



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM DESENVOLVIMENTO E
INOVAÇÃO TECNOLÓGICA EM MEDICAMENTOS



TESE DE DOUTORADO

**CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA, TOXICOLÓGICA E
ATIVIDADES FARMACOLÓGICAS DO EXTRATO DAS
RAÍZES DE *Solanum paniculatum* L.**

JONH ALDSON BEZERRA TENÓRIO

RECIFE

Agosto/2015

JONH ALDSON BEZERRA TENÓRIO

**CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA, TOXICOLÓGICA E
ATIVIDADES FARMACOLÓGICAS DO EXTRATO DAS
RAÍZES DE *Solanum paniculatum* L.**

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Desenvolvimento e Inovação Tecnológica em Medicamentos como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor pela Universidade Federal Rural de Pernambuco.

ORIENTADOR: Dr. Clécio Souza Ramos

CO-ORIENTADORA: Dra. Teresinha Gonçalves da Silva

*Bolsista CAPES

RECIFE

Agosto/2015

Ficha catalográfica

T295c Tenório, Jonh Aldson Bezerra
Caracterização química, toxicológica e atividades
farmacológicas do extrato das raízes de Solanum
paniculatum L. / Jonh Aldson Bezerra Tenório. – Recife,
2015.
163 f. : il.

Orientador(a): Clécio Souza Ramos.
Tese (Doutorado em Desenvolvimento e Inovação
Tecnológica em Medicamentos) – Universidade
Federal Rural de Pernambuco, Departamento de Química,
Recife, 2015.
Referências.

1. Solanum paniculatum 2. Toxicidade 3. Otimização de
processos 4. Validação 5. Atividades farmacológicas
I. Ramos, Clécio Souza, orientador II. Título

CDD 615.19

JONH ALDSON BEZERRA TENÓRIO

**CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA, TOXICOLÓGICA E ATIVIDADES
FARMACOLÓGICAS DO EXTRATO DAS RAÍZES DE *Solanum paniculatum* L.**

TESE AVALIADA E APROVADA PELA BANCA EM:

____/____/____

Profº Dr. Clécio Souza Ramos (DCM/UFRPE)
Orientador

Profº Dr. André Augusto Pimentel Liesen Nascimento (DCM/UFRPE)
1º Examinador Interno

Dr. Antônio Cláudio da Silva Lins (UFRPE)
2º Examinador Interno

Profª Dra. Teresinha Gonçalves da Silva (BPF/UFPE)
1ª Examinadora Externa

Dra. Jaciana dos Santos Aguiar (UFPE)
2ª Examinadora Externa

Profº Dr. João Rufino de Freitas Filho (DCM/UFPE)
Suplente Interno

Dra. Isla Vanessa Gomes Alves Bastos (UFPE)
Suplente Externo

Dedico este trabalho:

A Deus, pela vida, e por seu amor incondicional.
“... porque sem Mim nada podereis fazer” (João 15:5).

Aos meus pais, Maria Marli e Abimael Tenório, pelo amor e
por muitas vezes sacrificar seus sonhos para que os meus
fossem realizados...

A minha irmã, Ariadna, pelo amor...
que minha sede de conhecimento motive sua vida.

Aos meus irmãos, Junior e Annabel, pelo carinho...

A minha esposa, Dulciana Santos, pelo amor,
conselhos e apoio incondicional em todos os momentos,
principalmente nos de incerteza.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por seu Amor infinito, por me dar o direito a vida, por me proteger e enveredar pelo caminho da justiça, da verdade e do Amor.

Aos meus pais, pelo privilégio de ser seu filho e por todo amor e ensinamentos que me são dados.

A Ariadna pelo amor incondicional compartilhado entre nós.

Aos meus irmãos, Júnior e Annabel pelo incentivo e por sempre acreditarem em mim, mesmo quando eu julgava não ser capaz.

A Dulciana Santos do Monte, por ter nascido e por me conceder o prazer de desfrutar a vida ao seu lado e por me dar o privilégio de ser pai.

Ao meu filho que ainda estando no ventre da mãe foi capaz de proporcionar a motivação necessária para a conclusão deste trabalho.

Ao meu primo José Roberto Rodrigues pelo apoio, momentos compartilhados, por seu exemplo de vida e de fé.

A Planck por sua lealdade, companheirismo e por me ensinar a observar o Amor Divino existente em todos os seres vivos.

Ao professor Dr. Clécio Souza Ramos, por ser um exemplo de vida, de dignidade e moralidade, e por ter me dado a honra de sua orientação.

A professora Dra. Teresinha Gonçalves da Silva, por sua conduta exemplar, que exala bondade e compreensão, e pelo privilégio de sua orientação e confiança.

A professora Dra. Tania Maria Sarmiento Silva, por compartilhar seus conhecimentos.

Aos professores Dr. Evêncio e Dr. Fábio, pela contribuição nos experimentos histológicos e oportunidade.

A professora Leônia Maria Batista, por me introduzir verdadeiramente no mundo científico.

A Dra. Jaciana Santos Aguiar, por ser um exemplo de pessoa e pesquisadora, sendo uma referência de dignidade, por sua amizade e orientação.

Aos amigos do Biofarmatox, em especial, Temístocles Ítalo, Tonny Cley, Tatiane Bezerra, Isla Bastos, Aline Stanford, Jessica Barbosa, Laís Nerys, Cynthia Laise, Larrisa e Bruno, pela amizade momentos compartilhados e risadas.

As meninas do Biofito, Telma Guedes, Girliane Regina, Natália Ramos e Silvana Alves pela amizade e momentos compartilhados.

Ao meu grande amigo e irmão Paulo Ricardo da Silva, por seu exemplo de fraternidade, amizade, paciência e compaixão.

Aos meus Irmãos da Loja Maçônica William Schaw, em especial, Jean Voltaire, Edmilson Oliveira, Edson Pardin, Marcos "Vovô" e Evaldo Muribeca, por seus exemplos de moral e bons costumes, pelos conselhos e ensinamentos.

Ao programa de pós-graduação em Desenvolvimento e Inovação Tecnológica em Medicamentos, pela oportunidade.

Ao laboratório de histologia da UFRPE, em especial a Edna, pelo aprendizado, paciência e boas risadas.

A todos que contribuíram direta ou indiretamente para a conclusão deste trabalho.

Ao CENAPESQ, pelo suporte na realização dos meus experimentos.

À banca examinadora, pelas críticas, sugestões e correções sugeridas a este trabalho.

*"Bem-aventurado o homem que acha sabedoria, e o homem que
adquire conhecimento;
Porque é melhor a sua mercadoria do que artigos de prata, e
maior o seu lucro que o ouro mais fino.
Mais preciosa é do que os rubis, e tudo o que mais possas
desejar não se pode comparar a ela.
Vida longa de dias está na sua mão direita; e na esquerda,
riquezas e honra.
Os seus caminhos são caminhos de delícias, e todas as suas
veredas de paz.
É árvore de vida para os que dela tomam, e são bem-
aventurados todos os que a retêm."*

[Provérbios 3:13-18](#)

Resumo

Caracterização Química, Toxicológica e Atividades Farmacológicas do Extrato das Raízes de *Solanum paniculatum* L.

Solanaceae é uma família que pertence à ordem Solanales e compõe um dos maiores grupos dentre as plantas Angiospermas e dicotiledôneas, dentre as espécies mais estudadas do gênero *Solanum* destaca-se a *Solanum paniculatum* L. por sua ampla distribuição e por seus diversos usos medicinais. O objetivo deste estudo foi determinar parâmetros químicos, toxicológicos e farmacológicos das raízes de *Solanum paniculatum* para seu controle de qualidade. Foi observado que a *S. paniculatum* L. possui afinidade por solos ricos em cálcio e com uma correlação positiva na absorção do Ca^{+2} com os íons Fe^{+3} , Na^+ e K^+ e negativa com o Zn^{+2} e Mg^{+2} . As raízes demonstraram um potencial nutritivo, com predominância de carboidratos (47,46 g/100g), fibras (37,28 g/100g) e Ca^{+2} (92%). Nas análises por cromatografia líquida de alta eficiência foi definido o ác. clorogênico como marcador químico, sendo validada uma metodologia para sua análise. Foi caracterizado o perfil térmico de degradação em treze etapas com eventos endotérmicos e exotérmicos por TG/DTA, além de ser demonstrado a capacidade do extrato prolongar a estabilidade do óleo de soja para $6,55 \pm 0,05$ horas frente a termo-oxidação acelerada. Através do planejamento experimental foi possível elevar a extração de compostos fenólicos pelas técnicas de maceração, ultrassom e micro-ondas. No ensaio toxicológico agudo e subcrônico o extrato não demonstrou efeitos adversos significativos nos parâmetros hematológicos, bioquímicos e anatomo-histopatológicos. Na investigação farmacológica o extrato apresentou atividade antimicrobiana frente a micro-organismos patogênicos, atividade antidiarreica pela capacidade de reduzir o acúmulo de fluido intestinal (26,7%), diminuir a diarreia (50%) e moderar o trânsito intestinal (44,1%), apresentando resultados próximos da Loperamida. O extrato apresentou atividade anti-inflamatória, provavelmente por atuar na liberação de aminas vasoativas, reduzir a migração de leucócitos, minimizar a formação de edema e a permeabilidade vascular, além de reduzir os níveis de $\text{TNF-}\alpha$. Portanto, o presente trabalho contribuiu para o controle de qualidade e a farmacotoxicologia de *Solanum paniculatum* L.

Palavras-chaves: *Solanum paniculatum*, toxicidade, otimização de processos, validação, atividades farmacológicas.

Abstract

Chemical Characterization, Toxicological and Pharmacological Activities of *Solanum paniculatum* L. Roots Extract.

Solanaceae family that belongs to Solanales order and makes up of the largest groups among the angiosperm plants and dicotyledoneas, among the most studied of the *Solanum* genus highlight *Solanum paniculatum* L. species for its wide distribution and its various medicinal uses. The aim of this study was to determine chemical, toxicological and pharmacological parameters of *Solanum paniculatum* roots for its quality control. *S. paniculatum* has affinity for soils rich in calcium and have a positive correlation with the absorption of Ca^{+2} to Fe^{+3} ions, Na^{+} and K^{+} and negative with Zn^{+2} and Mg^{+2} . The roots showed a nutritional potential with carbohydrate (47.46 g / 100g), fibers (37.28 g / 100 g) and Ca^{+2} (92%). In high-performance liquid chromatography analysis chlorogenic acid was found and defined like a chemical marker and methodology for its analysis was validate. In thermal degradation profile by TG/DTA the extract was characterized in thirteen steps with endothermic and exothermic events, was showed extract's ability to prolong the stability of soybean oil at 6.55 ± 0.05 hours front accelerated thermo-oxidation. Using experimental design was possible to increase phenolic compounds extraction by maceration, ultrasound and microwave techniques. In acute and subchronic toxicological test the extract did not show significant adverse effects on hematological, biochemical and anatomical and histopathological parameters. In pharmacological research the extract showed antimicrobial activity against pathogenic microorganisms, anti-diarrheal activity to reduce the intestinal fluid accumulation (26.7%), decrease diarrhea (50%) and reduce intestinal transit (44.1%), with loperamide similar results. The extract showed anti-inflammatory activity, probably by acting on the release of vasoactive amines, reduce leukocyte migration, minimize edema and vascular permeability, reduce TNF- α levels. Therefore, this study has contributed with *Solanum paniculatum* L.'s quality control and pharmacotoxicology.

Keywords: *Solanum paniculatum*, toxicity, optimization, validation, pharmacological activities.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - <i>Solanum paniculatum</i> L. A. Ramo frutificado; B. Raízes; C. Ramo florido; D. Planta inteira.....	31
Figura 2 - Bebidas alcoólicas a base de “jurubeba” (<i>Solanum Paniulatum</i> L.)....	32
Figura 3 - <i>Solanum paniculatum</i> : A) A folha, com lâmina foliar largo-ovada e margem lobada; B) Raiz ramificada. C) Secção transversal da raiz secundária apresentando xilema com estrutura hexarca. D) Face adaxial da epiderme com células de paredes poligonais, retas. E) Face abaxial da epiderme com células de paredes sinuosas e estômatos anisocíticos. F) Pecíolo, em secção transversal, com cinco feixes. C) 800 µm; D) 250 µm; E) 250 µm; F) 2500 µm.....	33
Figura 4 - Substâncias isoladas e identificadas das raízes de <i>Solanum paniculatum</i> (Solanaceae)	35
Figura 5 - Fitoterápico Ierobina®	41
Figura 6 - Análise do ERSP pelo método A.....	87
Figura 7 - Análise do ERSP pelo método B.....	88
Figura 8 - Cromatograma do ácido clorogênico e ácido cafeico.....	89
Figura 9 - Curva de Linearidade da metodologia.....	90
Figura 10 - Curva Termogravimétrica do ERSP.....	96
Figura 11 - Curva por Análise Térmica Diferencial do ERSP.....	96
Figura 12 - Curva TG/DTG do ERSP.....	97
Figura 13 - Curva TG/DTA do ERSP.....	97
Figura 14 - Porcentagem de proteção do ERSP em relação ao TBHQ.....	99
Figura 15 - Gráfico de Pareto demonstrando as variáveis significativas frente a extração de fenólicos por maceração.	100
Figura 16 - Superfície de resposta e curva de contorno para o teor de fenólicos totais (EAG/g) em função da temperatura e do tempo para extração por maceração.	104
Figura 17 - Superfície de resposta e curva de contorno para o teor de fenólicos totais (EAG/g) em função da temperatura e do pH por maceração.....	105

Figura 18 - Superfície de resposta e curva de contorno para o teor de fenólicos totais (EAG/g) em função da temperatura e do pH por maceração.....	106
Figura 19 - Gráfico de Pareto sobre efeito do tempo e do pH frente a extração de fenólicos por ultrassom.....	109
Figura 20 - Superfície de resposta e curva de contorno para o teor de fenólicos totais (EAG/g) em função da temperatura e do tempo para extração com ultrassom.....	111
Figura 21 - Gráfico de Pareto sobre efeito do tempo, temperatura e do pH frente a extração de fenólicos por microondas.....	114
Figura 22 - Superfície de resposta e curva de contorno para o teor de fenólicos totais (EAG/g) em função da temperatura e do tempo para extração por microondas.....	116
Figura 23 - Superfície de resposta e curva de contorno para o teor de fenólicos totais (EAG/g) em função da temperatura e do pH para extração por microondas.....	117
Figura 24 - Superfície de resposta e curva de contorno para o teor de fenólicos totais (EAG/g) em função da temperatura e do pH para extração por microondas.....	118
Figura 25 - Análise de Correlação de Pearson entre a atividade antidiarreica e o teor de Ác. Clorogênico.....	139
Figura 26. Resultados do ERSP frente ao edema de pata.....	141
Figura 27 -Efeito do ERSP frente a migração celular no modelo de bolsão.....	142
Figura 28 - Efeito do ERSP frente a permeabilidade Vascular.....	144

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Alguns estudos que relatam propriedades medicinais da <i>Solanum paniculatum</i>	39
Tabela 2 – Melhores tipos de planejamentos experimentais em relação ao número de variáveis.	44
Tabela 3 - Parâmetros operacionais do espectrômetro de absorção atômica em chama.	58
Tabela 4 - Valores utilizados no DCCR para três fatores utilizando a técnica de maceração.....	65
Tabela 5 - Valores utilizados no DCCR para três fatores utilizando a técnica de microondas.	65
Tabela 6 - Valores utilizados no DCCR para três fatores utilizando a técnica de ultrassom	66
Tabela 7 - Análise da Fertilidade do Solo.....	80
Tabela 8 - Teor de Minerais das raízes da <i>Solanum paniculatum</i> L	82
Tabela 9 - Coeficientes de Correlação de Pearson observados nos minerais das raízes da <i>Solanum paniculatum</i> L.....	82
Tabela 10 - Coeficiente de Correlação de Pearson entre o Cálcio do solo e os minerais das raízes.....	84
Tabela 11 - Resultado obtidos na realização da exatidão.....	91
Tabela 12 - Dados obtidos na precisão intermediária.....	92
Tabela 13 - Resultados obtidos na avaliação da exatidão do método.....	93
Tabela 14 - Avaliação da robustez do método frente a variações no fluxo da fase móvel.	94
Tabela 15 - Avaliação da robustez do método frente a variações na temperatura do forno.	94
Tabela 16 -Dados referentes as curvas TG e DTA do ERSP.....	95
Tabela 17 - Avaliação da estabilidade do óleo de soja enriquecido com ERSP a oxidação a 110°C.	99

Tabela 18 - Coeficientes de regressão para o teor de fenólicos totais (FT) por maceração.	102
Tabela 19 - ANOVA para o teor de fenólicos totais por maceração.....	103
Tabela 20 - Coeficientes de regressão para o teor de fenólicos totais (FT) por ultrassom.....	108
Tabela 21. ANOVA para o teor de fenólicos totais por ultrassom.....	110
Tabela 22 - Coeficientes de regressão para o teor de fenólicos totais (FT) por micro-ondas.....	113
Tabela 23 - ANOVA para o teor de fenólicos totais por micro-ondas.....	115
Tabela 24 - Determinação do halo de inibição (mm) do ERSP de <i>S. paniculatum</i> frente a microorganismos patogênicos.....	120
Tabela 25 - Determinação CMI e CMB do ERSP.....	121
Tabela 26. Atividade do ERSP (50 µg/mL) frente a inibição do crescimento de células neoplásicas.	122
Tabela 27 - Avaliação da atividade Hemolítica do ERSP.....	123
Tabela 28 - Avaliação do consumo de água, ração e variação de peso na toxicidade aguda dos ratos.....	124
Tabela 29 - Avaliação do consumo de água, ração e variação de peso na toxicidade aguda dos ratas.....	124
Tabela 30 - Avaliação da variação dos pesos dos órgãos dos ratos após exposição aguda.....	125
Tabela 31 - Avaliação da variação dos pesos dos órgãos das ratas após exposição aguda.....	125
Tabela 32 - Avaliação dos parâmetros bioquímicos após exposição aguda dos ratos.....	126
Tabela 33 - Avaliação dos parâmetros bioquímicos após exposição aguda dos ratas.....	126
Tabela 34 - Hemograma dos ratos após exposição aguda.....	127

Tabela 35. Hemograma das ratas após exposição aguda.....	128
Tabela 36. Avaliação do consumo de água, ração e variação de peso durante 30 dias dos ratos.....	129
Tabela 37. Avaliação do consumo de água, ração e variação de peso durante 30 dias dos ratos.....	130
Tabela 38. Avaliação da variação dos pesos dos órgãos dos ratos após 30 dias.....	130
Tabela 39. Avaliação da variação dos pesos dos órgãos dos ratos após 30 dias.	130
Tabela 40. Avaliação dos parâmetros bioquímicos dos ratos no modelo crônico.....	131
Tabela 41. Avaliação dos parâmetros bioquímicos dos ratos no modelo crônico.....	132
Tabela 42. Hemograma dos ratos no modelo crônico.....	132
Tabela 43. Hemograma das ratas no modelo crônico.....	133
Tabela 44. Efeito do ERSP frente a diarreia induzida por óleo de rícino em ratos.....	135
Tabela 45 - Efeito do ERSP frente ao acúmulo de fluido intestinal induzido por óleo de rícino.....	136
Tabela 46 - Efeito do ERSP sobre o a motilidade intestinal.....	137
Tabela 47 - Efeito do ERSP no edema de pata induzido por carragenina....	141

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Condições da análise cromatográfica.....	62
Quadro 2. Matriz de planejamento fatorial total 2^3 , com 6 pontos axiais e 3 pontos centrais com valores codificados para extração por maceração e microondas.....	64
Quadro 3. Matriz de planejamento fatorial total 2^2 , com 4 pontos axiais e 4 pontos centrais, para extração por ultrassom.....	66
Quadro 4 – Parâmetros comportamentais avaliados em ratos segundo Almeida et al., 1999.....	74
Quadro 5 - Resultados das análises bromatológicas das raízes da <i>S. paniculatum</i>	85
Quadro 6 - Metodologia A para HPLC.....	86
Quadro 7 - Metodologia B para HPLC.....	87
Quadro 8. Valores reais e respostas obtidas para o planejamento fatorial total 2^3 , com 6 pontos axiais e 3 pontos centrais para otimização da extração de compostos fenólicos por maceração.....	101
Quadro 9. Valores reais e respostas obtidas para o planejamento fatorial total 2^2 , com 4 pontos axiais e 4 pontos centrais para otimização da extração de compostos fenólicos por maceração.....	107
Quadro 10 - Valores reais e respostas obtidas para o planejamento fatorial total 2^3 , com 6 pontos axiais e 3 pontos centrais para otimização da extração de compostos fenólicos por microondas.....	112

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABTS	Ácido 2,2'-azinobis-[3-etilbenzotiazoline-6-sulfônico]
ACN	Acetonitrila
ANOVA	Análise de Variância
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
CHCM	Concentração da Hemoglobina Corpuscular Média
CL ₅₀	Concentração Letal Média
CLSI	Instituto Clínico e Laboratório de Padronização
CMH	Caldo Muller Hinton
CMI	Concentração Mínima Inibitória
CMM	Concentração Mínima Microbicida
COBEA	Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
CTC	Capacidade de Troca Catiônica
DCCR	Delineamento do Composto Central Rotacional
DL ₅₀	Dose Letal 50%
DMSO	Dimetilsufóxido
DPPH	1,1-difenil-2-picril-hidrazila
DPR	Desvio-padrão relativo
DTA	Análise Térmica Diferencial
DTG	Derivada Termogravimétrica
EAG/g	Equivalentes de Ácido Gálico por Grama

EMCv	Vírus da encefalomiocardite
ERSP	Extrato das Raízes de Solanum paniculatum L.
ERSP	Extrato das raízes da Solanum paniculatum L.
FA	Fosfatase Alcalina
FT	Fibra Total
HCM	Hemoglobina Corpuscular Média
HHV-1	Vírus da Herpes Humana tipo-1
HL60	leucemia promielocítica humana
HPLC/DAD	Cromatografia de Alta Eficiência acoplada a detector de arranjo de diodos
HT29	carcinoma de cólon - humano
IL-1 β	Interleucina 1 β
INMETRO	Instituto Nacional de Metrologia
LD	Limite de detecção
LQ	Limite de Quantificação
MS	Ministério da Saúde
MTT	brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5-difenil-2-H-tetrazólio
N	Nitrogênio Total
IPA	Instituto Agronômico de Pernambuco
OMS	Organização Mundial de Saúde
PAF	Fator de Agregação Plaquetário
PB	Proteína Bruta
PBS	Solução Tampão Fosfato

PI	Período de Indução
RDW	Largura da Distribuição das Hemácias
RENISUS	Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS
RENAFITO	Relação Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos
SNA	Sistema Nervos Autônomo
SNC	Sistema Nervoso Central
SUS	Sistema Único de Saúde
TBHQ	Terc-butil hidroquinona
TG	Termogravimetria
TGO	Transaminase Glutâmico Oxalacética
TGP	Transaminase Glutâmico Pirúvica
TNF- α	Fator de Necrose Tumoral - α
UFPEDA	Coleção de Microrganismos do Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco
VACV-WR	Vaccinia virus cepa Western Reserve
VCM	Volume Corpuscular Médio
%IC	Percentual de inibição do crescimento

