias celulares provocadas pela ação de certas substâncias. O parâmetro mais utilizado para se testar a toxicidade de um material é a avaliação da viabilidade celular que uma cultura de células apresenta após permanecer em contato com este material. Esta viabilidade só poderá ser detectada caso seja incorporado/ ao meio de cultura um corante vital. Estes corantes são captados rapidamente pelas células vivas, atravessam a membrana celular fixando-se na matriz lisossomal corando as células. Quando os materiais testados apresentam-se nocivos às células, estas entram em processo de necrose ocorrendo o rompimento da sua membrana, e conseqüentemente, liberam o corante. Este processo determina ao redor e sob o material uma região com células mortas descoradas denominadas de “halo de inibição”. Deste modo, é possível diferenciar células vivas das células mortas pela intensidade ou ausência de coloração que a célula apresenta ao final do ensaio [112].

O estudo *in vitro* utilizando culturas de células tem se mostrado preferencial devido à homogeneidade das amostras e à facilidade de uma padronização, pois é possível o controle

de fatores tais como: pH, temperatura, pressão osmótica, tensão de CO<sub>2</sub> e de O<sub>2</sub>. Porém, algumas desvantagens devem ser consideradas para este método de estudo, entre elas podemos citar a necessidade de se trabalhar em ambiente estéril e asséptico, o que exige certa prática por parte do pesquisador, e ainda, o custo de um experimento feito em cultura de células é muito maior do que o mesmo feito em animais [113-114].

### 3.8.1. *Ensaio do Vermelho Neutro*

O ensaio de incorporação do vermelho neutro é um teste *in vitro* eficaz, reproduzível e quantitativo para selecionar substâncias potencialmente tóxicas. Está baseado no fato de que o vermelho neutro é um corante solúvel em água e que passa através da membrana plasmática e se concentra nos lisossomas de células vivas onde se fixa por ligações eletrostáticas nos sítios aniônicos da matriz lisossomal. Muitas substâncias danificam as membranas celulares e lisossomais resultando no decréscimo de captura e ligação do vermelho neutro. Portanto é possível distinguir entre células vivas e mortas pela medida da intensidade de cor final [115].

# ***CAPÍTULO II: Artigo I***

---

**Caracterização de drogas vegetais com diferentes tamanhos de partículas  
utilizando diferentes técnicas analíticas**

Artigo submetido para publicação no *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*

## **Caracterização de drogas vegetais com diferentes tamanhos de partículas utilizando diferentes técnicas analíticas**

Lidiane Pinto Correia<sup>1,3</sup>, José Valdilânio Virgulino Procópio<sup>1</sup>, Cleildo Pereira de Santana<sup>3</sup>, Ana Flávia Oliveira Santos<sup>1</sup>, Horacina Maria de Medeiros Cavalcante<sup>2</sup>, Rui Oliveira Macêdo<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> *Departamento de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Pernambuco, Avenida Artur de Sá, Cidade Universitária, Recife, PE, Brasil, 50740-521*

<sup>2</sup> *Departamento de Ciências Farmacêuticas, Laboratórios Unificados de Desenvolvimento e Ensaio de Medicamentos, Universidade Federal da Paraíba, Campus I, João Pessoa, PB, Brasil, 58059-970*

<sup>3</sup> *Departamento de Farmácia, Universidade Estadual da Paraíba, Rua das Baraúnas, Bodocongó, Campina Grande, PB, Brasil, 58429-500*

E-mail: [lidiane@lidiane.org](mailto:lidiane@lidiane.org)

### **Resumo**

Técnicas analíticas vem sendo utilizadas para caracterizar drogas vegetais, seus derivados e produtos. O objetivo desse trabalho consistiu na caracterização do pó de *Erythrina velutina* Willd obtido em diferentes tamanhos de partícula. As amostras utilizadas foram denominadas de MUF01 (710µm), MUF03 (180 µm) e MUF05 (75 µm). As técnicas empregadas foram microscopia eletrônica de varredura (MEV), análise térmica através da termogravimetria (TG) e da análise térmica diferencial (DTA), junto com a pirólise acoplada a cromatografia gasosa/espectrometria de massa (Pir-CG/EM). MEV detectou divergência nos resultados esperados da granulometria. As técnicas termoanalíticas (TG e DTA) mostraram o perfil de decomposição térmica das amostras, correspondente a fenômenos físicos e químicos ocorridos. Os dados cromatográficos relativos a área de pico dos compostos analisados evidenciaram diferenças na composição química das amostras MUF01, MUF03 e MUF05 a 300, 450 and 600 °C. Neoftadieno 2,6,10-Trimetil, 14 e 3-Eicosino foram as substâncias identificadas nessas três temperaturas, classificando e diferenciando os pós das plantas pelo valor das áreas de pico na seguinte ordem decrescente: MUF05>MUF03>MUF01, fato confirmado pelo fluxo de calor no DTA, perda de massa no TG e uniformidade de tamanho do MEV.

*Palavras-chave: Erythrina velutina Willd, Pir-CG/EM, Análise térmica, Microscopia eletrônica de varredura*

## 1. Introdução

*Erythrina velutina* Willd (Fabaceae) é uma árvore endêmica das regiões semi-áridas do Brasil. Esta espécie é conhecida popularmente como "mulungu". Na medicina popular é utilizada como sudorípara, calmante e no tratamento de verminoses [1-2].

O processo de pulverização da matéria-prima vegetal constitui uma etapa crítica na obtenção de preparações intermediárias e de medicamentos fitoterápicos, desse modo, o controle da tenuidade de pós é uma etapa importante no processo de produção [3].

Métodos analíticos vem sendo utilizados para auxiliar na caracterização de compostos oriundos de droga vegetal, seus extratos e produtos. A MEV é utilizada para caracterizar a morfologia e análise do tamanho de partículas de drogas vegetais [4-9]; a análise térmica e a pirólise acoplada à cromatografia gasosa/espectrometria de massa para autenticar e avaliar a qualidade de produtos farmacêuticos [10-11], bem como de extratos nebulizados de plantas medicinais como *E. mulungu* [12] e de diferentes marcas e lotes de chás de *Cymbopogon citratus* [13], através da caracterização e decomposição térmica de drogas e análise da impressão digital.

O objetivo deste trabalho consistiu em aplicar a Microscopia eletrônica de varredura (MEV), técnicas termoanalíticas (Termogravimetria (TG) e Análise Térmica Diferencial (DTA)) e pirólise acoplada à cromatografia gasosa/espectrometria de massa (Pir-CG/EM) para caracterização de pós com diferentes tamanhos de partícula de *Erythrina velutina* Willd.

## 2. Materiais e Métodos

### 2.1. Material Botânico

O material botânico utilizado neste estudo foi coletado no Município de Lagoa Seca-PB, sob coordenadas geográficas: latitude (07°09'10"), longitude (35°48'45"), altitude 585 m, e a distância da sede de 5 Km, durante os meses de março e abril de 2010, com o apoio da equipe técnica da Empresa de Assistência Técnica e Extensão Rural da Paraíba (EMATER-PB).

A *Erythrina velutina* Willd foi identificada por comparação com exsiccatas já depositadas no Herbário Prof. Jayme Coelho de Moraes, pelo botânico Prof. Dr. Leonardo Félix, conforme registro: 10240.

## 2.2. Preparação dos Pós

As folhas de *Erythrina velutina* foram desidratadas em estufa com circulação de ar com temperatura controlada de 40 °C. O material seco foi moído usando um moinho de quatro facas móveis e quatro fixas, da marca Marconi, modelo Willey, acoplado a um tamis de 10 mesh.

A droga vegetal pulverizada foi submetida a um sistema de peneiras com diferentes tamanhos de poros: 710, 355, 180, 150, e 75 µm. Os pós obtidos nestas diferentes granulometrias foram acondicionados separadamente em frascos de polietileno branco fosco devidamente fechados, para proteção da luz e da umidade e armazenados em temperatura ambiente, em média de 25 °C.

As amostras de 710, 180 e 75 µm foram caracterizadas por microscopia eletrônica de varredura; termogravimetria, análise térmica diferencial e pirólise acoplada à cromatografia gasosa/espectrometria de massa.

## 2.3. Determinação do Tamanho de Partículas

As análises microscópicas dos pós das plantas em diferentes granulometrias foram realizadas através de um microscópio eletrônico de varredura, modelo MEV TM-1000, Hitachi. Devido as irregularidades das partículas, o maior lado visualizado foi considerado como parâmetro de medida.

## 2.4. Estudos de Análise Térmica

### 2.4.1. Termogravimetria (TG)

As curvas termogravimétricas dinâmicas dos pós das plantas em diferentes granulometrias (710, 180 e 75 µm) foram obtidas em uma termobalança modelo TGA-50H, da Shimadzu, na razão de aquecimento de 10 °C min<sup>-1</sup>, variando de 25 °C até temperatura de 900 °C. Utilizou-se atmosfera de nitrogênio e de ar sintético, com fluxo de 50 mL min<sup>-1</sup>. Foi utilizado massa de 5,00 ± 0,05 mg acondicionada em cadinho de alumina para cada amostra. A calibração da termobalança foi feita utilizando oxalato de cálcio monohidratado. As curvas foram analisadas através do software Tasy 60, da Shimadzu, para caracterizar as etapas de perda de massa.

#### 2.4.2. *Análise Térmica Diferencial (DTA)*

As curvas térmicas diferenciais dos pós das plantas em diferentes granulometrias (710, 180 e 75  $\mu\text{m}$ ) foram obtidas em um analisador térmico diferencial, modelo DTA-50, da Shimadzu, na razão de aquecimento de  $10\text{ }^\circ\text{C min}^{-1}$ , variando de  $25\text{ }^\circ\text{C}$  até temperatura de  $900\text{ }^\circ\text{C}$ , em atmosfera de nitrogênio, com fluxo de  $50\text{ mL min}^{-1}$ . As amostras foram acondicionadas em cadinho de alumina utilizando massa de  $5,00 \pm 0,5\text{ mg}$  para cada amostra. A calibração do equipamento foi realizada através do ponto de fusão e entalpia dos padrões de índio e zinco. As curvas térmicas diferenciais foram analisadas usando o programa Tasy 60, da Shimadzu.

#### 2.5. **Pirólise acoplada a CG/EM (Pir-CG/EM)**

O processo pirolítico foi realizado usando um pirolizador (SHIMADZU, Pyr-4A), diretamente acoplado a um sistema de Cromatografia gasosa/Espectrometria de massas (SHIMADZU, GCMS-QP5050A). Foi utilizada uma coluna capilar com fase estacionária fenil:dimetilpolissiloxano (5:95) (com 30 m de comprimento, 0,25 mm de diâmetro interno e 0,25  $\mu\text{m}$  de tamanho de partícula). A temperatura da interface foi de  $300\text{ }^\circ\text{C}$ . O forno foi operado com a seguinte programação de temperatura  $50\text{ }^\circ\text{C}$  (inicial) e  $15\text{ }^\circ\text{C min}^{-1}$  até  $280\text{ }^\circ\text{C}$ , permanecendo nessa temperatura por 5 minutos. Utilizou-se como gás de arraste o Hélio a um fluxo de  $1,7\text{ mL min}^{-1}$  e uma razão de split de 1:20. O espectrômetro de massas foi configurado para varrer uma faixa de massa entre  $m/z$  50 e 450. Os espectros de massas foram obtidos por impacto eletrônico a uma energia 70 eV.

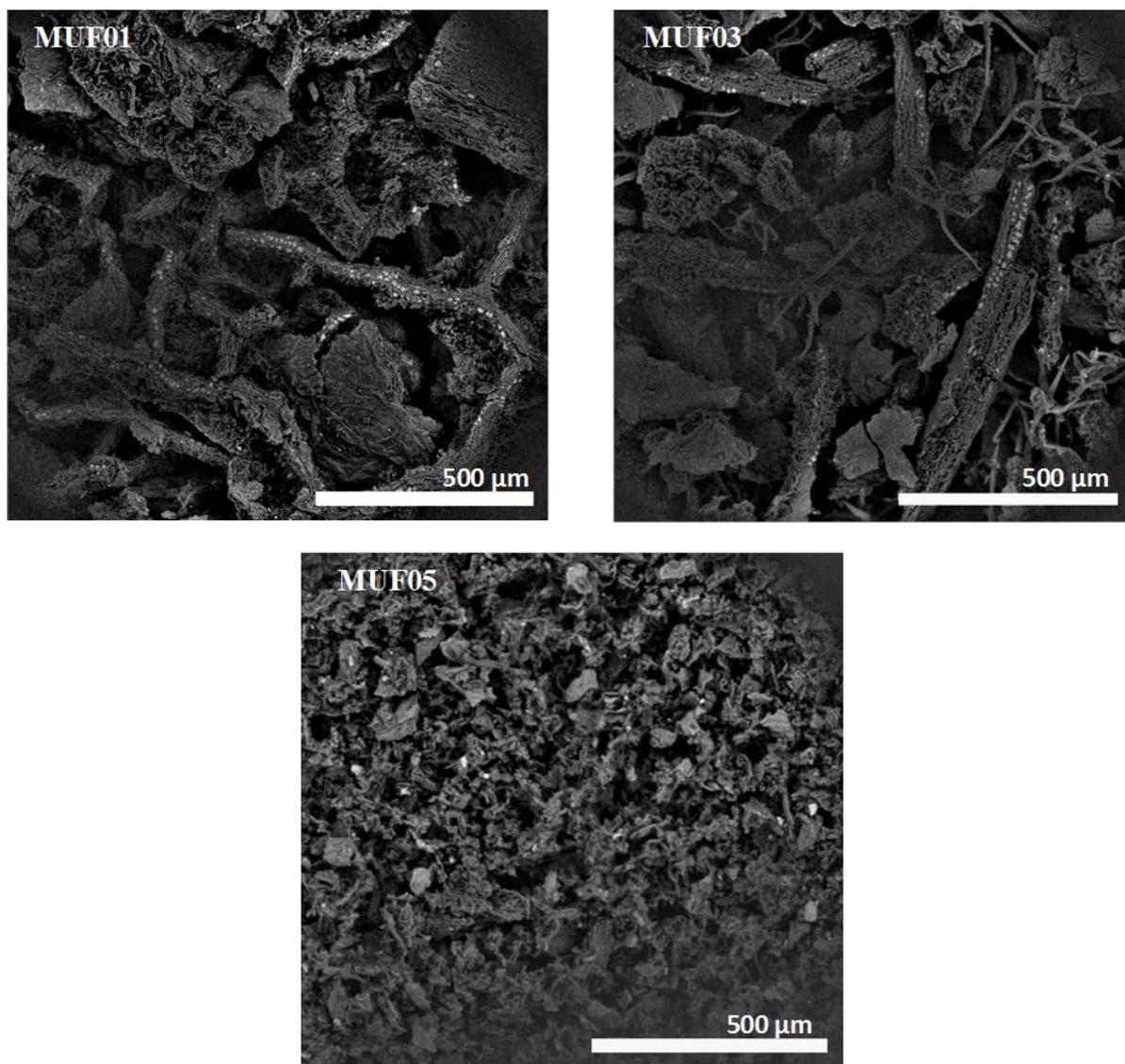
A amostra correspondente a uma minúscula porção dos pós das drogas vegetais foi colocada em cadinho de platina e introduzida no pirolizador nas temperaturas de 300, 450, e  $600\text{ }^\circ\text{C}$ , selecionadas de acordo com as etapas de termodecomposição visualizadas através da termogravimetria das amostras estudadas.

Os compostos químicos produzidos nos processos pirolíticos foram identificados através da análise comparativa com os espectros de massa da biblioteca Wiley, 6<sup>a</sup> Edição para o Class-5000.

### 3. Resultados e Discussões

#### 3.1. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

A **Figura II-1** mostra os diferentes tamanhos de partículas das amostras MUF 01, 03 e 05. É importante verificar em cada uma das amostras a diversidade morfológica dos grânulos, o que demonstra limitações no processamento de plantas para obtenção de pós uniformes.



**Figura II-1:** Eletromicrografias de varredura dos pós da planta em três diferentes tamanhos de partículas: MUF01, MUF03 e MUF05, correspondendo a 710, 180 e 75 µm, respectivamente.

Avaliando as imagens obtidas da MEV, determinou-se os tamanhos das partículas para cada pó, utilizando uma ferramenta do ImageJ, a qual relaciona tamanho com megapixels e cujos valores foram transferidos para uma planilha do excel. Os valores medianos e os limites inferiores e superiores mostraram a seguinte distribuição de tamanhos de partículas por

amostra, MUF01 573,14  $\mu\text{m}$ , variando de 234,2-1000  $\mu\text{m}$ ; MUF03 307,86  $\mu\text{m}$ , variando de 236,2-854,1  $\mu\text{m}$  e MUF05 62,3  $\mu\text{m}$ , variando de 44,3-89,5  $\mu\text{m}$ , respectivamente.

Algumas exceções foram verificadas na microscopia eletrônica, como a presença de partículas com tamanhos superiores ao diâmetro preconizado pelas malhas. Por exemplo, para a amostra MUF01, encontrou-se partículas medindo 1000  $\mu\text{m}$ ; da mesma forma pôde ser visto, partículas maiores que 800  $\mu\text{m}$  para a amostra MUF03, isto ocorre pelo fato da largura dessas partículas serem menor que 710  $\mu\text{m}$  e 180  $\mu\text{m}$ . Para a amostra MUF05, visualizou-se maior homogeneidade no tamanho de partículas, embora se verifique diferentes morfologias.

A determinação do tamanho de partículas por peneiras granulométricas, ou técnicas que permitam a passagem de partículas em diferentes posições conduz a erros técnicos na afirmação de que, aquele produto pulverizado contém partículas de tamanho abaixo daquele diâmetro preconizado.

A determinação do tamanho de partículas por tamisação não assegura que as partículas retidas em cada tamis são menores que o diâmetro pré-determinado pelas malhas. A caracterização por MEV conseguiu detectar essas anomalias de tamanhos e morfologias de partículas, permitindo uma melhor avaliação na tecnologia de produção dos pós das drogas vegetais.

## **3.2. Estudos de Análise Térmica**

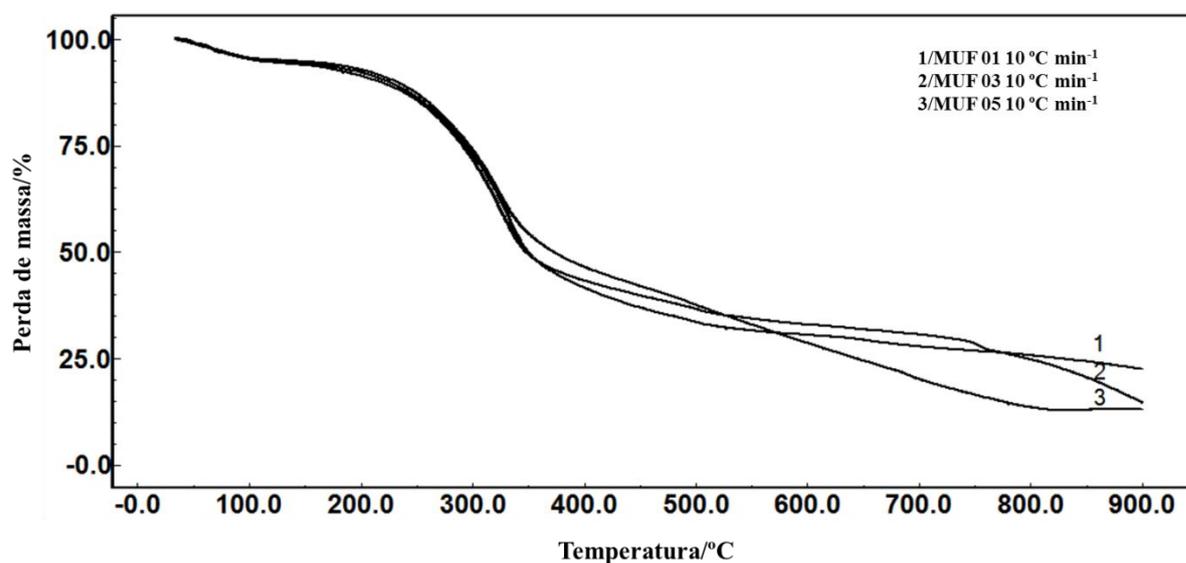
### *3.2.1. Termogravimetria (TG)*

As curvas termogravimétricas dinâmicas em atmosfera de nitrogênio (**Figura II-2**) das amostras MUF01, MUF03 e MUF05 apresentaram três etapas de decomposição. A primeira etapa que ocorreu na faixa de temperatura de 30-137 °C pode ser atribuída à perda de voláteis, majoritariamente água, representando 5,4; 5,7 e 4,7%, para MUF01, MUF03 e MUF05, respectivamente.

A segunda etapa de decomposição representa a degradação do conjunto dos macro e micro constituintes da amostra, ocorrendo nas faixas de temperatura de 231,0-350,0 °C; 230,0-349,0 °C e 230,0-344,0 °C correspondendo a uma perda de massa de 37,3% 38,2% e 34,3%, para MUF01, MUF03 e MUF05, respectivamente.

A terceira etapa de decomposição corresponde aos resíduos não degradáveis em atmosfera inerte, sendo que a 900 °C a amostra MUF01 manteve esse resíduo em um valor maior que a MUF03, e esta por sua vez maior que a MUF05. As faixas de temperatura e a

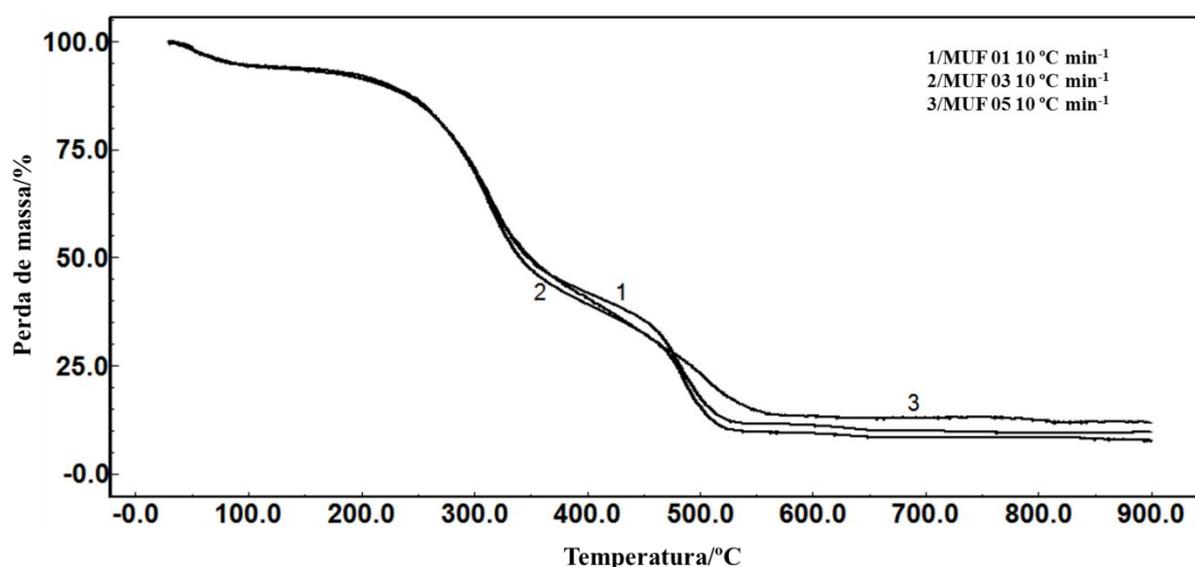
porcentagem de perda de massa para as amostras MUF01, MUF03 e MUF05, foram de: 350,0-900 °C (27,2%), 349,0-900 °C (35,0%) e 344,0-900 °C (43,3%).



**Figura II-2:** Curvas termogravimétricas dinâmicas em atmosfera de nitrogênio dos pós das folhas de *Erythrina velutina*.

A perda de massa final foi crescente com a diminuição do tamanho das partículas, sendo de 69, 79 e 82% para MUF01, MUF03 e MUF05, respectivamente, obedecendo a seguinte ordem: MUF01<MUF03<MUF05.

O perfil de decomposição térmica dinâmica em atmosfera de ar sintético dos pós das folhas de *Erythrina velutina* nos tamanhos de partícula 710, 180 e 75  $\mu\text{m}$ , está representado na **Figura II-3**.

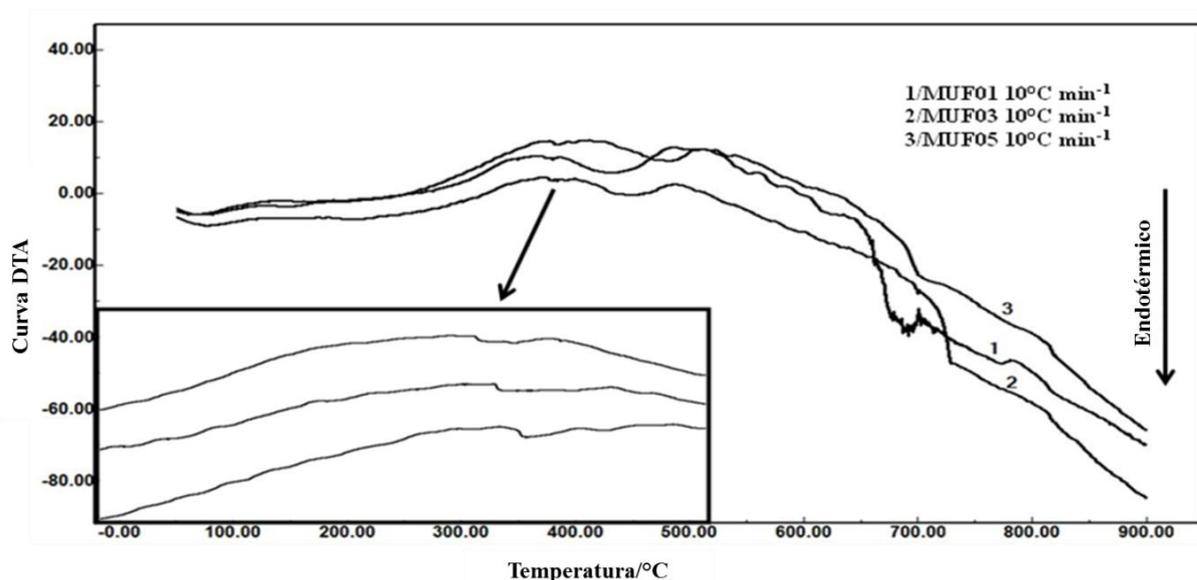


**Figura II-3:** Curvas termogravimétricas dinâmicas em atmosfera de ar sintético dos pós das folhas de *Erythrina velutina*.

As curvas termogravimétricas dinâmicas em atmosfera de ar sintético das amostras MUF01, MUF03 e MUF05 apresentaram quatro etapas de decomposição. A primeira etapa ocorreu na faixa de temperatura de 31-188 °C referente à perda de voláteis, majoritariamente água, nas proporções de 7,7; 7,8 e 7,3%, para as amostras MUF01, MUF03 e MUF05, respectivamente. A segunda etapa de decomposição das amostras ocorreram nas seguintes faixas de temperatura e perda percentual de massa, MUF01 227,8-353 °C (40,5%); MUF03 219,3-347 °C (41,8%) e MUF05 240-355 °C (38%). A terceira etapa ocorreu nas faixas de temperatura e perda de massa percentual MUF01 353,0-461,4 °C (15,4%); MUF03 347,0-471,5 °C (20,5%) e MUF05 355-478 °C (21,0%). A quarta etapa ocorreu nas faixas de temperatura e perda de massa percentual MUF01 461,4-513,6 °C (19%); MUF03 471,5-518,5 °C (16,7%) e MUF05 478-552,1 °C (13,1%). A amostra MUF05 mostrou maior proporção de resíduos não-degradáveis, equivalendo a aproximadamente 20 % de massa.

### 3.2.2. *Análise Térmica Diferencial (DTA)*

As curvas térmicas diferenciais dos pós da droga vegetal em diferentes tamanhos 710, 180 e 75  $\mu\text{m}$ , estão representadas na **Figura II-4**, por MUF01, MUF03 e MUF05, respectivamente.

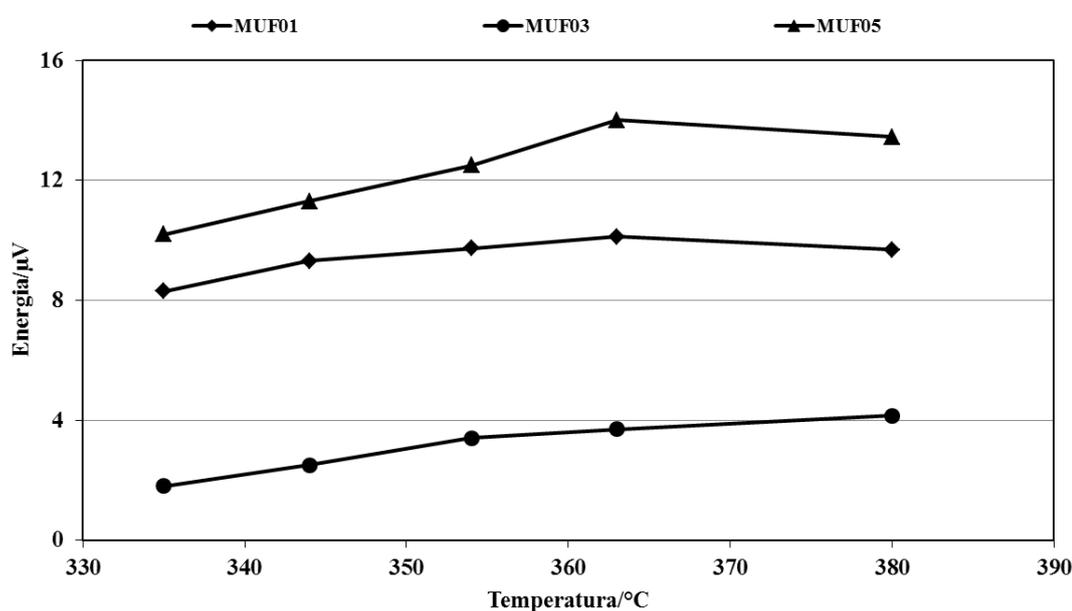


**Figura II-4:** Curvas térmicas diferenciais dos pós das folhas de *Erythrina velutina*.

Avaliando a faixa de temperatura de 230-380 °C, observa-se a presença de transições de fases, visualizadas através da ampliação dessa faixa, mostrada na **Figura II-4**.

As alturas dos picos correspondentes a segunda etapa de decomposição na termogravimetria em atmosfera de nitrogênio foram: 9,44; 3,09 and 11,12  $\mu\text{V}$ , para MUF01, MUF03 e MUF05, respectivamente.

As temperaturas observadas e alturas de pico correspondentes foram: 335 °C; 344 °C; 354 °C; 363 °C e 380 °C, com energias de 8,30; 9,31; 9,73; 10,12 e 9,68  $\mu\text{V}$  para MUF01; 1,80; 2,50; 3,40; 3,70 e 4,15  $\mu\text{V}$  para MUF03; 10,20; 11,30; 12,50; 14,00 e 13,44  $\mu\text{V}$  para MUF05. Através da **Figura II-5** pode ser observado a diferença dos valores de energia entre as amostras nos pontos selecionados. A amostra MUF05 mostrou os valores mais elevados de altura de pico, quando comparado as amostras MUF01 e MUF03.



**Figura II-5:** Altura dos picos das amostras MUF01, MUF03 e MUF05.

A partir de 500 até 900 °C, observa-se uma queda gradativa da linha de base, correspondente a terceira etapa de decomposição até a formação do resíduo não degradável, visualizada pelas curvas termogravimétricas em atmosfera de nitrogênio.

As perdas de massa registradas através das curvas termogravimétricas foram confirmadas através da presença de eventos registrados nas curvas de DTA em faixas de temperaturas correspondentes para as duas técnicas.

Técnicas termoanalíticas como DTA e TG mostram-se como uma ferramenta útil e auxiliar na caracterização de drogas vegetais, avaliando parâmetros térmicos e produzindo informações importantes acerca do controle de qualidade de drogas vegetais.

Amostras de drogas vegetais são misturas multicomponentes de compostos orgânicos e inorgânicos, e suas curvas de decomposição térmica são parcelas de fenômenos físico-

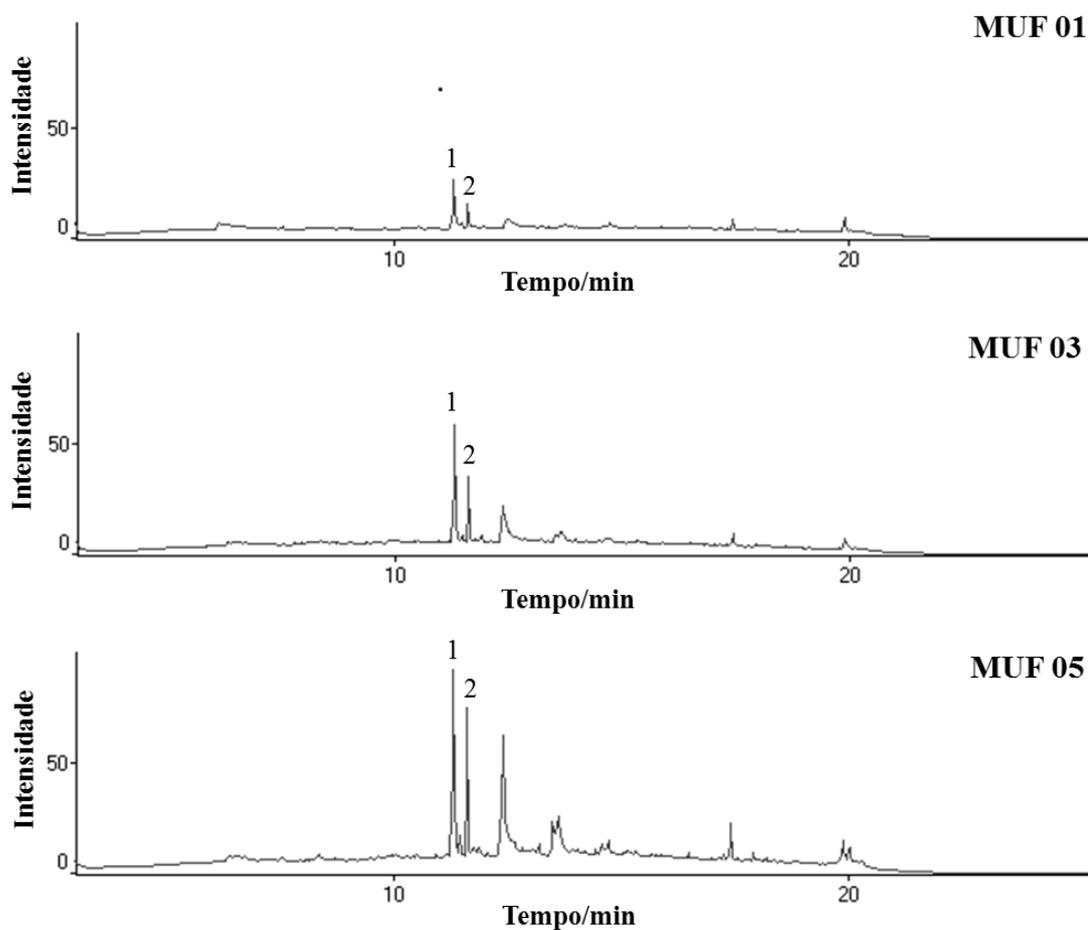
químicos que ocorrem quando a mesma é aquecida. Assim, não é possível associar o efeito térmico e a perda de massa à identificação da decomposição de um determinado componente da amostra [14].

Para identificação de produtos de degradação das amostras, a técnica pirolítica foi utilizada em associação à TG e DTA. Em conjunto tais técnicas são úteis na identificação da região de “impressão digital” das amostras de drogas vegetais e na avaliação de características de qualidade.

### 3.3. Pirólise acoplada a CG/EM

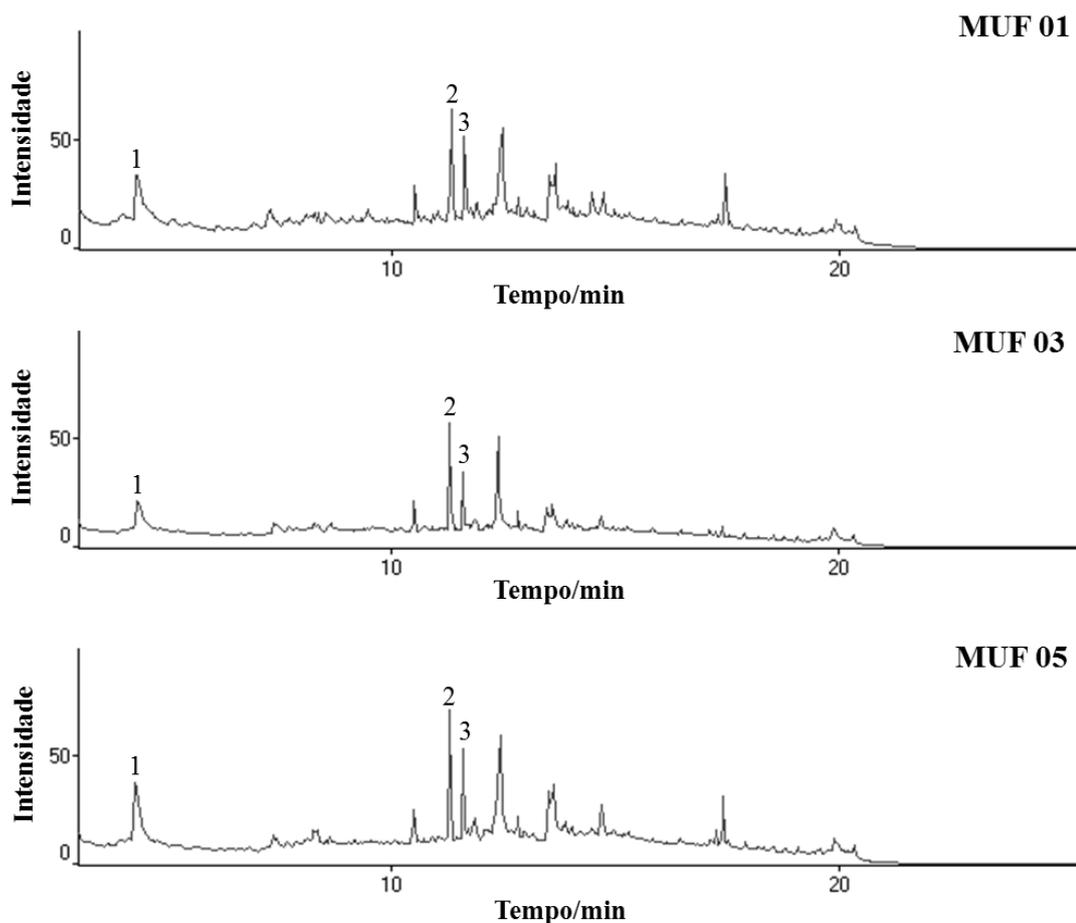
Os dados termogravimétricos apresentaram perdas de massa significativa da droga vegetal do mulungu na faixa de temperatura de 200-600 °C. No intuito de avaliar quais produtos de degradação estavam sendo liberados, as amostras foram submetidas a processo de pirólise nas temperaturas de 300 °C (**Figura II-6**), com 19% equivalente a perda de massa na TG em atmosfera inerte; 450 °C, correspondendo a 53% e de 600 °C, a 62% de perda de massa.

Os pirogramas das amostras submetidas a 300°C mostraram diferentes perfis cromatográficos entre as amostras de MUF01, MUF03 e MUF05, apresentando no entanto dois compostos comuns as três amostras, porém com áreas de picos diferentes. Os compostos identificados foram o Neoftadieno 2,6,10- Trimetil, 14 e 3- Eicosino; com respectivas áreas de pico para MUF01 7014064 e 2648832; MUF03 10965273 e 4994654; e MUF05 26912355 e 11816963. As áreas de pico das amostras MUF01. As áreas de pico das amostras MUF01 (710µm) e MUF03 (180µm), correspondem em abundância a 26,06% /22,4% e 40,7%/ 42,3% em relação a MUF05, considerando as substâncias Neoftadieno 2,6,10- Trimetil, 14/ 3- Eicosino, respectivamente.



**Figura II-6:** Pirogramas das amostras MUF01, MUF03 e MUF05 a 300 °C.

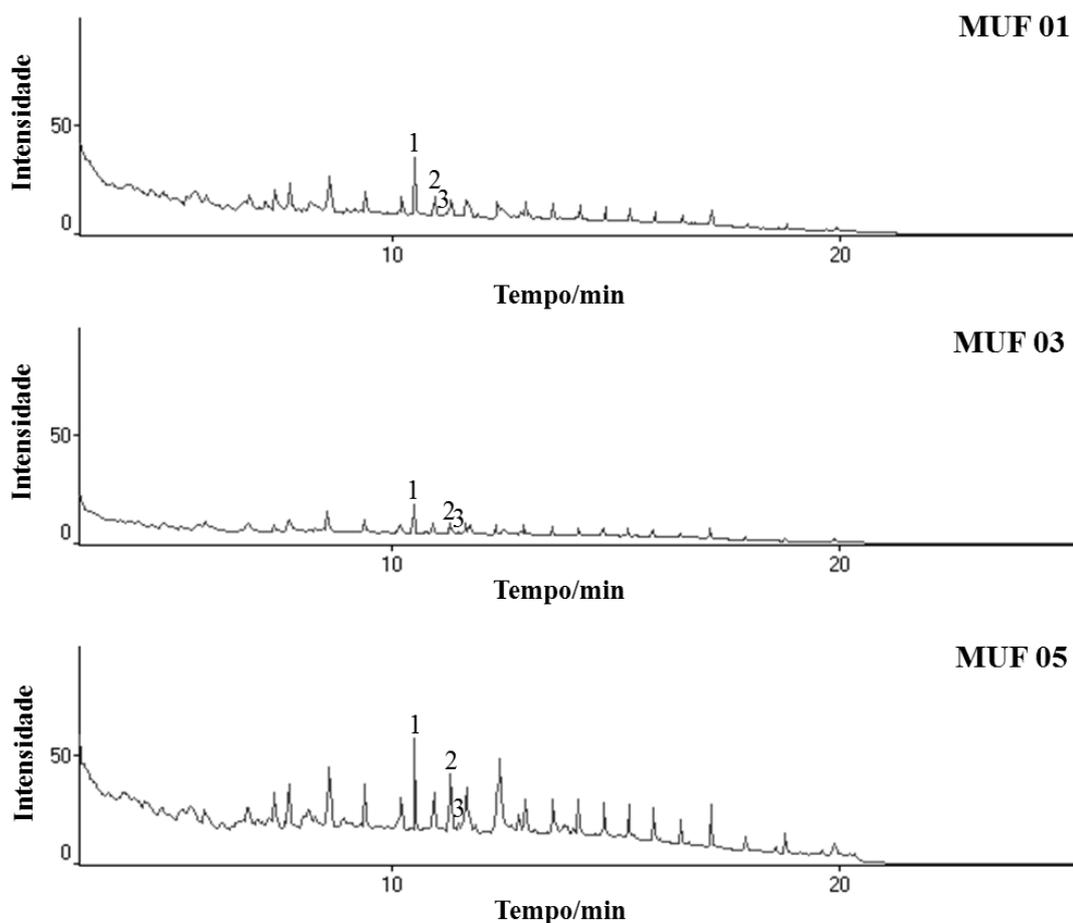
Na temperatura de 450 °C, **Figura II-7**, ocorreu também perfis cromatográficos com diferenças e com números de substâncias formadas maior, em relação ao perfil cromatográfico a 300 °C. A identificação dos picos cromatográficos nos pirogramas permitiu caracterizar a presença de dois componentes já identificados na temperatura de 300 °C e mais um terceiro presente nas amostras.



**Figura II-7:** Pirogramas das amostras MUF01, MUF03 e MUF05 a 450 °C.

Os produtos identificados e áreas de picos foram Limoneno, Neoftadieno 2,6,10-Trimetil, 14 e 3-Eicosino, com áreas de picos respectivamente para MUF01 28257913, 16979937 e 10507709; MUF03 12435165, 10553348 e 3848993; MUF05 24138134, 17454198 e 6624104. As áreas de pico das amostras MUF01 e MUF03, correspondem a 70% e 62.2%; 60% e 58.1% em relação a MUF05, considerando as substâncias Neoftadieno 2,6,10-Trimetil, 14 e 3-Eicosino, respectivamente. As áreas de pico do Limoneno para as amostras MUF03 e MUF05 em relação ao MUF01 foram de: 44% e 85%, respectivamente.

Na temperatura de 600 °C, **Figura II-8**, o número de picos cromatográficos resultante do processo pirolítico mostrou a presença de um número maior de substâncias proveniente da degradação térmica.



**Figura II-8:** Pirogramas das amostras MUF01, MUF03 e MUF05 a 600 °C.

De forma semelhante as duas condições pirolíticas anteriormente analisadas, foi possível avaliar três picos cromatográficos presentes nas três diferentes amostras, sendo dois semelhantes aos já analisados e um terceiro diferente dos encontrados em temperaturas inferiores. Os produtos identificados foram 1-Nonadeceno, Neoftadieno 2,6,10-Trimetil, 14 e 3-Eicosino, com áreas de picos respectivamente para MUF01 3921445, 1467438 e 278562; MUF03 2097900, 962068 e 184670; MUF05 7274289, 4257720 e 759745. As áreas de pico das amostras MUF01 e MUF03, correspondem a 34,4% e 36,6%; 22,5% e 24,3% em relação a MUF05, considerando as substâncias Neoftadieno 2,6,10-Trimetil, 14 e 3-Eicosino, respectivamente. As áreas relativas de pico das amostras MUF01 e MUF03 quando comparadas a MUF05, correspondem a 54% e 29%, respectivamente.

Os picos cromatográficos nos pirogramas relativos as diferentes temperaturas e amostras mostraram-se possíveis de identificar cada uma das substâncias através dos seus tempos de retenção, conforme dados a seguir: Limoneno de 4,27-4,32 min; 1-Nonadeceno de 10,49-10,51min; Neoftadieno 2,6,10-Trimetil, 14 de 11,28-11,35min e 3-Eicosino de 11,59-11,61 min.

Os dados cromatográficos relativos às áreas de picos dos compostos analisados evidenciaram diferenças quantitativas nas composições químicas das amostras MUF01, MUF03 e MUF05 nas diferentes condições pirolíticas 300, 450 e 600 °C.