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	24
1.1 Plantas Medicinais.....	25
1.2 Família Solanaceae.....	27
1.3 Gênero Solanum.....	29
1.4 <i>Solanum paniculatum</i>.....	30
1.4.1 Caracterização botânica	32
1.4.2 Análise Fitoquímica.....	34
1.4.3 Uso Medicinal e Atividades Biológicas	38
1.5 Planejamento Fatorial De Experimentos	41
1.6 Desenvolvimento analítico e validação de métodos.....	43
1.7 Atividade Toxicológica	46
1.8 Atividade Anti-inflamatória.....	48
1.9 Atividade Antidiarreica.....	51
2 OBJETIVOS	53
2.1 Objetivo Geral	53
2.2 Objetivos específicos	53
3 METODOLOGIA	55
3.1 Coleta e Preparo das Raízes	55
3.2 Análise de Fertilidade do Solo	55

3.2.1 pH em água	55
3.2.2 Cálcio e Magnésio Trocáveis	55
3.2.3 Alumínio Trocável	56
3.2.4 Potássio e Sódio Trocáveis	56
3.2.5 Acidez Extraível ou Valor H	56
3.2.6 Soma de Bases (SB)	56
3.2.7 Capacidade de Troca Catiônica CTC (pH 7,0)	56
3.2.8 Saturação por Bases (Valor V)	57
3.2.9 Saturação por Alumínio (Valor m)	57
3.2.10 Saturação por Sódio	57
3.3 Análise de Minerais.....	57
3.4 Análises Bromatológicas.....	59
3.4.1 Umidade e Matéria Seca (MS)	59
3.4.2 Cinzas.....	59
3.4.3 Proteína Bruta (PB).....	59
3.4.4 Fibra Total (FT)	59
3.4.5 Carboidratos.....	60
3.4.6 Extrato Etéreo ou Lipídios	60
3.4.7 Valor Energético	60
3.5 Obtenção do Extrato	61

3.6 Extração em Fase sólida	61
3.7 Análise por HPLC-DAD	61
3.8 Validação da Metodologia	63
3.9 Análise Termogravimétrica e Análise Térmica Diferencial do ERSP.	63
3.10 Análise da Estabilidade a Termo-oxidação por Rancimat.....	63
3.11 Planejamento e Otimização da Extração de Compostos Fenólicos por Maceração e Microondas.....	63
3.12 Planejamento e Otimização da Extração de Compostos Fenólicos por Ultrassom.....	65
3.13 Investigação da Atividade Antimicrobiana.....	67
3.13.1 Microorganismos.....	67
3.13.2 Método de difusão em disco	67
3.13.3 Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Microbicida Mínima (CMM).....	68
3.14 Estudo Toxicológico	68
3.14.1 Animais.....	68
3.14.2 Bioensaio com <i>Artemia salina</i> Leach.....	69
3.14.3 Citotoxicidade em eritrócitos.....	70
3.14.4 Avaliação da citotoxicidade <i>in vitro</i> em linhagem cancerígenas.	71
3.14.5 Ensaio toxicológico pré-clínico agudo.....	72
3.14.6 Ensaio toxicológico pré-clínico subcrônico.....	72
3.14.7 Análises Bioquímicas	73

3.14.8 Análises Hematológicas	75
3.14.9 Análise Anatomopatológica	75
3.14.10 Análises Histopatológicas	75
3.15 Investigação da Atividade Antidiarreica	76
3.15.1 Diarreia induzida por óleo de rícino.....	76
3.15.2 Acúmulo de Fluido Intestinal Induzido por Óleo de Rícino	76
3.15.3 Avaliação do ERSP sobre a motilidade intestinal	77
3.16 Investigação da Atividade Antiinflamatória	77
3.16.1 Edema de pata induzido por carragenina	77
3.16.2 Bolsão de ar subcutâneo.....	78
3.16.3 Permeabilidade vascular induzida por ácido acético	78
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	79
4.1 Informações climatológicas no período da coleta.....	79
4.2 Fertilidade do solo.....	79
4.3 Análise de Minerais.....	81
4.4 Análises Bromatológicas.....	84
4.5 Desenvolvimento da Metodologia.....	85
4.6 Validação	88
4.6.1 Especificidade	89
4.6.2 Linearidade e Intervalo.....	90

4.6.3	Precisão	91
4.6.4	Precisão Intermediária.....	91
4.6.5	Limite de Detecção e Limite de Quantificação	92
4.6.6	Exatidão	93
4.6.7	Robustez	93
4.7	Análise Termogravimétrica e Análise Térmica Diferencial do ERSP	94
4.8	Análise da Estabilidade a Termo-oxidação acelerada por Rancimat	98
4.9	Otimização da extração de compostos fenólicos das raízes de <i>Solanum paniculatum</i> L. por maceração	100
4.10	Otimização da extração de compostos fenólicos das raízes de <i>Solanum paniculatum</i> L. por ultrassom.....	107
4.11	Otimização da extração de compostos fenólicos das raízes de <i>Solanum paniculatum</i> L. por microondas.....	111
4.12	Investigação da Atividade Antimicrobiana.....	119
4.13	Estudo Toxicológico	121
4.13.1	Bioensaio com <i>Artemia salina</i> Leach.....	121
4.13.2	Avaliação da citotoxicidade <i>in vitro</i> em linhagem cancerígenas humanas.....	122
4.13.3	Investigação Citotoxicidade em eritrócitos	123
4.13.4	Avaliação da Toxicidade Aguda.....	123
4.13.5	Avaliação da Toxicidade Subcrônica	129
4.14	Avaliação da atividade antidiarreica.....	135

4.14.1 Diarreia induzida por óleo de rícino.....	135
4.14.2 Acúmulo de fluido intestinal induzido por óleo de rícino.....	135
4.14.3 Avaliação do ERSP frente a Motilidade Intestinal.....	136
4.15 Atividade anti-inflamatória.....	140
4.15.1 Edema de pata induzido por carragenina.....	140
4.15.2 Método do Bolsão de Ar Subcutâneo.....	142
4.15.3 Determinação dos Níveis de TNF- α	143
4.15.4 Permeabilidade Vascular.....	143
5 CONCLUSÃO.....	145

1 INTRODUÇÃO

As plantas têm sido utilizadas de forma empírica como medicamentos para tratamento de doenças durante séculos, sendo uma das mais antigas formas de práticas medicinais, através do conhecimento repassado de geração a geração. A investigação das plantas medicinais a partir das informações fornecidas pela medicina popular e fitoterapia tem ganhado espaço na pesquisa científica, com o objetivo de desenvolver novos medicamentos efetivos que não apresentem efeitos tóxicos ou possuam baixa toxicidade (FIRMO et al., 2014; LUBIAN et al., 2010; TAYLOR, et al., 2001).

Estima-se que das 350 a 500 mil espécies de plantas no mundo, apenas 15% delas tenham sido submetidas a algum estudo científico para avaliar suas potencialidades na preparação de novos produtos farmacêuticos (RAMOS et al., 2015; BRANDÃO et al., 2010). Sabe-se também que cerca de 30% de todas as drogas disponíveis como agentes terapêuticos são produtos naturais ou derivados deles (CALIXTO, 2005).

Mesmo com o desenvolvimento da medicina moderna na maior parte do mundo, em 2002, a Organização Mundial da Saúde (OMS) reconheceu que 80% da população dos países em desenvolvimento utilizavam práticas tradicionais nos cuidados básicos de saúde e 85% usavam plantas medicinais ou preparações obtidas a partir destas. Desde então, a OMS tem expressado sua posição a respeito da necessidade de valorizar a utilização de plantas medicinais no âmbito sanitário e na atenção básica à saúde (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2002; FOWLER, 2006; ROSA; BÉRIA, 2012).

Outro fator que colaborou bastante para o aumento mundial dos estudos envolvendo plantas medicinais foi à exigência da população por um modelo de vida mais saudável e natural. Sendo assim, o interesse da indústria farmacêutica pela procura de substâncias vegetais biologicamente ativas foi reativado, apesar dos obstáculos presentes no desenvolvimento de fármacos baseados em derivados de plantas. É válido salientar também que embora os avanços tecnológicos importantes tenham sido conquistados pela química sintética, muitos compostos bioativos isolados de plantas são formados por misturas de moléculas complexas, tornando sua obtenção no laboratório um processo por vezes inviável, ou seja, a melhor opção é retirar diretamente da planta (WALSH e FISCHBACH, 2010).

1.1 Plantas Medicinais

Desde os primórdios, os recursos naturais, em especial as plantas, tem sido um dos elos entre o homem e a natureza, pois os homens pré-históricos já faziam uso das plantas para amenizar o sofrimento dos males físicos que lhes acometiam (MACEDO; FERREIRA, 2004; LEMOS; ARAÚJO, 2015). A busca pelo alívio e/ou a cura das doenças humanas foi por milhares de anos conseguida através da utilização dos produtos naturais, os quais existiam nas formas de tinturas, chás e pós (BALICK e COX, 1997; VIEGAS-JÚNIOR; BOLZANI; BARREIRO, 2006). Médicos da antiguidade como Hipocrates e Avicenna já utilizavam as plantas medicinais. (FERRO, 2006).

Ainda de acordo com a OMS, entre 65-80% da população de países emergentes, devido à pobreza ou ao difícil acesso a medicina moderna, usam como medicamentos extratos ou preparações oriundas de plantas para tratar suas enfermidades como: inflamações, úlceras pépticas, diarreia e outras diversas enfermidades (CALIXTO, 2005; ROSA et al., 2012).

Como nas últimas décadas o interesse pela fitoterapia teve um aumento considerável entre usuários, pesquisadores, serviços de saúde e as empresas farmacêuticas, incluindo as multinacionais, estão produzindo mais medicamentos à base de plantas medicinais para a comercialização (ROSA; CÂMARA; BÉRIA, 2011). Esta recuperação de espaço no mercado dos produtos naturais vem sendo fonte de inspiração para uma grande fração da atual farmacopeia brasileira (KINGSTON, 2011).

Os brasileiros utilizam as plantas medicinais da flora nativa com pouca ou nenhuma comprovação de suas propriedades farmacológicas, propagadas por usuários ou comerciantes (VEIGA; ANGELO, 2005). Com base nessas afirmações, a pesquisa com plantas medicinais se torna importante, uma vez que ira validar as ações farmacológicas das mesmas. É importante considerar que para estudar as possíveis ações biológicas de plantas, se faz necessária uma integração multidisciplinar, envolvendo as áreas da botânica, química, farmacologia e toxicologia e têm como fim viabilizar os estudos de eficácia e segurança das espécies vegetais na perspectiva de correlacionar os constituintes ativos as atividades farmacológicas (RATES, 2001).

Diversas substâncias têm sido isoladas de plantas em vários centros de pesquisas, o que vem comprovando que os vegetais são fontes potenciais de novos fármacos, apesar do crescimento da indústria química e da síntese de novas substâncias. As plantas são fontes importantes de moléculas biologicamente ativas que podem ser utilizadas não apenas como modelo para a síntese e obtenção de novos fármacos, mas também como uma nova possibilidade de intervenção terapêutica (GUZMÁN-RODRÍGUEZ et al., 2015; SHINHABABU, A., 2015).

No Brasil, é perceptível a multiplicação de programas de fitoterapia apoiados pelo serviço público de saúde. Verifica-se a formação de equipes multidisciplinares responsáveis pelo atendimento fitoterápico, com profissionais encarregados pela sua produção, cultivo de plantas medicinais, realização de diagnóstico médico e recomendação destes produtos (ALVES, 2006).

Foi aprovado em junho 2006 o Decreto 5.813 que cria a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos, cujo objetivo é “garantir à população brasileira o acesso seguro e o uso racional de plantas medicinais e fitoterápicos, promovendo o uso sustentável da biodiversidade, o desenvolvimento da cadeia produtiva e da indústria nacional” (BRASIL, 2015b). O Governo Federal também criou a Rede Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao Sistema Único de Saúde (RENISUS), em 2008, com a finalidade de auxiliar o desenvolvimento de toda cadeia produtiva e orientar estudos e pesquisas que possam subsidiar a elaboração da Relação Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos (RENAFITO). A RENISUS é composta por uma lista de 71 espécies vegetais já utilizadas nos serviços de saúde estaduais e municipais, considerando o conhecimento tradicional e popular, e os estudos químicos e farmacológicos disponíveis (BRASIL, 2015a). Estas plantas estão listadas pelos seus nomes científicos (BRASIL, 2009).

As principais classes terapêuticas comercializadas no Brasil de medicamentos fitoterápicos comercializados no Brasil são indicadas como psicolépticos (sedativos, ansiolíticos e antidepressivos), antivaricosos, anti-hemorroidários, auxiliares digestivos e hepáticos, antiespasmódicos, tônicos, laxantes, descongestionantes, antigripais e para auxiliar na circulação cerebral (VALEZE; BRENZAN, 2011).

Entretanto, várias plantas medicinais da flora nativa são consumidas com pouca ou nenhuma comprovação de suas propriedades farmacológicas e sem nenhum controle da sua qualidade, podendo assim acarretar um sério problema de saúde pública. É importante ressaltar que efeitos tóxicos, adulteração do produto e

interações medicamentosas são existentes em medicamentos alopáticos e fitoterápicos (VEIGA; ANGELO, 2005).

Portanto, o estudo farmacológico das drogas vegetais, constitui um passo importante na aquisição de novos conhecimentos científicos e aprimoramento da medicina tradicional, permitindo que os resultados dos estudos farmacológicos e clínico-farmacológicos sejam retomados a população, com identificação da espécie, parte empregada, modo de preparo, melhores informações de uso, segurança e eficácia (SIXEL; PECINALLI, 2005). Dessa forma, faz-se necessário maior incentivo por parte do governo federal e real esforço por parte dos cientistas brasileiros em comprovar as indicações das plantas medicinais utilizadas pela população e/ou pesquisar drogas complexas que possam vir a se tornarem fitoterápicos (OLIVEIRA, 2013).

1.2 Família Solanaceae

A Solanaceae é uma família cosmopolita pertence à ordem Solanales e compõe um dos maiores grupos dentre as plantas Angiospermas e dicotiledôneas. Possui cerca de 100 gêneros e um número aproximado de 2500 espécies (SOARES et al., 2007; OLMSTEAD et al., 2008; SOUZA; LORENZI, 2008; GOMES; LIMA; FACUNDO, 2014). Provavelmente esta família teve como centro de origem as Américas Central e do Sul (D'ARCY, 1991). As plantas da família Solanaceae são fontes ricas de metabólitos secundários, como alcaloides do tipo tropano, pirrol, piridínicos e esteroidais, witanolidas, ecdisteroides, sesquiterpenos, diterpenos, glicoalcaloides, flavonoides, esteroides, saponinas, sapogeninas esteroidais, glicosídeos esteroidais e antraquinonas (GRIFFIN; LINA, 2000; VAZ, 2008). É uma das famílias mais importantes de arbustos e ervas de capoeiras, matas secundárias e de áreas antropizadas. No Brasil, possui representantes herbáceos, arbustivos, arbóreos, escandentes e epifíticos (HUNZIKER, 2001; NEE, 2007; MARQUES; RODRIGO; JASCONE, 2012).

Quanto a morfologia das folhas as solanaceas são: simples, alternadas ou opostas; inteiras ou lobadas; sem estípulas, glabras, pubescentes ou tomentosas; com o indumento constituído de diferentes tipos de tricomas, desde simples, glandulares até os estrelados, dendríticos, lepidotos, dentre outros, ocorrendo

principalmente no gênero *Solanum*. Suas flores são: perfeitas; de pequenas a grandes; vistosas; pentâmeras; actinomorfas ou zigomorfas; diclamídeas, solitárias ou em diferentes tipos de inflorescências; cálice gamossépalo, podendo ser acrescente e ampliado no fruto; corola gamopétala de diferentes formas (tubulosa, campanulada, rotácea ou estrelada) com estames adnatos ao tubo da corola. Os frutos podem ser bagas, drupas ou cápsulas (NEE, 1999; HUNZIKER, 2001; KNAPP, 2002; MARQUES; RODRIGO; JASCONE, 2012; SAMPAIO, 2013).

As primeiras informações documentadas para a família Solanaceae datam de períodos anteriores a Linnaeus. De acordo com D'Arcy (1979), no manuscrito Dioscorides Codex, 825 d.C., pode ser reconhecida uma ilustração que se atribui ser de *Solanum nigrum* L. No Brasil, os primeiros dados sobre a família foram referidos por Piso e Marcgravius (1648), com ilustrações e descrições de duas espécies de *Solanum*, sob os nomes indígenas “jurepeba” e “aguaraquiya”, que correspondem respectivamente as espécies *Solanum paniculatum* L. e *Solanum americanum* Mill. (AGRA, 1991).

No Brasil esta família apresenta grande diversidade e endemismo, ocorrendo desde a Amazônia até o Sul do país, além de possuir várias espécies com atribuições ornamentais, medicinais e nutricionais (SOARES et al., 2007). Foram identificados 34 gêneros e 449 espécies, sendo 215 endêmicas (STEHMANN et al., 2010; KAUR et al., 2014). No nordeste brasileiro foram identificados 22 gêneros e 132 espécies de Solanaceae, com sete espécies endêmicas para a região e todas elas pertencentes ao gênero *Solanum* (STEHMANN et al., 2010).

As espécies da Solanaceae encontram-se entre as mais estudadas no mundo, pois tem grande importância econômica. Na economia, as espécies são muito exploradas para fins alimentícios e terapêuticos. Como fins alimentícios podemos citar: o pimentão (*Capsicum annum* L.), jiló (*Solanum gilo*), tomate (*Solanum lycopersicum*), pepino (*Solanum muricatum*), pimenta malagueta (*Capsicum frutescens* L.) (SOUZA; LORENZI, 2008).

Na terapêutica essas espécies são fonte de muitos compostos, cujos principais são alcaloides tropânicos e esteroidais, além de possuir espécies alucinógenas e de uso ornamental (KNAPP et al., 2004; FRIEDMAN, 2006; EICH, 2008). Como exemplo de espécies que possuem compostos bioativos, podemos citar: lobeira (*Solanum lycocarpum*) para hipertensão, diabetes e combate do colesterol; *Atropa belladonna*, com atropina e correlatos da beladona; *Hyosciamus*

niger L. com hiosciamina e *Datura* spp. que possui a hioscina. Estas substâncias apresentam atividade antimuscarínica e inibem a ação da acetilcolina (BROWN e PALMER, 2003). Além disso algumas apresentam atividade tóxica, como a espécie *Solanum fastigiatum*, que causa disfunção cerebelar e epilepsia em animais após ingestão, e a *Nicotiana tabacum* L., que apresenta propriedades narcóticas e alucinógenas (SILVA, 2001).

1.3 Gênero *Solanum*

Solanum é o gênero mais diversificado taxonomicamente da família Solanaceae e um dos maiores gêneros de Angiospermas Eudicotiledôneas (HUNZIKER 2001; NEE, 2001). É composto por aproximadamente 1500 espécies, sendo o mais importante gênero da família Solanaceae (BOHS, 2007; KNAPP 2008; GOMES; LIMA; FACUNDO, 2014). Habitam sistemas ecológicos estabelecidos nas regiões tropicais e subtropicais do mundo e tem a América do Sul como centro de diversidade e distribuição (AGRA, 1999a). Apesar da diversidade, apresenta-se como um grupo bem caracterizado, pois sua uniformidade pode ser reconhecida pelo perianto e androceu pentâmeros, estames coniventes, anteras amarelas, oblongas ou atenuadas da base para o ápice e deiscência poricida (ROE, 1972). Possui também grande diversidade que não é comum nas angiospermas, tornando-as extremamente interessante tanto do ponto de vista evolutivo quanto de sua utilidade para os humanos (KNAPP et al., 2004).

No Brasil existem cerca de 250 espécies, onde aproximadamente 100 são endêmicas, e estão presentes desde florestas, como por exemplo a Floresta Atlântica, até regiões áridas, como a Caatinga (AGRA, 2008). No Nordeste do Brasil, o gênero *Solanum* está representado por cerca de 80 espécies, das quais 75 ocorrem na Mata Atlântica e sete são endêmicas do bioma (AGRA, 2000; STEHMANN et al. 2012).

Apesar das riquezas e propriedades que as espécies do gênero *Solanum* apresentam, poucas são estudadas química e biologicamente. Além disso, muitas espécies são consideradas ervas daninhas e isto estimula ao conhecimento das substâncias bioproduzidas pelo seu metabolismo especializado (SANTOS, 2014).

Algumas espécies podem ser utilizadas na alimentação humana como *Solanum melongena* L. (berinjela) (KAUR et al., 2014), *S. tuberosum* L. (batatinha) (CHETTY; NARVÁEZ-VÁSQUEZ; OROZCO-CÁRDENAS, 2015), *S. lycopersicum* L. (tomate) (LI et al., 2014) e *S. muricatum* L. (pepino) (KOLA et al., 2015). Outras possuem metabólitos bioativos que apresentam propriedades farmacológicas (IKEDA et al., 2000; VIEIRA et al., 2010), como, por exemplo, *S. lycocarpum* (lobeira) utilizada no tratamento de diabetes, obesidade, inflamações e hipertensão (VIEIRA JÚNIOR et al., 2003, CLERICI et al., 2011); *Solanum melongena* L. usada no tratamento de diabetes (FERRÃO et al., 2014); e *Solanum paniculatum*, utilizada para hepatite, cirrose e astite (MARINHO et al., 2007). Também tem as espécies que interessam as indústrias farmacêuticas por apresentarem alcalóides esteroidais como a solasodina, por apresentar o núcleo esteroidal servindo como base para a síntese de hormônios (SILVA et al., 2005a).

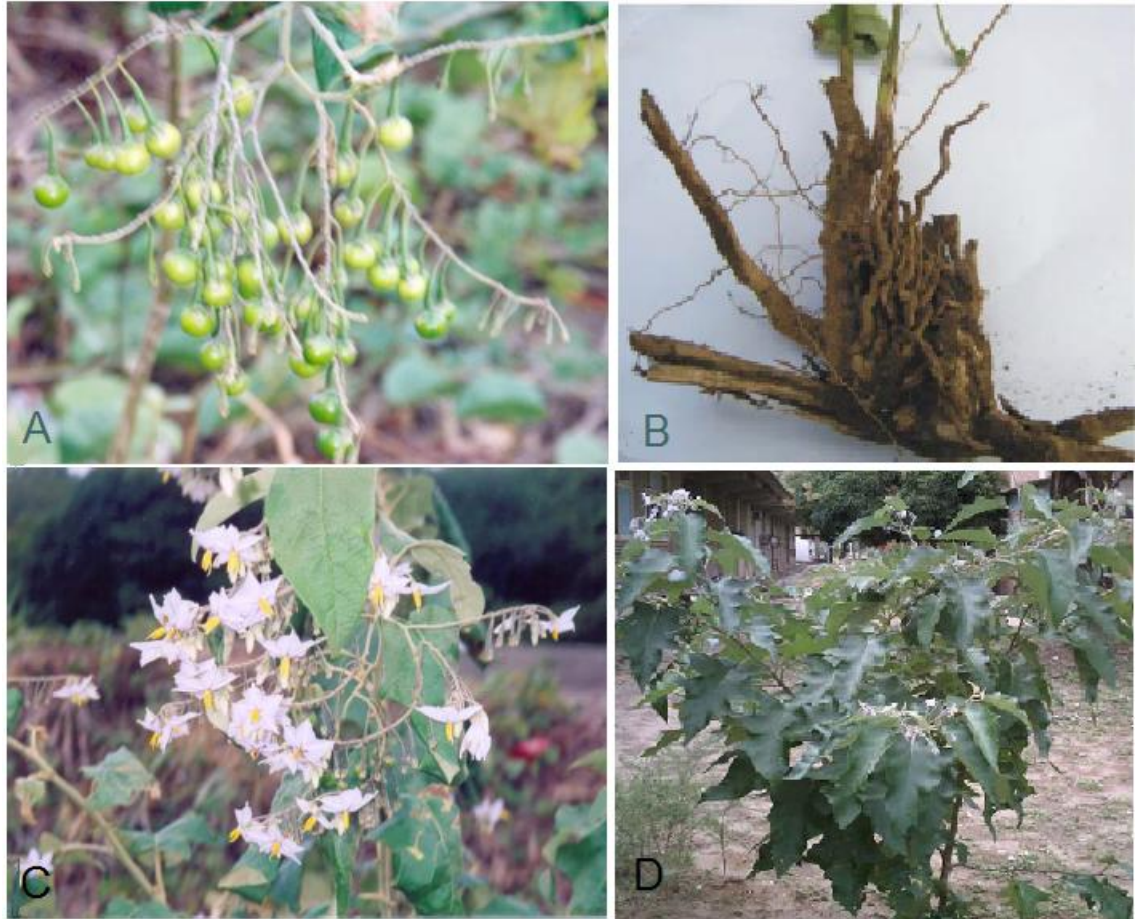
O gênero *Solanum* produz uma grande variedade de flavonoides (SILVA et al., 2001), saponinas (BENTO et al., 2004; ZHOU et al., 2006; NAKAMURA et al., 2008), sapogeninas (VALERI et al., 1989; WEISSENBERG, 2001) e glicoalcaloides (HALL et al., 2006; SILVA et al., 2008; DISTL e WINK, 2009). Os glicoalcaloides, dependendo da dosagem utilizada, podem ser tóxicos a bactérias, fungos, vírus, animais e até humanos (FRIEDMAN, 2006).

Dentre as espécies mais estudadas do gênero *Solanum* destaca-se a espécie *Solanum paniculatum* L. por sua ampla distribuição, por seus diversos usos medicinais e principalmente por ser reconhecido como fitoterápico pela Farmacopeia Brasileira 1^o e 2^o edição (FARMACÓPEIA BRASILEIRA, 1929 e 1959).

1.4 *Solanum paniculatum* L.

Muitas espécies de *Solanum* são conhecidas popularmente no Brasil pelo nome de "jurubeba", porém apenas a espécie *Solanum paniculatum* é descrita como a verdadeira "jurubeba" na Farmacopeia Brasileira (CORRÊA, 1984). Também é conhecida "Jurupeba", "Juripeba", "Juvena", "Jubeba Juina" ou "Juna" (MESIA-VELA et al., 2002; LOBO et al., 2010). Etimologicamente, a palavra "jurubeba" vem do Tupi-Guarani, *yu'peba*, onde *yu* = espinho e *peba* = chato (PIO-CORRÊA, 1974; FORNI-MARTINS; MARQUES; LEMES, 1998; AGRA et al., 1999b)(Figura 1).

Figura 1 - *Solanum paniculatum* L. A. Ramo frutificado; B. Raízes; C. Ramo florido; D. Planta inteira.



Fonte: Nurit-Silva (2007) com modificações.

A espécie *S. paniculatum* L. (Solanaceae) ocorre em várias partes da América tropical, principalmente no Brasil, Paraguai, Bolívia e Argentina. Nesses lugares, esta planta é utilizada para fins culinários e medicina popular (MISSOURI JARDIM BOTÂNICO DE 2010; VIEIRA et al., 2010; VIEIRA et al., 2011). No Brasil, esta planta ocorre desde o Rio Grande do Sul até o Rio Grande do Norte. Floresce e frutifica praticamente todo o ano (ENDRINGER et al., 2010). É uma planta que infesta terrenos vazios, bordas da estrada e pastagens degradadas (ENDRINGER et al., 2010). Esta planta é utilizada para fins terapêuticos e alimentícios. Além de receitas utilizando a partes da planta como ingrediente, bebidas alcoólicas, como cachaças e vinhos, são vendidas no mercado a base de jurubeba (Figura 2).

Figura 2 – Bebidas alcoólicas a base de “jurubeba” (*Solanum Paniulatum* L.)



Fonte: Autor.

1.4.1 Caracterização botânica

Segundo Nurit-Silva et al. (2007), *Solanum paniculatum* é um arbusto de 1 a 1,5 m de altura, revestido de indumento alvo-tomentoso a cinéreo, constituído basicamente de tricomas porrecto-estrelados, sésseis ou estipitados, com o raio central reduzido, unicelular.

A raiz é ramificada (Figura 3B), tem estrutura secundária inicial, em secção transversal, possui epiderme com uma gradativa suberificação e parênquima cortical com cinco a seis camadas de células. Em crescimento secundário inicial possui xilema com estrutura hexarca (Figura 3C).

As folhas são largo-ovadas a lanceoladas, com a margem lobada ou inteira (Figura 3A), com acúleos cônicos. A epiderme da lâmina, em vista frontal, apresenta células com paredes anticlinais poligonais, retas na face adaxial (Figura 3D) e sinuosas na face abaxial (Figura 3E). A lâmina foliar hipostomática, com estômatos do tipo anisocítico. O mesofilo dorsiventral, com uma camada de parênquima paliçádico e um número variável de estratos do parênquima esponjoso.

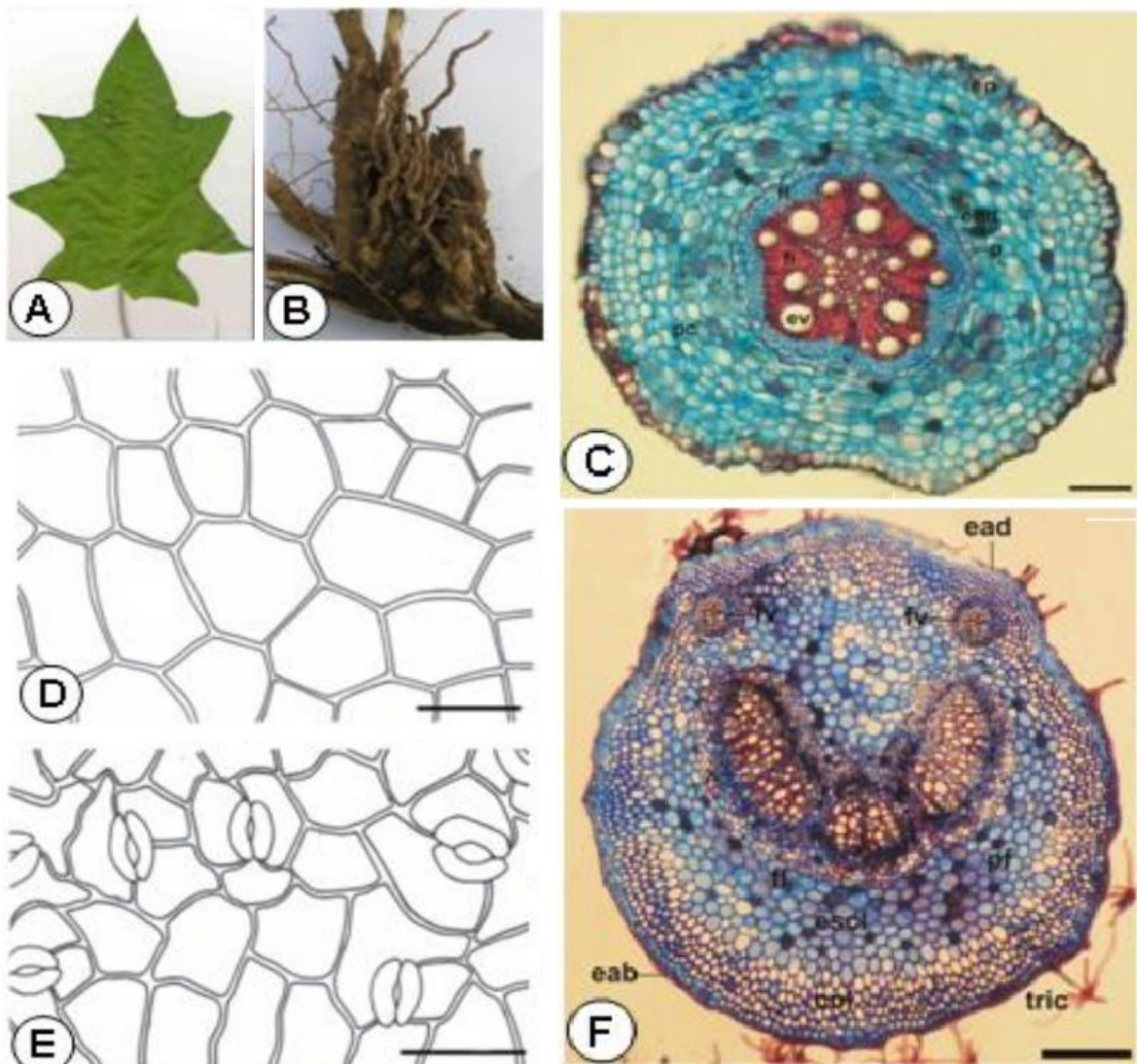
O pecíolo, em secção transversal, exhibe contorno levemente biconvexo, e o sistema vascular é formado por quatro a cinco feixes bicolaterais (Figura 3F).

O caule cilíndrico e lenticelado, ramificação simpodial plurifoliada, acúleos em toda a planta. Possui em estrutura secundária, de contorno circular e cilindro

central com estrutura sifonostélica anfiflóica, contínua, com xilema formado por um cilindro maciço.

Forni-Matins et al. (1998) realizou o estudo da biologia floral dessa espécie. *Solanum paniculatum* possui inflorescências em forma de panículas terminais, nas quais as flores atingem a maturidade da base para o ápice. As flores possuem cinco pétalas unidas, corola pigmentada por antocianina e cinco anteras amarelas, porcidas, vistosas e tubulosas, que se dispõem de tal modo a formar um cone ao redor do estigma. O estigma é capitado e o ovário das flores são multiovulados.

Figura 3 – *Solanum paniculatum*: A) A folha, com lâmina foliar largo-ovada e margem lobada; B) Raiz ramificada. C) Secção transversal da raiz secundária apresentando xilema com estrutura hexarca. D) Face adaxial da epiderme com células de paredes poligonais, retas. E) Face abaxial da epiderme com células de paredes sinuosas e estômatos anisocíticos. F) Pecíolo, em secção transversal, com cinco feixes. C) 800 µm; D) 250 µm; E) 250 µm; F) 2500 µm.



Fonte: (NURIT-SILVA et al., 2007) com modificações.

1.4.2 Análise Fitoquímica

Estudos fitoquímicos de várias partes da *S. paniculatum* evidenciaram a presença de duas saponinas, paniculonina A (RIPPERGER; SCHREIBER, 1968) e paniculonina B (MAHATO; GANGULY; SAHU, 1982), alcaloides esteroidais, jurubina (SCHREIBER; RIPPERGER, 1966), isojuripidina, isopaniculidina, paniculidina (RIPPERGER et al., 1967a) e isojurubidina (CAMBIAGHI et al., 1971; SILVA, 2005), esteroides, neoclorogenina, paniculogenina, tigogenina, epitigogenina (RIPPERGER et al., 1967b) e solanina (SIQUEIRA; MACAN, 1976; SOUZA et al., 1991; TESKE; TRENTINI, 1995), resinas, jupebina e jupebenina (SIQUEIRA-JACCOUD et al., 1982), frutose, glicose, galactose (LEEKNING; ROCCA, 1968), mucilagens, ceras e ácidos orgânicos (TESKE; TRENTINI, 1995), glicoalcaloides esteroides e saponinas esteroidais (RIPPERGER et al., 1967; RIPPERGER; SCHREIBER, 1968; MESIAVELA et al., 2002; BOTION et al., 2005).

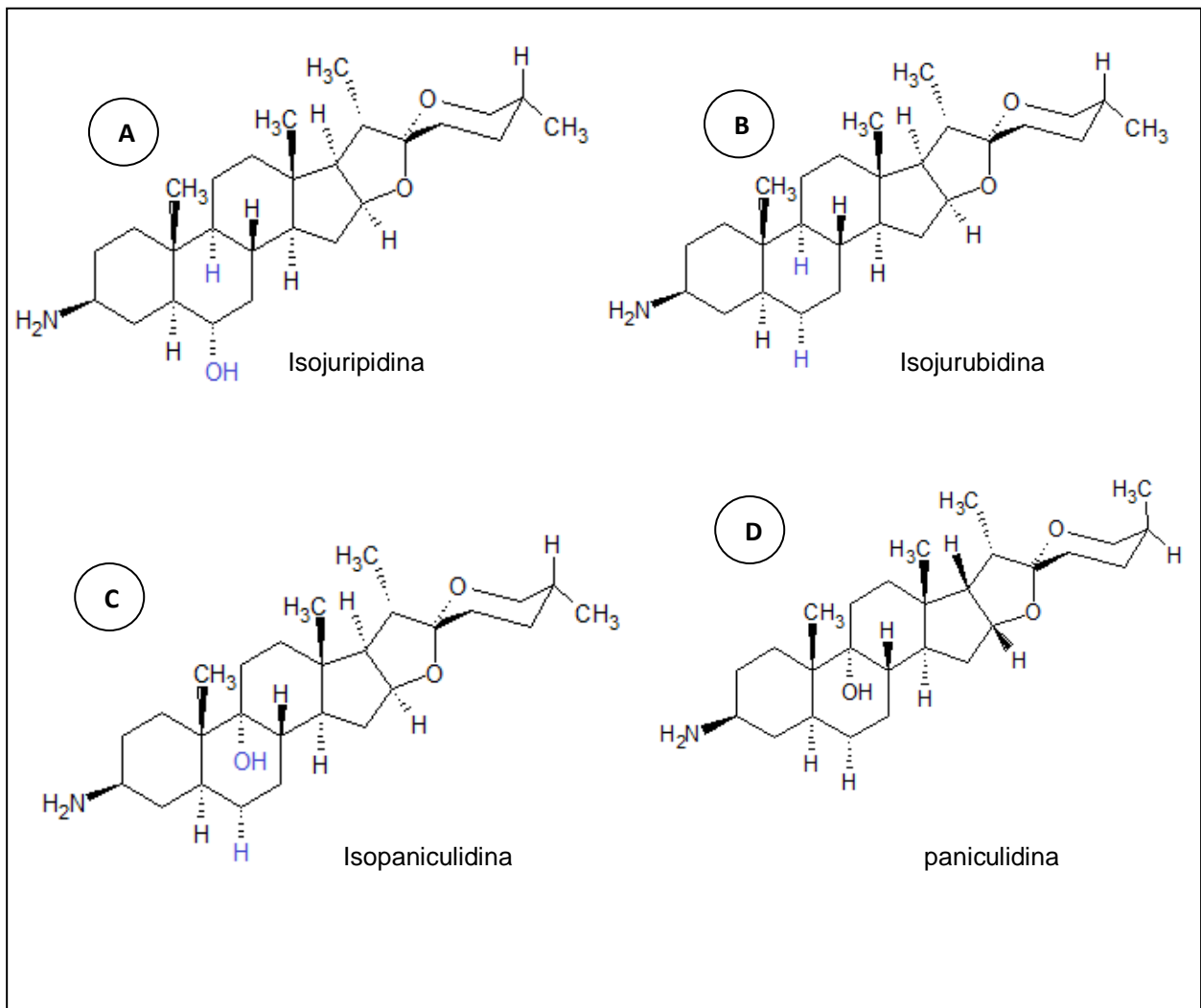
Em estudos mais recentes, Valadares et al. (2009) isolou os compostos neotigogenina, e o novo composto $\Delta^{25(27)}$ -tigogenina-3-O- β -D-glucopiranosídeo. Júnior et al. (2015) isolou seis novos compostos: **1**) (22R, 23S, 25R) - 3 β , 6 α , 23 - trihidroxi - 5 α - spirostano 6 - O - β - D - xilopiranosil - (1'''' \rightarrow 3''') - O - [β - D - quinovopiranosil (1'' \rightarrow 2'')] - O - [α - L - rhamnopiranosil (1'' \rightarrow 3')] - O - β - D - quinovopiranosídeo; **2**) diosgenina 3 - O - β - D - glucopiranosil (1'' \rightarrow 6') - O - β - D - glucopiranosídeo; **3**) ácido cafeico; **4**) diosgenina β -D-glucopiranosídeo; **5**) rutina; **6**) quercetina 3-O- α -L-rhamnopiranosil (1'' \rightarrow 6'')-O- β -D-galactopiranosídeo.

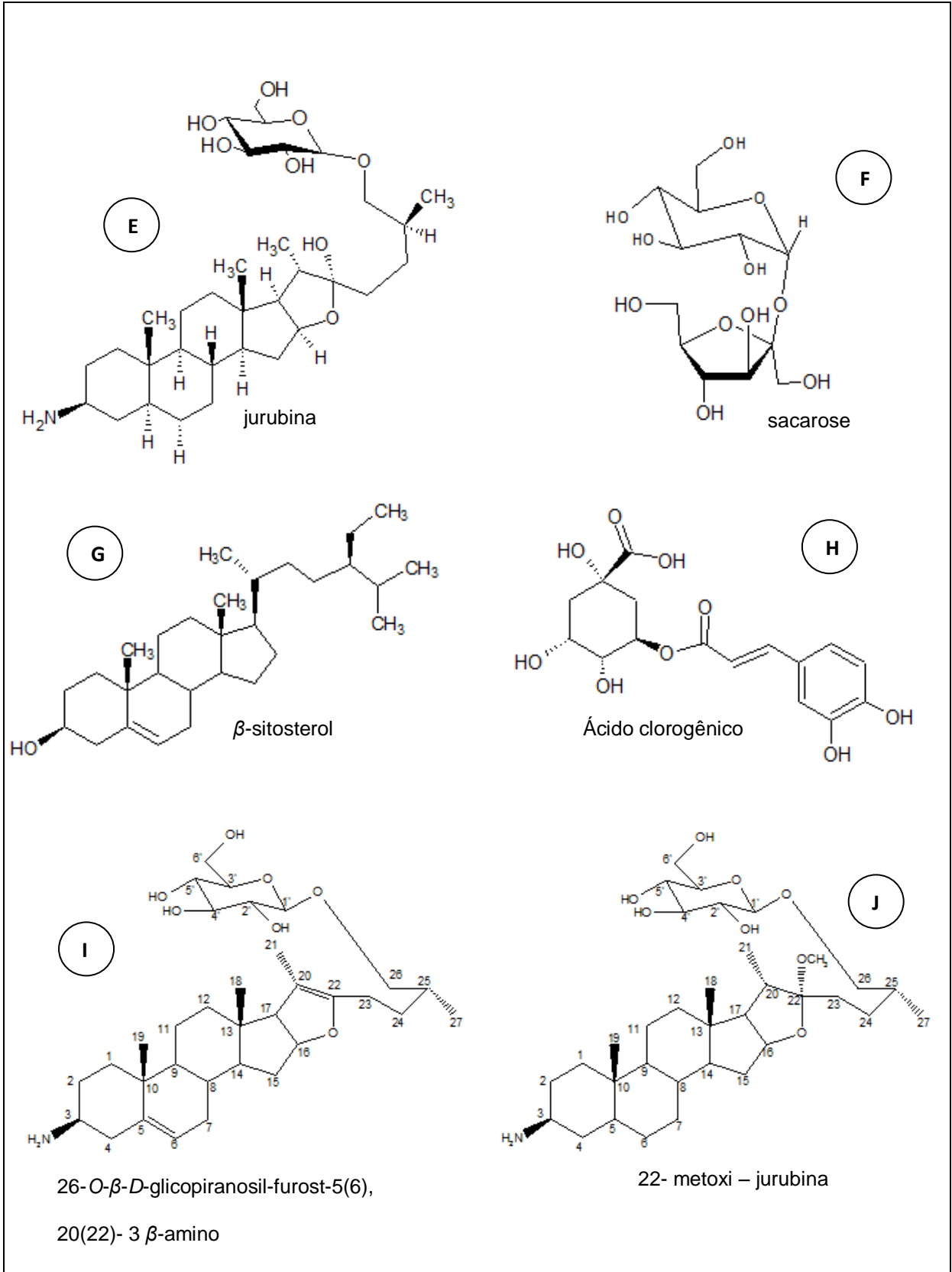
A análise fitoquímica extratos de *S. paniculatum* mostrou que alcaloides esteroidais são os principais constituintes, embora as resinas e os hidratos de carbono foram também isolados. Os componentes e seu conteúdo variam de acordo com a parte da planta (SCHREIBER et al. 1965; SCHREIBER; RIPPERGER 1966; RIPPERGER et al. 1967, VIEIRA et al. 2011). Frutos possuem um teor de alcaloides reduzidos na maturação (SIQUEIRA-JACCOUD et al., 1982).

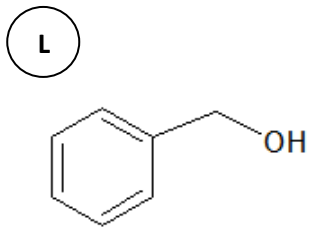
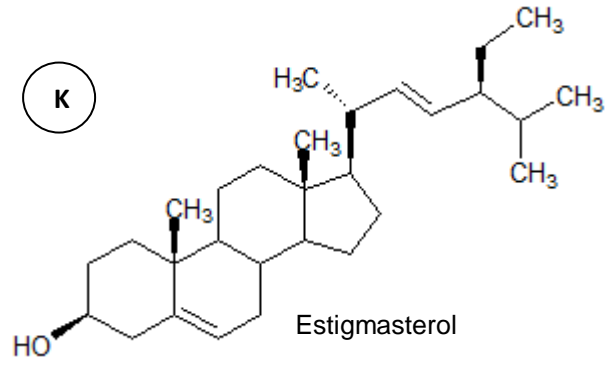
Foram isolados das raízes os compostos químicos: isojuripidina (Figura 4A), isojurubidina (Figura 4B), isopaniculidina (Figura 4C), paniculidina (Figura 4D), jurubina (Figura 4E), sacarose (Figura 4F), 26-O- β -D-glicopiranosil-furost-5(6),20(22)-3 β -amino (Figura 4I), 22- metoxi - jurubina (Figura 4J), Estigmasterol (Figura 4K) (SCHREIBER; RIPPERGER, 1966; RIPPERGER; SCHREIBER;

BUDZIKIEWICZ, 1967; CAMBIAGHI; DRADI; LONGO 1971; SILVA, 2012). Do óleo essencial das raízes foram identificados os compostos: álcool benzílico (Figura 4L), fenil etil álcool (Figura 4M), *cis-p*-mentha-1(7)8-dien-2-ol (Figura 4N), 13-hidroxi-valencene (Figura 4O), limonen-10-ol (Figura 4P), aristolone(Figura 4Q), maaliol (Figura 4R), longipenanol (Figura 4S), nerol (Figura 4T), Dilapiol (Figura 4U), timol (Figura 4V), criptomeridiol (Figura 4X), *E* – azarone (Figura 4W), 1,3,5-trimetoxi-2-propenilbenzeno (Figura 4Y) (SILVA, 2012). Em geral os estudos fitoquímicos, principalmente das raízes, dessa espécie são antigos.

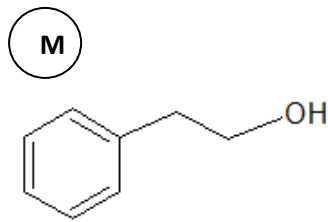
Figura 4 – Substâncias isoladas e identificadas das raízes de *Solanum paniculatum* (Solanaceae).