#### 4. Conclusões

A droga vegetal *Erythrina velutina* mostrou diferenças significativas no comportamento físico e químico em função dos tamanhos de partículas do pó. A Pir-CG/EM permitiu caracterizar e diferenciar quimicamente a composição dos pós em diferentes tamanhos de partículas.

A Pir-CG/EM apresentou dois picos comuns nas três temperaturas correspondendo as duas substâncias (Neoftadieno 2,6,10-Trimetil, 14 e 3-Eicosino), classificando os pós das plantas pelo valor das áreas de pico com MUF05>MUF03>MUF01, fato confirmado pelo fluxo de calor no DTA e perda de massa no TG e uniformidade de tamanho do MEV.

#### 5. Agradecimentos

Os autores agradecem a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio técnico e financeiro. Agradecem também a Empresa de Assistência Técnica e Extensão Rural da Paraíba (EMATER-PB).

#### 6. Referências

- [1] RABELO, L. A.; AGRA, M. F.; CUNHA, E. V.; SILVA, M. S.; BARBOSA, J. M. F.. Homohesperetin and phaseollidin from *Erythrina velutina*. *Biochemical Systematics and Ecology*. 29:543-4, 2001.
- [2] FLAUSINO, A. O. J.; PEREIRA, A. M.; SILVA, B. V.; SOUZA, R. L. N.. Effects of erythrinian alkaloids isolated from *Erythrina mulungu* (Papilionaceae) in mice submitted to animal models of anxiety. *Biological Pharmaceutical Bulletin*. 30:375-8, 2007.
- [3] SILVA JÚNIOR, J. O. C. *Tese de Doutorado*. USP: São Paulo, 2006. 127 p.
- [4] WANG, L.; WANG, C.; PAN, Z.; SUN, Y.; ZHU, X.. Application of pyrolysis-gas chromatography and hierarchical cluster analysis to the discrimination of the Chinese traditional medicine *Dendrobium candidum* Wall. ex Lindl.. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*. 90:13-7, 2011.

- [5] SILVA, C. D. J.; ALVES, P. B.; ANTONIOLLI, A. R.; MARCHIORO, M.. Central nervous system effects of the crude extract of *Erythrina velutina* on rodents. *Journal of Ethnopharmacology*. 94:129-33, 2004.
- [6] TAKESHI, N.; KAWAMOTO, H.; SAKA, S. J.. Pyrolysis behavior of Japanese cedar wood lignin studied with various model dimers. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*. 81:173-82, 2008.
- [7] DEL RÍO, J. C.; GUTIÉRREZ, A.; RODRÍGUEZ, I. M.; IBARRA, D.; MARTÍNEZ, Á. T.. Composition of non-woody plant lignins and cinnamic acids by Py-GC/MS, Py/TMAH and FT-IR. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*. 79:39-46, 2007.
- [8] ZENG, Z. D.; LIANG, Y. Z.; ZHANG, T.; CHAU, F. T.; WANG, Y. L.. Orthogonal projection (OP) technique applied to pattern recognition of fingerprints of the herbal medicine *Houttuynia cordata* Thunb. and its final injection products. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 385:392-400, 2006.
- [9] YUAN, M.; ZHANG, M. G.; YUAN, P.; ZENG, Z.; YAN, C. L.. Pyrolysis-gas chromatography fingerprint with fuzzy cluster analysis for *Curcuma aromatica* Salisb., *Chinese Journal of Chromatography*. 21:469-71, 2003.
- [10] PROCÓPIO, J. V. V.; SOUZA, V. G.; COSTA, R. A.; CORREIA, L. P.; SOUZA, F. S.; MACÊDO, R.O.. Application of thermal analysis and pyrolysis coupled to GC/MS in the qualification of simvastatin pharmaceutical raw material. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*. DOI 10.1007/s10973-010-1274-y, 2011.
- [11] MOURA, E. A.; CORREIA, L. P.; PINTO, M. F.; PROCÓPIO, J. V. V.; SOUZA, F. S.; MACÊDO, R. O.. Thermal characterization of the solid state and raw material fluconazole by thermal analysis and pyrolysis coupled to GC/MS. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*. 100:289-93, 2010.
- [12] MACÊDO, R. O.. Tecnologia analítica baseada na pirólise acoplada à cromatografia gasosa/espectrometria de massa para caracterização e obtenção de compostos químicos a partir de extratos de *Erythrina mulungu* Linné secos por nebulização. *PI0800530-3 A2*, 2010.
- [13] OLIVEIRA, E. J.; ALVAREZ, E.D.A.; LIMA, N.G.P.B.; MACÊDO, R. O.. Usefulness of pyrolysis coupled to gas chromatography/mass spectrometry for evaluating the reproducibility of commercial samples of *Cymbopogon citratus* Stapf. Poaceae. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*. 20:93-9, 2010.
- [14] WESOŁOWSKI, M.; KONIECZYNSKI, P.. Thermoanalytical, chemical and principal component analysis of plant drugs. *International Journal of Pharmaceuticals*. 262:29-37, 2003.

## ***CAPÍTULO III: Artigo II***

---

**Estudos de correlação da atividade farmacológica e toxicidade de pós das  
folhas de *Passiflora edulis* em diferentes tamanhos de partículas**

## Estudos de correlação da atividade farmacológica e toxicidade de pós das folhas de *Passiflora edulis* Sims em diferentes tamanhos de partículas

Lidiane Pinto Correia<sup>1,3</sup>, Paula Regina Rodrigues Salgado<sup>4</sup>, Reinaldo Nóbrega de Almeida<sup>4</sup>, Sergio Luiz Dalmora<sup>5</sup>, Horacina Maria de Medeiros Cavalcante<sup>2</sup>, Rui Oliveira Macêdo<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Pernambuco, Avenida Artur de Sá, Cidade Universitária, Recife, PE, Brasil, 50740-521

<sup>2</sup> Departamento de Ciências Farmacêuticas, Laboratórios Unificados de Desenvolvimento e Ensaios de Medicamentos, Universidade Federal da Paraíba, Campus I, João Pessoa, PB, Brasil, 58059-970

<sup>3</sup> Departamento de Farmácia, Universidade Estadual da Paraíba, Rua das Baraúnas, Bodocongó, Campina Grande, PB, Brasil, 58429-500

<sup>4</sup> Laboratório de Tecnologia Farmacêutica Prof. Delby Fernandes de Medeiros, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, PB, Brasil, 58059-900

<sup>5</sup> Departamento de Farmácia Industrial, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brasil, 97105-000

E-mail: [lidiane@lidiane.org](mailto:lidiane@lidiane.org)

### Resumo

*Passiflora edulis* Sims é uma espécie do gênero *Passiflora* (Passifloraceae), que contém flavonóides como seus principais constituintes, é utilizada na medicina tradicional no tratamento dos sintomas do alcoolismo, ansiedade, enxaqueca, nervosismo e insônia. O objetivo desse estudo consistiu em obter e caracterizar pós de *Passiflora edulis* em diferentes tamanhos de partículas, bem como avaliar a atividade ansiolítica e a citotoxicidade da infusão dos pós em diferentes tamanhos de partículas. Para caracterização microscópica das amostras utilizou-se a microscopia eletrônica de varredura (MEV), caracterização térmica a termogravimetria (TG) e análise térmica diferencial (DTA); a atividade ansiolítica das partículas resultantes da infusão foi avaliada através do teste do labirinto em cruz elevado (LCE) e a citotoxicidade, através do ensaio do vermelho neutro usando a cultura de células NCTC clone 929. O tamanho das partículas dos pós foram: 710; 355; 180 e 150  $\mu\text{m}$ , correspondendo as amostras MA 01, 02, 03 e 04. As técnicas térmicas diferenciaram as amostras de diferentes tamanhos de partícula através das diferentes etapas de decomposição e energias relacionadas. No LCE para o infuso derivado da amostra MA01 a 500 mg Kg<sup>-1</sup> houve aumento no número de entradas e tempo de permanência nos braços abertos, seguido de valores inferiores para a amostra MA04. A citotoxicidade demonstrou os seguintes valores, variando de acordo com as granulometrias dos pós : MA01 (DL50 de 62,43 mg mL<sup>-1</sup>), MA02

(DL50 de 42,48 mg mL<sup>-1</sup>), MA03 (DL50 de 29,88 mg mL<sup>-1</sup>) e MA04 (DL50 de 29,72 mg mL<sup>-1</sup>). A infusão da droga vegetal *Passiflora edulis* em diferentes tamanhos de partícula demonstrou atividade farmacológica e toxicidade distintas.

*Palavras-chave: Passiflora edulis, granulometria, análise térmica, labirinto em cruz elevado, citotoxicidade*

## 1. Introdução

Espécies do gênero *Passiflora* (Passifloraceae) têm sido muito utilizadas pela medicina tradicional em muitos países como um remédio para tratar a ansiedade, insônia, histeria, epilepsia, espasmo, dor, entre outros [1].

*Passiflora edulis* Sims, popularmente conhecida por maracujá, é a espécie com maior valor econômico do gênero *Passiflora*, sendo este o maior gênero da família Passifloraceae [2].

Os extratos hidroalcoólicos das folhas da *Passiflora edulis* foram avaliados para confirmar seu uso como ansiolítico, conforme relatos populares [3-4].

No entanto Dhawan; Kumar; Sharma, 2001 [5] concluiu que a *Passiflora edulis* não possui atividade ansiolítica. De acordo com Deng et al, 2010 [6] existe a necessidade da realização de mais pesquisas sobre o efeito das espécies da *Passiflora* sobre o sistema nervoso. Quanto à toxicidade estudos demonstram que a *Passiflora edulis* pode ocasionar toxicidade hepatobiliar e pancreática em animais e seres humanos [7].

Ensaio *in vitro* têm sido desenvolvidos como alternativa aos testes de toxicidade *in vivo*. Testes *in vitro* são geralmente rápidos, sensíveis, passíveis de automação e econômicos quando comparados aos que usam animais. Diferentes ensaios têm sido utilizados para avaliar a citotoxicidade *in vitro*, dentre eles a captação de vermelho neutro [8-9].

Esses ensaios geralmente avaliam diferentes aspectos das funções celulares. O ensaio de captação do vermelho neutro por exemplo, reflete a capacidade das células viáveis de incorporar o corante vital, avaliado através da integridade lisossomal [10-12].

A RDC 10/2010 regulamenta o uso popular de drogas vegetais e preconiza que a *Passiflora edulis* deve ser usada na forma de infusão, seguindo a proporção de 3g do pó da planta para 150 mL de água, duas vezes ao dia [13].

O processo de pulverização da matéria-prima vegetal constitui uma etapa importante na obtenção de preparações intermediárias e produção de medicamentos fitoterápicos, justificando, o controle da tenuidade de pós [14].

O objetivo deste estudo foi avaliar a atividade ansiolítica e a citotoxicidade da infusão dos pós de *Passiflora edulis* em diferentes tamanhos de partículas.

## **2. Materiais e Métodos**

### **2.1. Animais**

No desenvolvimento deste estudo, foram utilizados camundongos machos albinos da linhagem suíça, com 2 a 3 meses de idade, pesando de 25 a 40 g, provenientes do Biotério Prof. Dr. Thomas George do Laboratório de Tecnologia Farmacêutica Prof. Delby Fernandes de Medeiros da Universidade Federal da Paraíba. O estudo foi realizado de acordo com a aprovação do Comitê de ética em pesquisa animal (CEPA), dessa instituição, com número de protocolo 0207/10. Os animais foram alojados em gaiolas de polietileno (cinco por gaiola) vinte minutos antes do teste, mantidos sob condições controladas de temperatura de  $21 \pm 2$  °C e ciclo claro/escuro de 12 horas (fase clara das 06:00 às 18:00 horas e fase escura de 18:00 às 6:00 horas), tendo livre acesso a alimentação (ração tipo pellets da marca comercial Purina<sup>®</sup>) e água, exceto durante o experimento.

### **2.2. Material Botânico**

O material botânico utilizado neste estudo foi coletado em fevereiro de 2010, no Município de Lagoa Seca - PB, sob as seguintes coordenadas geográficas: latitude (7°08'24"S), longitude (35°47'50"L), altitude 582 m, e a distância da sede de 5 Km com o apoio da equipe técnica da Empresa de Assistência Técnica e Extensão Rural da Paraíba (EMATER-PB).

A exsicata da *Passiflora edulis* foi depositada no herbário Arruda Câmara, localizado no Departamento de Biologia da Universidade Estadual da Paraíba (UEPB), pelo botânico Prof. Dr. Ivan Coelho, sob número de registro 0185.

### **2.3. Preparação dos Pós**

As folhas de *Passiflora edulis* foram desidratadas em estufa com circulação de ar na temperatura controlada de 40 °C. O material seco foi moído usando um moinho de quatro facas móveis e quatro fixas, da marca Marconi, modelo Willey, acoplado a um tamis de 10 mesh.

A droga vegetal pulverizada foi submetida a um sistema de peneiras com diferentes tamanhos de poros: 710, 355, 180 e 150  $\mu\text{m}$ . Os pós obtidos nestas diferentes granulometrias foram acondicionados separadamente em frascos de polietileno branco fosco devidamente fechados, para proteção da luz e da umidade e armazenados a temperatura ambiente, em média de 25 °C. As amostras identificadas como MA01, MA02, MA03 e MA04, de acordo com a granulometria do pó.

#### **2.4. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)**

As análises microscópicas dos pós das plantas em diferentes granulometrias foram realizadas através de um microscópio eletrônico de varredura, modelo MEV TM-1000, Hitachi. O aumento utilizado foi de 100 vezes em relação ao tamanho real. Devido as irregularidades das partículas, o maior lado foi considerado como parâmetro de medida.

#### **2.5. Estudos de Análise Térmica**

##### *2.5.1. Termogravimetria (TG)*

As curvas termogravimétricas dinâmicas dos pós das plantas em diferentes granulometrias (710 e 150  $\mu\text{m}$ ) foram obtidas em uma termobalança modelo TGA-50H, da Shimadzu, na razão de aquecimento de 10 °C  $\text{min}^{-1}$ , variando de 25 °C até temperatura de 900 °C. Utilizou-se atmosfera de nitrogênio e de ar sintético, com fluxo de 50  $\text{mL min}^{-1}$ . Foi utilizado massa de  $5,00 \pm 0,05$  mg acondicionada em cadinho de alumina para cada amostra. A calibração da termobalança foi feita utilizando oxalato de cálcio monohidratado. As curvas foram analisadas através do software Tasy 60, da Shimadzu, para caracterizar as etapas de perda de massa.

##### *2.5.2. Análise Térmica Diferencial (DTA)*

As curvas térmicas diferenciais dos pós das plantas em diferentes granulometrias (710 e 150  $\mu\text{m}$ ) foram obtidas em um analisador térmico diferencial, modelo DTA-50, da Shimadzu, na razão de aquecimento de 10 °C  $\text{min}^{-1}$ , variando de 25 °C até temperatura de 900 °C, em atmosfera de nitrogênio, com fluxo de 50  $\text{mL min}^{-1}$ . As amostras foram acondicionadas em cadinho de alumina utilizando massa de  $5,00 \pm 0,5$  mg para cada amostra. A calibração do equipamento foi realizada através do ponto de fusão e entalpia dos padrões de índio e zinco. As curvas térmicas diferenciais foram analisadas usando o programa Tasy 60, da Shimadzu.

## 2.6. Labirinto em Cruz Elevado

O labirinto em cruz elevado utilizado foi da marca Insight, modelo EP 150. O módulo é feito de acrílico e consiste em quatro braços, sendo dois braços com paredes laterais e sem cobertura (braços fechados), medindo 30 cm de comprimento por 6 cm de largura e 16 cm de altura, colocados perpendicularmente a dois braços desprovidos de paredes laterais (braços abertos) com o mesmo comprimento e largura. Cada braço é posicionado a 90 ° do braço adjacente e cruzam-se numa área central onde o animal é posicionado. O labirinto é apoiado sob um suporte com 25 cm de elevação em relação ao solo.

Para realização do teste foram utilizados grupos com 5 camundongos tratados com uma única administração por via oral. Os grupos experimentais MA 01 e MA 04 foram tratados com doses de 500 mg Kg<sup>-1</sup>, enquanto que o grupo controle foi tratado com o veículo e o grupo padrão com o Diazepam, na dose de 2 mg Kg<sup>-1</sup>. Sessenta minutos após a administração, os camundongos foram colocados individualmente no centro do labirinto, para que eles pudessem explorar o mesmo.

Os parâmetros número de entradas e o tempo total de permanência nos braços abertos e fechados foram avaliados durante um período de 5 minutos. A entrada nos braços foi definida como a entrada das quatro patas do animal dentro do braço [15-16].

Todos os animais utilizados nesse estudo foram eutanasiados por deslocamento cervical, como recomendado pela comunidade científica após os ensaios [17].

## 2.7. Cultura Celular L929

Ensaio de citotoxicidade foram realizados *in vitro* utilizando-se culturas de células NCTC clone 929 (fibroblastos de mamíferos) por incorporação do corante vermelho neutro. As células foram mantidas no meio MEM (Meio mínimo essencial de Eagle com 0,1 mM de aminoácidos não essenciais, 1 mM de sódio e suplementado com 10% de soro bovino fetal). As células foram destacadas com tripsina e a suspensão celular ajustada para 2 x 10<sup>5</sup> células ml<sup>-1</sup>. Um volume de 0,2 mL da suspensão celular foi adicionada em cada poço da microplaca de 96 poços e incubada em incubadora de CO<sub>2</sub> (mantida a 5% CO<sub>2</sub>, e 37 °C) por 24 horas. Em seguida, as células foram expostas a meio sem (controle) ou com *Passiflora edulis* (concentração entre 1,67 – 53,34 mg mL<sup>-1</sup>). Cada concentração foi testada em triplicata. No final da incubação, os ensaios de citotoxicidade por incorporação do corante vermelho neutro foram avaliados.

## 2.8. Ensaio de Citotoxicidade: Vermelho Neutro

O ensaio de citotoxicidade *in vitro* foi realizado baseado no ensaio de captura do vermelho neutro conforme descrito por Diress et al, 2010; Nogueira et al, 2008 [18-19]. Após a remoção do meio de cultura as células foram lavadas uma vez com PBS. Após serem incubadas durante 4 h com meio livre de soro contendo vermelho neutro na concentração de  $50 \mu\text{g ml}^{-1}$ , as células foram lavadas com tampão PBS e posteriormente com  $\text{CaCl}_2$  (1%) em formaldeído 0,5%, em seguida 0,2 mL de uma solução de de ácido acético (1%) em etanol (50% ) foi adicionado a cada poço para fixar as células e remover o vermelho neutro da solução. As placas foram levemente agitadas por 10 minutos em um agitador de placas e as absorvâncias das soluções foram lidas a 570 nm usando um leitor de microplaca *Thermo Scientific Multiskan FC* (Vantaa, Finlândia).

## 2.9. Tratamento dos Dados

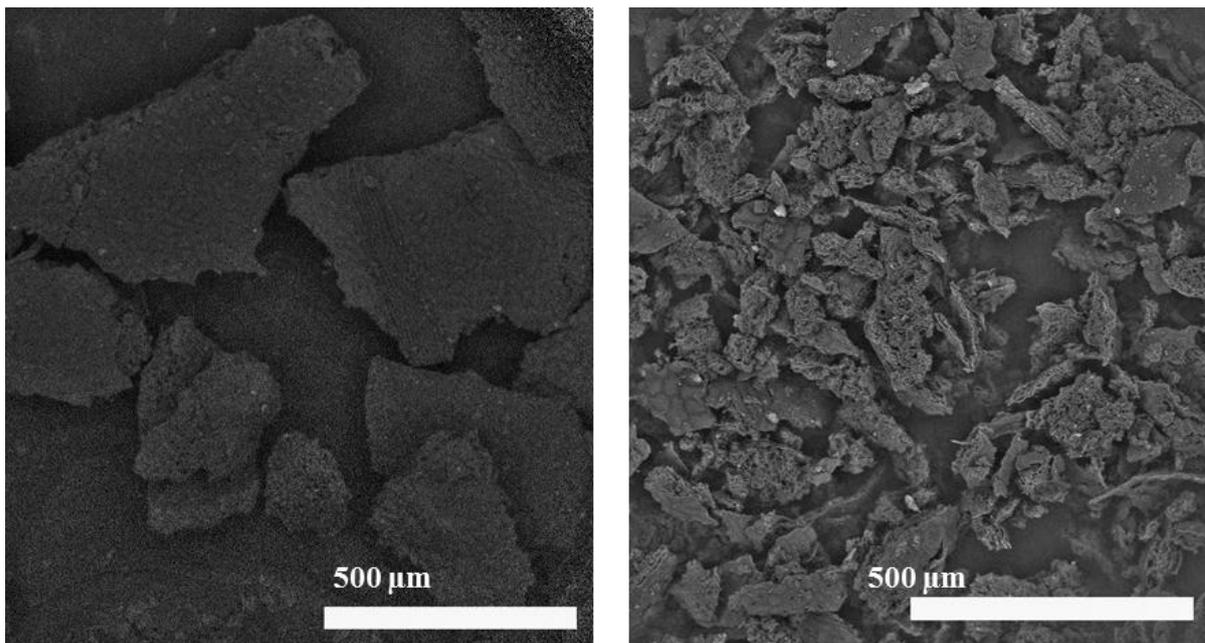
Os resultados do teste labirinto em cruz elevado foram expressos como média  $\pm$  EPM, os valores médios representam os valores dos grupos tratados menos a média do grupo controle (água). Os resultados da avaliação de citotoxicidade foram expressos pela média de mortalidade celular, cada experimento de citotoxicidade foi realizado em triplicata. A DL50 representa a concentração que produziu 50% de mortalidade celular. Os resultados foram expressos em percentual em relação ao grupo controle.

# 3. Resultados e Discussões

## 3.1. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

A RDC 10/10, regulamentada pela ANVISA preconiza o uso popular de plantas medicinais, dentre as quais se encontra a *Passiflora edulis* utilizada popularmente no tratamento da ansiedade. Baseado nisso, o presente trabalho consistiu na avaliação da influência do tamanho das partículas do pó dessa espécie frente às atividades farmacológica e toxicológica.

Através do teste da granulometria foram obtidos pós com os seguintes tamanhos de partícula: 710,0; 355,0; 180,0 e 150,0  $\mu\text{m}$ . A caracterização dos pós da folha de *Passiflora edulis* foi avaliada por MEV, como pode ser visto na **Figura III-1**.



**Figura III-1:** Eletromicrografias de varredura dos pós da planta em dois tamanhos de partículas 710 e 150 µm, correspondendo a MA01 e MA04, respectivamente.

Os valores medianos e os limites inferiores e superiores mostraram a seguinte distribuição de tamanhos de partículas por amostra, MA01 515,65 µm, variando de 307,32-800,0 µm e MA04 133,7 µm, variando de 87,4-336,4 µm, respectivamente.

A caracterização dos pós das amostras em estudo revelaram através da MEV a heterogeneidade do tamanho e morfologia das partículas, o que demonstra limitações no processamento de plantas para obtenção de pós uniformes. O tamanho das partículas da matéria-prima vegetal pode influenciar no efeito farmacológico e toxicológico de preparações líquidas de uso popular, como infusos, decoctos e macerados, já que a superfície de contato com o solvente extrator é diferente.

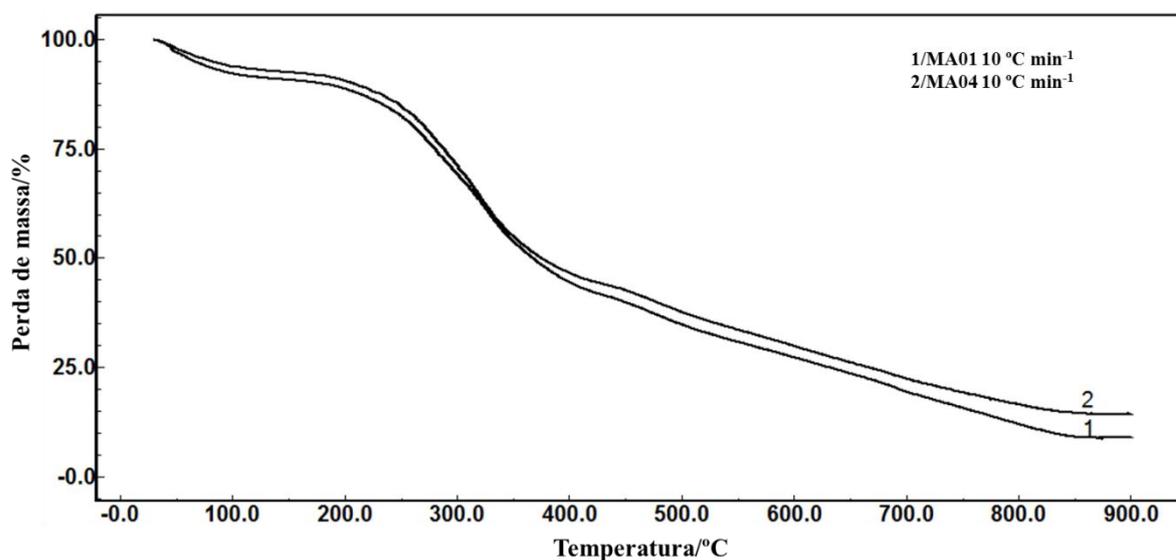
### 3.2. Estudos de Análise Térmica

#### 3.2.1. Termogravimetria (TG)

As curvas termogravimétricas dinâmicas em atmosfera de nitrogênio (**Figura III-2**) das amostras MA01 e MA04 apresentaram três etapas de decomposição. A primeira etapa que ocorreu na faixa de temperatura de 29-115 °C pode ser atribuída à perda de voláteis, majoritariamente água, representando 8,2 e 6,5%, para MA01 e MA04, respectivamente.

A segunda etapa de decomposição representa a degradação do conjunto dos macro e micro constituintes da amostra, ocorrendo nas faixas de temperatura de 204,0-364,0 °C e

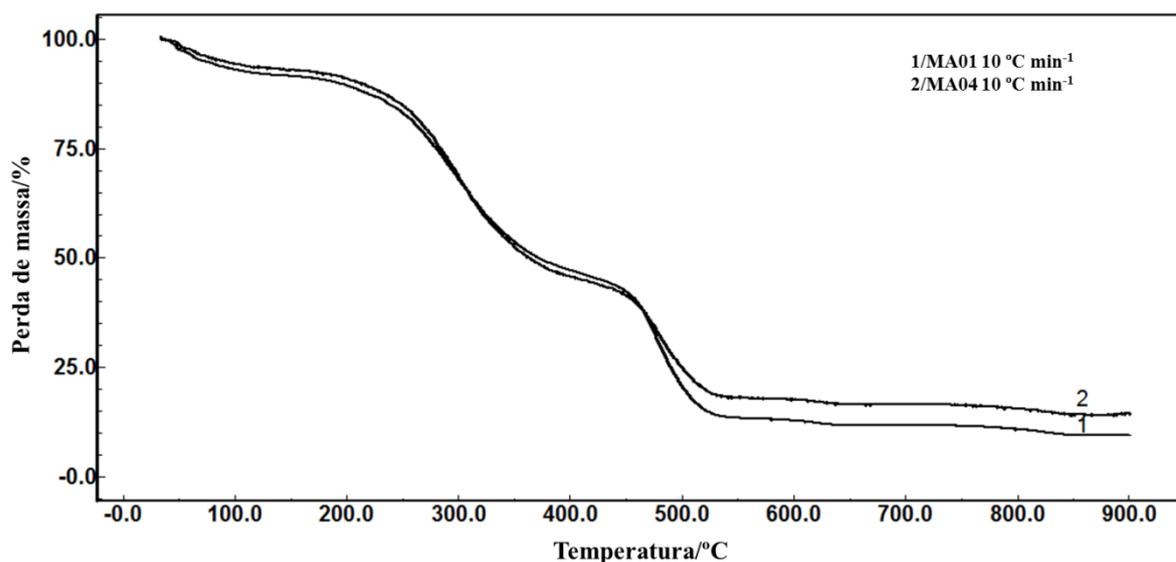
194,7-383,0 °C correspondendo a uma perda de massa de 37,7% e 42,0%, para MA01 e MA04, respectivamente.



**Figura III-2:** Curvas termogravimétricas dinâmicas em atmosfera de nitrogênio dos pós das folhas de *Passiflora edulis*

A terceira etapa de decomposição ocorreu com perda de massa gradativa em uma faixa de temperatura extensa até a formação dos resíduos não degradáveis em atmosfera inerte. As faixas de temperatura e a porcentagem de perda de massa para as amostras MA01 e MA04 foram de: 364,0-900,0 °C (41,7%) e 383-900,0 °C (34,0%). Observou-se que a 900 °C a amostra MA04 manteve esse resíduo em um valor maior que a MA01.

As curvas termogravimétricas dinâmicas em atmosfera de ar sintético das amostras MA01 e MA04 (**Figura III-3**) apresentaram quatro etapas de decomposição. A primeira etapa ocorreu na faixa de temperatura de 29-137 °C referente à perda de voláteis, majoritariamente água, nas proporções de 8,7 e 8,0%, para as amostras MA01 e MA04, respectivamente.



**Figura III-3:** Curvas termogravimétricas dinâmicas em atmosfera de ar sintético dos pós das folhas de *Passiflora edulis*

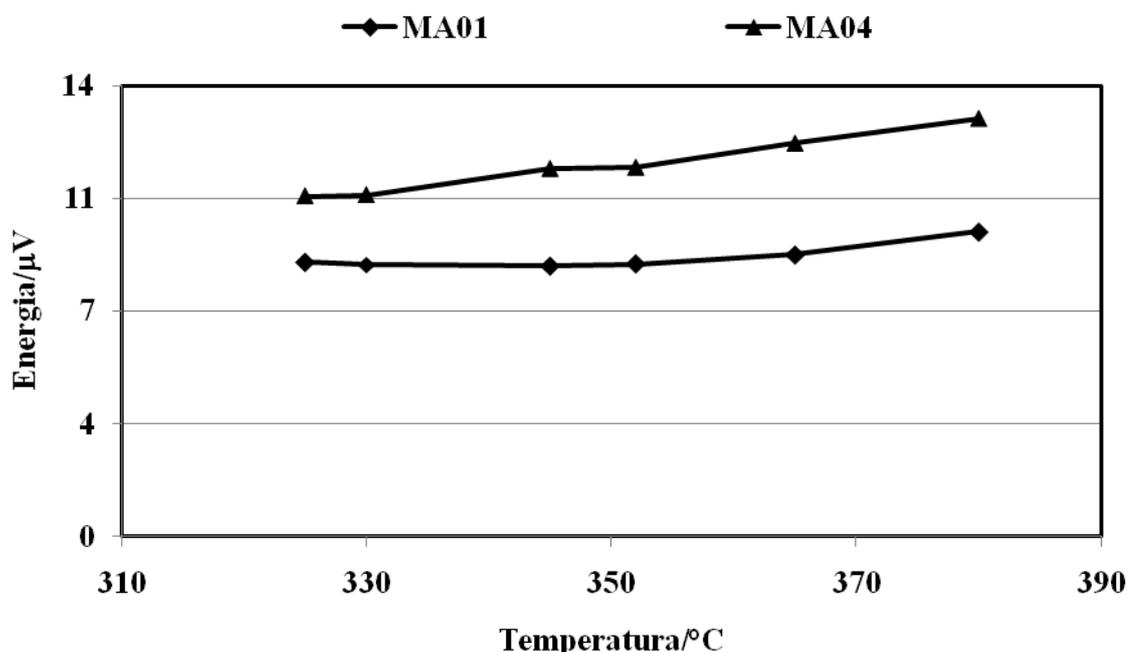
A segunda etapa de decomposição das amostras ocorreu nas seguintes faixas de temperatura e perda percentual de massa: MA01 215,0-347,0 °C (33,6%) e MA04 217-352 °C (36,6%). A terceira etapa ocorreu nas faixas de temperatura e perda de massa percentual MA01 347,0-457,0 °C (13,6%) e MA04 352,0-452,0 °C (11%). A quarta etapa ocorreu nas faixas de temperatura e perda de massa percentual MA01 450,0-518,0 °C (25%) e MA04 452,0-516,0 °C (20,0%).

Observou-se que o término da quarta etapa de decomposição sinalizou a formação do resíduo não degradável em atmosfera oxidativa, já que até a temperatura de 900°C não houve registro de perda de massa. A amostra MA04 mostrou uma maior proporção de resíduos não-degradáveis, equivalendo a aproximadamente 25 % da massa inicial da amostra.

### 3.2.2. *Análise Térmica Diferencial (DTA)*

As curvas de DTA foram avaliadas na faixa de temperatura correspondente a segunda etapa de decomposição das curvas termogravimétricas em atmosfera de nitrogênio. Dentro dessa faixa observaram-se transições medidas através da altura do pico que corresponderam a uma energia média de 8,68 e 11,54  $\mu\text{V}$ , para MA01 e MA04, respectivamente.

Através da **Figura III-4** pode ser observado a diferença de valores de energia entre as amostras nos pontos selecionados. A amostra MA04 mostrou valores mais elevados de altura de pico, quando comparado as amostras MA01.



**Figura III-4:** Altura dos picos das amostras MA01 e MA04

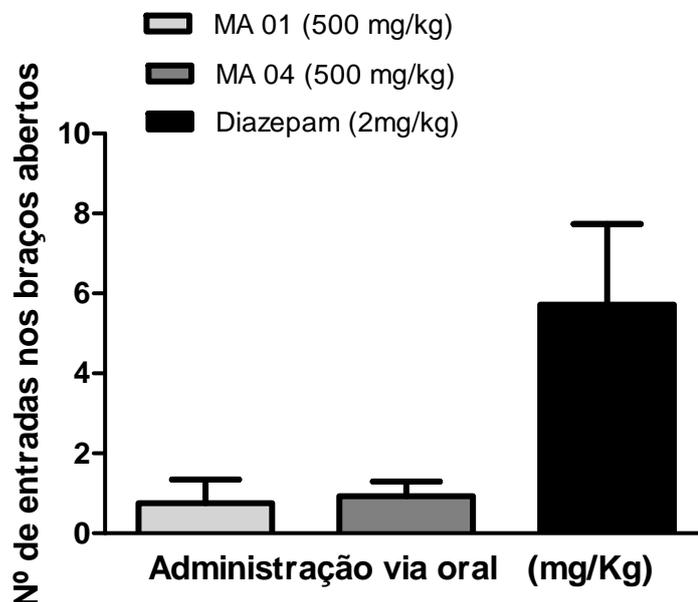
A partir de 450 até 900 °C, observou-se uma queda gradativa da linha de base, correspondente a terceira etapa de decomposição até a formação do resíduo não degradável, visualizada pelas curvas termogravimétricas em atmosfera de nitrogênio. Nesse mesmo intervalo de temperatura ocorreu um evento endotérmico observado nas duas amostras, correspondendo a 3,73 e 7,88; para MA01 e MA04, respectivamente.

Amostras de drogas vegetais são misturas multicomponentes de compostos orgânicos e inorgânicos, e suas curvas de decomposição térmica são parcelas de fenômenos físico-químicos que ocorrem quando a mesma é aquecida. Assim, não é possível associar o efeito térmico e a perda de massa à identificação da decomposição de um determinado componente da amostra.

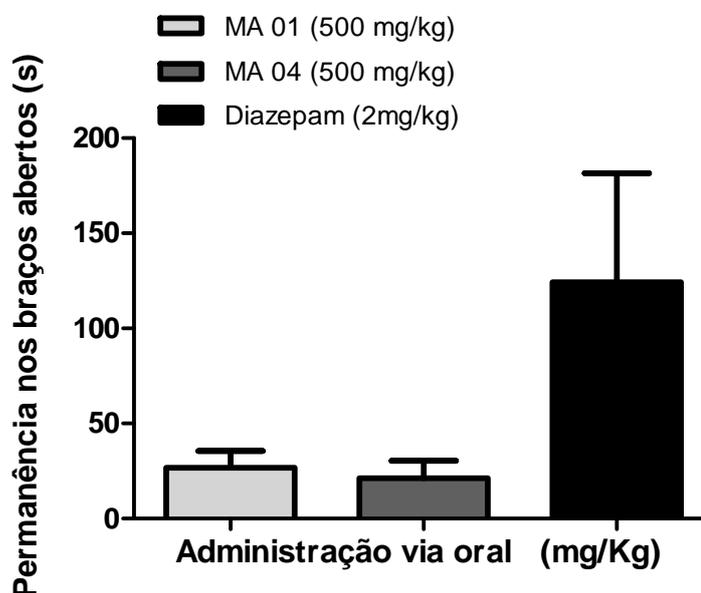
### 3.3. Estudo da atividade ansiolítica

A atividade ansiolítica dos infusos das partículas MA01 (710,0 μm) e MA04 (150,0 μm), administrada via oral, avaliada através do teste de labirinto em cruz elevado (LCE) mostrou que para o DZP (2 mg Kg<sup>-1</sup>), os animais em estudo apresentaram maior número de entradas nos braços abertos no LCE, seguido da infusão da amostra MA04 e MA01 (500 mg Kg<sup>-1</sup>) como ilustrado na **Figura III-5**.

Os dados apresentados na **Figura III-6** demonstram o tempo de permanência dos animais nos braços abertos, o qual foi maior para o DZP ( $2 \text{ mg Kg}^{-1}$ ), seguido da infusão da amostra MA01 e MA04 ( $500 \text{ mg Kg}^{-1}$ ).



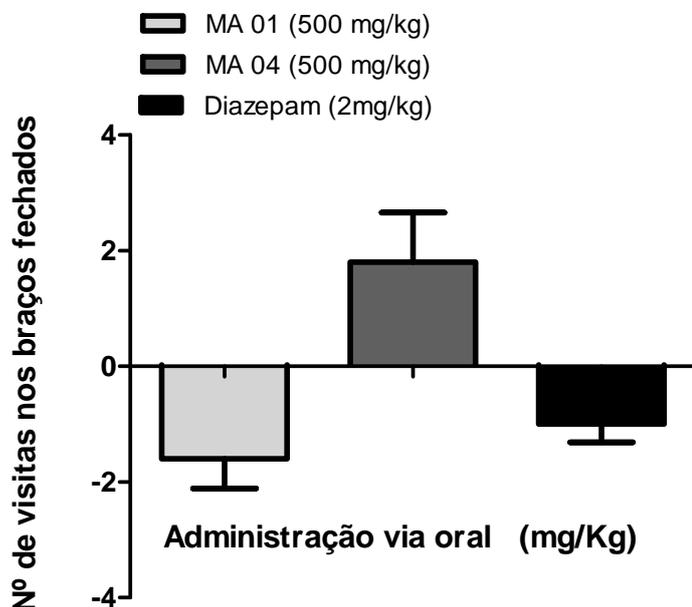
**Figura III-5:** Número de entradas nos braços abertos dos animais tratados com infuso de *Passiflora edulis* (MA01 e MA04) no teste de labirinto em cruz elevado.



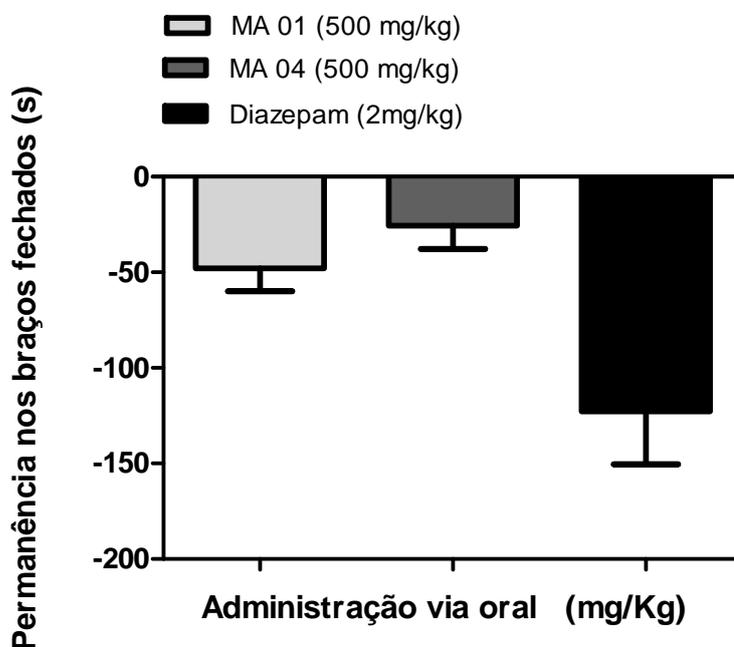
**Figura III-6:** Tempo de permanência nos braços abertos dos animais tratados com infuso de *Passiflora edulis* (MA01 e MA04) no teste de labirinto em cruz elevado.

Observou-se que os animais tratados com DZP ( $2 \text{ mg Kg}^{-1}$ ) e o infuso da amostra MA01 reduziram o número de entradas nos braços fechados no teste LCE, enquanto os tratados com o infuso da amostra MA04, aumentaram a resposta a este parâmetro, conforme ilustrado na

**Figura III-7.** Os dados apresentados na **Figura III-8** demonstram que houve uma diminuição no tempo de permanência nos braços fechados induzida pelo DZP ( $2 \text{ mg Kg}^{-1}$ ), seguido pela infusão da amostra MA01 e MA04, ambas administradas na dose de  $500 \text{ mg Kg}^{-1}$ .



**Figura III-7:** Número de entradas nos braços fechados dos animais tratados com infuso de *Passiflora edulis* (MA01 e MA04) no teste de labirinto em cruz elevado



**Figura III-8:** Tempo de permanência nos braços fechados dos animais tratados com infuso de *Passiflora edulis* (MA01 e MA04) no teste de labirinto em cruz elevado.

A atividade ansiolítica dos infusos das amostras baseou-se no ensaio de labirinto em cruz elevado, de acordo com Jones et al, 1992 [20], o aumento do tempo de permanência, bem

CORREIA, L. P.; SALGADO, P. R. R.; ALMEIDA, R. N. de; DALMORA, S. L.; CAVALCANTE, H. M. de M.; MACÊDO, R. O.. Estudos de correlação das potências farmacológicas e toxicológicas de pós das folhas de *Passiflora edulis* em diferentes tamanhos de partículas

como no número de visitas nos braços abertos, quando comparada com o grupo controle é um indício de que houve atenuação da inibição da atividade exploratória induzida pelo medo, característica esta, das substâncias com atividade ansiolítica. O tempo de permanência nos braços abertos dos animais tratados com DZP e outras drogas com atividade ansiolítica tende a ser maior que nos braços fechados [21]. DZP tem sido utilizado como um ansiolítico padrão e frequentemente empregado na farmacologia comportamental como substância de referência. Trata-se de uma substância com potencial ação ansiolítica e eficaz quando avaliada através do teste de labirinto em cruz elevado [22]. No presente estudo o DZP 2 mg Kg<sup>-1</sup> v.o., mostra um efeito ansiolítico em camundongos caracterizado pelo aumento no número de entradas e tempo de permanência nos braços abertos, possivelmente a diminuição no número de entradas e tempo de permanência nos braços fechados corroboram com este efeito ansiolítico.

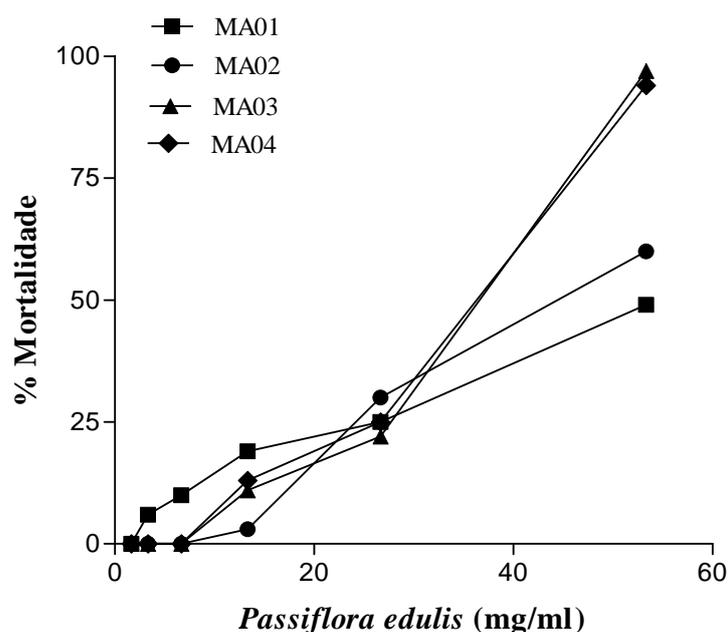
O resultado da atividade do infuso das amostras MA01 e MA04, quando comparado com a resposta da atividade do DZP foi indicativo do possível efeito ansiolítico destas amostras. A resposta acentuada do DZP em relação aos testes experimentais pode ser atribuída a sua alta dose.

Sabendo-se que o processo de pulverização da matéria-prima vegetal constitui uma etapa importante no processo de produção preparações intermediárias e produtos fitoterápicos [14]. Diante das diferenças observadas através do LCE, observa-se que o tamanho das partículas dos pós da planta utilizados para preparação do infuso, influencia na sua atividade farmacológica.

Segundo Li et al, 2009 [23], a *Passiflora edulis* possui atividade sedativa em doses elevadas, não possuindo efeitos neurofarmacológicos em baixas doses. Diante disso, verifica-se que é necessário a realização de mais investigações para avaliar a atividade ansiolítica da infusão do pó das folhas da *Passiflora edulis*.

### 3.4. Estudo da citotoxicidade

A citotoxicidade da infusão das amostras MA01, 02, 03 e 04 (**Figura III-9**) foi avaliada por meio do ensaio de vermelho neutro, utilizando a cultura celular NCTC 929. Os valores de DL<sub>50</sub> obtidos para as amostras MA01, 02, 03 e 04 obtidos foram de: 62,43 mg mL<sup>-1</sup>, 42,48 mg mL<sup>-1</sup>, 29,88 mg mL<sup>-1</sup> e 29,72 mg mL<sup>-1</sup>, respectivamente.



**Figura III-9:** Percentual de mortalidade celular após 24h de incubação com infuso de *Passiflora edulis* (MA01, 02, 03 e 04), a altura cada ponto representa a média da triplicata.

Culturas celulares podem ser usadas para avaliar a citotoxicidade basal e a toxicidade de órgãos-alvo [24-25] e, em alguns casos, podem fornecer informações sobre a dose letal *in vivo* [26].