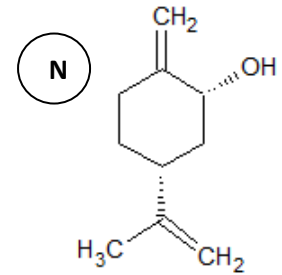
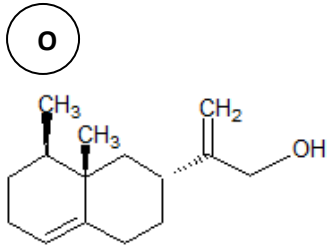




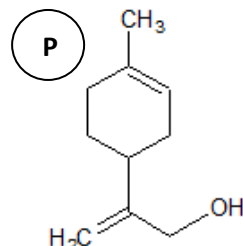
álcool benzílico



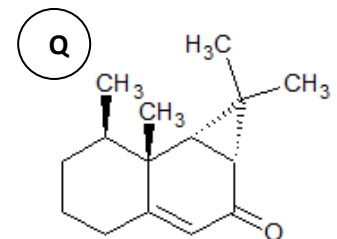
fenil-etanol

*cis-p*-mentha-1(7)8-dien-2-ol

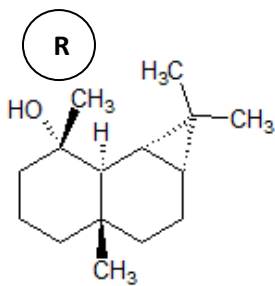
13-hidroxi-valencene



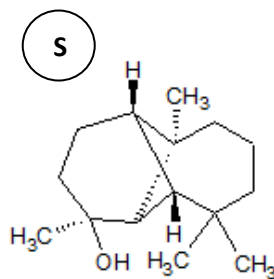
limonenol



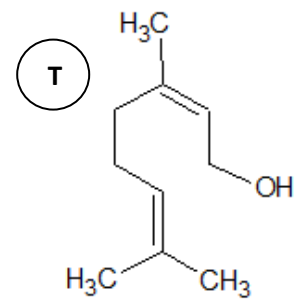
aristolone



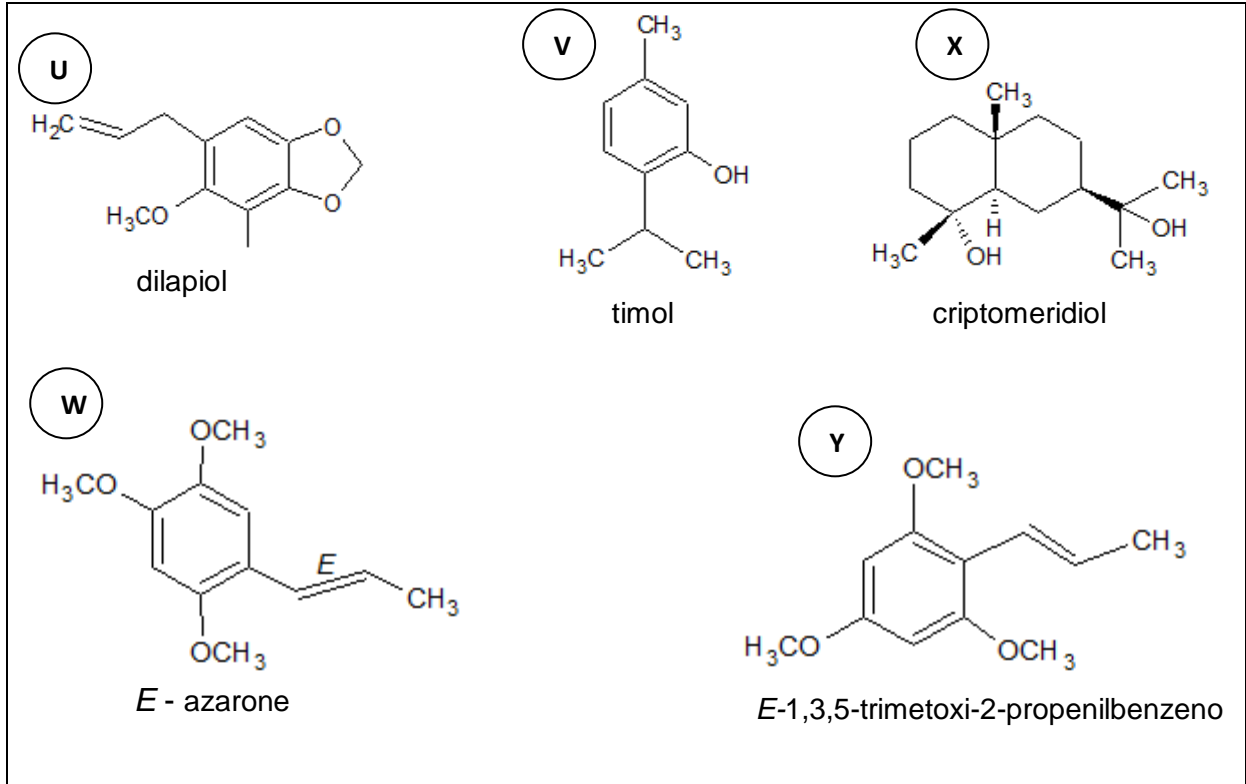
maaliol



longipenanol



nerol



1.4.3 Uso Medicinal e Atividades Biológicas

Dentre as espécies do gênero *Solanum*, a *Solanum paniculatum* L. é a que mais se destaca pelos seus diferentes usos medicinais, por sua distribuição ampla e, principalmente, por ser reconhecido como fitoterápico pela Farmacopeia Brasileira na 1ª e na 2ª edição (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 1929 e 1959), cujas raízes e caules são indicados no tratamento da anemia e das desordens hepáticas e digestivas. Muitos estudos citam a utilização de várias partes de *S. paniculatum* para tratamento de doenças, como pode ser visto na tabela 1. Esta espécie também foi incluída na Relação Nacional de Plantas Medicinais de interesse ao SUS (RENISUS 2009).

Diversos estudos das atividades biológicas de *S. paniculatum* já foram realizados. De acordo com Jachimovits (1954), o extrato etanólico das folhas e o das raízes apresentou-se ativo como espasmolítico. Chiappeta et al. (1983) e Antunes (2001) relatam que a atividade antibacteriana foi registrada contra *Bacillus subtilis*, *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*, *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* e *Ralstonia solanacearum*. No trabalho realizado por Júnior et al. (2015), o extrato

etanólico das folhas foram administrado em ratos e promoveram efeito anti-úlceras. As raízes de *S. paniculatum* apresentaram atividade bactericida contra monoculturas de bactérias (MACÊDO-COSTA et al., 2014; DUAILIBE et al., 2015).

Tabela 1 – Estudos que relatam propriedades medicinais de *Solanum paniculatum*.

PARTE DA PLANTA UTILIZADA	PROPRIEDADE	REFERÊNCIA
Planta inteira	Anti-inflamatória, emenagoga, anti-úlceras.	MEIRA, 1946; MORENO, 1975; ANDRADE et al., 1996; MESIA-VELA et al., 2002; MENDES, CARLINI 2007.
Folha, flores e frutos	Tratamento de problemas respiratórios (tosse, gripes, resfriados, bronquites), hepatoprotetora.	CORDEIRO, FELIX, 2014
Raízes	Tratamento da artrite, estimulante (garrafada), hepatoprotetora, diurético, anemia.	PIO CORRÊA, 1969; MATOS, 1987; POTT, POTT, 1994; AGRA, 1996; AGRA et al., 2007;
Folhas	Tratamento da hipertensão. Atividade antioxidante. Cicatrizante. Antiemético.	RIBEIRO et al., 1986; POTT, POTT, 1994; AHMED et al., 2013
Frutas	Tratamento de anemia. Atividade coagulante. Ressaca.	MATOS, 1987; POTT, POTT, 1994; BURGER et al.2008.
Flor	Tratamento de bronquite, tosse, nefropatias e diabetes.	MATOS, 1987; POTT, POTT, 1994; MESIA-VELA et al., 2002;
Casca e caule	Tratamento da malária.	BRANDAO et al., 1985.
Raízes e frutos	Tratamento de hepatopatias, nefropatias, anemias, tuberculose, febre e astite.	JOACHIMOVITS,1954; CORREA, 1969; AGRA, 1996; AGRA, 1999. MARINHO et al., 2007
Raízes e caule	Tratamento da anemia, hepatopatias e gastropatias.	FARMACOPEIA BRASILEIRA, 1929 e 1959.
Flores, frutos e raízes	Antiemético	DE ALBUQUERQUE et al., 2007

Testes *in vitro* mostraram também que o extrato etanólico das raízes, folhas e dos frutos de jurubeba apresentaram atividade bactericida contra *Staphylococcus aureus*; *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa* (LOBO et al., 2010); anti-viral contra o vírus SuHV-1 que ataca bovinos e suínos (KAZIYAMA et al., 2012) e anti-tripanosoma (MOREIRA et al., 2013).

A citotoxicidade desta espécie foi determinada por Daunter e Cham (1990) e suas atividades antiulcerogênica. Mesia-Vela (2002) demonstrou que os extratos aquosos de caules e raízes inibiram a secreção ácida gástrica em roedores. Silva, et al. (2007) demonstrou a bioatividade de *S. paniculatum* frente a *Artemia salina* Leach. Apresentou também, atividade frente os vírus HHV-1 (Vírus da Herpes Humana tipo-1), vírus da encefalomiocarditi (EMCv) e VACV-WR (vaccinia virus strain Western Reserve) (VALADARES, Y. M. et al., 2009).

Os extratos etanólicos das folhas e dos frutos de *S. paniculatum* não apresentaram ação mutagênica em medula óssea de camundongos, porém, em doses mais elevadas, ambos os extratos exibiram atividade citotóxica (VIEIRA et al., 2010).

Um extrato hidroalcolico das espécies *Solanum paniculatum* (Solanaceae), *Remijia ferruginea* (Rubiaceae), *Jacaranda caroba* (Bignoniaceae) e *Erythraea centaurium* (Gentianaceae) compõem o fitoterápico brasileiro lerobina[®] (Figura 5), que é utilizado popularmente para o tratamento de dispepsia. Pesquisa realizada por Botion et al. (2005) comprova a indicação do lerobina[®] como agente antidispépticos. Tagliati et al. (2008), através do estudo da toxicidade aguda e crônica, concluíram que o mesmo, aparentemente, não oferece risco a saúde humana.

Em virtude de seu largo emprego na medicina popular regional as raízes e caules de outras espécies, principalmente das *S. caavurana* e *S. rhytidoandrum*, também conhecidas como jurubeba, são confundidas e utilizadas como *S. paniculatum* mostrando a necessidade de existir um controle de qualidade e identificação botânica para seu uso seguro (AGRA, 1999b). Porém, estudos referentes ao controle de qualidade de *S. paniculatum* não são encontrados na literatura.

Figura 5 – Fitoterápico Ierobina®.



Fontes: <http://www.drogariaprimus.com.br/ierobina-10ml-p211103>
<http://www.labelsaude.com.br/produtos/saude/liquidos/ierobina>

1.5 Planejamento Fatorial de Experimentos

O planejamento fatorial representa um conjunto de ensaios estabelecidos com critérios científicos e estatísticos, com o objetivo de determinar a influência de duas ou mais variáveis (fatores) nos resultados de um dado sistema ou processo. É uma poderosa ferramenta estatística que possibilita a otimização de variáveis, pois permite a combinação de todos os fatores, simultaneamente, em todos os níveis. Desta forma, o número de ensaios experimentais para se chegar ao melhor resultado esperado será reduzido (CALADO, 2003; BUTTON, 2005; PERALTA-ZAMORA; MORAIS; NAGATA, 2005).

Em geral, a avaliação de variáveis experimentais é realizada de maneira univariada, ou seja, o efeito de cada uma é avaliado de maneira independente. A desvantagem dessa avaliação é o alto gasto de tempo para otimização e a negligência das interações que possam existir entre duas ou mais variáveis que podem afetar o processo em questão (CUNICO *et al*, 2008).

Quando se trabalha com planejamento fatorial, é possível prever a interação entre fatores, pois em cada tentativa completa, ou réplica do experimento, todas as combinações possíveis dos níveis dos fatores são investigadas (MONTGOMERY; RUNGER, 2007). A utilização dessa ferramenta permite alcançar o máximo de

eficiência, minimizando desperdícios e custos, pois é possível realizar experimentos mais inteligentes com fornecimento máximo de informações e esforço mínimo.

Existem vários métodos de planejamento de experimentos, com diferentes aplicações. Os principais processos são: Fatorial Total ou Completo; Fatorial Fracionado; Delineamento do Composto Central Rotacional (DCCR); Plackett e Burman.

Segundo Button (2001), o planejamento fatorial é indicado para a fase inicial do procedimento experimental, ou seja, quando há necessidade de se definir os fatores mais importantes e estudar os efeitos sobre a variável resposta escolhida.

Experimentos delineados em esquemas fatoriais são aqueles que envolvem combinações entre os níveis de dois ou mais fatores, visto que os esquemas fatoriais são considerados delineamentos de tratamentos. Se todas as combinações possíveis, em todos os níveis de cada fator, estão presentes, o esquema fatorial será completo. Em qualquer outro caso temos um esquema fatorial incompleto (RODRIGUES; LEMMA, 2014).

Da Silva (2013) e Rodrigues e Lemma (2014) relatam que um experimento fatorial com k fatores, onde cada um deles possui dois (2) níveis, é denominado de experimento fatorial 2^k . Esse processo experimental realiza testes com cada uma das combinações da matriz experimental e, logo após, determina e interpreta os efeitos e interações dos fatores investigados, ou seja, permite varredura completa da região de estudo. A desvantagem desse processo é que este método não determina variação intermediária, pois só trabalha em dois níveis, além de demandar um alto número de ensaios para problemas com grande número de variáveis. É aplicável em processos onde já se tem um prévio domínio e onde a realização dos testes não demanda alto tempo e custo.

Para a aplicação das técnicas de experimentos fatoriais fracionados usa-se 2^{k-p} combinações de testes, onde ao realizar-se metade do experimento, temos que p é igual a 1 ($\frac{1}{2} 2^k = 2^{-1} 2^k = 2^{k-1}$), ou um quarto do experimento onde p é igual a 2 ($\frac{1}{4} 2^k = 2^{-2} 2^k = 2^{k-2}$), e assim por diante (MONTGOMERY, 1991; RODRIGUES; LEMMA, 2014). Este processo permite uma pré-análise com um número reduzido de ensaios, sendo sua desvantagem não permitir varredura completa da região. É aplicado quando se deseja um pré-conhecimento, quando a literatura é limitada ou para ensaios que demandam maior tempo e custo (DA SILVA, 2013).

O DCCR é um delineamento simétrico e de segunda ordem, constituído de duas partes: o fatorial 2^k , com um ou mais pontos centrais, e a parte axial (MATEUS; BARBIN; CONAGIN, 2008). Além de realizar varredura completa, este processo é capaz de formar modelos preditivos, que o direciona para o ponto máximo de otimização. Sua aplicação é indicada para, preferencialmente, 3 variáveis. A desvantagem de seu uso é o grande número de experimentos quando o processo tem mais de 5 variáveis.

O método Plackett Burman permite estimar os efeitos principais e identificar as variáveis mais relevantes de um processo com um número reduzido de experimentos. A desvantagem desse método é que ele não permite a varredura completa da região e nem identifica interações. A aplicação sugerida é em processos onde o interesse é verificar apenas os efeitos principais (DA SILVA, 2013).

Rodrigues e Lemma (2014) relatam que os números de planejamentos experimentais fatoriais dependem principalmente do número de variáveis a serem estudadas inicialmente. A Tabela 2 relaciona os tipos de planejamentos experimentais possíveis em função do número de fatores envolvidos.

1.6 Desenvolvimento analítico e validação de métodos

Para o desenvolvimento tecnológico de produtos fitoterápicos deve-se realizar estudos prévios como: estudos botânicos, agrônômicos, químicos e pesquisas sobre suas atividades biológicas, diferenciando-se desta forma das plantas medicinais e das preparações utilizadas pela medicina popular. Quatro etapas são necessárias para a obtenção de um novo medicamento fitoterápico, são elas: botânica, farmacêutica, pré-clínica e clínica (TEIXEIRA, 2014).

Na etapa botânica é realizada a identificação do material em estudo, já na etapa farmacêutica tem-se o preparo e garantia da qualidade desse material. Na etapa pré-clínica são realizados ensaios farmacodinâmicos, farmacocinéticos e toxicológicos. Na etapa final, a clínica, a amostra é testada diretamente nos seres humanos (SIMOES et al., 2003). Neste tópico o foco será a etapa farmacêutica, responsável pela qualidade do produto, a qual preocupa-se com a uniformidade e eficiência do novo produto.

Tabela 2 – Melhores tipos de planejamentos experimentais em relação ao número de variáveis.

Número de Variáveis	Tipo de planejamento	Qualidade da Informação
2	DCCR	Boa
3	DCCR	Boa
4	DCCR	Boa
	Fracionado	Boa
	Plackett e Burman	Boa
5	DCCR	Boa
	Fracionado	Boa (2^{5-1}) Ruim (2^{5-2})
	Plackett e Burman	Boa
6	DCCR	Boa
	Fracionado	Boa (2^{6-1}) Ruim (2^{6-2})
	Plackett e Burman	Boa
7	DCCR	Boa
	Fracionado	Boa Ruim (2^{7-4})
	Plackett e Burman	Boa
8 e acima	Plackett e Burman	Boa

Fonte: Rodrigues e Lemme (2014) com adaptações.

Para uma exata determinação da identidade da matéria-prima vegetal, a identificação botânica vem utilizando o perfil cromatográfico, o qual relaciona características químicas e farmacológicas comuns dos componentes de uma

amostra vegetal evidenciando suas semelhanças e diferenças (GONG et al., 2003; SCHANEBERG et al., 2003). Deve se considerar dessas informações fatores relacionados com a separação cromatográfica, com a identificação do seu marcador químico, fazendo com que haja o controle de sua qualidade, garantindo a segurança e confiabilidade nos resultados (OBRADOVIC et al., 2007).

Com essa finalidade, metodologias desenvolvidas utilizando técnicas como a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) tem sido largamente utilizada tanto para o estudo fitoquímico, quanto no controle de qualidade de produtos de origem vegetal, uma vez que proporciona vantagens como a alta eficiência e rapidez (RIBANI et al., 2004).

Segundo a Resolução 899/2003, para a validação de metodologia analítica não descrita em farmacopeias ou formulários oficiais, devidamente reconhecidos pela a ANVISA, são necessários a avaliação nos parâmetros de especificidade, linearidade, intervalo, precisão, limite de detecção, limite de quantificação, exatidão e robustez.

A norma ISO/IEC 17025 (Requerimentos Gerais de Competência para Laboratórios de Ensaio e Calibração)- define validação de um método analítico como a “comprovação, através de evidências objetivas, de que o método cumpriu os requisitos para uma aplicação ou uso específico pretendido”. Para a ANVISA (2003), fala que “a validação das metodologias quantitativas é indispensável para garantir, por meio de estudos experimentais, que o método atenda às exigências das aplicações analíticas, assegurando a confiabilidade dos resultados”. Ainda segundo essa agência, para que estes sejam reconhecidos pelos órgãos regulamentadores, tais como: ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária), IBAMA (Instituto Brasileiro de Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis), INMETRO (Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial) e o MAPA (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento), essas validações devem ser baseadas nas normas específicas para cada caso.

Em sumo, o principal objetivo da validação de um método analítico é demonstrar que todo o método é adequado para quantificar um analito numa determinada matriz com certo nível de concentração, cujos resultados são confiáveis, pois possuirá precisão e exatidão adequadas. O processo de validação deve estar descrito num procedimento laboratorial e a determinação dos parâmetros de validação, onde será efetuada em equipamentos e instrumentos dentro das

especificações, funcionando corretamente e adequadamente calibrados (INMETRO, 2007; COMMITTEE FOR MEDICINAL PRODUCTS FOR HUMAN USE et al., 2011).

1.7 Atividade Toxicológica

A Toxicologia, observada sobre o âmbito da ciência moderna, é uma ciência multidisciplinar que estuda tanto os efeitos adversos ocasionados por agentes químicos no homem e no meio ambiente, como estuda também as propriedades físico-químicas de cada substância, avaliando a segurança de seu uso (ADEBAL, 2001).

Erroneamente, a sociedade acredita que todo produto natural é seguro e desprovido de efeitos adversos, entretanto, não podemos esquecer que os mesmos possuem moléculas ativas que podem apresentar eficácia terapêutica, mas também inúmeros efeitos adversos que podem até causar um problema sério de saúde pública (FERREIRA, 2010).

Como exemplos de efeitos tóxicos de substâncias presentes em plantas, podem ser citados os efeitos hepatotóxicos do apiol, safrol, lignanas e alcalóides pirrolizidínicos; a ação tóxica renal que pode ser causada por espécies vegetais que contém terpenos e saponinas; alguns tipos de dermatites causadas por espécies ricas em lactonas sesquiterpênicas e produtos naturais do tipo furanocumarinas (CAVALCANTE, et al., 2006). Dois exemplos muito conhecidos dos efeitos tóxicos de produtos naturais o uso de confrei (*Symphytum officinale* L. - Boraginaceae) e de cápsulas de têucríio (*Teucrium chamaedrys* L. – Labiateae).

O confrei era utilizado na medicina tradicional como cicatrizante devido à presença de alantoína, porém a planta também possui alcaloides pirrolizidínicos, os quais são comprovadamente hepatotóxicos e carcinogênicos (BUCKEL, 1998). Após diversos casos de morte ocasionados por cirrose resultante de doença hepática veno-oclusiva, desencadeadas por estes alcaloides, o uso confrei foi proibido pela OMS. O têucríio causou uma epidemia de hepatite na França. A origem do efeito tóxico foi atribuída a diterpenos do tipo *neo-clerodano*, transformados pelo citocromo P450 em metabólitos hepatotóxicos, que apresentavam uma subunidade epóxido. Anteriormente, o uso do têucríio era considerado seguro até que a comercialização do vegetal em cápsulas, associado à camomila, começou a ser prescrito para dietas

de emagrecimento e desencadeou os casos de hepatite tóxica (VEIGA-JUNIOR; PINTO; MACIEL, 2005).

Diante do exposto, fica evidente a importância da avaliação do potencial toxicológico das plantas medicinais e de seus constituintes, pois só dessa forma a população terá acesso a uma terapia alternativa segura e de qualidade.

O estudo toxicológico pré-clínico de uma substância é uma etapa indispensável para o uso seguro, uma vez que tem como objetivo caracterizar os efeitos toxicológicos a partir da administração da substância (EATON; KLAASSEN, 1996). Além disso, esses estudos buscam, entre outras, informações sobre quais doses são capazes de causar efeitos tóxicos em animais de laboratório (BRITO, 1996). Toda substância pode comportar-se como um agente tóxico, dependendo da dose administrada ou absorvida, do tempo de frequência de exposição e das vias de administração (BARROS; DAVINO, 2008).

O ensaio de toxicidade frente *Artemia salina* Leach tem por objetivo selecionar e monitorar a pesquisa de extratos de plantas na procura de substâncias bioativas. É um teste rápido, de baixo custo e eficiente que, por não exigir técnicas assépticas e equipamentos específicos, favorece a sua utilização rotineira, podendo ser desenvolvido em qualquer laboratório (LUNA et al., 2005; NASCIMENTO et al., 2008). A letalidade desse organismo simples tem sido utilizada para um rápido monitoramento da resposta biológica (MEYER, et al., 1982), onde existe apenas um parâmetro envolvido: vida ou morte. Os resultados são facilmente tratados, utilizando-se a Concentração Letal Média (CL₅₀), ou seja, a concentração que dizima metade de uma população (DOLABELA, 1997), é possível determinar e avaliar a atividade biológica (toxidade) de certo composto ou extrato natural (LOPES et al., 2002).

A citotoxicidade fornece informações a respeito da ação potencial tóxica de moléculas estudadas de forma mais rápida e com menos custo que os estudos *in vivo*. Neste tipo de ensaio, pode ser avaliada a morte, a viabilidade, os aspectos morfológicos, a integridade da membrana celular, o crescimento e a proliferação das células (CASTAÑO; LECHÓN, 2005).

Outros testes empregados para avaliar efeitos colaterais e toxicológicos são os de toxicidade aguda que tem a finalidade de definir a toxicidade intrínseca do composto, identificar órgãos-alvos da substância ou amostras estudadas, e selecionar doses para estudo de longa duração (SÁ; ALMEIDA, 2006). A Resolução

90 (2004) determina que se avalie os efeitos tóxicos agudos de amostras vegetais, utilizando a mesma via de administração proposta para o uso do produto, em mamíferos machos e fêmeas de idade adulta. Devem ser avaliados sinais de toxicidade durante as primeiras 24 horas e também a variação de peso dos animais e o consumo de água e ração. Além destas recomendações, os animais sobreviventes devem ser eutanasiados e autopsiados para a realização de procedimentos que permitam estudos dos órgãos acometidos.

Pode-se fazer também o teste *in vivo* subcrônico, onde os animais serão expostos a pequenas doses diariamente durante 30 dias. O efeito crônico pode advir de dois mecanismos: a Somatória ou Acúmulo do Agente Tóxico no Organismo e a Somatória de Efeitos. Na Somatória ou Acúmulo do Agente Tóxico a velocidade de eliminação é menor que a de absorção, assim ao longo da exposição o produto vai sendo somado no organismo, até alcançar um nível tóxico. A Somatória de Efeitos ocorre quando o dano causado é irreversível e, portanto, vai sendo aumentado a cada exposição, até atingir um nível detectável; ou, então, quando o dano é reversível, mas o tempo entre cada exposição é insuficiente para que o organismo se recupere totalmente. Como nos testes agudos, deve-se analisar consumo de água e ração, monitoramento de peso e os sobreviventes devem ser eutanasiados e autopsiados (ALMEIDA; OLIVEIRA, 2006).

A realização da Triagem Comportamental permite avaliar se uma determinada droga modifica a atividade cerebral, através do registro de alguns sinais ou alterações de condutas apresentados pelos animais, ou seja, esse modelo permite avaliar se determinadas drogas apresentam toxicidade, possibilitando o estudo farmacológico de plantas e/ou fitoconstituintes com uma determinada margem de segurança (ALMEIDA; OLIVEIRA, 2006). Deve ser aplicado em ambos testes *in vivo*.

1.8 Atividade Anti-inflamatória

O processo inflamatório é um dos mecanismos mais antigos que existe no organismo animal para sua defesa quando há uma invasão de um antígeno, já tendo sido mencionado por Celsius (30 a.C. – 38 d.C.), o qual propôs os quatro sinais

clássicos da inflamação, que são :rubor, tumor, calor e dor. Um quinto sinal clássico da inflamação foi proposto por Virchow (1821-1902) que é a perda de função do órgão ou tecido inflamado (WEISSMAN, 1992; HEIDLAND et al., 2006).

Iwalewa et al., (2007) fala que inflamação é um termo geral para as mudanças que podem ocorrer nos tecidos vascularizados como resposta a danos teciduais, infecções ou reações imunológicas. Segundo Maldine et al. (2009), a inflamação é uma resposta biológica complexa de tecidos vasculares a estímulos nocivos, tais como patógenos, danos celulares ou irritantes (físicos ou químicos).

A resposta inflamatória é essencial para a sobrevivência de um organismo e esta capacidade dos seres vivos em responder defensivamente a estímulos lesivos ocorre de forma cada vez mais complexa, à medida que aumenta a especialização biológica (CUZZOCREA, 2005). A inflamação poderá ser aguda ou crônica dependendo do tempo de permanência do processo inflamatório no organismo.

O processo inflamatório agudo consiste de uma liberação sequencial de mediadores e do recrutamento de leucócitos circulantes, os quais se tornam ativos no local da lesão e liberam mais mediadores pró-inflamatórios. O principal objetivo da reação inflamatória é possibilitar ao tecido lesionado o acesso de células, proteínas e outros elementos originários do sangue para que haja reparação do tecido lesionado. A inflamação aguda pode ser dividida em três fases, cada qual mediada por diferentes mecanismos. A primeira é a fase inicial que é caracterizada principalmente por vasodilatação local e aumento da permeabilidade vascular. A segunda é uma fase tardia, com a infiltração de leucócitos e células fagocitárias. A terceira é a fase proliferativa, na qual ocorre degeneração tecidual e fibrose (MCDONALD; THURSTON; BALUK, 1999; COLLINS, 1999; MURI, SPOSITO, METSAVAHT, 2009).

Se o estímulo agressor persistir, ocasionando destruição contínua dos tecidos, ou ainda ocorrer falha na resolução da defesa do organismo, o processo inflamatório pode progredir para um processo inflamatório crônico (COSSEUNS; WERB, 2002; BILATE, 2007; DE MARZO et al., 2007; RODRIGUEZ-VITA; LAWRENCE, 2010). A inflamação crônica apresenta duração muito mais extensa do que a inflamação aguda e esta associada à presença de linfócitos e macrófagos, necrose tecidual e proliferação de fibroblastos e formação de granulomas (FERREIRA; LORENZETTI; POOLE, 1993; GEPDIREMEN et al., 2004).

O sistema imune é responsável pelos processos de reparo tecidual como também pela defesa do organismo. Os leucócitos atuam em momentos distintos da resposta imune, que podem ser classificadas em imunidade inata e imunidade adaptativa (CRUVINEL et al., 2010).

Na imunidade inata há uma resposta rápida e estereotipada a um número grande, mas limitado, de estímulos, sendo representada por barreiras físicas, químicas e biológicas, células especializadas e moléculas solúveis, presentes em todos os indivíduos, independentemente de contato prévio com imunógenos ou agentes agressores, e não se altera qualitativa ou quantitativamente após o contato. As principais células efetoras da imunidade inata são: macrófagos, neutrófilos, células dendríticas e células *Natural Killer* – NK. Os principais mecanismos são: fagocitose, liberação de mediadores inflamatórios, ativação de proteínas do sistema complemento, síntese de proteínas de fase aguda, citocinas e quimiocinas (CRUVINEL et al., 2010).

Na imunidade inata, os macrófagos atuam secretando diversos mediadores, tais como óxido nítrico (NO), citocinas (IL-1, IL-6, IL-12, TNF- α), quimiocinas (IL-8) entre outros, que podem ser induzidos tanto pelo estímulo lesivo, agente infectante ou pela ação de outras citocinas, principalmente interferon gama (IFN- γ) que são liberadas por linfócitos (WALKER et al., 1999; KONSMAN et al., 2002; MARTÍN-FONTECHA et al., 2004; MESQUITA JUNIOR, 2010).

No caso da imunidade adquirida, além das células efetoras, há atuação dos linfócitos (linfócitos T e linfócitos B) (KIRVESKARI et al., 2003). Estas células são produzidas no timo ou na medula óssea, sofrem amadurecimento nos órgãos linfóides periféricos (baço, linfonodos e amígdalas) (WALKER et al., 1999; MARTÍN-FONTECHA et al., 2004). Os linfócitos T efetores (maduros), quando chegam ao local da injúria liberam diversas citocinas (IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, TNF- α) e quimiocinas, que são responsáveis pela ativação de células B, quimiotaxia de leucócitos, ativação dos macrófagos, deposição de fibrina e dor (WATKINS et al., 1995; LI et al., 2014).

As citocinas são importantes mediadores de processo inflamatório e são produzidas principalmente por macrófagos e linfócitos ativados. Elas modulam a função de muitos tipos celulares e são determinantes para a infiltração celular e para os efeitos sistêmicos durante o processo inflamatório agudo.

Existem interleucinas anti-inflamatórias e pró-inflamatórias. O processo inicial das reações que caracterizam a fase aguda do processo inflamatório é mediado pela

liberação de citocinas pró-inflamatórias no tecido lesado (SIQUEIRA-JUNIOR; DANTAS, 2000). A secreção das citocinas é estimulada por endotoxinas, complexos imunes, toxinas, lesões físicas e uma variedade de processo inflamatórios (BILATE, 2007). Varias citocinas diferentes desempenham papéis importantes no estabelecimento e no desenvolvimento do processo inflamatório, as quais atuam como substâncias pró-inflamatórias que induzem a síntese e a liberação de mediadores inflamatórios típicos, como as prostaglandinas, os leucotrienos e o óxido nítrico. Enquanto outras citocinas como IL-4, IL-10 e IL-13 atuam como agentes anti-inflamatórios, diminuem as funções celulares e a síntese de citocinas pró-inflamatórias, reduzindo a dor e a quimiotaxia de leucócitos (FRANKE et al., 2002; VALE et al., 2003, JÚNIOR et al., 2015).

1.9 Atividade Antidiarreica

A diarreia é definida como um aumento no número de evacuações (3 ou mais/24 h), um aumento na fluidez das fezes e/ou a presença de sangue e muco nas mesmas (Mathan, 1998; SCHUTZE; WILLOUGHBY, 2013). O principal determinante do volume e consistência as fezes é o conteúdo líquido, o que reflete um equilíbrio entre a entrada luminal e a saída ao longo do trato gastrointestinal. A viscosidade do bolo fecal depende basicamente da absorção de água e da intensidade da propulsão intestinal. No processo diarreico observa-se uma redução da absorção ou uma hipersecreção de água juntamente com um aumento da motilidade intestinal, que reduz a solidez das fezes (FIELD; SEMRAD, 1993). Muitos fatores podem ser responsáveis pelo aparecimento da diarreia, incluindo agentes infecciosos, toxinas, ansiedade, medicamentos, e etc.

As substâncias antidiarreicas reduzem os sinais da diarreia, fazendo com que a consistência das fezes, a frequência da defecação e a massa fecal normalizem. Sua ação é produzida através de efeitos sobre o trânsito intestinal (motilidade) e a secreção de água e eletrólitos pela mucosa intestinal (BRUNTON et al., 2011).

Os fármacos antidiarreicos geralmente utilizados são a loperamida e o difenoxilato, cujos mecanismos de ação envolvem o sistema opioide (WANG et al., 2005; MARCOS; DUPONT, 2007). Em caso de doenças diarreicas agudas causadas por microrganismos patogênicos, todos esses medicamentos devem ser evitados,

visto que retardam a eliminação dos mesmos e aumentam o risco de infecções sistêmicas (BRUNTON et al., 2011).

Os modelos experimentais de trânsito intestinal normal e esvaziamento gástrico são amplamente utilizados na triagem de drogas com potencial atividade antimotilidade, que normalmente utilizam-se de marcadores, substâncias com coloração, para que possa ser mensurado o trânsito intestinal e o esvaziamento gástrico (STICKNEY; NORTHUP, 1959; SCARPIGNATO, 1980).

Outro modelo que vem sendo utilizado em animais de laboratório para avaliação da atividade antidiarreica é a indução de diarreia por óleo de rícino. O potencial diarreico do óleo de rícino deve-se ao ácido ricinoleico, um metabólito ativo da mamona (*Ricinus communis* L.) que difere do ácido oleico por ter uma hidroxila no décimo segundo carbono (WATSON; GORDON, 1962; ZAVALA et al., 1998). No lúmen intestinal, este óleo fica sob efeito de lipases intestinais, que convertem os triglicerídeos em glicerol e ácido ricinoleico. Este ácido promove a irritação e inflamação da mucosa intestinal, fazendo que ocorra a síntese e liberação de autacoides, NO e prostaglandinas. Acredita-se que o "enteropooling", termo que representa o aumento na secreção intestinal de fluido intestinal e como cúmulo de água e eletrólitos, como consequências, tem-se a estimulação da motilidade intestinal e aumento da secreção de fluidos e eletrólitos pela modulação de aquaporinas e canais iônicos (PIERCE et al., 1971; MASCOLO et al., 1994; CAPASSO et al., 1998; RATNAIKE et al., 2000).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Realizar a caracterização química, toxicológica e a investigação de atividades farmacológicas do extrato das raízes de *Solanum paniculatum* L. (ERSP).

2.2 Objetivos específicos

- Analisar o solo onde a planta foi coletada;
- Realizar a análise bromatológica das raízes de *S. paniculatum*;
- Determinar os minerais presentes nas raízes de *S. paniculatum*;
- Obtenção do extrato das raízes de *S. paniculatum* por Soxhlet (ERSP);
- Realizar extração em fase sólida do ERSP;
- Desenvolver método por HPLC para análise do ERSP;
- Validar a metodologia desenvolvida segundo a Resolução 899/2003 do Ministério da Saúde;
- Obter o perfil Térmico do ERSP por Termogravimetria e Análise Térmica Diferencial ;
- Determinar a perda de massa do ERSP utilizando a derivada da Termogravimetria;
- Analisar o ERSP frente à Estabilidade a Termo-oxidação por Rancimat;
- Planejar e otimizar a Extração de Compostos Fenólicos por Maceração, Micro-ondas e Ultrassom;
- Avaliar a atividade antimicrobiana, determinar a CMI e CMM do ERSP pelo método de difusão em disco e microdiluição;
- Determinar a CL₅₀ do ERSP frente ao bioensaio com *Artemia salina*;

- Avaliar a atividade hemolítica do ERSP e a citotoxicidade frente a linhagens de células cancerígenas;
- Avaliar a toxicidade do ERSP frente aos ensaios toxicológicos pré-clínicos agudo e subcrônico e avaliar os parâmetros bioquímicos, hematológicos, anatomopatológicos e histopatológicos em ratos de ambos os sexos;
- Investigar a atividade antidiarreica do ERSP;
- Investigar a atividade do ERSP frente ao acúmulo de fluido intestinal induzido por óleo de rícino;
- Avaliar o ERSP frente à motilidade intestinal;
- Investigar a Atividade Antiinflamatória do ERSP em diferentes modelos animais de inflamação aguda.

3 METODOLOGIA

3.1 Coleta e Preparo das Raízes

As raízes da *Solanum paniculatum* L. foram coletadas na mata de Aldeia, Km 5, Camaragibe-PE, no período de janeiro de 2012. A identificação botânica foi realizada pelo Instituto Agronômico de Pernambuco – IPA e uma exsicata foi depositada no Herbário Dárdano de Andrade Lima com o número 88503.

As raízes foram secas em estufa de ar circulante por um período de 72 horas na temperatura de 40°C. Em seguida foram trituradas em moinho de facas e tamisadas (tamis mesh 10).

3.2 Análise de Fertilidade do Solo

Juntamente com a coleta das raízes da *Solanum paniculatum* L. foi retirada uma amostra do solo onde as espécies se encontravam para análise da fertilidade do solo, sendo avaliados os parâmetros abaixo segundo as metodologias descritas em EMBRAPA (1998):

3.2.1 pH em água

Determinado potenciométricamente em suspensão solo-água (1:2,5) após 1 hora de contato, com agitação da suspensão antes da leitura.

3.2.2 Cálcio e Magnésio Trocáveis

Utilizou-se o extrator KCl (1 mol/L) na proporção 1:10 (solução:extrator), para obtenção do sobrenadante do qual se extrai uma alíquota para a determinação, sendo obtidos por complexometria com EDTA (0,0125 mol/L).

3.2.3 Alumínio Trocável

Foi extraído com o extrator KCl 1 (mol/L) na proporção 1:10 e determinado pela titulação da acidez com NaOH (0,025 mol/L).

3.2.4 Potássio e Sódio Trocáveis

Extraídos com solução duplo-ácida (Carolina do Norte) de HCl (0,05 mol/L) + H₂SO₄ (0,0125 mol/L) e determinados por fotometria de chama (potássio) e colorimétrica (fósforo).

3.2.5 Acidez Extraível ou Valor H

Foram extraídos com acetato de cálcio 1 mol/L a pH 7,0 na proporção 1:15 e titulados com NaOH (0,025 mol/L).

3.2.6 Soma de Bases (SB)

O valor S, que é a soma de bases trocáveis, é calculado em cmol/Kg, de acordo com a seguinte expressão:

$$S = Ca^{+2} + Mg^{+2} + K^{+} + Na^{+}$$

3.2.7 Capacidade de Troca Catiônica CTC (pH 7,0)

A capacidade de troca de cátions (CTC) corresponde à soma das bases trocáveis mais a acidez potencial, é calculada em cmol/Kg, de acordo com a seguinte expressão:

$$CTC = SB + H^{+} + Al^{+3}$$

3.2.8 Saturação por Bases (Valor V)

O índice de saturação por bases é calculado em percentagem, de acordo com a seguinte expressão:

$$V = \frac{SB}{CTC} \times 100$$

3.2.9 Saturação por Alumínio (Valor m)

O valor m, ou índice de saturação por alumínio trocável ou % de Al^{+3} , é calculado em percentagem, de acordo com a seguinte expressão:

$$m = \frac{100 \times Al^{+3}}{SB + Al^{+3}}$$

3.2.10 Saturação por Sódio

O índice de saturação por sódio é calculado em percentagem, de acordo com a expressão:

$$SNa = \frac{100 \times Na}{CTC}$$

3.3 Análise de Minerais

A determinação dos minerais cádmio, cobre, ferro, potássio, manganês, sódio, zinco, magnésio e cálcio na amostra das raízes foi realizada utilizando espectrofotômetro de absorção atômica modelo Varian AA240FS (Tabela 3). As amostras foram submetidas à digestão empregando HNO_3 e H_2O_2 utilizando aquecimento assistido por radiação micro-ondas e os parâmetros operacionais estão

descritos na Tabela 3. Os valores foram quantificados a partir de uma curva padrão para cada elemento.

Tabela 3 - Parâmetros operacionais do espectrômetro de absorção atômica em chama.

Elemento	Comprimento de Onda (nm)	Gás
Cádmio	228,8	Acetileno, Ar Comprimido
Cobre	324,7	Acetileno, Ar Comprimido
Ferro	348,3	Acetileno, Ar Comprimido
Potássio	769,9	Acetileno, Ar Comprimido
Manganês	279,5	Acetileno, Ar Comprimido
Sódio	589,6	Acetileno, Ar Comprimido
Zinco	213,9	Acetileno, Ar Comprimido
Magnésio	285,2	Acetileno, Ar Comprimido
Cálcio	422,7	Acetileno, Óxido Nitroso

3.4 Análises Bromatológicas

3.4.1 Umidade e Matéria Seca (MS)

A determinação da MS foi feita em laboratório utilizando 1,0 g de amostra moída, a qual foi seca em estufa de circulação forçada de ar à temperatura de 100°C-105 °C por 12 horas, seguida de pesagem.

3.4.2 Cinzas

Foi pesado 5 g da amostra e aquecida em mufla a 550°C, posteriormente foi resfriada até temperatura ambiente. As cinzas devem ficar brancas ou ligeiramente acinzentadas. Em caso contrário, após esfriar, é adicionado 0,5 mL de água e novamente incinerado. As operações de aquecimento e resfriamento são repetidas até peso constante.

3.4.3 Proteína Bruta (PB)

Foi determinada indiretamente a partir do valor de nitrogênio total (N) pelo método Kjeldahl. Após determinar o N, o teor de PB é estimado multiplicando-se pelo fator de conversão de 6,25, considerando-se que a proporção de N nas proteínas das plantas é igual a 16%.

3.4.4 Fibra Total (FT)

Foi pesado 2g da amostra, após obtenção do extrato etéreo e seca em estufa. Foram adicionados 100 mL de solução ácida (500 mL de ácido acético glacial, 450 mL de água, 50 mL de ácido nítrico e 20 g de ácido tricloracético) e 0,5 g de agente de filtração. Em seguida foi colocado em refluxo por 40 minutos, filtrado em cadinho de Gooch, lavado com água quente, posteriormente lavado com 20 mL de álcool e

20 mL de éter. Após, foi realizada secagem em estufa a 105°C, por 2 horas, e resfriado em dessecador até a temperatura ambiente. As operações de aquecimento e resfriamento foram repetidas até peso constante. Posteriormente, a amostra foi incinerada em mufla a 550°C e novamente resfriada em dessecador até a temperatura constante. O teor de fibras foi calculada pela expressão:

$$FT = \text{Fibra (g)} / \text{Amostra (g)} \times 100$$

3.4.5 Carboidratos

O teor de carboidratos foi obtido subtraindo-se de 100 a soma de PB, FT, EE e MM (expressos em porcentagem de MS), então:

$$\text{Carboidratos} = 100 - (\text{PB} + \text{FT} + \text{EE} + \text{Cinzas})$$

3.4.6 Extrato Etéreo ou Lipídios

O teor de lipídios foi realizado por extração direta em Soxhlet onde 2 g da amostra foi extraída com éter por 8 horas.

3.4.7 Valor Energético

O cálculo do valor energético foi obtido levando-se em consideração que carboidratos fornecem 4 kcal/g - 17 kJ/g, proteínas fornecem 4 kcal/g - 17 kJ/g e Gorduras fornecem 9 kcal/g - 37 kJ/g, utilizado os seguintes fatores de conversão obtemos a fórmula (Brasil, 2005):

$$\text{Energia} = (\text{Carboidratos} \times 4) + (\text{Proteínas} \times 4) + (\text{Lipídios} \times 9)$$

O valor energético foi expresso em Kcal por grama de raízes.

3.5 Obtenção do Extrato

Foi retirada uma alíquota de 46 g do pó obtido (raízes pulverizadas e tamisadas) para realização de extração em Soxhlet com 200 mL de diclorometano durante 2h, seguido de extração com 300 mL de etanol por um período de 4 horas. Após secagem em evaporador rotativo, foi obtido 4,35 g do extrato das raízes de *Solanum paniculatum* L. (ERSP).

3.6 Extração em Fase sólida

Foi solubilizado 15 mg do ERSP em 0,5 mL de água acidificada (pH 2) e 0,5 mL de Acetonitrila, em seguida foi realizada uma extração assistida por ultrassom durante 20 min. Posteriormente a solução foi submetida a uma extração em fase sólida utilizando um cartucho Supelco® – (C₁₈), sendo obtido uma fração de 6 mg a qual foi solubilizada em 2 mL de acetonitrila e analisada por HPLC-DAD (C-18).

3.7 Análise por HPLC-DAD

A análise foi realizada no cromatógrafo líquido de alta eficiência (CLAE-DAD), modelo LC-6AD, composto de quatro bombas de solvente e equipado com um detector de arranjo de diodos SPD-M20A (Shimadzu, Corp., Kyoto, Japan). As corridas foram realizadas nas condições do quadro 1.

Quadro 1 - Condições da análise cromatográfica.

Coluna	Phenomenex® RP-18 (250 × 4.7 mm, 5 µm)	
Temperatura forno	40°C	
Fluxo	1 mL/min	
Volume de Injeção	10 µL	
Solvente A	Solução ácido fosfórico pH 2.2	
Solvente B	Acetonitrila	
Gradiente	Tempo	% de B
	0.1	20
	15	30
	20	40

3.8 Validação da Metodologia

Para realização da validação foi seguido o "guia de validação de métodos analíticos e bioanalíticos" descrito na Resolução 899/2003 do Ministério da Saúde.

3.9 Análise Termogravimétrica e Análise Térmica Diferencial do ERSP

As curvas termogravimétricas, no modo não isotérmicas, foram obtidas em um analisador térmico da Shimadzu, Simultaneous DTA-TG, modelo DTG-60 H, em atmosfera de N₂, vazão de gás de 50 mL.min⁻¹ e razão de aquecimento de 10 °C min⁻¹ até 800°C com 10 mg de amostra em cadinho de alumina. Foi obtido, simultaneamente, a curva de análise térmica diferencial (DTA).