A linhagem celular utilizada foi a NCTC clone 929, pois já foi bem caracterizada e utilizada em estudos de toxicidade, por exemplo no trabalho de Valderrama-Negrón et al, 2011 [27]. O ensaio de citotoxicidade do vermelho neutro é um procedimento de sensibilidade química vista através da viabilidade celular, baseado na capacidade das células viáveis de incorporar o corante vital vermelho neutro [28]. A citotoxicidade das infusões das amostras das folhas de *Passiflora edulis* (**Figura III-9**) em diferentes granulometrias demonstrou aumento crescente da toxicidade celular a medida que o tamanho da partícula das amostras testadas diminuía. Neste contexto, o infuso da amostra MA04 apresenta-se como a mais tóxica e possivelmente está induzindo o efeito sedativo apresentado por esta droga vegetal.

#### 4. Conclusões

A droga vegetal *Passiflora edulis* mostrou diferenças no comportamento físico e químico em função dos tamanhos de partículas do pó, visualizadas através do MEV e da análise térmica.

Amostras de infusos com diferentes tamanhos de partícula de *Passiflora edulis* demonstraram atividades farmacológicas e toxicológicas distintas, sugerindo que a granulometria do pó é um parâmetro que influencia estas atividades.

## 5. Agradecimentos

Os autores agradecem a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio técnico e financeiro. Agradecem também a Empresa de Assistência Técnica e Extensão Rural da Paraíba (EMATER-PB).

## 6. Referências

- [1] DHAWAN, K.; DHAWAN, S.; SHARMA, A.. *Passiflora*: a review update. *Journal of Ethnopharmacology*. 94:1-23, 2004.
- [2] BENIGNI, R.; CAPRA, C.; CATTORINI, P. E.. *Plante medicinale; chimica, farmacologia, e terapia*. Vol. 2. Milan: Inverni della Beffa, 1964. p.p. 1080-1085.
- [3] PETRY, R. D.; REGINATTO, F.; DE-PARIS, F.; GOSMANN, G.; SALGUEIRO, J. B.; QUEVEDO, J.; KAPCZINSKI, F.; ORTEGO, G. G.; SCHENKEL, E. P.. Comparative pharmacological study on hydroethanol extracts of *Passiflora alata* and *Passiflora edulis* leaves. *Phytotherapy Research*. 15:162-4, 2001.
- [4] COLETA, M.; BATISTA, M. T.; CAMPOS, M. G.; CARVALHO, R.; COTRIM, M. D.; LIMA, T. C.; CUNHA, A. P.. Neuropharmacological evaluation of the putative anxiolytic effects of *Passiflora edulis* Sims, its sub-fractions and flavonoid constituents. *Phytotherapy Research*. 20:1067-1073, 2006.
- [5] DHAWAN, K.; KUMAR, S.; SHARMA, A.. Comparative biological activity study on *Passiflora incarnata* and *P. edulis*. *Fitoterapia*. 72:698-702, 2001.
- [6] DENG, J.; ZHOU, Y.; BAI, M.; LI, H.; LI, L.. Anxiolytic and sedative activities of *Passiflora edulis* f. *flavicarpa*. *Journal of ethnopharmacology*. 128:148-53, 2010.
- [7] MALUF, E.; BARROS, H. M. T.; FROCHTENGARTEN, M. L.; BENTI, R.; LEITE, J. R.. Assessment of the hypnotic/sedative effects and toxicity of *Passiflora edulis* aqueous extract in rodents and humans. *Phytotherapy Research*. 5(6):262-6, 1991.
- [8] CONTI, R. de; OLIVEIRA, D. A. De.; FERNANDES, A. M. P.; MELO, P. S.; RODRIGUEZ, J. A.; HAUN, M.; CASTRO, S. L. de; SOUZA-BRITO, A. R. M.;

- DURAN, N.. Application of a multiendpoint cytotoxicity assay to the trypanocidal compounds 2-propen-1-amine derivatives and determination of their acute toxicity. *In Vitro Molecular Toxicology*. 11:153-60, 1998.
- [9] MELO, P. S.; DURAN, N.; HAUN, M.. Derivatives of dehydrocrotonin, a diterpene lactone isolated from *Croton cajucara*: Cytotoxicity in rat cultured hepatocytes and in V79 cells. *Human Experimental Toxicology*. 21:281-8, 2002.
- [10] MELO, P. S.; DURAN, N.; HAUN, M.. Cytotoxicity of derivatives from dehydrocrotonin on V79 cells and *Escherichia coli*. *Toxicology*. 159:135-41, 2001a.
- [11] MELO, P. S.; DURAN, N.; HAUN, M.. Cytotoxicity of prodigiosin and benznidazole on V79 cells. *Toxicology Letters*. 16:237-42, 2001b.
- [12] RENZI, D.; VALTOLINA, M.; FORSTER, R.. The evaluation of a multi-endpoint cytotoxicity assay system. *Alternatives to Laboratory Animals*. 21:89-96, 1993.
- [13] BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução da Diretoria Colegiada - RDC nº 10, de 9 de março de 2010. Dispõe sobre a notificação de drogas vegetais junto à Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e dá outras providências. *Diário Oficial da União*. 46(1), 2010. 8 p.
- [14] SILVA-JÚNIOR, J. O. C.. *Tese de Doutorado apresentada a USP*. São Paulo, 2006. 127 p.
- [15] PELLOW, S.; CHOPIN, P.; FILE, S. E.; BRILEY, M.. Validation of open: closed arm entries in a elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. *Journal of Neuroscience Methods*. 14:149-67: 1985.
- [16] GRUNDMANN, O.; PHIPPS, S. M.; ZADEZENSKY, I.; BUTTERWECK, V.. Salvia divinorum and Salvinorin A: An Update on Pharmacology and Analytical Methodology. *Planta Med*. 73:1039-46, 2007.
- [17] ALMEIDA, R. N. *Psicofarmacologia: fundamentos práticos*. 1ª Ed.. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006. 384 p.
- [18] DIRESS, A.; LORBERSKIE, B.; LAROCQUE, L.; LI, X.; ALTEEN, M.; ISBRUCKER, R.; GIRARD, M. Study of aggregation, denaturation and reduction of interferon alpha-2 products by size-exclusion high-performance liquid chromatography with fluorescence detection and biological assays. *Journal of Chromatography A*. 1217:3297-306, 2010.

- [19] NOGUEIRA, D. R.; SANGOI, M. S.; SILVA, L. M.; TODESCHINI, V.; DALMORA, S. L.. Determination of rupatadine in pharmaceutical formulation by a validated stability-indicating MEKC method. *Journal of Separation Science*. 31(16-17):3098-105, 2008.
- [20] JONES, G. H.; HERNANDEZ, T. D.; KENDALL, D; A.; MARSDEN, C. A.; ROBBINS, T. W.. Dopaminergic and serotonergic function following isolation rearing in rats: study of behavioural response and postmortem and *in vivo* neurochemistry. *Pharmacology Biochemistry Behavior*. 43:17-35, 1992.
- [21] RANG, H. P.; DALE, M. M.; RITTER, J. M.. *Pharmacology*. 5th Ed.. Churchill Livingstone, 2003. 516 p.
- [22] HAN, H.; MA, Y.; EUN, J. S.; LI, R.; HONG, J. T.; LEE, M. K.; OH, K. W.. Anxiolytic-like effects of anjoinine A isolated from *Zizyphi spinosi* Semen: Possible involvement of GABAergic transmission. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*. 92:206-13, 2009.
- [23] LI, H.; ZHOUA, P.; YANGA, Q.; SHENA, Y.; DENG, J.; LIC, L.; ZHAOD, D.. Comparative studies on anxiolytic activities and flavonoid composition of *Passiflora edulis* 'edulis' and *Passiflora edulis* 'flavicarpa'. *Journal of Ethnopharmacology*. 133:3-16, 2011.
- [24] ANDREWS, M. J.; GARLE, M. J.; CLOTHIER, R. H.; Reduction of the new tetrazolium dye, alamar blue™, in cultured rat hepatocytes and liver fractions. *Alternatives to Laboratory Animals*. 25:641-53, 1997.
- [25] PAILLARD, F.; FINOT, F.; MOUCHE, I.; PRENEZ, A.; VERICAT, J. A.; Use of primary cultures of rat hepatocytes to predict toxicity in the early development of new chemical entities. *Toxicology in Vitro*. 13:693-700, 1999.
- [26] ANAND-SRIVASTAVA, M. B.; GUTKOWSKA, J.; CANTIN, M.. The presence of atrial-natriuretic-factor receptors of ANF-R2 subtype in rat platelets. *Biochemistry Journal*. 278:211-17, 1991.
- [27] VALDERRAMA-NEGRÓN, A. C.; ALVES, W. A.; CRUZ, A. S.; ROGERO, S.O.; SILVA, D. O.. Synthesis, spectroscopic characterization and radiosensitizing properties of acetato-bridged copper(II) complexes with 5-nitroimidazole drugs. *Inorganica Chimica Acta*. 367:85-92, 2011.
- [28] VALDIVIESO-GARCIA, A.; CLARKE, R. C.; RAHN, K.; DURETTE, A.; MACLEOD, D. L.; GYLES, C. L.; Neutral red assay for measurement of quantitative vero cell cytotoxicity. *Applied and Environmental Microbiology*. 59(6):1981-3, 1993.

## ***CAPÍTULO IV: Artigo III***

---

**Estudos de correlação da atividade farmacológica e toxicidade de pós das folhas e cascas de *Erythrina velutina Willd* em diferentes tamanhos de partículas**

## Estudos de correlação da atividade farmacológica e toxicidade de pós das folhas e cascas de *Erythrina velutina* Willd em diferentes tamanhos de partículas

Lidiane Pinto Correia<sup>1,3</sup>, Paula Regina Rodrigues Salgado<sup>4</sup>, Reinaldo Nóbrega de Almeida<sup>4</sup>, Sergio Luiz Dalmora<sup>5</sup>, Horacina Maria de Medeiros Cavalcante<sup>2</sup>, Rui Oliveira Macêdo<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Pernambuco, Avenida Artur de Sá, Cidade Universitária, Recife, PE, Brasil, 50740-521

<sup>2</sup> Departamento de Ciências Farmacêuticas, Laboratórios Unificados de Desenvolvimento e Ensaios de Medicamentos, Universidade Federal da Paraíba, Campus I, João Pessoa, PB, Brasil, 58059-970

<sup>3</sup> Departamento de Farmácia, Universidade Estadual da Paraíba, Rua das Baraúnas, Bodocongó, Campina Grande, PB, Brasil, 58429-500

<sup>4</sup> Laboratório de Tecnologia Farmacêutica Prof. Delby Fernandes de Medeiros, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, PB, Brasil, 58059-900

<sup>5</sup> Departamento de Farmácia Industrial, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brasil, 97105-000

E-mail: [lidiane@lidiane.org](mailto:lidiane@lidiane.org)

### Resumo

O objetivo desse estudo consistiu em obter e caracterizar pós de *Erythrina velutina* (folhas e cascas) em diferentes tamanhos de partículas, através da microscopia e análise térmica, bem como avaliar a atividade ansiolítica e a citotoxicidade da infusão/decoção desses pós. Para caracterização microscópica e térmica das amostras utilizou-se a microscopia eletrônica de varredura (MEV), termogravimetria (TG) e análise térmica diferencial (DTA); a atividade ansiolítica das partículas resultantes do decocto das cascas e da infusão das folhas foram avaliadas através do teste do labirinto em cruz elevado (LCE) e a citotoxicidade, pelo ensaio do vermelho neutro usando a cultura de células NCTC clone 929. O tamanho das partículas dos pós obtidos foram: 710,0; 355,0; 180,0, 150,0 e 75 µm. MEV revelou heterogeneidade do tamanho e morfologia das partículas. As técnicas térmicas diferenciaram as amostras de diferentes tamanhos de partícula através das diferentes etapas de decomposição e energias relacionadas. O decocto da casca (MUC01 e MUC04) e o infuso das folhas (MUF01 e MUF05) (1000 mg Kg<sup>-1</sup>) de *Erythrina velutina* apresentaram atividade ansiolítica. Os valores de DL<sub>50</sub> obtidos para o decocto do pó da casca das partículas MUC02, MUC04 e MUC05 foram de: 72,47 mg mL<sup>-1</sup>, 66,42 mg mL<sup>-1</sup> e 53,01 mg mL<sup>-1</sup>, respectivamente; e para o infuso do pó da folha das partículas MUF01, MUF03 e MUF05 a

DL<sub>50</sub> obtidas foram de 50,08 mg mL<sup>-1</sup>, 49,01 mg mL<sup>-1</sup> e 37,38 mg mL<sup>-1</sup>, respectivamente. Os resultados do teste de citotoxicidade para as amostras da casca e das folhas de *Erythrina velutina* mostraram aumento da toxicidade de acordo com a diminuição do tamanho das partículas dos pós.

*Palavras-chave: Erythrina velutina, granulometria, análise térmica, labirinto em cruz elevado, citotoxicidade*

## 1. Introdução

Há muitas espécies conhecidas de *Erythrina* (Fabaceae) em regiões tropicais e subtropicais [1], incluindo as espécies *Erythrina velutina* e *Erythrina verna*.

Estas espécies são usadas em algumas comunidades brasileiras para tratar a insônia e outros distúrbios do sistema nervoso central [2-3].

A *Erythrina velutina* é uma planta da família Fabaceae encontrada no vale do Rio São Francisco e regiões semi-áridas do Nordeste brasileiro. Popularmente conhecida como mulungu, é utilizada na medicina tradicional por seus efeitos no sistema nervoso central como ansiolítico e sedativo [4]. Os efeitos centrais como por exemplo, o ansiolítico foi demonstrado para *Erythrina velutina*, sustentando o uso popular de extratos dessa planta como agente tranquilizante [5].

Craveiro et al, 2008 [6], avaliaram a toxicidade aguda do extrato aquoso das folhas de *Erythrina velutina* em ratos Wistar adultos tratados com a dose limite de 5 g kg<sup>-1</sup> e foram observados por 14 dias consecutivos, neste período nenhum animal morreu e não houve sinais de toxicidade, indicando que o extrato não foi tóxico.

Inúmeros ensaios *in vitro* têm sido desenvolvidos como alternativas aos testes de toxicidade *in vivo* [7]. Técnicas que envolvem testes *in vitro* são cada vez mais utilizadas devido ao uso reduzido de animais experimentais, seu baixo custo, especificidade e rapidez [8].

O ensaio de citotoxicidade por incorporação do vermelho neutro é baseado na capacidade de células viáveis incorporar o corante vermelho neutro, um corante supravital. O vermelho neutro é um corante catiônico fraco que penetra facilmente as membranas celulares por difusão não-iônica e acumula-se intracelularmente nos lisossomos. Alterações na superfície celular ou na sensível membrana lisossomal levam à fragilidade lisossômica e outras mudanças que gradualmente se tornam irreversíveis. Essas mudanças provocadas pela ação de xenobióticos resultam na diminuição da captação e ligação do vermelho neutro.

Sendo possível distinguir as células viáveis, danificadas, ou mortas, que são a base deste ensaio [9-10].

O objetivo deste estudo foi caracterizar termicamente os pós das drogas vegetais e avaliar a atividade ansiolítica e a citotoxicidade do decocto das cascas e do infuso das folhas dos pós de *Erythrina velutina* em diferentes tamanhos de partículas.

## 2. Materiais e Métodos

### 2.1. Animais

No desenvolvimento deste estudo, foram utilizados camundongos machos albinos da linhagem suíça, com 2 a 3 meses de idade, pesando de 25 a 40 g, provenientes do Biotério Prof. Dr. Thomas George do Laboratório de Tecnologia Farmacêutica Prof. Delby Fernandes de Medeiros da Universidade Federal da Paraíba. O estudo foi realizado de acordo com a aprovação do Comitê de ética em pesquisa animal (CEPA), dessa instituição, com número de protocolo 0207/10. Os animais foram alojados em gaiolas de polietileno (cinco por gaiola) vinte minutos antes do teste, mantidos sob condições controladas de temperatura de  $21 \pm 2$  °C e ciclo claro/escuro de 12 horas (fase clara das 06:00 às 18:00 horas e fase escura de 18:00 às 6:00 horas), tendo livre acesso a alimentação (ração tipo pellets da marca comercial Purina®) e água, exceto durante o experimento.

A *Erythrina velutina* Willd foi identificada por comparação com exsiccatas já depositadas no Herbário Prof. Jayme Coelho de Moraes, localizado no Campus de Ciências Agrárias da Universidade Federal da Paraíba, Areia-PB, pelo botânico Prof. Dr. Leonardo Félix, conforme registro: 10240.

### 2.2. Material Botânico

O material botânico utilizado neste estudo foi coletado no Município de Lagoa Seca-PB, sob coordenadas geográficas: latitude ( $07^{\circ}09'10''$ ), longitude ( $35^{\circ}48'45''$ ), altitude 585 m, e a distância da sede de 5 Km, durante os meses de março e abril de 2010, com o apoio da equipe técnica da Empresa de Assistência Técnica e Extensão Rural da Paraíba (EMATER-PB).

A droga vegetal pulverizada foi submetida a um sistema de peneiras com diferentes tamanhos de poros: 710, 355, 180, 150 e 75  $\mu\text{m}$ . Os pós obtidos nestas diferentes granulometrias foram acondicionados separadamente em frascos de polietileno branco fosco devidamente fechados, para proteção da luz e da umidade e armazenados a temperatura

ambiente, em média de 25 °C. As amostras identificadas como MUC01, 02, 03, 04 e 05/MUF01, 02, 03, 04 e 05, de acordo com a granulometria do pó.

### **2.3. Preparação dos Pós**

As cascas e folhas de *Erythrina velutina* foram desidratadas em estufa com circulação de ar na temperatura controlada de 40 °C. O material seco foi moído usando um moinho de quatro facas móveis e quatro fixas, da marca Marconi, modelo Willey, acoplado a um tamis de 10 mesh.

### **2.4. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)**

As análises microscópicas dos pós das plantas em diferentes granulometrias foram realizadas através de um microscópio eletrônico de varredura, modelo MEV TM-1000, Hitachi. O aumento utilizado foi de 100 vezes em relação ao tamanho real.

### **2.5. Estudos de Análise Térmica**

#### *2.5.1. Termogravimetria (TG)*

As curvas termogravimétricas dinâmicas dos pós das plantas em diferentes granulometrias MUF (710, 180 e 75 µm) e MUC (355, 150 e 75 µm) foram obtidas em uma termobalança modelo TGA-50H, da Shimadzu, na razão de aquecimento de 10 °C min<sup>-1</sup>, variando de 25 °C até temperatura de 900 °C. Utilizou-se atmosfera de nitrogênio e de ar sintético, com fluxo de 50 mL min<sup>-1</sup>. Foi utilizado massa de 5,00 ± 0,05 mg acondicionada em cadinho de alumina para cada amostra. A calibração da termobalança foi feita utilizando oxalato de cálcio monohidratado. As curvas foram analisadas através do software TasyS 60, da Shimadzu, para caracterizar as etapas de perda de massa.

#### *2.5.2. Análise Térmica Diferencial (DTA)*

As curvas térmicas diferenciais dos pós das plantas em diferentes granulometrias MUF (710, 180 e 75 µm) e MUC (355, 150 e 75 µm) foram obtidas em um analisador térmico diferencial, modelo DTA-50, da Shimadzu, na razão de aquecimento de 10 °C min<sup>-1</sup>, variando de 25 °C até temperatura de 900 °C, em atmosfera de nitrogênio, com fluxo de 50 mL min<sup>-1</sup>. As amostras foram acondicionadas em cadinho de alumina utilizando massa de 5,00 ± 0,5 mg para cada amostra. A calibração do equipamento foi realizada através do ponto de fusão e

entalpia dos padrões de índio e zinco. As curvas térmicas diferenciais foram analisadas usando o programa TasyS 60, da Shimadzu.

## 2.6. Labirinto em Cruz Elevado

O labirinto em cruz elevado utilizado foi da marca Insight, modelo EP 150. O módulo é feito de acrílico e consiste em quatro braços, sendo dois braços com paredes laterais e sem cobertura (braços fechados), medindo 30 cm de comprimento por 6 cm de largura e 16 cm de altura, colocados perpendicularmente a dois braços desprovidos de paredes laterais (braços abertos) com o mesmo comprimento e largura. Cada braço é posicionado a 90 ° do braço adjacente e cruzam-se numa área central onde o animal é posicionado. O labirinto é apoiado sob um suporte com 25 cm de elevação em relação ao solo.

Para realização do teste foram utilizados grupos com 5 camundongos tratados com uma única administração por via oral. Aos grupos experimentais foi administrado o decocto das cascas e infuso das folhas da *Erythrina velutina* (1000 mg Kg<sup>-1</sup>), o grupo controle foi tratado com o veículo e o grupo padrão com o Diazepam, na dose de 2 mg Kg<sup>-1</sup>. Sessenta minutos após a administração, os camundongos foram colocados individualmente no centro do labirinto, para que eles pudessem explorar o mesmo.

Os parâmetros número de entradas e o tempo total de permanência nos braços abertos e fechados foram avaliados durante um período de 5 minutos. A entrada nos braços foi definida como a entrada das quatro patas do animal dentro do braço [11-12].

Todos os animais utilizados nesse estudo foram eutanasiados por deslocamento cervical, como recomendado pela comunidade científica após os ensaios [13].

## 2.7. Cultura Celular L929

Ensaio de citotoxicidade foram realizados *in vitro* utilizando-se culturas de células NCTC clone 929 (fibroblastos de mamíferos) por incorporação do corante vermelho neutro. As células foram mantidas no meio MEM (Meio mínimo essencial de Eagle com 0,1 mM de aminoácidos não essenciais, 1mM de sódio e suplementado com 10% de soro bovino fetal). As células foram destacadas com tripsina e a suspensão celular ajustada para 2 x 10<sup>5</sup> células mL<sup>-1</sup>. Um volume de 0,2 mL da suspensão celular foi adicionada em cada poço da microplaca de 96 poços e incubada em incubadora de CO<sub>2</sub> (mantida a 5% CO<sub>2</sub>, e 37 °C) por 24 horas. Em seguida, as células foram expostas a meio sem (controle) ou com *Erythrina velutina* casca ou folha (concentração entre 1.47 - 47.0 mg mL<sup>-1</sup>). Cada concentração foi testada em triplicata.

No final da incubação, os ensaios de citotoxicidade por incorporação do corante vermelho neutro foram avaliados.

## 2.8. Ensaio de Citotoxicidade: Vermelho Neutro

O ensaio de citotoxicidade *in vitro* foi realizado baseado no ensaio de captura do vermelho neutro conforme descrito por Diress et al, 2010; Nogueira et al, 2008 [14-15]. Após a remoção do meio de cultura, as células foram lavadas uma vez com PBS. Após serem incubadas durante 4 h com meio livre de soro contendo 50 µg de vermelho neutro. ml<sup>-1</sup>, as células foram lavadas com tampão PBS e posteriormente com CaCl<sub>2</sub> (1%) em formaldeído 0,5%, em seguida 0,2 mL de uma solução de ácido acético (1%) em etanol (50% ) foi adicionado a cada poço para fixar as células e remover o vermelho neutro da solução. As placas foram levemente agitadas por 10 minutos em um agitador de placas e as absorbâncias das soluções eram lidas a 570 nm usando um leitor de microplaca Thermo Scientific Multiskan FC (Vantaa, Finlândia).

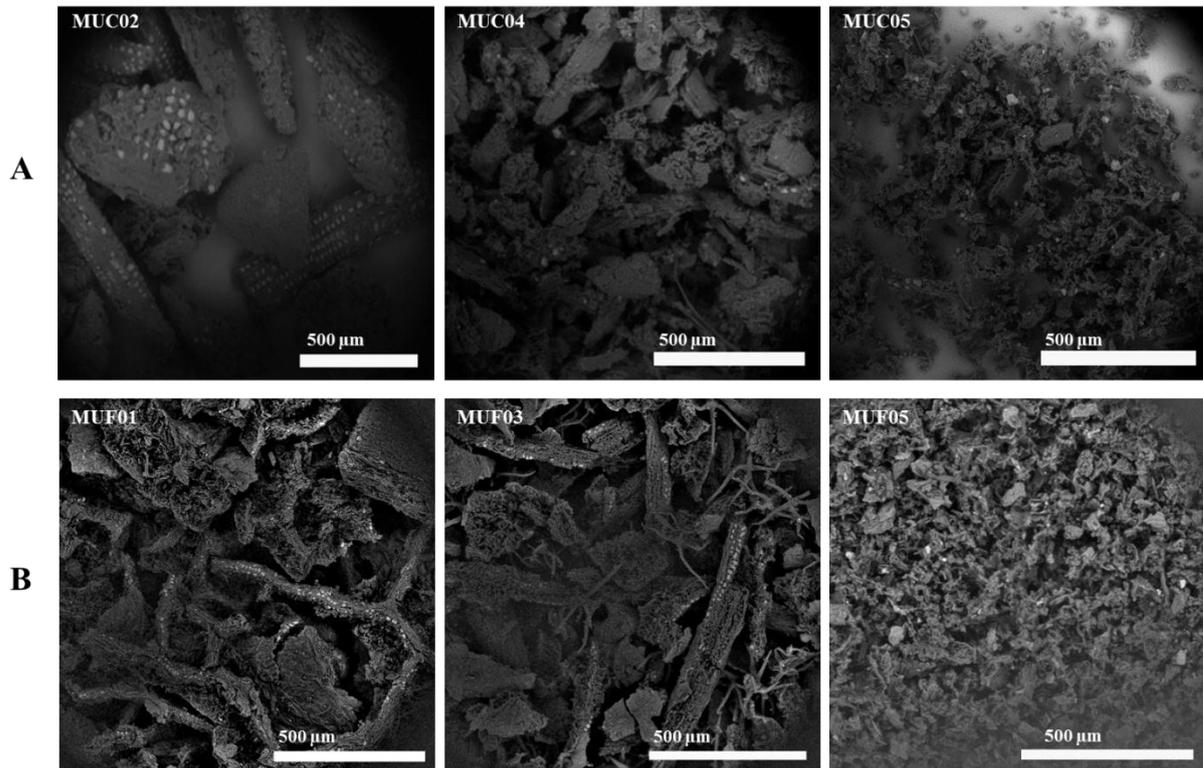
## 2.9. Tratamento dos Dados

Os resultados do teste labirinto em cruz elevado foram expressos como média ± EPM, os valores médios representam os valores dos grupos tratados menos a média do grupo controle (água). Os resultados da avaliação de citotoxicidade foram expressos pela média de mortalidade celular, cada experimento de citotoxicidade foi realizado em triplicata. A DL50 representa a concentração que produziu 50% de mortalidade celular. Os resultados foram expressos em percentual em relação ao grupo controle.

## 3. Resultados e Discussões

### 3.1. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Através do teste da granulometria foram obtidos pós com os seguintes tamanhos de partícula: 710,0; 355,0; 180,0; 150,0 e 75,0 µm, definidos como 01, 02, 03, 04 e 05, respectivamente. A caracterização dos pós das folhas e das cascas de *Erythrina velutina* foi avaliada por MEV, como pode ser visto na **Figura IV-1**.



**Figura IV-1:** Eletromicrografias de varredura dos pós da planta correspondendo a MUC e MUF em diferentes tamanhos de partícula

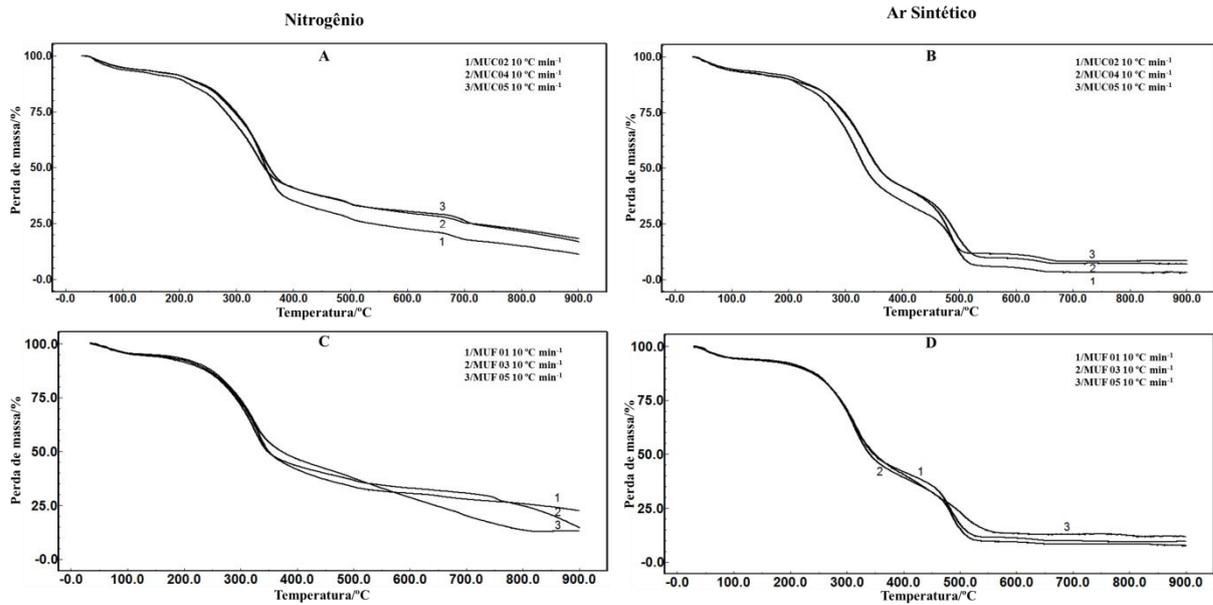
A Figura IV-1A mostra os diferentes tamanhos de partículas das amostras MUC 02, 04 e 05 e a Figura IV-1B para as amostras MUF 01, 03 e 05. Através das imagens verifica-se nas amostras a diversidade morfológica dos grânulos, o que demonstra limitações no processamento de plantas para obtenção de pós uniformes. O tamanho das partículas da matéria-prima vegetal pode influenciar no efeito farmacológico e toxicológico de preparações líquidas de uso popular, como infusos, decoctos e macerados, já que a superfície de contato com o solvente extrator é diferente.

### 3.2. Estudos de Análise Térmica

#### 3.2.1. Termogravimetria (TG)

As curvas termogravimétricas dinâmicas em atmosfera de nitrogênio das amostras MUC02, MUC04 e MUC05 (**Figura IV-2A**) e MUF01, MUF03 e MUF05 (**Figura IV-2C**) apresentaram quatro e três etapas de decomposição, respectivamente.

As curvas termogravimétricas dinâmicas em atmosfera de ar sintético das amostras MUC02, MUC04 e MUC05 (**Figura IV-2B**) e MUF01, MUF03 e MUF05 (**Figura IV-2D**), apresentaram cinco e quatro etapas de decomposição, respectivamente.



**Figura IV-2:** Curvas termogravimétricas dinâmicas em nitrogênio e ar sintético das amostras MUC e MUF em diferentes tamanhos de partícula

A primeira etapa ocorreu na faixa de temperatura de 33-116 °C (cascas) e 30-137 °C (folhas), representando 5,8; 6,0 e 6,6%, para MUC02, MUC04 e MUC05 e 5,4; 5,7 e 4,7%, para MUF01, MUF03 e MUF05, respectivamente, esta etapa pode ser atribuída à perda de voláteis, majoritariamente água.

A segunda etapa de decomposição representa a degradação do conjunto dos macros e micros constituintes das amostras, ocorrendo nas faixas de temperatura de 226,0-373,0 °C; 210,0-371,0 °C e 208,0-364,0 °C para MUC02, MUC04 e MUC05, com perda de massa de 49,0% 45,0% e 43,0% e para MUF01, MUF03 e MUF05, nas faixas de 231,0-350,0 °C; 230,0-349,0 °C e 230,0-344,0 °C, correspondendo a uma perda de massa de 37,3% 38,2% e 34,3%, respectivamente.

A terceira etapa de decomposição ocorreu de forma mais lenta, com intervalo de temperatura extenso para as amostras das cascas. As faixas avaliadas e respectivas perdas de massa para essa etapa foram: 373,0-700,0°C (21,8%), 371,0-701,0°C (20,0%) e 364,0-494°C (11,2%), para MUC02, MUC04 e MUC05, respectivamente. Para as amostras de folha, as faixas de temperatura e a porcentagem de perda de massa para as amostras MUF01, MUF03 e MUF05, foram de: 350,0-900 °C (27,2%), 349,0-900 °C (35,0%) e 344,0-900 °C (43,3%).

Para amostra MUC05 observou-se uma quarta etapa de decomposição, não discriminada nas demais amostras, ocorrendo na faixa de temperatura de 494 -715°C, correspondendo a 9,8% de massa. Em termo de percentual total, essa amostra foi a que perdeu menos massa, de resíduo não degradável, correspondendo a 30% da massa total. Para as amostras da folha a

perda de massa final foi crescente com a diminuição do tamanho das partículas, sendo de 69, 79 e 82%, obedecendo a seguinte ordem: MUF01<MUF03<MUF05.

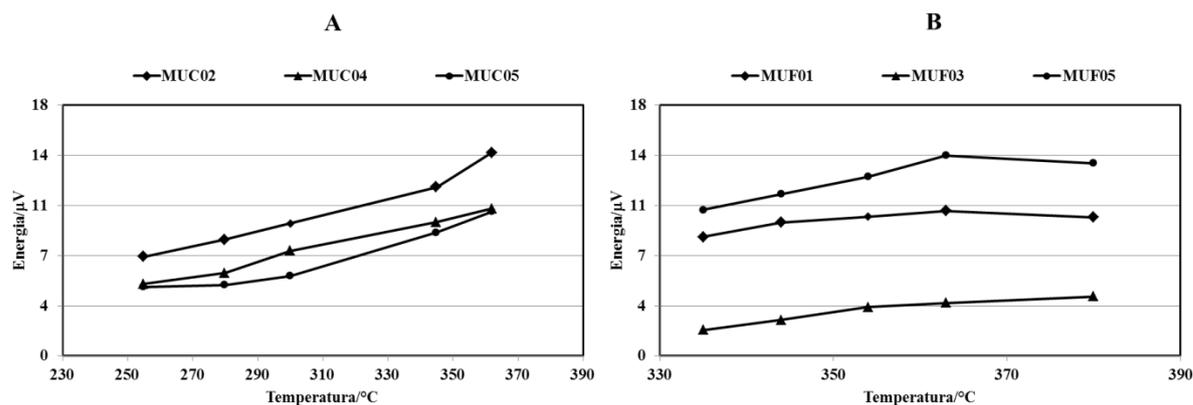
A primeira etapa ocorreu na faixa de temperatura de 32-130 °C (cascas) e 31-188 °C (folhas), representando 7,0; 5,8 e 6,0%, para MUC02, MUC04 e MUC05 e 7,7; 7,8 e 7,3%, para MUF01, MUF03 e MUF05, respectivamente, esta etapa também pode ser atribuída à perda de voláteis, majoritariamente água.

A segunda/ terceira etapas de decomposição das amostras MUC02, MUC04 e MUC05 ocorreram nas seguintes faixas de temperatura e perda de massa percentual: 244,0-365,0 °C (38,5%) / 365,0-457,0 °C (16,0%); 202,0-364,0 °C (42,8%) / 364,0- 461°C (15,0%) e 197-353 °C (46,6%) / 353,0- 464°C (17,7%). A quarta/ quinta etapa de decomposição das amostras MUC02, MUC04 e MUC05 ocorreram nas faixas de temperatura e perda de massa percentual: 457,0-517 °C (24,5%) / 517-659,0°C (4,1%); 461,0-519,0 °C (20,2%) / 519,0-660,0 °C (5,0%) e 462-506,0 °C (13,3%) / 506-667 °C (4,2%), respectivamente. Da temperatura final da quinta etapa de decomposição até 900°C, não foi verificada perda de massa, havendo a formação dos resíduos não-degradáveis.

A segunda etapa de decomposição das amostras das folhas, ocorreram nas seguintes faixas de temperatura e perda percentual de massa, MUF01 227,8-353 °C (40,5%); MUF03 219,3-347 °C (41,8%) e MUF05 240-355 °C (38%). A terceira etapa ocorreu nas faixas de temperatura e perda de massa percentual MUF01 353,0-461,4 °C (15,4%); MUF03 347,0-471,5 °C (20,5%) e MUF05 355-478 °C (21,0%). A quarta etapa ocorreu nas faixas de temperatura e perda de massa percentual MUF01 461,4-513,6 °C (19%); MUF03 471,5-518,5 °C (16,7%) e MUF05 478-552,1 °C (13,1%). A amostra MUF05 mostrou maior proporção de resíduos não-degradáveis, equivalendo a aproximadamente 20 % de massa.

### 3.2.2. *Análise Térmica Diferencial (DTA)*

As curvas de DTA foram avaliadas na faixa de temperatura correspondente a segunda etapa de decomposição das curvas termogravimétricas em atmosfera de nitrogênio **Figura IV-3A (cascas)** e **Figura IV-3B (folhas)**. Dentro dessa faixa observaram-se transições medidas através da altura do pico que corresponderam a uma energia média de 10,07; 7,43 e 6,84  $\mu\text{V}$  para MUC02, MUC04 e MUC05, respectivamente e de 9,44; 3,09 e 11,12  $\mu\text{V}$  para MUF01, MUF03 e MUF05, respectivamente. Os valores medidos mostram diferenças no comportamento térmico em função dos tamanhos das partículas dos pós.



**Figura IV-3:** Altura dos picos das amostras MUC e MUF em diferentes tamanhos de partícula

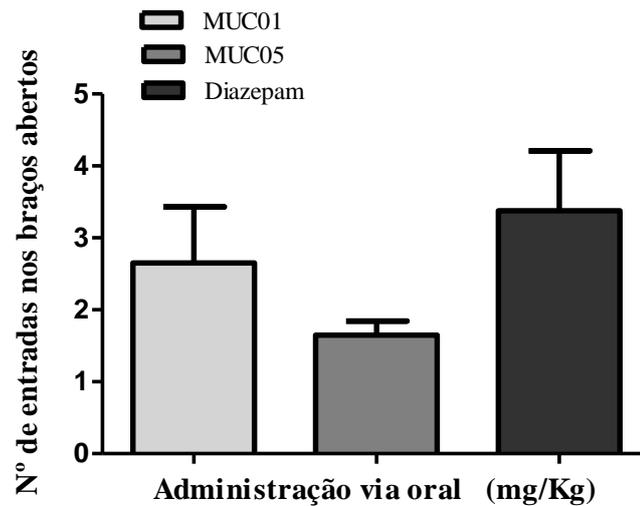
### 3.3. Estudo da atividade ansiolítica

Para avaliar a atividade ansiolítica do decocto do pó da casca MUC01 e MUC05 e do infuso das folhas MUF01 e MUF04 ( $1000 \text{ mg Kg}^{-1}$ ) para as duas amostras da *Erythrina velutina*, ambos administrados via oral, foi utilizado o teste de labirinto em cruz elevado (LCE) em camundongos. Este teste é um modelo clássico, bastante utilizado para avaliar o efeito de substâncias ansiolíticas [16-17].

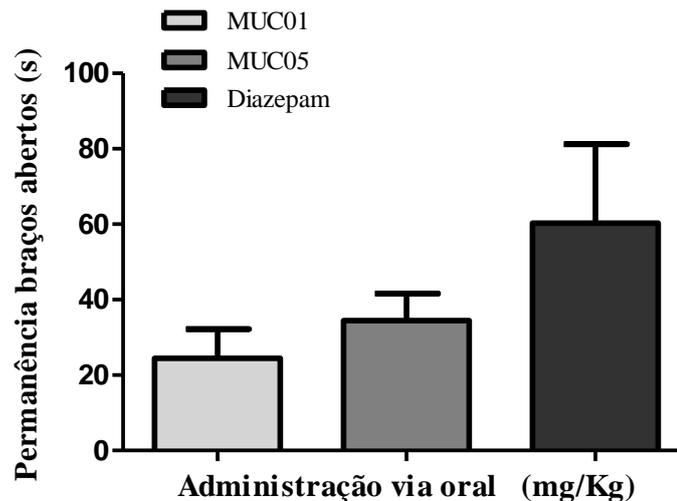
A eficácia de um medicamento ansiolítico pode ser demonstrada por um aumento na atividade de roedores nos braços abertos. Índices de ansiedade convencional no teste LCE aumenta as entradas nos braços abertos e o tempo gasto nas áreas do labirinto [18].

O diazepam é usado como um ansiolítico padrão e também tem sido frequentemente empregado na farmacologia comportamental como um composto referência para substâncias com ação potencialmente ansiolítica [19]. O diazepam e outras drogas com atividade ansiolítica aumentam o tempo de permanência dos animais nos braços abertos [20].

Neste estudo o comportamento dos animais usando DZP ( $2 \text{ mg Kg}^{-1}$ ), administrado via oral, e o decocto da casca com as amostras MUC01 e MUC05 ( $1000 \text{ mg Kg}^{-1}$ ) da *Erythrina velutina*, demonstraram aumentar o número de entradas e no tempo de permanência dos animais nos braços abertos no teste LCE, conforme as **Figura IV-4** e **Figura IV-5**. Estes resultados sugerem que estas drogas vegetais apresentam atividade ansiolítica, sendo mais pronunciada em MUC01.

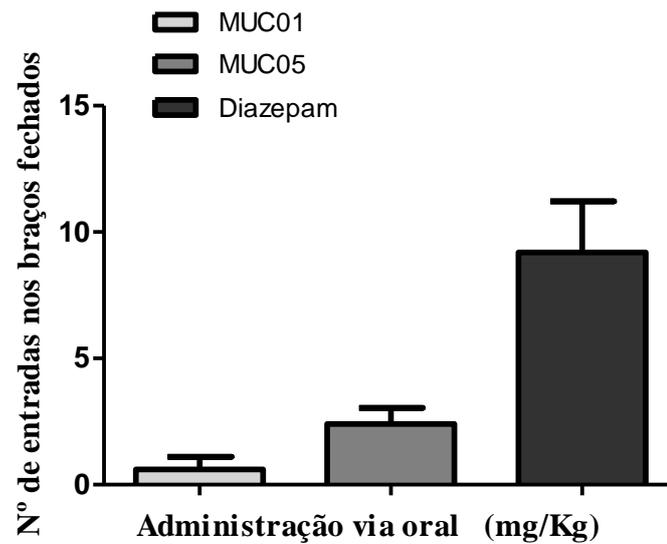


**Figura IV-4:** Número de entradas nos braços abertos dos animais tratados com decocto da casca de *Erythrina velutina*, partículas 01 e 05, no teste de labirinto em cruz elevado

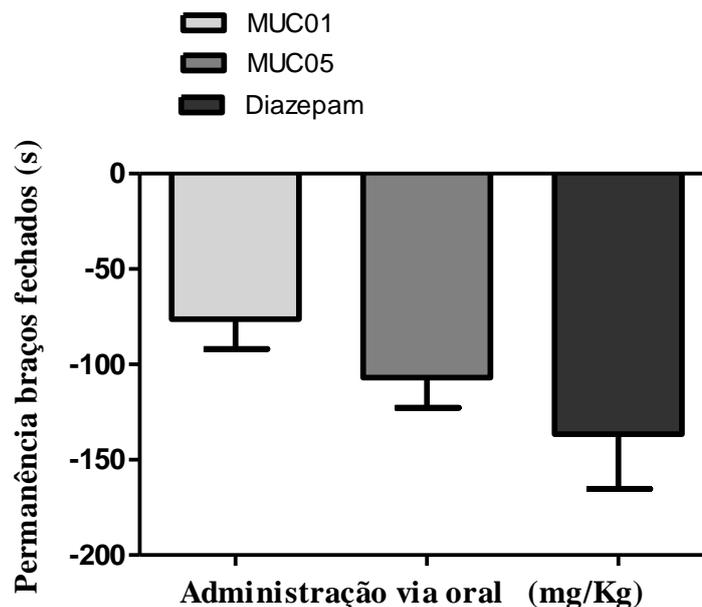


**Figura IV-5:** Tempo de permanência nos braços abertos dos animais tratados com decocto da casca de *Erythrina velutina*, partículas 01 e 05, no teste de labirinto em cruz elevado

Observou-se que os animais tratados com DZP (2 mg Kg<sup>-1</sup>) e o decocto das amostras MUC01 e MUC05 aumentaram o número de entradas nos braços fechados no teste LCE, , conforme ilustrado na **Figura IV-6**. Os dados apresentados na **Figura IV-7** demonstram que houve uma diminuição no tempo de permanência nos braços fechados induzida pelo DZP (2 mg Kg<sup>-1</sup>) e pelo decocto das amostras MUC01 e MUC05. Possivelmente a diminuição no tempo de permanência nos braços fechados corroboram com o efeito ansiolítico destas amostras.