3.10 Análise da Estabilidade a Termo-oxidação por Rancimat

Os ensaios de estabilidade oxidativa foram realizados em duplicatas no equipamento 873 Biodiesel Rancimat, da marca Metrohm, utilizando o método EN 14112. De acordo com este método três gramas de amostra foram mantidas em um vaso de reação sob fluxo constante de ar de 10 L h⁻¹ a uma temperatura de 110 °C.

3.11 Planejamento e Otimização da Extração de Compostos Fenólicos por Maceração e Microondas

Para avaliar os efeitos das variáveis, Temperatura, Tempo e pH, sobre o processo de extração de compostos fenólicos por maceração e microondas, foi utilizado um planejamento experimental utilizando a técnica de delineamento do composto central rotacional (DCCR). Assim, foi realizado um fatorial completo 2³, incluindo 6 pontos axiais e 3 repetições no ponto central, totalizando 17 ensaios, tendo-se como resposta o conteúdo de fenólicos totais.

A matriz de planejamento experimental codificada está representada no Quadro 2 e os valores utilizados estão expressos na tabela 4 para a maceração e tabela 5 para microondas.

Quadro 2 - Matriz de planejamento fatorial total 2^3 , com 6 pontos axiais e 3 pontos centrais com valores codificados para extração por maceração e microondas.

Ensaio	Temperatura	Tempo	pH
1	-1	-1	-1
2	1	-1	-1
3	-1	1	-1
4	1	1	-1
5	-1	-1	1
6	1	-1	1
7	-1	1	1
8	1	1	1
9	-1,68	0	0
10	1,68	0	0
11	0	-1,68	0
12	0	1,68	0
13	0	0	-1,68
14	0	0	1,68
15	0	0	0
16	0	0	0
17	0	0	0

Tabela 4 - Valores utilizados no DCCR para três fatores utilizando a técnica de maceração.

Variáveis	Código	-1,68	-1	0	1	1,68
Temperatura (°C)	X ₁	30	34	40	46	50
Tempo (horas)	X ₂	12	14,4	18	21,6	24
pH	X ₃	2	2,6	3,5	4,4	5

Tabela 5 - Valores utilizados no DCCR para três fatores utilizando a técnica de microondas.

Variáveis	Código	-1,68	-1	0	1	1,68
Temperatura (°C)	X ₁	30	38	50	62	70
Tempo (min)	X ₂	1	1,8	3	4,2	5
pH	X ₃	1,5	1,8	2,25	2,7	3

3.12 Planejamento e Otimização da Extração de Compostos Fenólicos por Ultrassom

Para otimização da extração dos compostos fenólicos pela técnica de ultrassom foram avaliadas as variáveis, tempo e pH, com temperatura constante em 40°C através do delineamento do composto central rotacional. Para isso, foi utilizado um fatorial completo 2², incluindo 4 pontos axiais e 4 repetições no ponto central, totalizando 12 ensaios, tendo-se como resposta o teor de fenólicos totais. A matriz de planejamento experimental codificada está representada no Quadro 3 e os valores utilizados estão expressos na tabela 6.

Quadro 3 - Matriz de planejamento fatorial total 2^2 , com 4 pontos axiais e 4 pontos centrais, para extração por ultrassom.

Ensaio	Temperatura	pH
1	-1	-1
2	1	-1
3	-1	1
4	1	1
5	-1,41	0
6	1,41	0
7	0	-1,41
8	0	1,41
9	0	0
10	0	0
11	0	0
12	0	0

Tabela 6 - Valores utilizados no DCCR para três fatores utilizando a técnica de ultrassom.

Variáveis	Código	-1,41	-1	0	1	1,41
Tempo (min)	X_1	10	13	20	27	30
pH	X_2	2	2,5	3,5	4,5	5

3.13 Investigação da Atividade Antimicrobiana

3.13.1 Microorganismos

As linhagens de bactérias e fungos leveduriformes utilizados foram obtidas a partir da Coleção de Microorganismos do Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco (UFPEDA). Para estes ensaio foram utilizadas quatro bactérias gram-positivas: *Staphylococcus aureus* (UFPEDA 01), *Micrococcus luteus* (UFPEDA 100), *Bacillus subtilis* (UFPEDA 86) e *Enterococcus faecalis* (UFPEDA 138); três bactérias gram-negativas: *Escherichia coli* (UFPEDA 224), *Serratia marcescens* (UFPEDA 352) e *Pseudomonas aeruginosa* (UFPEDA 416); uma álcool-ácido-resistente: *Mycobacterium smegmatis* (UFPEDA 71) e a levedura *Candida albicans* (UFPEDA 1007).

3.13.2 Método de difusão em disco

A atividade antimicrobiana dos extratos foi avaliado pela metodologia de difusão em ágar, utilizando-se discos de papel de filtro com diâmetro de 6 mm, conforme *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2012) para se conhecer o perfil de atividade do extrato. Para este ensaio foi utilizado alíquotas de 10 µL do extrato na concentração de 1 mg/mL para impregnar os discos de papel. O extrato foi solubilizado em etanol e então esterilizado por filtração em membrana de 0,22 µm.

Uma suspensão do microrganismo-teste ($1,5 \times 10^8$ UFC/mL para bactérias e $1,5 \times 10^5$ UFC/mL para leveduras) foi determinada através de comparação visual com um padrão na concentração de 0,5 na escala de Mc Farland e espalhada (0,1 mL) sobre a superfície do meio em placa de Petri. Posteriormente foram adicionados sobre as placas inoculadas os discos impregnados com os extratos. As placas foram incubadas a 37 °C por 24 h (bactérias) e a 28 °C por 48 h (leveduras). Após este período foi mensurado o halo de inibição em mm com o auxílio de um paquímetro.

3.13.3 Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Microbicida Mínima (CMM)

Após conhecer o perfil de inibição dos extratos, foi realizado o ensaio de susceptibilidade pela metodologia da microdiluição para determinação da Concentração Mínima Inibitória (CIM) e Concentração Mínima Microbicida segundo o NCCLS (2002; 2003).

Inicialmente adicionou-se em cada poço 90 µL do meio Caldo Muller Hinton (CMH) e posteriormente a partir da terceira coluna 90 µL do extrato na concentração de 1000 µg/mL esta alíquota foi homogeneizada e transferida para a coluna posterior até atingir a concentração 15,75 µg/mL. Por último foi adicionada uma alíquota de 10 µL da suspensão do microrganismo preparada conforme o método anterior. Logo, cada poço recebeu como volume final uma alíquota de 100 µL (90 µL de meio e extrato e 10 µL do microrganismo).

As placas com o meio, extrato e microrganismo foram incubadas por 24 horas (37 °C) para bactérias e 48 horas (28 °C) para leveduras. Posteriormente foram adicionados 20 µL de resazurina para bactérias e 20 µL d trifeniltetrazolio-TTC a 1% para fungos (indicadores colorimétricos de oxi-redução) para determinar a concentração inibitória mínima, uma vez que a resazurina na presença de crescimento bacteriano muda da coloração azul para róseo e o trifeniltetrazolio-TTC muda de incolor para rosa/vermelho na presença de fungos.

3.14 Estudo Toxicológico

3.14.1 Animais

Camundongos swiss albinos machos e fêmeas (30-35g) e ratos wistar machos e fêmeas (250- 300g) foram obtidos do Biotério do Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), que está registrado no Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) sob o nº 18. Os animais foram mantidos em caixas de polipropileno à temperatura de 22 ± 2 °C, com ciclo claro-escuro de 12 horas, recebendo ração balanceada e água à vontade. Os

animais foram submetidos a jejum antes de cada experimento. Os protocolos de experimentação foram aprovados pela Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEA) da UFPE (nº 23076.46150/2012-23 CCB – UFPE).

3.14.2 Bioensaio com *Artemia salina* Leach

A avaliação preliminar de uma possível atividade biológica do ERSP foi realizada utilizando-se o bioensaio com *Artemia salina*, segundo Meyer et al. (1982) e Nascimento; Araújo (1999). Os cistos de *A. salina* foram armazenados sob resfriamento a 4 °C até a execução do experimento. Foram utilizadas larvas de *Artemia salina* L., microcrustáceo da classe Anostraca, na forma de náuplio, utilizando-se a Concentração Letal Média (CL₅₀) como parâmetro de avaliação da atividade biológica. Em um recipiente retangular de vidro com uma divisória contendo furos de aproximadamente 0,02 cm de espessura e distribuídos uniformemente, foi adicionada água salina artificial preparada pela solubilização de 38 g de sal marinho (Marinex®) em 1 litro de água destilada. O recipiente permaneceu sob iluminação através de uma lâmpada incandescente. Cistos de *Artemia salina* foram incubados durante 24 horas (22 - 29 °C) em um dos lados do recipiente. A parte do sistema contendo os cistos foi coberta com papel alumínio, para que as larvas, após a eclosão dos cistos, fossem atraídas pela luz para o outro lado do sistema, forçando-as a atravessar a divisória, e assim sendo coletadas com auxílio de uma pipeta de *Pasteur*. O ERSP foi solubilizado em Tween (1 %) e água salina artificial (Marinex®), a fim de se obter a solução mãe de 10 mg/mL. A partir destas, foram efetuadas diluições para concentrações de intervalo 0 - 1800 µg/mL. A cada 5 mL dessas soluções foram adicionados 500 µL de água salina artificial contendo 10 náuplios. Cada concentração foi testada em triplicata. Um grupo controle foi preparado contendo apenas o solvente e as larvas. O conjunto permaneceu em incubação sob luz artificial por 24 h e então foi realizada a contagem do número de larvas vivas e mortas, para posterior determinação da CL₅₀.

3.14.3 Citotoxicidade em eritrócitos

Os ensaios para avaliação da atividade hemolítica foram realizados segundo Kang et al. (2009), com algumas modificações. Os eritrócitos foram obtidos de sangue fresco de camundongos Swiss coletado por punção cardíaca, a agulha foi heparinizada (heparina sódica) para prevenir coagulação. Os eritrócitos de humanos tipo O, A, B e AB foram obtidos de voluntários saudáveis.

Para obter a suspensão de eritrócitos, 1 mL de sangue total foi solubilizado em 10 mL de solução tampão fosfato (PBS) e então centrifugado a 3.000 rpm durante 5 minutos. O plasma sobrenadante foi descartado e esse processo repetido mais duas vezes. Os eritrócitos foram finalmente ressuspensos em PBS, obtendo-se então a suspensão de eritrócitos a 0,5 % (v/v) que foi utilizada para o ensaio de hemólise. O ERSP foi solubilizado em Tween 80 (1 %) e preparado em PBS, no dobro das concentrações desejadas. A cada 100 µL dessas soluções foi adicionado 100 µL da suspensão de eritrócitos, em triplicata. O controle positivo e negativo foram também utilizados, pela incubação de eritrócitos em uma solução de 0,1 % de Triton X-100 (Sigma- Aldrich®) em PBS (2 mL) e Tween 80 (1 %) em PBS (2 mL), respectivamente. A placa de 96 poços foi mantida sob agitação suave em um agitador por 60 minutos. Após esse período, a placa foi centrifugada por 5 minutos a 3.000 rpm e o sobrenadante cuidadosamente removido. Após remoção foi adicionado, a cada poço, 200 µL de solução do Triton X-100 (0,1%) e cuidadosamente agitada. A quantidade de hemólise causada pela solução do Triton X-100 (0,1%) foi determinada espectrofotometricamente a 415 nm. Determinou-se a % de hemólise para determinar a CH₅₀ (concentração que produz 50 % de hemólise), utilizando a seguinte fórmula:

$$\% \text{Hemólise} = \frac{(Ac - Ae)}{Ac} \times 100$$

Ac = Absorbância do triton X-100

Ae = Absorbância do poço contendo a amostra do ERSP

3.14.4 Avaliação da citotoxicidade *in vitro* em linhagem cancerígenas

As linhagens tumorais utilizadas, HT29 (carcinoma de cólon - humano) e HL60 (leucemia promielocítica humana), foram obtidas da seção de culturas celulares do Banco de células do Rio de Janeiro e mantidas de acordo com o protocolo estabelecido pelo Laboratório de Cultura de Células do Departamento de Antibióticos da UFPE. As células foram cultivadas em meio DMEM, suplementado com 10% de soro fetal bovino e 1 % de antibióticos, mantidas em estufa a 37°C e atmosfera contendo 5% de CO₂. A amostra do ERSP (10 µg/mL) foi diluída em DMSO (0,1%) puro estéril e testadas. A doxorrubicina foi usada como controle positivo.

A análise da citotoxicidade foi feita pelo método do MTT, que é uma análise colorimétrica baseada na conversão do brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5-difenil-2-H-tetrazólio (MTT) em azul de formazan, a partir de enzimas mitocondriais presentes somente nas células metabolicamente ativas e tem a capacidade de analisar a viabilidade e o estado metabólico da célula (BERRIDGE et al., 1996). A metodologia foi proposta por Mosmann (1983), e modificada por Alley et al. (1988). As células foram plaqueadas na concentração de 1×10^5 células/mL. As amostras foram diluídas em série no meio DMEM para obtenção das concentrações finais (25 µg/mL) e adicionadas em placa de 96 poços (100µL/poço). As placas foram incubadas por 72 horas em estufa a 5% de CO₂ a 37°C. Em seguida foram adicionados 25 µL da solução de MTT, e as placas foram incubadas por 3h. Após a dissolução do precipitado com DMSO, a absorbância foi lida em espectrofotômetro de UV-VIS em comprimento de onda de a 595 nm.

Para triagem das amostras, o percentual de inibição do crescimento celular (%IC), onde a doxorrubicina foi considerada como 100% de inibição, com um intervalo de confiança de 95% e determinado a partir de regressão não-linear no programa *GraphPad Prism versão beta*. Amostras foram classificadas como: sem atividade, com pouca atividade (inibição de crescimento celular variando de 1 a 50%), com atividade moderada (inibição de crescimento celular variando de 50 a 75%) e com alta atividade (inibição de crescimento variando de 75 a 100%).

3.14.5 Ensaio toxicológico pré-clínico agudo

Os ensaios de toxicidade aguda em camundongos foram realizados de acordo com o “Guia para a realização de estudos de toxicidade pré-clínica de fitoterápicos” (RE n. 90/2004 – ANVISA), com algumas modificações (ALMEIDA et al., 1999).

Ratus norvegicus, seis machos e seis fêmeas por grupo, incluindo o controle, foram submetidos a dose de 2000 mg/kg do ERSP., via oral (v.o.), e aos grupos controles foi administrado apenas o veículo (Tween 80, 1%). O número de animais mortos foram contabilizado para determinação da dose responsável pela morte de 50 % dos animais experimentais (DL_{50}), com limite de confiança de 95 %.

Com o objetivo de mapear possíveis alterações comportamentais, sugestivas de atividade sobre o Sistema Nervoso Central (SNC) ou Sistema Nervoso Autônomo (SNA), após administração do ERSP por via oral (v.o.), foi realizada uma observação cuidadosa para se detectar sinais tóxicos de caráter geral a cada 30 minutos até um período de 4 horas; e diariamente durante 14 dias, utilizando-se o protocolo experimental descrito por Almeida e colaboradores (1999). A qualificação dos efeitos comportamentais foi classificada em: sem efeito, efeito presente e efeito intenso (Quadro 4).

A cada período de 24 horas até 14 dias após administração da dose, foram monitoradas a variação de peso, o consumo de água e ração pelos animais experimentais. Ao fim do período de observação todos os animais foram anestesiados ,com os anestésicos a base de xilazina e ketamina, e realizada coleta de sangue por punção cardíaca para exames hematológicos e bioquímicos. Os animais foram eutanasiados e seus órgãos (coração, pulmão, estômago, rim, fígado e baço) foram retirados para observação de alterações macroscópicas e microscópicas.

3.14.6 Ensaio toxicológico pré-clínico subcrônico

No ensaio subcrônico (30 dias), ratos pré-selecionados foram distribuídos em 3 grupos de 14 animais cada, 7 machos e 7 fêmeas. Foi administrado diariamente a cada animal, durante um intervalo de 30 dias, os seguintes tratamentos: O grupo 1

recebeu apenas o veículo (Tween 80 1%); o grupo 2 recebeu a dose de 500 mg/kg do ERSP; O grupo 3 (satélite), recebeu a dose de 500 mg/Kg do ERSP e só foi sacrificado 30 dias após o término do experimento, para a verificação da reversão de um possível quadro de intoxicação.

Com o objetivo de mapear possíveis alterações comportamentais, sugestivas de atividade sobre o Sistema Nervoso Central (SNC) ou Sistema Nervoso Autônomo (SNA), após administração do ERSP por via oral (v.o.), foi realizada uma observação cuidadosa para se detectar sinais tóxicos de caráter geral a cada 30 minutos até um período de 4 horas; e diariamente durante 30 dias, utilizando-se o protocolo experimental descrito por Almeida et al. (1999). A qualificação dos efeitos comportamentais foi classificada em: sem efeito, efeito presente e efeito intenso (Quadro 4).

A cada período de 24 horas até 30 dias após administração da dose, foram monitoradas a variação de peso, o consumo de água e ração pelos animais experimentais. Ao fim do período de 30 dias de observação todos os animais foram anestesiados, exceção para o grupo satélite que foi submetido a este procedimento após 60 dias da primeira administração, com anestésicos a base de xilazina e ketamina, e realizada coleta de sangue por punção cardíaca para exames hematológicos e bioquímicos. Os animais foram eutanasiados e seus órgãos (coração, pulmão, estômago, rim, fígado e baço) foram retirados para análise anatomopatológicas e histopatológicas.

3.14.7 Análises Bioquímicas

Para realização das análises bioquímicas do soro, foram utilizados kits específicos da marca Labtest® para dosagem de TGO, TGP, FA, Bilirrubina, Uréia e Creatinina, utilizando analisador bioquímico semiautomático BIOPLUS-200.

Quadro 4 – Parâmetros comportamentais avaliados em ratos segundo Almeida et al., 1999.

PARÂMETROS COMPORTAMENTAIS	
1. Sistema Nervoso Central	Ataxia
1.1 Estimulantes	Catatonía
Agressividade	Cauda de Straub
Ambulação aumentada	Hipnose
Andar em círculo	Perda do reflexo auricular
Auto limpeza	Perda do reflexo corneal
Bocejo	Ptose palpebral
Contorções abdominais	Reflexo de endireitamento
Convulsões	Resposta ao toque diminuída
Escalar	Sedação
Estereotipia	2. Sistema Nervoso Periférico
Irritabilidade	Cianose
Levantar	Constipação
Movimentação intensa das vibrissas	Defecação
Pedalar	Diarreia
Sacudir a cabeça	Força para agarrar
Saltos	Lacrimejamento
Tremores	Micção
Vocalização	Piloereção
1.2 Depressores	Respiração
Abdução das patas do trem posterior	Salivação
Ambulação diminuída	Tônus musculares
Analgesia	3. MORTE
Anestesia	

3.14.8 Análises Hematológicas

As análises hematológicas foram realizadas com auxílio do contador hematológico ABX Micros 60. A contagem diferencial foi realizada em microscópio óptico, após esfregaço do tecido sanguíneo em lâmina, seguido de coloração pelo método de May-Grunwald-Giemsa.

3.14.9 Análise Anatomopatológica

Após a coleta do sangue dos animais, submetidos ao ensaio toxicológico agudo e dos animais submetidos ao ensaio toxicológico subcrônico, para análises bioquímicas e hematológicas, todos os animais foram eutanasiados, e os órgãos extirpados foram pesados, examinados macroscopicamente, para investigação de mudanças de coloração, hemorragias, presença de nódulos, alterações morfológicas ou outras alterações, e em seguida foram fixados em formalina tamponada durante 24 horas e posteriormente fixados em solução de etanol a 70%.

3.14.10 Análises Histopatológicas

Os órgãos dos animais após análise anatomopatológica foram seccionados para processamento histopatológico seguido de desidratação com séries crescentes de álcool (70 a 100 %), diafanização em xilol, impregnação e inclusão em parafina. Em micrótomo rotativo semiautomático, os fragmentos tissulares emblocados em parafina, foram seccionados em espessura de 5,0 μm e subsequentemente submetidos à coloração hematoxilina-eosina, em seguida foram examinados ao microscópio óptico (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2008).

3.15 Investigação da Atividade Antidiarreica

3.15.1 Diarreia induzida por óleo de rícino

Foi seguido o método descrito por Awouters, et al. (1978). Ratos albinos saudáveis, pesando entre 200-250g, foram selecionados e divididos em cinco grupos de cinco animais cada. Antes da realização do ensaio os animais foram submetidos a jejum por um período de 12 horas, com água *ad libitum*. O Grupo 1 recebeu o veículo (Tween 80 1%), enquanto que o Grupo 2 recebeu loperamida (5 mg / kg), droga de referência. Os animais do grupo 3, 4 e 5 receberam o ERSP (125, 250, 500 mg / kg), respectivamente. As substâncias foram administradas por via oral.

Os animais foram alojados individualmente em gaiolas forradas com papel de filtro, pesados previamente. Uma hora após a administração das substâncias, os animais foram tratados com 1 ml de óleo de rícino, por via oral e o tempo entre a administração de óleo e o primeiro evento fecal, foi observado. Em seguida, os animais foram observados durante 4 h quanto a presença de diarreia, a cada hora os papéis das gaiolas eram removidos e pesados, após o período de avaliação o peso total das fezes excretadas foi obtido.

3.15.2 Acúmulo de Fluido Intestinal Induzido por Óleo de Rícino

Neste método, como descrito por Robert et al (1976), os ratos foram privados de alimentação durante 12 h antes do experimento, com livre acesso à água. Os ratos foram divididos em seis grupos de cinco animais. O veículo (Solução de Tween 80 1%) foi administrado para o primeiro grupo. O segundo grupo recebeu Loperamida (5 mg/kg), enquanto que os grupos 3, 4 e 5 receberam diferentes doses do ERSP (125, 250 e 500 mg / kg), respectivamente. Trinta minutos após a administração, os ratos foram tratados com 1 ml de óleo de rícino. O grupo sham não receberam qualquer tratamento. Depois de 30 minutos, os animais foram eutanasiados seus intestinos delgado removidos desde o esfíncter pilórico até a junção ileocecal, o conteúdo intestinal foi coletado e pesado.

3.15.3 Avaliação do ERSP sobre a motilidade intestinal

Ratos albinos machos (200-250 g) foram divididos aleatoriamente em cinco grupos de cinco ratos cada. Os animais foram submetidos a jejum, com água *ad libitum*, durante 12 h antes do teste. O Grupo 1 (controle) foi tratado com o veículo (Solução de Tween 80 1%). No Grupo 2 os ratos receberam loperamida (5 mg/kg), enquanto que os grupos 3, 4 e 5 receberam diferentes doses do ERSP (125, 250 e 500 mg/kg), respectivamente. Trinta minutos após a administração da droga, 1 ml de carvão ativo (5%) foi administrado, via gavagem, a todos os animais. Após 30 minutos, todos os ratos foram eutanasiados, seus intestinos delgado foram removidos desde o esfíncter pilórico até a junção íleocecal e a distância total percorrida pelo carvão em relação ao comprimento do intestino delgado foi estimada e expressa em porcentagem.

3.16 Investigação da Atividade Anti-inflamatória

3.16.1 Edema de pata induzido por carragenina

O modelo de edema em pata de rato foi realizado de acordo com Winter et al. (1962). Cinco grupos de 6 ratos cada, foram tratados por via oral com o ERSP (125, 250 e 500 mg/kg), indometacina (fármaco padrão, 10 mg/kg) e Veículo (solução tween 80 1%). Após uma hora, os animais receberam uma injeção subcutânea de 0,1 mL de carragenina a 1% na região subplantar da pata direita posterior. O edema foi registrado imediatamente após a injeção de carragenina e nos tempos de 1, 2, 3, 4 e 5h. O volume do edema foi determinado em milímetros através de pletismômetro (Ugo Basile). Os resultados foram expressos como a diferença entre o volume final e o volume inicial.