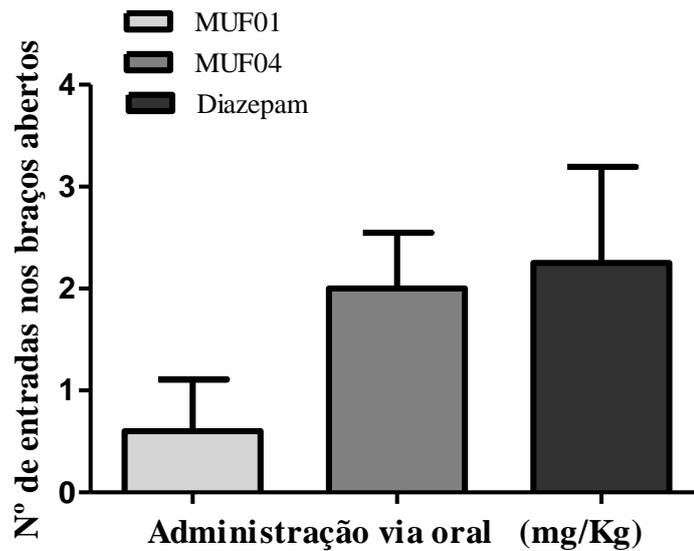


**Figura IV-6** Número de entradas nos braços fechados dos animais tratados com decocto da casca de *Erythrina velutina*, partículas 01 e 05, no teste de labirinto em cruz elevado

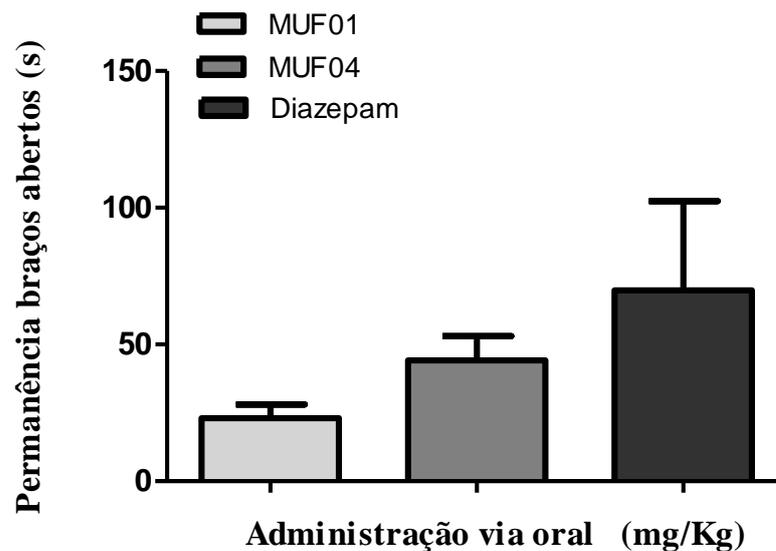


**Figura IV-7** Tempo de permanência nos braços abertos dos animais tratados com decocto da casca de *Erythrina velutina*, partículas 01 e 05, no teste de labirinto em cruz elevado

O infuso das folhas MUF01 e MUF04 ( $1000 \text{ mg Kg}^{-1}$ ) da *Erythrina velutina*, também demonstrou aumentar o número de entradas e o tempo de permanência dos animais nos braços abertos no teste LCE, conforme **Figura IV-8** e **Figura IV-9**. Estes resultados indicam que os infusos das folhas de *Erythrina velutina* com as amostras MUF01 e MUF04 apresentam atividade ansiolítica, sendo a atividade mais pronunciada para MUF04.



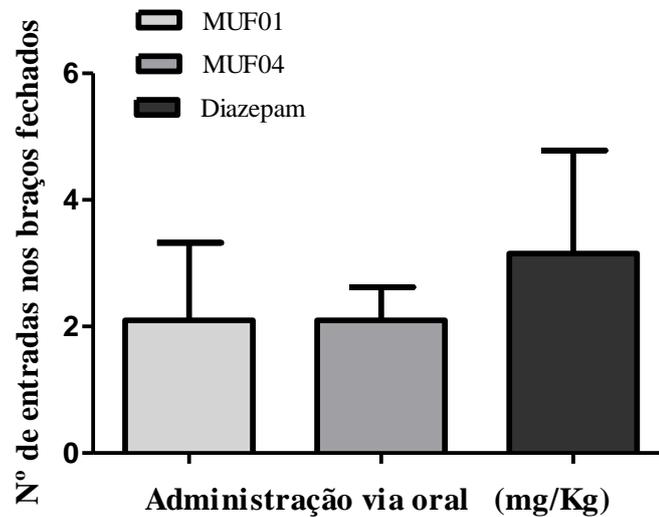
**Figura IV-8:** Número de entradas nos braços abertos dos animais tratados com infuso das folhas de *Erythrina velutina*, partículas 01 e 04, no teste de labirinto em cruz elevado



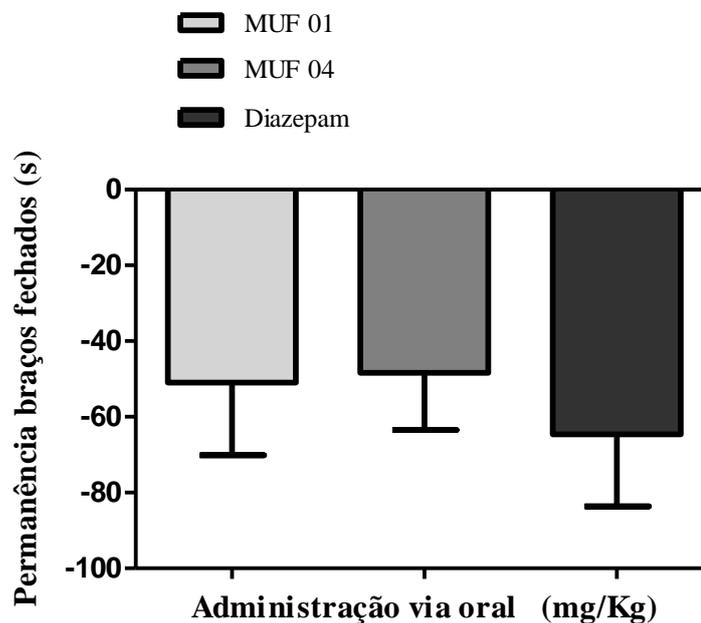
**Figura IV-9:** Tempo de permanência nos braços abertos dos animais tratados com infuso das folhas de *Erythrina velutina*, partículas 01 e 04, no teste de labirinto em cruz elevado

Observou-se que os animais tratados com DZP ( $2 \text{ mg Kg}^{-1}$ ) e o infuso das amostras MUF01 e MUF04 aumentaram o número de entradas nos braços fechados no teste LCE, conforme ilustrado na **Figura IV-10**. Os dados apresentados na **Figura IV-11** demonstram que houve uma diminuição no tempo de permanência nos braços fechados induzida pelo DZP ( $2 \text{ mg Kg}^{-1}$ ) e pelo infuso das amostras MUF01 e MUF04. Possivelmente a diminuição no

tempo de permanência nos braços fechados corroboram com o efeito ansiolítico destas amostras.



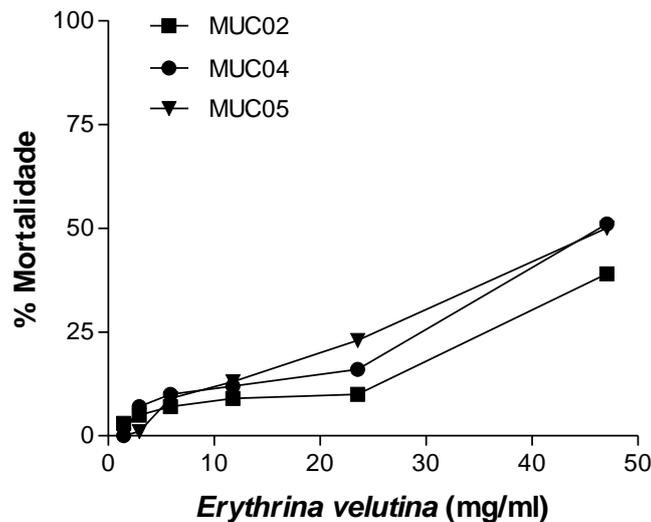
**Figura IV-10** Número de entradas nos braços fechados dos animais tratados com infuso das folhas de *Erythrina velutina*, partículas 01 e 04, no teste de labirinto em cruz elevado



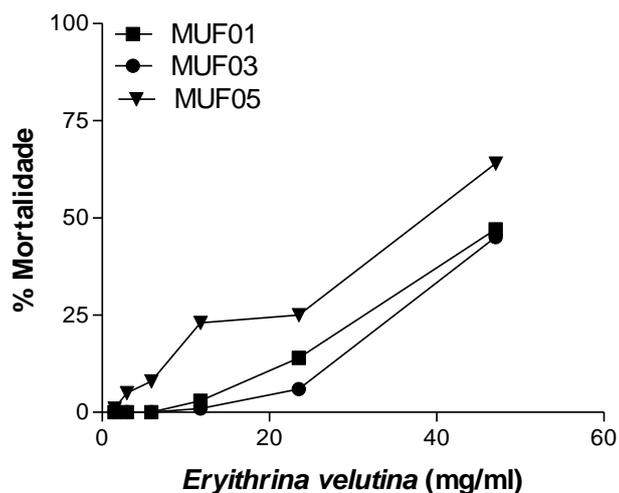
**Figura IV-11** Tempo de permanência nos braços fechados dos animais tratados com infuso das folhas de *Erythrina velutina*, partículas 01 e 04, no teste de labirinto em cruz elevado

### 3.4. Estudo da citotoxicidade

A citotoxicidade do decocto do pó da casca (**Figura IV-12**), bem como do infuso (**Figura IV-13**) do pó da folha da *Erythrina velutina* nos diferentes tamanhos de partículas foi avaliada por meio do ensaio de vermelho neutro, utilizando a cultura celular NCTC 929. O vermelho neutro é um corante vital que é incorporado nos lisossomas das células viáveis. O ensaio de incorporação do vermelho neutro é basicamente um método que fornece informações sobre a viabilidade e o crescimento celular [21].



**Figura IV-12:** Mortalidade celular após 24 h de incubação com decocto das cascas de *Erythrina velutina*, a altura de cada ponto representa a média da triplicata



**Figura IV-13:** Mortalidade celular após 24 h de incubação com infuso das folhas de *Erythrina velutina*, a altura de cada ponto representa a média da triplicata

Os valores de  $DL_{50}$  obtidos para o decocto do pó da casca MUC02, MUC04 e MUC05 foram de:  $72,47 \text{ mg mL}^{-1}$ ,  $66,42 \text{ mg mL}^{-1}$  e  $53,01 \text{ mg mL}^{-1}$ , respectivamente; e para o infuso do pó da folha MUF01, MUF03 e MUF05 a  $DL_{50}$  obtidas foram de  $50,08 \text{ mg mL}^{-1}$ ,  $49,01 \text{ mg mL}^{-1}$  e  $37,38 \text{ mg mL}^{-1}$ , respectivamente.

Os resultados do ensaio do vermelho neutro o decocto do pó da casca MUC02, MUC04 e MUC05, e o infuso do pó da folha MUF01, MUF03 e MUF05 da *Erythrina velutina* mostraram aumento da toxicidade de acordo com a diminuição do tamanho das partículas dos pós. Essa distinção quanto a toxicidade entre as partículas sugere que o tamanho das partículas do pó influencia na citotoxicidade quando se aplica o ensaio de vermelho neutro, utilizando cultura de célula NCTC 929. De acordo com [22], o processo de pulverização de drogas vegetais é uma etapa crítica na produção de medicamentos fitoterápicos.

A comparação dos resultados das potências farmacológica e toxicológica mostram claramente uma equivalência farmacológica entre as drogas vegetais MUC01 e MUF04, respectivamente maior tamanho de partícula (MUC01) e menor tamanho de partícula (MUF04) e uma inversão na toxicidade com as amostras na mesma ordem. A maior toxicidade na amostra MUF05 em relação a amostra MUC05 é indicativo de justificativa da recomendação da ANVISA para o uso das cascas de mulungu nas drogas vegetais.

#### 4. Conclusões

As técnicas térmicas mostraram diferentes perfis térmicos em relação a perda de massa e energia das amostras dos pós obtidos em diferentes tamanhos de partícula. O decocto da casca MUC01 e MUC05 de *Erythrina velutina* ( $1000 \text{ mg Kg}^{-1}$ ) e o infuso das folhas MUF01 e MUF04 ( $1000 \text{ mg Kg}^{-1}$ ) da *Erythrina velutina* apresentaram atividade ansiolítica. Os resultados do vermelho neutro com MUC02, MUC04 e MUC05 e das folhas MUF01, MUF03 e MUF05 da *Erythrina velutina* mostraram aumento da toxicidade de acordo com a diminuição do tamanho das partículas dos pós.

#### 5. Agradecimentos

Os autores agradecem a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio técnico e financeiro. Agradecem também a Empresa de Assistência Técnica e Extensão Rural da Paraíba (EMATER-PB).

## 6. Referências

- [1] NEILL, D. A.. Experimental studies on species relationships in *Erythrina* (Leguminosae: Papilionoidae). *Annals of the Missouri Botanical Garden*. 75:886-969, 1988.
- [2] LEITE, M. N.; OLIVEIRA, M. B.; GOMES, E. C.; LOESH, C. L.; BRAGA, G. H. C.. Avaliação da tintura de *Erythrina mulungu* Mart constituintes do produto cardiosetylgotas. In: *Proceedings of the XVI Brazilian Medicinal Plants Symposium*. Recife-PE, Brazil, 2000. pp. 184.
- [3] RODRIGUES, V. E. G.; CARVALHO, D. A.. *Plantas Mediciniais no Domínio dos Cerrados*. Lavras: UFLA, 2001. 180 p.
- [4] RAUPP, I. M.; SERENIKI, A.; VIRTUOSO, S.; GHISLANDI, C.; CAVALCANTI, E.; SILVA, EL.; TREBIEN, H. A.; MIGUEL, O. G.; ANDREATINI, R.. Anxiolytic-like effect of chronic treatment with *Erythrina velutina* extract in the elevated plus-maze test. *Journal of Ethnopharmacology*. 118(2):295-9, 2008.
- [5] RIBEIRO, M. D.; ONUSIC, G. M.; POLTRONIERI, S. C.; VIANA, M. B.. Effect of *Erythrina velutina* and *Erythrina mulungu* in rats submitted to animal models of anxiety and depression. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. 39(2):263-70, 2006.
- [6] CRAVEIRO, A. C. S.; CARVALHO, D. M. M.; NUNES, R. de S.; FAKHOURI, R.; RODRIGUES, S. A.; TEIXEIRA-SILVA, F.. Toxicidade aguda do extrato aquoso de folhas de *Erythrina velutina* em animais experimentais. *Revista Brasileira de Farmacognosia*. 18(Suplemento):739-43, 2008.
- [7] MELO, P. S.; FABRIN-NETO, J. B.; MORAES, S. G.; ASSALIN, R. M.; DURÁN, N.; HAUN, M.. Comparative toxicity of effluents processed by different treatments in V79 fibroblasts and the Alga *Selenastrum capricornutum*. *Chemosphere*. 62:1207-13, 2006.
- [8] ASENSIO, V.; KILLE, P.; MORGAN, A. J.; SOTO, M.; MARIGOMEZ, I.. Metallothionein expression and Neutral Red uptake as biomarkers of metal exposure and effect in *Eisenia fetida* and *Lumbricus terrestris* exposed to Cd. *European Journal of Soil Biology*. 43:233-8, 2007.
- [9] BARILE, F.A.; *Introduction to in vitro Cytotoxicology Mechanisms and Methods*. New York: CRC Press, 1994. 240p.
- [10] REPETTO, G.; DEL-PESO, A.; ZURITA, J. L.. Neutral red uptake assay for the estimation of cell viability/cytotoxicity. *Nature Protocols*. 3:1125-31, 2008.

- [11] PELLOW, S.; CHOPIN, P.; FILE, S. E.; BRILEY, M.. Validation of open: closed arm entries in a elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. *Journal of Neuroscience Methods*. 14:149-67: 1985.
- [12] GRUNDMANN, O.; PHIPPS, S. M.; ZADEZENSKY, I.; BUTTERWECK, V.. *Salvia divinorum* and Salvinorin A: An Update on Pharmacology and Analytical Methodology. *Planta Med.* 73:1039-46, 2007.
- [13] ALMEIDA, R. N. Psicofarmacologia: fundamentos práticos. 1ª Ed.. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006. 384 p. SILVA-JÚNIOR, J. O. C.. *Tese de Doutorado apresentada a USP*. São Paulo, 2006. 127 p.
- [14] DIRESS, A.; LORBERSKIE, B.; LAROCQUE, L.; LI, X.; ALTEEN, M.; ISBRUCKER, R.; GIRARD, M. Study of aggregation, denaturation and reduction of interferon alpha-2 products by size-exclusion high-performance liquid chromatography with fluorescence detection and biological assays. *Journal of Chromatography A*. 1217:3297-306, 2010.
- [15] NOGUEIRA, D. R.; SANGOI, M. S.; SILVA, L. M.; TODESCHINI, V.; DALMORA, S. L.. Determination of rupatadine in pharmaceutical formulation by a validated stability-indicating MEKC method. *Journal of separation science*. 31(16-17):3098-105, 2008
- [16] WEI, X. Y.; YANG, J. Y.; WANG, J. H.; WU, C. F.. Anxiolytic effect of saponins from *Panax quinquefolium* in mice. *Journal of Ethnopharmacology*. 111:613-8, 2007.
- [17] PITCHAIAH, G.; VISWANATHA, G. L.; SRINATH, R.; NANDAKUMAR, K.; DAYABARAN, D.; FLORANCE, E. J.. Anxiolytic and Anticonvulsant Activity of Aqueous Extract of Stem Bark of *Erythrina variegata* in Rodents. *International Journal of Pharmaceutical Technology Research*. 2(1), 40-48, 2010.
- [18] HAN, H.; MA, Y.; EUN, J. S.; LI, R.; HONG, J. T.; LEE, M. K.; OH, K. W.. Anxiolytic-like effects of anjoinine A isolated from *Zizyphi spinosi* Semen: Possible involvement of GABAergic transmission. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*. 92:206-213, 2009.
- [19] SODERPHALAM, R.; HJORTH, S.; ENGEL, J.A.. Effect of 5HT1A receptor agonists and L-5 HTP in Montgomery's conflict test. *Pharmacology, biochemistry, and behavior*. 32:259-65, 1989.
- [20] RANG, H. P.; DALE, M. M.; RITTER, J. M.; MOORE, P. K. *Farmacologia*. 5ª Ed.. Rio de Janeiro: Editora Elsevier, 2003. 920 p.
- [21] ZUANG, V.. The neutral red release assay: A review. 575-599, 2001.

[22] SILVA JÚNIOR, J. O. C. *Tese de Doutorado*. USP: São Paulo, 2006. 127 p.

## ***CONCLUSÕES***

---

#### 4. Conclusões Gerais

A droga vegetal *Erythrina velutina* mostrou diferenças significativas no comportamento físico e químico em função dos tamanhos de partículas do pó. A Pir-CG/EM permitiu caracterizar e diferenciar quimicamente a composição dos pós em diferentes tamanhos de partículas.

A Pir-CG/EM apresentou dois picos comuns nas três temperaturas correspondendo as substâncias Neoftadieno 2,6,10-Trimetil, 14 e 3-Eicosino, classificando os pós das plantas pelo valor das áreas de pico com MUF05>MUF03>MUF01, fato confirmado pelo fluxo de calor no DTA e perda de massa no TG e uniformidade de tamanho do MEV.

A droga vegetal *Passiflora edulis* mostrou diferenças no comportamento físico e químico em função dos tamanhos de partículas do pó, visualizadas através do MEV e da análise térmica.

Amostras de infusos com diferentes tamanhos de partícula de *Passiflora edulis* demonstraram atividades farmacológicas e toxicológicas distintas, sugerindo que a granulometria do pó é um parâmetro que influencia estas atividades.

As técnicas térmicas mostraram diferentes perfis térmicos em relação a perda de massa e energia das amostras dos pós obtidos em diferentes tamanhos de partícula. O decocto da casca MUC01 e MUC05 de *Erythrina velutina* (1000 mg Kg<sup>-1</sup>) e o infuso das folhas MUF01 e MUF04 (1000 mg Kg<sup>-1</sup>) da *Erythrina velutina* apresentaram atividade ansiolítica. Os resultados do vermelho neutro com MUC02, MUC04 e MUC05 e das folhas MUF01, MUF03 e MUF05 da *Erythrina velutina* mostraram aumento da toxicidade de acordo com a diminuição do tamanho das partículas dos pós.

***PERSPECTIVAS***

---

## **5. Perspectivas**

✓ Continuar a linha de pesquisa utilizando diferentes drogas vegetais utilizadas popularmente e constantes na RDC 10/10.

## ***REFERÊNCIAS***

---

---

## Referências

- [1] WORLD HEALTH ORGANIZATION. *Culture and Health*. Paris: World Health Organization, 1996, 196 p.
- [2] HOUREAU, L.; DA SILVA, E. J.. Medicinal plants: a re-emerging health aid. *Electronic Journal of Biotechnology*. 2(2):56-70, 1999.
- [3] ALONSO, R. J. *Tratado de fitomedicina: bases clínicas e farmacológicas*. Buenos Aires: ISIS, 1998. 1039 p.
- [4] BRASIL. Presidência da República. Decreto nº 5.813 de 22 de junho de 2006. Aprova a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos e dá outras providências. *Diário Oficial da União*, Poder Executivo, Brasília, 23 jun de 2006.
- [5] RODRIGUES, A. G. Fitoterapia no Sistema Único de Saúde. *Anais da V Jornada Catarinense e I Jornada Internacional de Plantas Medicinais*. Joinville, 2006. pp. 68-9.
- [6] BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria nº 971, de 3 de maio de 2006. Aprova a Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares no Sistema Único de Saúde. *Diário Oficial da União*. 84(1), 2006. 19 p.
- [7] BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução da Diretoria Colegiada - RDC nº 10, de 9 de março de 2010. Dispõe sobre a notificação de drogas vegetais junto à Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e dá outras providências. *Diário Oficial da União*. 46(1), 2010. 8 p.
- [8] CARVALHO, A. C. B.; SILVEIRA, D.. Drogas vegetais: uma antiga nova forma de utilização de plantas medicinais. *Brasília Médica*. 48(2):219-37, 2010.
- [9] WORLD HEALTH ORGANIZATION. *WHO guidelines for assessing quality of herbal medicines with reference to contaminants and residues*. Geneva: World Health Organization, 2007. 118 p.
- [10] SOUSA, F. C. F.; MELO, C. T. V.; CITÓ, M. C. O.; FÉLIX, F. H. C.; VASCONCELOS, S. M. M.; FONTELES, M. M. F.; BARBOSA-FILHO, J. M.; VIANA, G. S. B.. Plantas medicinais e seus constituintes bioativos: Uma revisão da bioatividade e potenciais benefícios nos distúrbios da ansiedade em modelos animais. *Revista Brasileira de Farmacognosia*. 18(4):642-54, 2008.

- 
- [11] NAKAZAWA, T. A. Particularidades de formulações para fitoterápicos. *Revista Racine*. 9(53):38-41, 1999.
- [12] CALIXTO, J. B.. Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytotherapeutic agents). *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. 33(2):179-89, 2000.
- [13] CARVALHO, J. C. T.. *Fitoterápicos anti-inflamatórios: aspectos químicos, farmacológicos e aplicações terapêuticas*. Ribeirão Preto-SP: Tecmedd, 2004. 480 p.
- [14] STASI, L. C. D.. *Plantas medicinais: verdades e mentiras*. São Paulo-SP: UNESP, 2007. 136 p.
- [15] ACCORSI, W. R.. Medicina natural, um novo conceito. *A fórmula: guia de negócios*. 2(4):5, 2000.
- [16] CARVALHO, A. C. B.; SANTOS, L. A.; SILVEIRA, D.. La regulación de los medicamentos herbarios en Brasil. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*. 8:7-11, 2008.
- [17] SIMONI, C. de; BENEVIDES, I. Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares no SUS - PNPIC SUS: Trajetória de avanços e desafios. *Revista de APS*. 10(1):90-1, 2007.
- [18] BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução de Diretoria Colegiada - RDC nº 48, de 16 de março de 2004. Dispõe sobre o Registro de Fitoterápicos. *Diário Oficial da União*. 53(1), 2004. 100 p.
- [19] EFRAIM, I. *O que é ansiedade*. Disponível em: <http://www.ansiedade.com.br>. Acessado em: 10 de agosto de 2010.
- [20] NAZAR, M.; JESSA, M.; PRAZNIK, A.. Benzodiazepine GABA-A receptor complex ligands in two models of anxiety. *Journal of Neural Transmission*. 104:733-46, 1997.
- [21] CHEN, S.; KONG, W.; Li, Y.; ZHANG, Y.; WANG, R.; MIN, L.; MI, X. Effects of taurine on rat behaviors in three anxiety models. *Pharmacology Biochemistry and Behaviour*. 83:271-6, 2006.
- [22] SCHATZBERG, A. F.; COLE, J. O.; DEBATTISTA C.. *Manual of clinical Psychopharmacology*. 7th Ed. Washington, DC: American Psychiatric Publishing, 2010. 720 p.