3.16.2 Bolsão de ar subcutâneo

A atividade anti-inflamatória do ERSP foi avaliada pela formação de uma bolsa de ar na região dorsal de camundongos pela injeção subcutânea de 2,5 mL de ar estéril no dia 0, seguida pela segunda injeção de 2,5 mL de ar estéril três dias depois. No sexto dia, os animais receberam via oral o ERSP (125, 250 e 500 mg/kg), indometacina (10 mg/kg) ou veículo (Solução Tween 80, 1%). Uma hora após a administração oral, a inflamação foi induzida pela injeção de 1 mL de um solução de carragenina (1% em solução salina) dentro do bolsão de ar. Após 6 h, os animais foram eutanasiados em câmara de CO₂, as bolsas foram lavadas com 3 mL de solução salina contendo 3 µMol de EDTA. A contagem de leucócitos polimorfunucleares foi realizada em contador hematológico ABX Micros 60. O exsudato restante foi centrifugado e os sobrenadantes armazenados a -20°C para determinação das citocinas pró-inflamatórias (GUERRA, 2011).

3.16.3 Permeabilidade vascular induzida por ácido acético

Os efeitos dos extratos no aumento da permeabilidade vascular induzida por ácido acético foram determinados de acordo com o método descrito por Whittle (1964). As amostras em estudo foram administradas por via oral a um grupo de cinco camundongos machos (0,1mL/10 g de peso) nas doses de 125, 250 e 500 mg/Kg. Trinta minutos após, os animais receberam por via endovenosa 0,1 mL de uma solução Evans blue a 1% (Sigma, St. Louis, Missouri, USA). Uma horas após a administração oral, 0.5 mL de ácido acético a 1% (v/v) foi injetado por via intraperitoneal. Após 30 minutos, os camundongos foram sacrificados em câmara de CO₂ e o exsudado intraperitoneal foi coletado em 2 mL de salina. As absorções das amostras foram medidas a 630 nm em leitor de ELISA.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Informações climatológicas no período da coleta

É importante salientar as características climáticas que se encontram as plantas na hora da coleta, visto que tais fatores podem influenciar na produção de fitoconstituintes (GOOBO - NETO, 2007).

Em Agência Pernambucana de Águas e Clima - APAC (2012) foram relatadas as condições climáticas obtidas para o mês de janeiro de 2012 informando que a precipitação ocorrida durante o mês citado, no estado de Pernambuco, ficou 16,8% acima da média histórica do período. A precipitação média observada para todo o estado foi de 67,2 mm. Um dos maiores acumulados de chuva no mês foi observado no município de Camaragibe (301 mm), local da coleta. A temperatura máxima média foi de 30,23°C, umidade relativa média 74,53%, pressão média 1012,13 mbar (APAC, 2012; INMET, 2015).

Molmann et al. (2015) avaliou a influência da temperatura e exposição ao sol sobre a produção de algumas substâncias da *Broccoli florets*, foi evidenciado que os teores de glicosinolatos variaram com a temperatura e duração do dia, e os conteúdos de quercetina e camferol eram mais baixos do que em condições "semi-campo", já os teores de vitamina C não variaram.

4.2 Fertilidade do solo

Foi realizada a caracterização do solo na região onde as raízes coletadas se encontravam, Tabela 7. Podemos destacar que o solo é fortemente ácido apresentando um pH 4,6 e classificados segundo os valores de referência como, alto teor de Ca^{+2} , médio teor de Mg^{+2} , muito pobre em K^+ , valor V baixo, valor m considerado mediano, CTC média, SB baixa, baixa concentração de fósforo, baixo teor de saturação de sódio e de concentração íons sódio, sendo classificado como um solo pobre (EMBRAPA, 2002).

Tabela 7 - Análise da Fertilidade do Solo.

FATOR ANALISADO	RESULTADO
pH em água	4,6
Fósforo assimilável	5 mg/Kg
Cálcio	0,91 cmol/dm ³
Magnésio	0,61 cmol/dm ³
Potássio	0,04 cmol/dm ³
Sódio	0,06 cmol/dm ³
Soma de Bases (SB)	1,62 cmol/dm ³
Valor H	3,40 cmol/dm ³
Alumínio	0,45 cmol/dm ³
CTC	5,47 cmol/dm ³
Valor V	29,61 %
Valor m	21,74 %
Saturação por Sódio	1,10 %

Os principais componentes do solo são os minerais, partículas de areia, silte e argila, matéria orgânica, micro-organismos e gases como O₂, CO₂, N₂ (FOTH, 1990; TAN, 1998). A capacidade do solo em fornecer nutrientes às plantas depende de suas características físicas, químicas e biológicas e suas interações. A preocupação com a qualidade do solo tem crescido à medida que seu manejo racional tem elevado à capacidade produtiva e garantido a qualidade do produto devido à uniformização do plantio.

A quantidade de metabólitos primários e secundários encontrados nas espécies vegetais possui relação direta com as propriedades do solo, sendo de

fundamental importância sua caracterização para manutenção da qualidade da produção, evitando aleatoriedade na extração de moléculas bioativas de vegetais (DIOMANDE, 2015).

Em solos ácidos, devido a uma redução na taxa de conversão de amônio a nitrato, a incorporação de nitrogênio pode ser inibida, o que tem sido utilizado para explicar estudos que constataram altos níveis de produção de compostos fenólicos, associados a plantas crescendo nesse tipo de solo. Os efeitos de nutrientes nos níveis de derivados do ácido chiquímico, especialmente derivados dos ácidos cinâmicos, taninos hidrolisáveis e condensados, são bem documentados e deficiências em nitrogênio, fósforo, enxofre e potássio geralmente resultam em maiores concentrações destes metabólitos (GOOBO-NETO, 2007).

4.3 Análise de Minerais

Na investigação do teor de minerais presentes nas raízes de *Solanum paniculatum* foi observado em maior concentração o cálcio, representando 92,84% dos metais investigados (Tabela 8). O Ca é importante para a planta devido a sua capacidade de manter a integridade estrutural das membranas e das paredes celulares e por formar uma barreira física contra patógenos. Quando há deficiência, as membranas celulares começam a se desintegrar, a compartimentação celular é rompida e a ligação do Ca com a pectina da parede celular é afetada, provocando a desestruturação do vegetal (SOREANO et al., 2011; EMERENCIANO, 2013).

Foi realizada uma análise de correlação dos minerais encontrados nas raízes da *Solanum paniculatum*. O coeficiente de correlação de Pearson (r), indica a relação entre duas variáveis com valores 1 e -1, os sinais positivos e negativos indicam a direção e a dimensão que a variável informa sobre a força de correlação. Valores de r maiores que 0,70 (+ ou -) indicam correlação significativa, valores entre 0,30 e 0,70 (+ ou -) indicam correlação moderada e fraca correlação para a faixa entre 0,00 e 0,30 (Tabela 9).

Tabela 8 - Teor de Minerais das raízes da *Solanum paniculatum* L.

ELEMENTO	CONCENTRAÇÃO NA RAIZ (mg . 100 g ⁻¹)	PERCENTUAL
Cálcio	7452,00	92,84
Sódio	73,25	0,91
Zinco	46,60	0,58
Ferro	227,00	2,82
Potássio	227,24	2,83
Magnésio	0,0002	NS
Manganês	0,371	0,004
Cádmio	ND	-
Cobre	ND	-

Tabela 9 - Coeficientes de Correlação de Pearson observados nos minerais das raízes de *Solanum paniculatum* L.

	Ca	Na	Zn	Fe	K	Mg	Mn
Ca	1,00	-	-	-	-	-	-
Na	0,93	1,00	-	-	-	-	-
Zn	-0,59	-0,84	1,00	-	-	-	-
Fe	0,72	0,92	-0,98	1,00	-	-	-
K	1,00	0,93	-0,59	0,72	1,00	-	-
Mg	-0,79	-0,51	-0,04	-0,14	-0,79	1,00	-
Mn	0,08	0,43	-0,85	0,74	0,08	0,56	1,00

*Todos os resultados com $p < 0,05$

Desta forma, a correlação de Pearson entre os metais avaliados, revelou correlação positiva entre Ca, Na, Fe e K, entre Fe e Mn, o que indica que à medida que a planta absorve um mineral ela carrega outro, ou seja, ao absorver cálcio ela também absorve sódio, ferro e potássio e ao absorver Mn também carrega Fe.

Correlações negativas foram observadas entre Zn e Ca, Na, Fe, K, Mn, como também entre Mg e Na, K e Ca. Dessa forma, o cultivo de *Solanum paniculatum* deverá evitar solos ricos em zinco que em altas concentrações poderá interferir na absorção de Ca, Na, Fe, K e Mn pela espécie, gerando deficiência no desenvolvimento da planta. O mesmo efeito se explica para o Mg que dificulta a absorção de Na, K e Ca para a espécie em estudo.

Em estudo realizado por Emerenciano et al.(2013) através da análise de correlação de Pearson, observou que a medida que *A. indica* absorve (Fe, K, Cu, Zn e K) possibilita o efeito sinérgico de absorção dos outros minerais via absorção positiva. Para os metais K, Ca e Mg, observou-se correlações negativas, indicando que ao adicionar um fertilizante rico em potássio e estima-se que haja redução na absorção de Ca e Mg.

O ferro representou 2,82% dos minerais, o ferro é necessário para vários processos celulares, tais como a respiração, a biossíntese de clorofila, e transporte de elétrons na fotossíntese.

Realizamos uma análise de correlação de Pearson entre o cálcio presente no solo e o minerais absorvidos pelas raízes de *S. paniculatum* (tabela 10). Os resultados corroboram a hipótese, discutida anteriormente, da correlação entre os minerais das raízes, onde existe uma correlação negativa entre o Ca^{+2} e Mg^{+2} ($r = -0,65$) e Ca^{+2} e Zn^{+2} ($r = -0,73$), confirmando a presença de uma competição entre a absorção de cálcio e magnésio, com preferência pela absorção de cálcio pela planta. Além disso, foi confirmada a correlação positiva entre o Ca^{+2} do solo com a absorção de Na^+ , Fe^{+2} , K^+ , Ca^{+2} pela *S. paniculatum.*, onde ao absorver cálcio ocorre uma infiltração conjunta desses outros minerais.

Em estudo realizado por Aram et al. (2014) foi demonstrado que a adição de calcário no solo influenciou a altura e o diâmetro do caule da *Solanum paniculatum*, com incremento de 32,63% e 21,16%, respectivamente, em relação ao tratamento sem calcário. E atribui esses resultados ao aumento do pH do solo, liberando íons OH^- , CO_3^{-2} para interagir com os íons H^+ e Al^{+3} retidos nos colóides do solo, neutralizando-os, fornecendo os íons Ca^{+2} e Mg^{+2} , maior mineralização da

matéria orgânica e conseqüentemente aumento na disponibilidade de nutrientes para as plantas, favorecendo seu crescimento e desenvolvimento (ARAN et al., 2014).

Tabela 10 - Coeficiente de Correlação de Pearson entre o Cálcio do solo e os minerais das raízes.

MINERAIS DAS RAÍZES	Ca (SOLO)
Ca	0,98
Na	0,98
Zn	- 0,73
Fe	0,84
K	0,98
Mg	- 0,65
Mn	0,26

4.4 Análises Bromatológicas

Os resultados das análises bromatológicas das raízes de *S. paniculatum* estão expressos no Quadro 5. As raízes são compostas em sua maior parte de carboidratos e fibras, representando 84,74%.

Em estudo realizado por Kinupp et al. (2008) foi encontrado 12,07% de proteínas nos frutos de *S. paniculatum*, o que representa mais que o dobro do valor encontrado nas raízes (5,33%), em nossa análise.

Quadro 5 - Resultados das análises bromatológicas das raízes de *S. paniculatum*.

COMPOSIÇÃO CENTESIMAL		
	Quantidade por porção (100g)	Valores Diários (%)*
Valor Energético	213,2 Kcal	10,66
Carboidratos	47,46 g	15,82
Proteínas	5,33 g	7,11
Lipídios	0,23 g	0,42
Fibra Alimentar	37,28 g	149,12
Matéria seca	95,54 %	-
Umidade	4,46%	-
Cinzas	5,25 %	-

* Valores diários calculados com base em uma dieta de 2000 Kcal.

4.5 Desenvolvimento da Metodologia

No estudo fitoquímico das raízes da *Solanum paniculatum* L. realizado por Silva (2012), em nosso laboratório, foi isolado o ácido clorogênico. Com base neste resultado, partimos para o desenvolvimento de uma metodologia para doseamento do ácido clorogênico presente no ERSP.

Foi realizada uma extração em fase sólida do ERSP, utilizando um cartucho Supelco®-C₁₈, com intuito de remover possíveis impurezas e interferentes do ERSP. Em seguida foi realizada uma série de análises com o ERSP visando o desenvolvimento de uma metodologia que fornecesse um pico referente ao ácido clorogênico com uma boa resolução, simples e com um tempo de análise máximo de 30 minutos.

Podemos destacar durante o desenvolvimento os seguintes métodos descritos nos quadros 6 e 7, e seus respectivos cromatogramas, demonstrados nas figuras 6 e 7.

Quadro 6 - Metodologia A para HPLC.

Coluna	Phenomenex® RP-18 (250 × 4.7 mm, 5 µm)	
Temperatura forno	40°C	
Fluxo	1 mL/min	
Volume de Injeção	20 µL	
Solvente A	Ácido fórmico 5%	
Solvente B	Metanol	
Gradiente	Tempo	% de B
	0.1	20
	15	30
	20	30

Quadro 7 - Metodologia B para HPLC.

Coluna	Phenomenex® RP-18 (250 × 4.7 mm, 5 µm)	
Temperatura forno	40°C	
Fluxo	1 mL/min	
Volume de Injeção	10 µL	
Solvente A	Solução ácido fosfórico pH 2.2	
Solvente B	Acetonitrila	
Gradiente	Tempo	% de B
	0.1	20
	15	30
	20	40

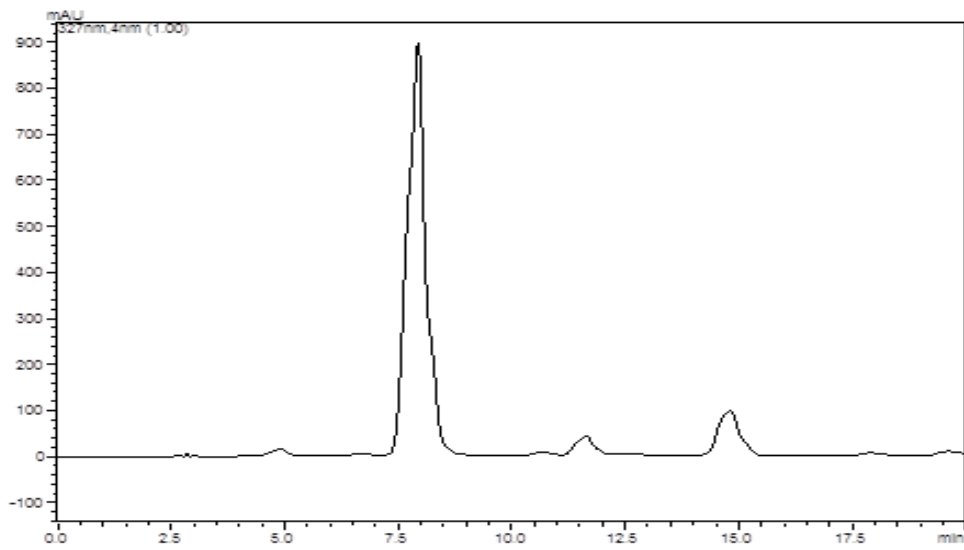
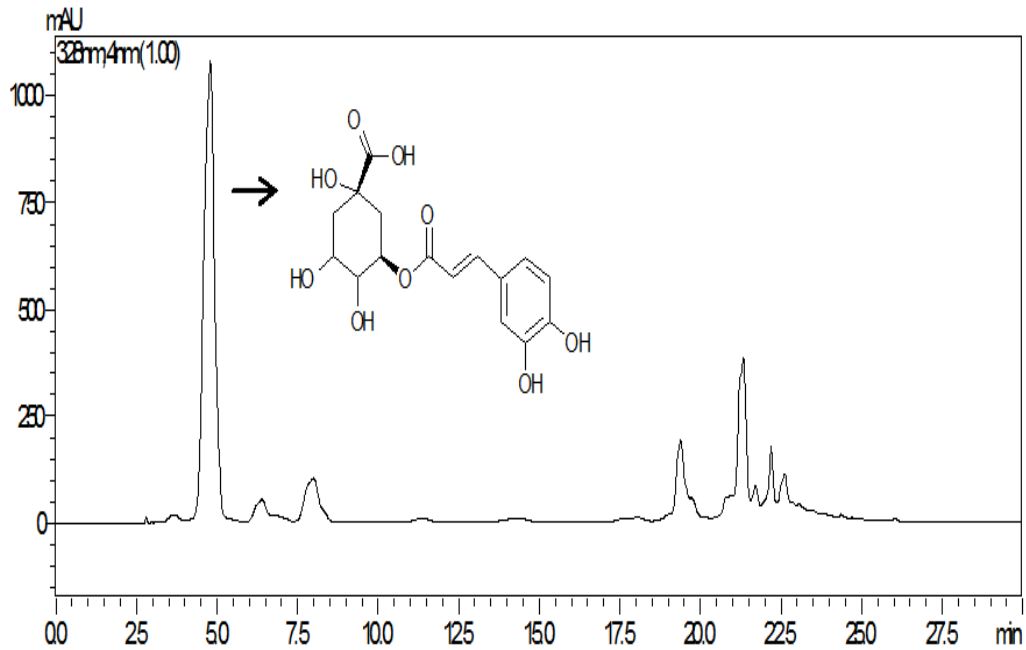
Figura 6 - Análise do ERSP pelo método A.

Figura 7 - Análise do ERSP pelo método B.



O método B apresentou um tempo de retenção menor, como também uma melhor resolução do pico referente ao ácido clorogênico no ERSP, sendo portanto a metodologia escolhida para validação.

4.6 Validação

Para validação da metodologia desenvolvida foi seguido o guia de validação de métodos analíticos e bioanalíticos descrito na Resolução 899/2003 da ANVISA. O ERSP se enquadra na categoria I da normativa, a qual se refere a validação de testes quantitativos para a determinação do princípio ativo em produtos farmacêuticos ou matérias-primas. Dessa forma foram avaliados os seguintes parâmetros do método desenvolvido: especificidade, linearidade, intervalo, precisão, precisão intermediária, limite de quantificação, limite de detecção, exatidão e robustez.

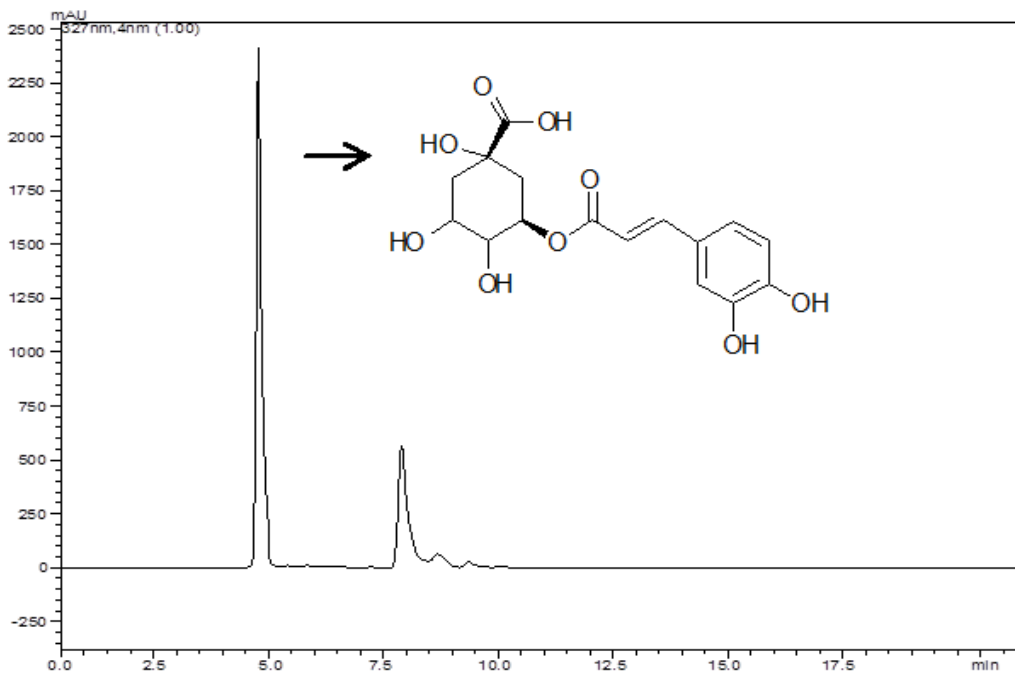
4.6.1 Especificidade

É a capacidade que o método possui de medir exatamente um composto em presença de outros componentes, que podem ser impurezas, produtos de degradação ou componentes da matriz.

Para determinação da especificidade a amostra padrão de ácido clorogênico foi contaminada com ácido cafeico, visto que tal substância pode ser uma impureza formada a partir da hidrólise do ácido clorogênico. O resultado da análise pode ser observado na figura 8.

O método foi capaz de detectar e separar o ácido clorogênico na presença do ácido cafeico, demonstrando a especificidade da metodologia.

Figura 8 - Cromatograma do ácido clorogênico e ácido cafeico.



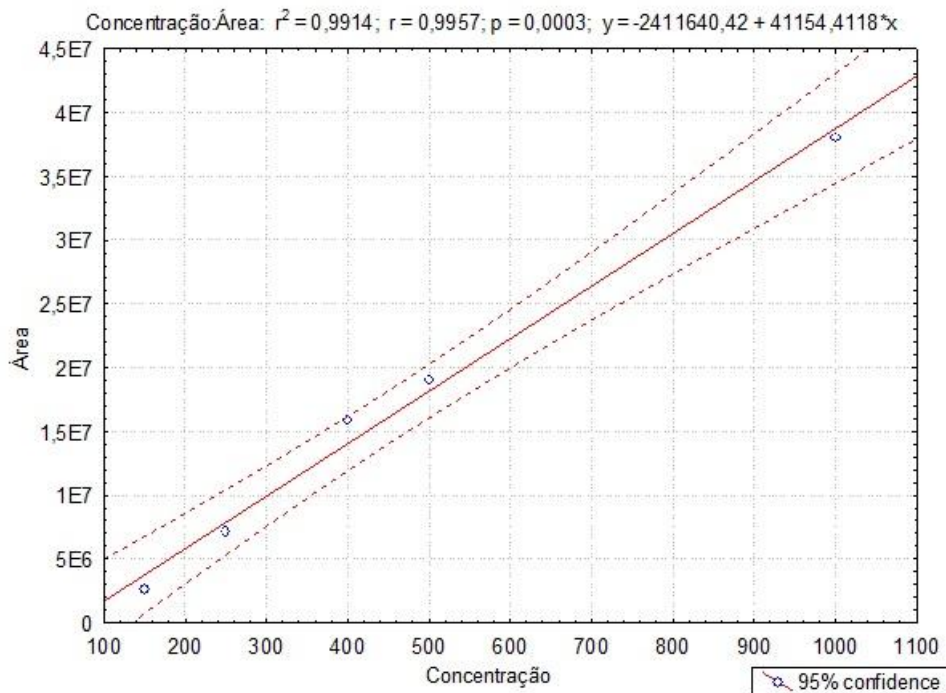
4.6.2 Linearidade e Intervalo

Linearidade é a capacidade da metodologia analítica demonstrar que os resultados obtidos são diretamente proporcionais à concentração do analito, dentro de um intervalo especificado.