- 
- [23] RANG, H. P.; DALE, M. M.; RITTER, J. M.; MOORE, P. K. *Farmacologia*. 6ª Ed.. Rio de Janeiro: Editora Elsevier, 2003. 920 p.
- [24] FAUSTINO, T. T.; ALMEIDA, R. B. de; ANDREATINI, R.. Plantas medicinais no tratamento do transtorno de ansiedade generalizada: uma revisão dos estudos clínicos controlados. *Revista Brasileira de Psiquiatria*. 32(4):1-8, 2010..
- [25] NOGUEIRA, E.; ROSA, G.; HARAGUCHI, M; VASSILIEFF, V. Anxiolytic effect of *Rubus brasiliensis* in mice. *Journal of Ethnopharmacology*. 61:111-7, 1998.
- [26] CARLINI, E. A. Plants and the central nervous system. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*. 3:501-12, 2003.
- [27] HUXTABLE, R.J. Herbal teas and toxins: novel aspects of pyrrolizidine poisoning in the United States. *Perspectives in Biology and Medicine*. 24:1-13, 1980.
- [28] SCHOENTAL, R. Health hazards of pyrrolizidine alkaloids: a short review. *Toxicology Letters*. 10:323-6, 1982
- [29] SOLDATELLI, M. V.; RUSCHEL, K.; ISOLAN, T. M. P.. *Valeriana officinalis*: uma alternativa para o controle da ansiedade odontológica?. *Stomatos*. 16(30):89-97, 2010.
- [30] ZUARDI, A. W.; CRIPPA, J. A. S.; HALLAK, J. E. C.. *Cannabis sativa*: a planta que pode produzir efeitos indesejáveis e também tratá-los. *Revista Brasileira de Psiquiatria*. 32(Suplemento):1-2, 2010.
- [31] OLIVEIRA, R. B.; NASCIMENTO, M. V. M.; VALADARES, M. C.; PAULA, J. R. de; COSTA, E. A.; CUNHA, L. C. da. Avaliação dos efeitos depressores centrais do extrato etanólico das folhas de *Synadenium umbellatum* Pax. e de suas frações em camundongos albinos. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*. 44(3):485-91, 2008.
- [32] FISS, E.; PARIS, E. G.; BRANDÃO, D. de C.; GHORAYEB, N.. Avaliação clínica da eficácia e tolerabilidade do uso assoc. de *Passiflora alata*, *Crataegus oxyacantha* L.e *Erythrina mulungu* comparado à assoc. de *Passiflora incarnata*, *Crataegus oxyacantha* L. e *Salix alba* L. em portadores de insônia e ansiedade leves. *Revista Brasileira de Medicina*. 63(9):489-96, 2006.
- [33] PROVENSI, G.. *Dissertação de Mestrado apresentada a Faculdade de Farmácia/Universidade Federal do Rio Grande do Sul*. Porto Alegre, 2007. 135 p.

- [34] SANTOS, M. R. V.; ALVES, P. B.; ANTONIOLLI, A. R.; MARCHIORO, M.. Relaxant effect of the aqueous extract of *Erythrina vellutina* leaves on rat vas deferens. *Revista Brasileira de Farmacognosia*. 17(3):343-78, 2007.
- [35] RAUPP, I. M.; SERENIKI, A.; VIRTUOSO, S.; GHISLANDI, C.; CAVALCANTI, E.; SILVA, EL.; TREBIEN, H. A.; MIGUEL, O. G.; ANDREATINI, R.. Anxiolytic-like effect of chronic treatment with *Erythrina velutina* extract in the elevated plus-maze test. *Journal of Ethnopharmacology*. 118(2):295-9, 2008.
- [36] VIRTUOSO, S.; DIAS, J. F. G.; CUNICO, M. M.; MIGUEL, M. D.; OLIVEIRA, A. B.; MIGUEL, O. G.. Estudo preliminar da atividade antibacteriana das cascas de *Erythrina velutina* Willd., Fabaceae (Leguminosae). *Revista Brasileira de Farmacognosia*. 15(2):137-42, 2005.
- [37] VASCONCELOS, S. M. M.; LIMA, N. M.; SALES, G. T. M.; CUNHA, G. M. A.; L. AGUIAR, M. V.; SILVEIRA, E. R.; RODRIGUES, A. C. P.; MACEDO, D. S.; FONTELES, M. M. F.; SOUSA, F. C. F.; VIANA, G. S. B.. Anticonvulsant activity of hydroalcoholic extracts from *Erythrina velutina* and *Erythrina mulungu*. *Journal of Ethnopharmacology*. 110:271-4, 2007.
- [38] DANTAS, M. C.; OLIVEIRA, F. S. de; BANDEIRA, S. M.; BATISTA, SILVA-JR, J. S.; C. D.; ALVES, P. B.; ANTONIOLLI, A. R.; MARCHIORO, M.. Central nervous system effects of the crude extract of *Erythrina velutina* on rodents. *Journal of Ethnopharmacology*. 94:129-33, 2004.
- [39] RIBEIRO, M. D.; ONUSIC, G. M.; POLTRONIERI, S. C.; VIANA, M. B.. Effect of *Erythrina velutina* and *Erythrina mulungu* in rats submitted to animal models of anxiety and depression. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. 39(2):263-70, 2006.
- [40] ONUSIC, G. M.; NOGUEIRA, R. L.; PEREIRA, A. M.; FLAUSINO-JR, O. A.; VIANA, M. de B.. Effects of Chronic Treatment with a Water-Alcohol Extract from *Erythrina mulungu* on Anxiety-Related Responses in Rats. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*. 26(11):1538-42, 2003.
- [41] FLAUSINO, A. O. J.; PEREIRA, A. M.; SILVA, B. V.; SOUZA, R. L. N.. Effects of erythrinian alkaloids isolated from *Erythrina mulungu* (Papilionaceae) in mice submitted to animal models of anxiety. *Biological Pharmaceutical Bulletin*. 30:375-8, 2007.
- [42] FAGGION, A. S.; CUNHA, A. O.; FACHIM, H. Á.; GAVIN, A. S.; SANTOS, W. F. dos; PEREIRA, A. M.; BELEBONI, R. O.. *Epilepsy & Behavior*. Doi:10.1016/j.yebeh.2010.12.037, 2011.

- [43] CRAVEIRO, A. C. S.; CARVALHO, D. M. M.; NUNES, R. de S.; FAKHOURI, R.; RODRIGUES, S. A.; TEIXEIRA-SILVA, F.. Toxicidade aguda do extrato aquoso de folhas de *Erythrina velutina* em animais experimentais. *Revista Brasileira de Farmacognosia*. 18(Suplemento):739-43, 2008.
- [44] BRASIL. Ministério da Saúde. Resolução - RE nº 90, de 16 de março de 2004. Aprova as normas para estudos toxicológicos de produtos fitoterápicos. *Diário Oficial da União*. 53(1), 2004. 100 p.
- [45] MARCHIORO, M.; BLANK, M. de F. A.; MOURÃO, R. H. V.; ANTONIOLLI, Â. R.. Anti-nociceptive activity of the aqueous extract of *Erythrina velutina* leaves. *Fitoterapia*. 76:637-42, 2005.
- [46] CARVALHO, A. C. C. S.; ALMEIDA, D. S.; MELO, M. G. D.; CAVALCANTI, S. C. H.; MARÇAL, R. M.. Evidence of the mechanism of action of *Erythrina velutina* Willd (Fabaceae) leaves aqueous extract. *Journal of Ethnopharmacology*. 122:374-8, 2009.
- [47] BARROSO, G. M.. *Sistemática de angiosperma do Brasil*. Viçosa: Editora Universitária de São Paulo, 1978. v.1 255 p.
- [48] FREITAS, P. C. D.. *Dissertação de Mestrado apresentada ao DCF/CCS/USP*. São Paulo, 1985. 133 p.
- [49] ROSS, M. S. F.; ANDERSON, A.. Selection of plants for phytopharmacological study based on modernal herbal practice. *International Journal of Crude Drug Research*. 24: 1-6, 1986.
- [50] DEMARDEROSIAN, A.; BEUTLER, J. A.. *The Review of Natural Products*. 3rd Ed. St. Louis: Facts & Comparisons, 2002. pp. 547-50.
- [51] POZZI, A. C. S. *Dissertação de Mestrado apresentada ao IQSC/USP*. São Carlos, 2007. 73 p.
- [52] MÜLLER, S. D.; VASCONCELOS, S. B.; COELHO, M.; BIAVATTI, M. W.. LC and UV determination of flavonoids from *Passiflora alata* medicinal extracts and leaves. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 37:399-403, 2005.
- [53] MORAES, M. L. L.; VILEGAS, J. H. Y.; LANÇAS, F. M.. Supercritical fluid extraction of glycosylated flavonoids from *Passiflora* leaves. *Phytochemical Analysis*. 8(5):257-60, 1997.

- [54] BOSQUE-PÉREZ, N. A.; MARECK, J. H.. Effect of the stem borer *Eldana saccharina* (Lepidoptera: Pyralidae) on the yield of maize. *Bulletin of Entomological Research*. 81:243-247, 1991.
- [55] LUTOMSKI, J.; MALEK, B.. Pharmakochemische udersuchungen Von drogen der gattung Passiflora L. Mitteilung: Phytochemische forshung der drogen aus Passiflora edulis Sims, forma flavicarpa. *Planta Medica*. 27(3):222-5, 1975.
- [56] VALE, N. B.; LEITE, J. R.. Efeitos psicofarmacológicos de preparações de *Passiflora edulis* (maracujá). *Ciência e Cultura*. 35(1):11-24, 1983.
- [57] MALUF, E.; BARROS, H. M. T.; FROCHTENGARTEN, M. L.; BENTI, R.; LEITE, J. R.. Assessment of the hypnotic/sedative effects and toxicity of *Passiflora edulis* aqueous extract in rodents and humans. *Phytotherapy Research*. 5(6):262-6, 1991.
- [58] DHAWAN, K.; KUMAR, S.; SHARMA, A. Comparative biological activity study on *Passiflora incarnata* and *P. edulis*. *Fitoterapia*. 72:698-702, 2001.
- [59] KHANUM, F.; RAZACK, S.. Anxiety-Herbal Treatment: A Review. *Research and Reviews in Biomedicine and Biotechnology*. 1(2):71-89, 2010.
- [60] DIAS, J. A.. A análise sedimentar e o conhecimento dos sistemas marinhos. 2004. pp. 10-27. Disponível em: [http://w3.ualg.pt/~jdias/JAD/eb\\_Sediment.html](http://w3.ualg.pt/~jdias/JAD/eb_Sediment.html). Acessado em: 20 de dezembro de 2010.
- [61] Farmacotécnico. *A importância da granulometria*. Disponível em: <http://farmacotecnico.blogspot.com/2009/04/granulometria.html>. Acessado em: 13 de janeiro de 2011.
- [62] AULTON, M. E. *Delineamento de formas farmacêuticas*. 2ª Ed. Porto Alegre: Artmed, 2005. 677p.
- [63] PRISTA, L. N.; ALVES, A. C. & MORGADO, M. R.. *Técnica Farmacêutica e Farmácia Galênica*. 4ª Ed.. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 1995. 1220 p.
- [64] BRANDÃO, M. das G. L. Produção de chás e extratos de plantas medicinais. Fundação Centro Tecnológico de Minas Gerais-CETEC. *Dossiê Técnico*. 2007. Disponível em: <http://sbrt.ibict.br/dossie-tecnico/downloadsDT/MTc1>. Acessado em: 10 de janeiro de 2011.
- [65] FARMACOPÉIA BRASILEIRA. 5ª Ed.. Brasília: Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2010. v.1 523 p.

- [66] SILVA JÚNIOR, J. O. C.. *Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Fármacos e Medicamentos*. Universidade de São Paulo, 2006. 120 p.
- [67] BABY, A. R.; MACIEL, C. P. M.; SALGADO-SANTOS, I. M. N.; DIAS, T. C. S.; KANECO, T. M.; CONSIGLIERI, V. O.; VELASCO, M. V. R. Uso de Extratos de Plantas em Produtos cosméticos. *Cosmetics e Toiletries*. 17:79-82, 2005.
- [68] DEDAVID, B. A.; GOMES, C. I.; MACHADO, G.. *Microscopia eletrônica de varredura: aplicações e preparação de amostras*. Porto Alegre: EDIPUCRS, 2007. 60 p.
- [69] GALLETI, S. R.. Introdução a microscopia eletrônica. *Biológico*. 65(1/2):33-5, 2003.
- [70] MANNHEIMER, W. A. *Microscopia dos Materiais: Uma introdução*. Rio de Janeiro: E-papers Serviços Editoriais, 2002. 223 p.
- [71] NAGATANI, T.; SAITO S.; SATO, M.; YAMADA, M.. Development of an ultra high resolution scanning electron microscope by means of a field emission source and in-lens system. *Scanning Microscopy*. 11:901-9, 1987.
- [72] MALISKA, A. M.. *Microscopia eletrônica de varredura e microanálise*. Santa Catarina: Universidade Federal de Santa Catarina, 2008. 98 p.
- [73] TOLEDO, A. C. O.; DUARTE, M. do R.; NAKASHIMA, T.. Caracterização Morfoanatômica das Folhas de *Symphytum officinale* L. (Boraginaceae). *Acta Farmaceutical Bonaerense*. 23(3):359-64, 2004.
- [74] SILVA, D. C. de M. N. da. *Dissertação de Mestrado apresentada departamento de pós-graduação em engenharia de alimentos da Universidade Federal de Santa Catarina*. Florianópolis, 2004. 130 p.
- [75] BARROS, G. M. C. C.; TEIXEIRA, S. de P.. Estudo farmacobotânico de duas espécies de Anileira (*Indigofera suffruticosa* e *Indigofera truxillensis*, Leguminosae) com propriedades farmacológicas. *Revista Brasileira de Farmacognosia*. 18(2):287-94, 2008
- [76] GIOLITO, I.; IONASHIRO, M.. A Nomenclatura em Análise Térmica. *Cerâmica*. 34:163-4, 1988.
- [77] ARAÚJO, A. A. de S.; MERCURI, L. P.; SEIXAS, S. R. S.; STORPIRTIS S., MATOS, J. de R.. Determinação dos teores de umidade e cinzas de amostras comerciais de guaraná utilizando métodos convencionais e análise térmica. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*. 42(2):269-77, 2006.

- [78] SKOOG, D. A.; HOLLER, F. J.; NIEMAN, T. A.. *Principles of Instrumental Analysis*. 5st., Philadelphia: Harcourt Brace & Company, 1998. pp. 798-809.
- [79] GIRON, D.. Applications of thermal analysis and coupled techniques in pharmaceutical industry. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*. 68:335-57, 2002.
- [80] KEMP, R. B.. *Handbook of Thermal Analysis and Calorimetry*. Vol. 4: From Macromolecules to Man. Amsterdam: Elsevier Science B. V., 1999. 1032 p.
- [81] SILVA, E. C. da; PAOLA, M. V. R. V. de; MATOS, J. do R.. Análise Térmica Aplicada à Cosmetologia. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*. 43(3):347-56, 2007.
- [82] CRAIG, M. Q. D.; READING, M.. *Thermal Analysis of Pharmaceuticals*. 1st Ed. New York: CRC Press, 2007. 416 p.
- [83] MATOS, J. R.; MACHADO, L. D. B.. Análise térmica - termogravimetria. In: CANEVAROLO-JUNIOR, S.V., (Ed.). *Técnicas de caracterização de polímeros*. São Paulo: Artliber, 2004. pp. 209-228.
- [84] WENDLANDT, W. W.. *Thermal Analysis*. 3rd Ed.. New York: Wiley-Interscience, 1986. 814 p.
- [85] MACHADO, L. D. B.; MATOS, J. R.. Análise térmica diferencial e calorimetria exploratória diferencial. In: CANEVAROLO JUNIOR, S.V., (Ed.). *Técnicas de caracterização de polímeros*. São Paulo: Artliber, 2004. pp. 229-261.
- [86] BENÍCIO, D. A.; NETO, V. Q.; SOUSA, J. G. de. Avaliação das propriedades físico-químicas e da composição química parcial do óleo de sementes de Nim Indiano (*Azadirachta indica* A. Juss.), cultivado no município de Patos – Paraíba. *Biofar*. 4(2):22-33, 2010.
- [87] REDA, S. Y.; LEAL, E. S.; BATISTA, E. A. C.; BARANA, A. C.; SCHNITZEL, E.; CARNEIRO, P. I. B.. Caracterização dos Óleos das Sementes de Limão Rosa (*Citrus limonia* Osbeck) e Limão Siciliano (*Citrus limon*), um resíduo agroindustrial. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*. 25(2):672-6, 2005.
- [88] NORIEGA, P.; MATOS, J. R.; MERCURI, L.; SCOTT, M.; BACCHI, M. E.. Thermal Characterization of *Passiflora edulis* Sims. (Maracujá) by TG/DTG and DSC. In: *VII Congresso Brasileiro De Análise Térmica e Calorimetria (VII CBRATEC)*, 2010.

- [89] ARAGÃO, C. F. S.. Aplicação da termogravimetria (TG) no controle de qualidade da milona (*Cissampelos sympodialis* Eichl.) Menispermaceae. *Revista Brasileira de Farmacognosia*. 12(Suplemento), 60-1, 2002.
- [90] SILVA-JÚNIOR, J. O. C.; VIEIRA, J. L. F.; BARBOSA, W. L. R.; PEREIRA, N. L.. Caracterização físico-química do extrato fluido e seco por nebulização de *Symphytum officinale* L. *Revista Brasileira de Farmacognosia*. 16(Suplemento):671-7, 2006.
- [91] CAMELO, S. R. P.. *Dissertação de Mestrado apresentada ao ICS/UFPA*. Belém, 2009. 163 p.
- [92] SILVÉRIO, F. O.; BARBOSA, L. C. A.. A pirólise como técnica analítica. *Química Nova*. 31(6):1543-52, 2008.
- [93] ROBERT, A. W. J.; Rose, M. E.. *Mass spectrometry for chemists and biochemists*. 2nd Ed.. Cambridge: Cambridge (UK), 1990.
- [94] BRITTO, J. M.; RANGEL, M. do C.. Processos avançados de oxidação de compostos fenólicos em efluentes industriais. *Química Nova*. 31(1):114-22, 2008.
- [95] ANDREY, R.E.. *Liquid Chromatography-Mass Spectrometry: An introduction*. England: John Wiley & Sons, LTD, 2003.
- [96] KENKEL, J.. *Analytical Chemistry for Technicians*. 3rd ed.. CRC Press, 2002. 584 p.
- [97] CHENG, F.; WANG, Y.. Polymer analysis by pyrolysis gas chromatography. *Journal of Chromatography A*. 843(1-2):413-23, 1999.
- [98] AHMAD, Z.; AL-SAGHEER, F.; AL-AWADI, N. A.. Pyro-GC/MS and thermal degradation studies in polystyrene-poly(vinyl chloride) Blends. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*. 87:99-107, 2010.
- [99] ERTAS, M.; ALMA, M. H.. Pyrolysis of laurel (*Laurus nobilis* L.) extraction residues in a fixed-bed reactor: Characterization of bio-oil and bio-char. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*. 88:22-9, 2010.
- [100] ACIKGOZ, C.; KOCKAR, O. M.. Characterization of slow pyrolysis oil obtained from linseed (*Linum usitatissimum* L.). *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*. 85:151-4, 2009.

- [101] MIRANDA, R.; BUSTOS-MARTINEZ, D.; BLANCO, C. S.; VILLARREAL, M. H. G.; CANT, M. E. R. Pyrolysis of sweet orange (*Citrus sinensis*) dry pee. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*. 86:245-51, 2009.
- [102] FRADE, J. C.; RIBEIRO, I.; GRAC, J.; VASCONCELOS, T.; RODRIGUES, J.. Chemotaxonomic application of Py-GC/MS: Identification of lacquer trees. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*. 89:117-21, 2010.
- [103] OLIVEIRA, E. J.; ALVAREZ, E. D. A.; LIMA, N. G. P. B.; MACEDO, R. O.. Usefulness of pyrolysis coupled to gas chromatography/mass spectrometry for evaluating the reproducibility of commercial samples of *Cymbopogon citratus* Stapf., Poaceae. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*. 20(1):93-9, 2010.
- [104] WANG, L.; JIA, Y.; PAN, Z.; MO, W.; HU, B.. Direct analysis of alkylphenols in *Ginkgo biloba* leaves by thermochemolysis–gas chromatography/mass spectrometry in the presence of tetramethylammonium hydroxide. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*. 85:66-71, 2009.
- [105] WANG, L.; WANG, C.; PAN, Z.; SUN, Y.; ZHU, X.. Application of pyrolysis-gas chromatography and hierarchical cluster analysis to the discrimination of the Chinese traditional medicine *Dendrobium candidum* Wall. ex Lindl.. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*. 90:13-7, 2011.
- [106] ALMEIDA, R. N. *Psicofarmacologia: fundamentos práticos*. 1ª Ed.. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006. 384 p.
- [107] BLANCHARD, R. J.; YODKO, E. B.; RODGERS, R. J.; BLANCHARD, D. C.. Defense system psychopharmacology: an ethiological approach to the pharmacology of fear and anxiety. *Behavioral Brain Research*. 58:155-65, 1993.
- [108] FLINT, J.. Animal models of anxiety and their molecular dissection. *Seminars in Cell Developmental Biology*. 14:37-42, 2003.
- [109] BRADLEY, B. F.; STARKEY, N. J.; BROWN, S. L.; LEA, R. W.. Anxiolytic effects of *Lavandula angustifolia* odour on the *Mongolian gerbil* elevated plus maze. *Journal of Ethnopharmacology*. 111:517-25, 2007.
- [110] PEREZ, G. R. M.. Neuropharmacological activity of *Solanum nigrum* fruit. *Journal of Ethnopharmacology*. 62:43-48, 1998.
- [111] SILVA, M. R. da.. *Dissertação de Mestrado apresentada ao LTF/UFPB*. João Pessoa, 2009. 97 p.

- [112] CIAPETTI, M. A. A.. *Tese de Doutorado apresentada Universidade do Estado do Rio de Janeiro*. Rio de Janeiro, 2005. 86 p.
- [113] FRESHNEY, R. I.. *Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique and Specialized Application*. 2nd Ed. New York: Wisley-Liss, 1990. 347 p.
- [114] ROGERO, S. O.; LUGÃO, A. B.; IKEDA, T. I.; CRUZ, Á. S.. Teste *in vitro* de Citotoxicidade: Estudo Comparativo entre Duas Metodologias. *Materials Research*. 6(3):317-20, 2003.
- [115] DAGUANO, J. K. M. F.; SANTOS, C.; ROGERO, S. O.. Avaliação da Citotoxicidade de Biocerâmicas Desenvolvidas para uso em Sistemas de Implantes. *Revista Matéria*. 12(1):134-9, 2007.