A linearidade do método pode ser observada no intervalo entre 37 - 250% em relação a concentração de 400 µg/mL ponto alvo da metodologia, apresentando a equação da reta $y = 41154,41 - 2,4116 \cdot 10^6$, e um coeficiente de correlação de 0.99, como preconizado na normativa. A curva de linearidade pode ser observada pela figura 9.

O teste de linearidade com padrão permite avaliar a concordância da resposta do sistema cromatográfico frente a diferentes concentrações do analito de interesse. O INMETRO (2007) denomina este ensaio como “escolha da faixa linear de trabalho”, e estabelece que a concentração mais esperada da amostra deva, sempre que possível, se situar no centro da faixa de trabalho.

Figura 9- Curva de Linearidade da metodologia



4.6.3 Precisão

Repetibilidade ou precisão intra-corrída refere-se a concordância entre os resultados dentro de um curto período de tempo com o mesmo analista e mesma instrumentação.

A repetibilidade foi avaliada injetando seis determinações, sucessivas, a 400 µg/mL (100%), realizada pelo mesmo analista (tabela 11).

Tabela 11 - Resultado obtido na realização da repetibilidade.

N	Área
1	1421474
2	1409022
3	1400897
4	1388551
5	1403153
6	1421258
Média	1407392,5
DPR (%)	0,90

Foi obtido um desvio padrão relativo de 0,9%, corroborando com o valor estipulado pela Normativa que é de um máximo de 5%.

4.6.4 Precisão Intermediária

Para avaliação da precisão intermediária foram realizadas seis determinações na concentração de 100% (400 µg/mL) em dias diferentes, por analistas diferentes (Tabela 12).

Tabela 12 - Dados obtidos na precisão intermediária.

N	ANALISTA 1	ANALISTA 2
	DIA 1	DIA 2
1	101,17	96,04
2	100,28	95,69
3	99,70	98,43
4	98,82	98,38
5	99,86	95,86
6	101,15	96,02
Média (%)	100,16	96,73
DPR (%)	0,90	1,34

Calculando a média aritmética, das médias dos resultados obtidos pelos dois analistas nos dois dias, juntamente com os desvios-padrão podemos calcular a precisão intermediária do método, resultando no valor de 2,12%. Assim, o método enquadra-se no estipulado pela Norma que é um máximo de 5%.

4.6.5 Limite de Detecção e Limite de Quantificação

O limite de detecção e quantificação foram calculados através da curva de calibração, sendo determinado pelo próprio software do aparelho. Os resultados obtidos foram 48,46 µg/mL para o Limite de detecção e 146,85 µg/mL para o Limite de quantificação.

4.6.6 Exatidão

A exatidão foi avaliada adicionando-se quantidades conhecidas do padrão e realizando a recuperação do analito. Para isso, foram efetuadas três determinações a 250 µg/mL, 400 µg/mL e 500 µg/mL. Os resultados podem ser observados na tabela 13.

O método apresentou desvios-padrões relativos (DPR) de 0,92%, 0,73% e 2,63% para as concentrações de 250, 400 e 500 µg/mL, respectivamente. Corroborando com o preconizado na Normativa que é no máximo 5%.

Tabela 13 - Resultados obtidos na avaliação da exatidão do método.

	% de Recuperação		
	(250 µg/mL)	(400 µg/mL)	(500 µg/mL)
1	90,28	101,17	99,32
2	89,79	100,28	100,67
3	88,68	99,70	104,47
Média	89,58	100,38	101,49
DPR (%)	0,92	0,73	2,63

4.6.7 Robustez

A robustez do método foi avaliada frente à variação no fluxo da fase móvel e da variação da temperatura do forno. Podemos observar nas tabelas 14 e 15 que o método se manteve robusto mediante as pequenas variações na metodologia, situação esta que pode ocorrer nas análises de rotina.

Assim, após a validação, foi demonstrado que o método desenvolvido é específico, linear, preciso, exato e robusto sendo adequado para análise. O teor de ácido clorogênico encontrado no ERSP foi de 225,7 µg/g de ERSP.

Tabela 14 - Avaliação da robustez do método frente a variações no fluxo da fase móvel.

Fluxo (mL/min)	Área
0,9	1393444
1,0	1403153
1,1	1409775
Média	1402124
DPR (%)	0,58

Tabela 15. Avaliação da robustez do método frente a variações na temperatura do forno.

Temperatura (°C)	Área
39	1379341
40	1403153
41	1386095
Média	1389529,7
DPR (%)	0,88

4.7 Análise Termogravimétrica e Análise Térmica Diferencial do ERSP

Na análise do perfil térmico do ERSP foram obtidas as curvas TG (Figura 10) e DTA (figura 11), separadamente, e simultaneamente TG/DTG e DT/DTA (Figura 12 e 13), respectivamente, para uma melhor observação dos eventos.

Foram observados treze eventos de perdas de massa no ERSP (Tabela 16). Os eventos entre 24 - 79°C podem estar relacionados a compostos voláteis presentes no ERSP, o evento endotérmico entre 79 - 140°C estão relacionados a desidratação. No intervalo de temperatura entre 140 e 790 °C foram verificadas

etapas de perda de massa com correspondentes picos endotérmicos e exotérmicos que podem estar atribuídos a fenômenos como, decomposição térmica da parte orgânica, incluindo, proteínas, gorduras, carboidratos, como também descarboxilação de compostos alifáticos e aromáticos, oxidação e combustão.

Tabela 16 -Dados referentes as curvas TG e DTA do ERSP

Etapas	TG		DTA
	$T_i - T_f$ (°C)	Δ massa (%)	Transição
1	24 - 40	0,30	Exotérmica
2	40 - 79	0,73	Endotérmica
3	79 - 140	10,80	Endotérmica
4	140 - 182	6,85	Endotérmica
5	182 - 206	4,23	Exotérmica
6	206 - 225	2,43	Exotérmica
7	225 - 247	3,19	Exotérmica
8	247 - 332	11,60	Endotérmica
9	332 - 419	13,65	Endotérmica
10	419 - 515	15,31	Endotérmica
11	515 - 558	6,41	Exotérmica
12	558 - 647	22,90	Exotérmica
13	647 - 790	1,60	Endotérmica
Resíduo	-	-	-

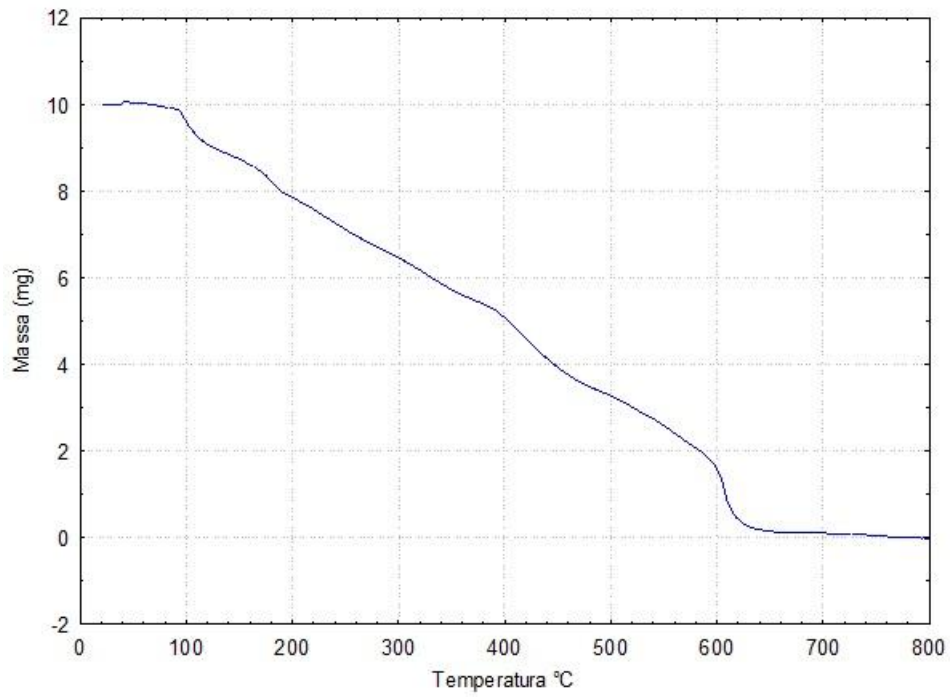
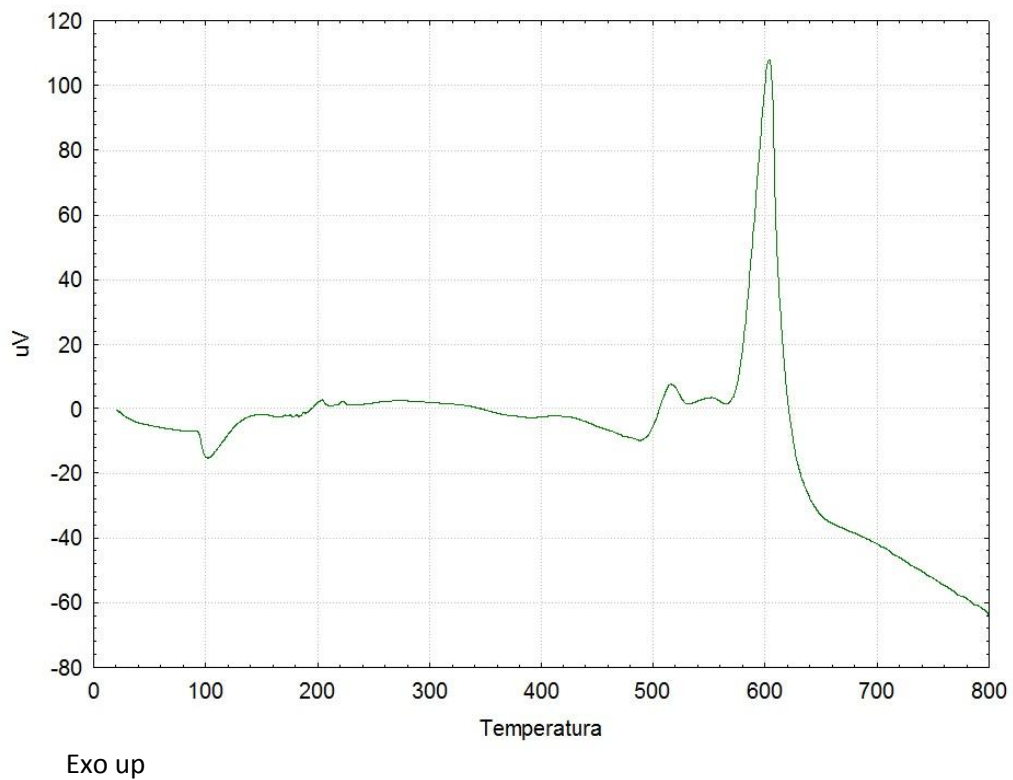
Figura 10 - Curva Termogravimétrica do ERSP**Figura 11 - Curva por Análise Térmica Diferencial do ERSP.**

Figura 12 - Curva TG/DTG do ERSP

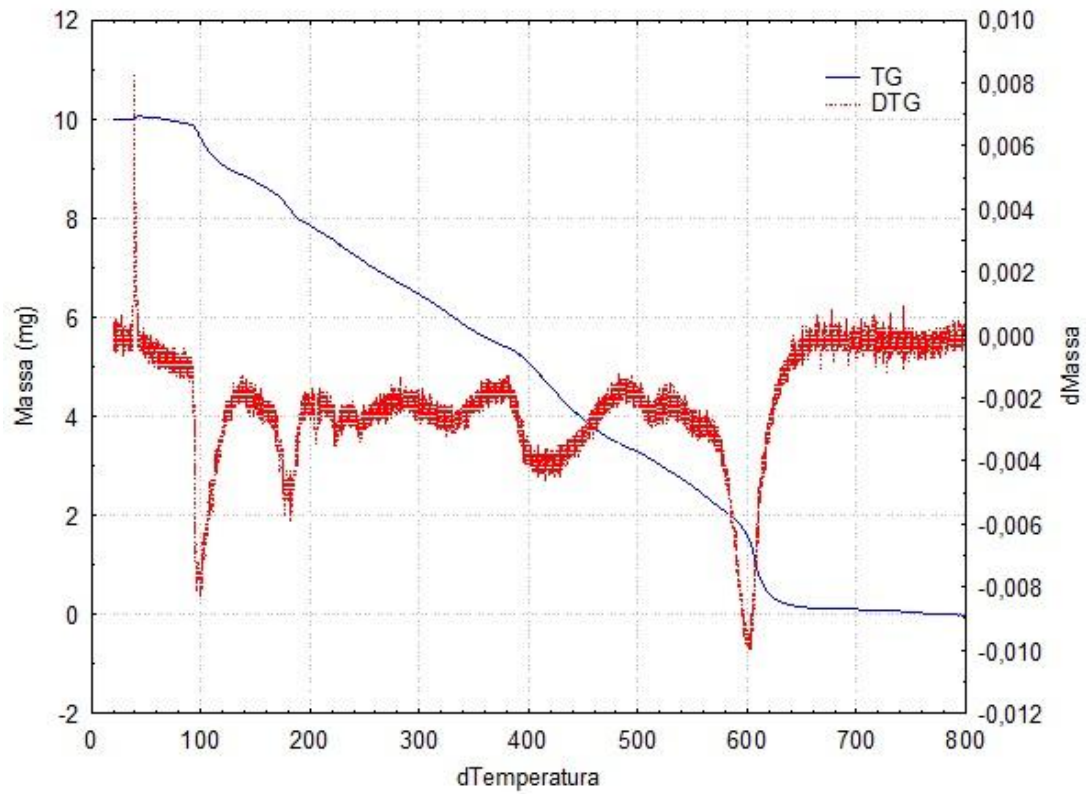
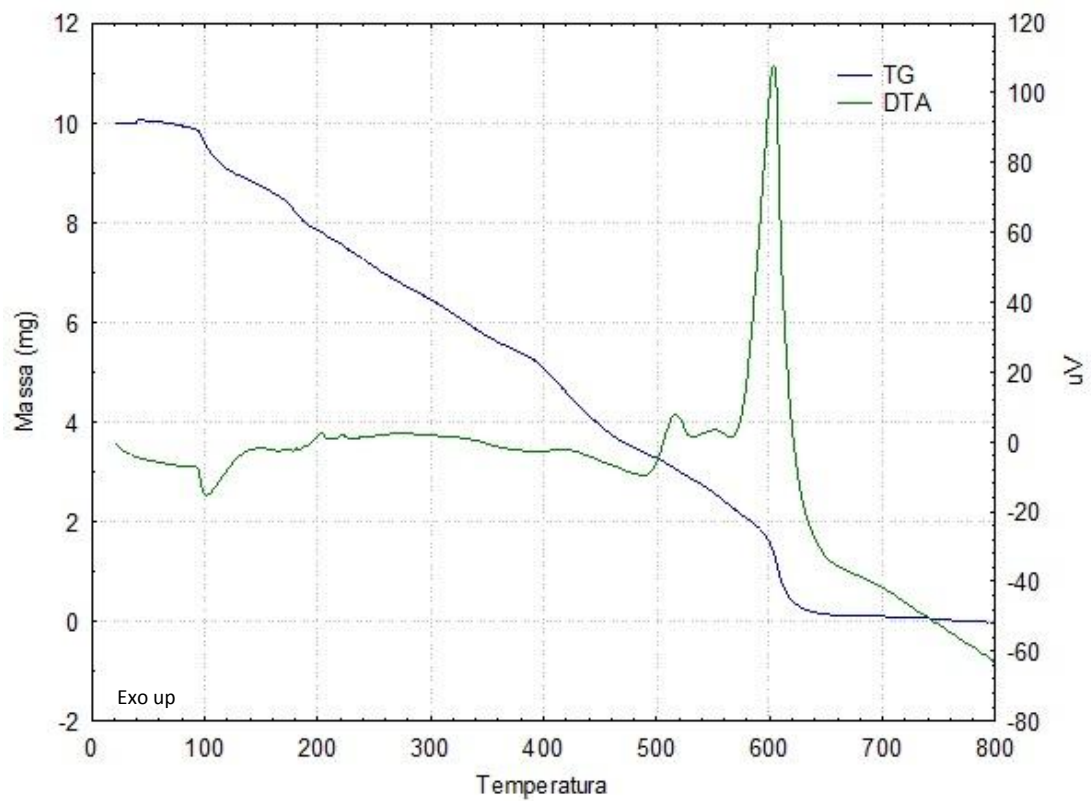


Figura 13 - Curva TG/DTA do ERSP



4.8 Análise da Estabilidade a Termo-oxidação acelerada por Rancimat

O Rancimat é um método acelerado bastante utilizado industrialmente. O avanço do processo oxidativo, ocasionado pelo aquecimento a altas temperaturas sob aeração constante, induz a formação de substâncias voláteis formadas pela oxidação do material que são arrastadas para um recipiente contendo água deionizada. À medida que são arrastadas, estas substâncias contribuem para o aumento da condutividade elétrica da água. O tempo decorrente até a detecção de um aumento súbito na condutividade, decorrente da presença dos compostos orgânicos voláteis de baixa massa molecular é denominado período de indução - PI.

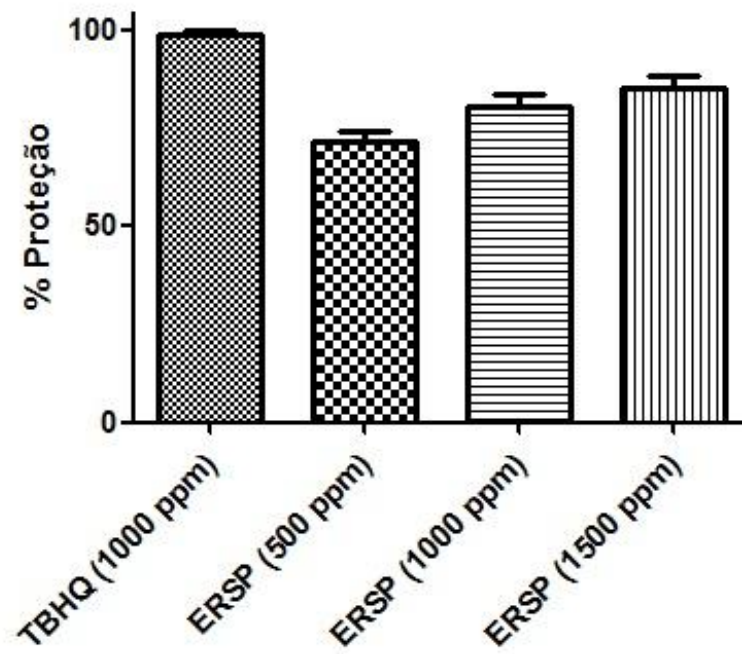
Na investigação da estabilidade do ERSP, aditivado em óleo de soja, frente a termo-oxidação acelerada por Rancimat, o óleo de soja aditivado com o ERSP na concentração de 500, 1000 e 1500 ppm levaram cerca de 6,31, 6,47 e 6,55 horas, respectivamente, para sofrer sua oxidação completa, diferentemente do óleo de soja isento de conservantes que levou cerca de 5,07 horas. Quando comparados os resultados dos óleos de soja adicionados do ERSP frente ao óleo de soja adicionado de TBHQ na concentração de 1000 ppm, conservante utilizado pela indústria alimentícia que apresentou o resultado de 6,78 horas, os resultados apresentaram bons valores para o ERSP (Tabela 17 e Figura 14).

Pawar (2014) avaliou o efeito do extrato etanólico das espécies *Pueraria tuberosa*, *Asparagus racemosus* e *Withania somnifera*, frente a termo-oxidação acelerada por rancimat prolongando o período de indução do óleo, tal atividade foi atribuída à presença de compostos fenólicos nos extratos. Efeito similar ocorre na proteção oferecida pelo ERSP no retardamento da oxidação do óleo de soja, visto que possui compostos fenólicos, entre eles o ácido clorogênico em maior quantidade.

Tabela 17 - Avaliação da estabilidade do óleo de soja enriquecido com ERSP a oxidação a 110°C.

Amostra (ppm)	Período de Indução (horas)
Branco	5.07 ± 0.01
TBHQ (1000)	6.78 ± 0.02
ERSP (500)	6.31 ± 0.05
ERSP (1000)	6.47 ± 0.05
ERSP (1500)	6.55 ± 0.05

Resultados expressos em média ± e.p.m

Figura 14 - Porcentagem de proteção do ERSP em relação ao TBHQ.

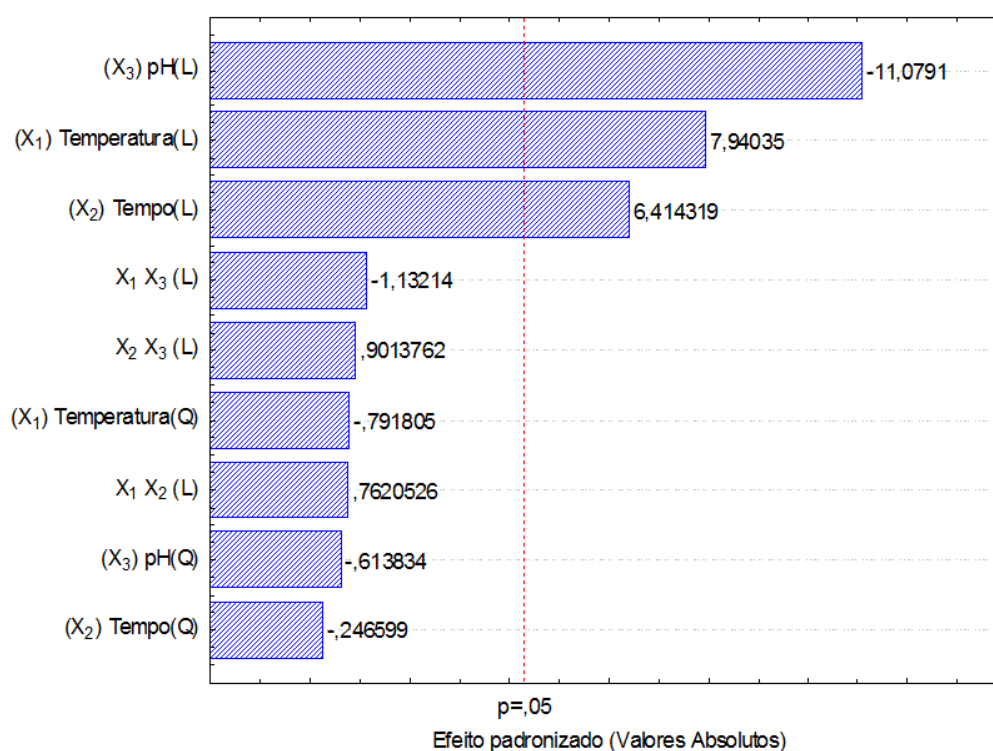
4.9 Otimização da extração de compostos fenólicos das raízes de *Solanum paniculatum* L. por maceração

Com o objetivo de elevarmos o poder extrativo dos compostos fenólicos presentes nas raízes de *Solanum paniculatum* L, realizamos a otimização de alguns processos de extração como maceração, ultrassom e micro-ondas.

Para a técnica utilizando maceração escolhemos 3 variáveis do processo, sendo elas, temperatura, tempo e pH, dentro de intervalos mais utilizados na literatura. Baseando-se no número de fatores foi escolhido o modelo do delineamento do composto central rotacional, sua matriz de planejamento com os valores reais podem ser observadas no quadro 8 juntamente com o teor de fenólicos obtidas para cada análise.

A partir dessas respostas obtidas foi possível realizar uma análise de regressão para encontrarmos as variáveis significativas no processo que podem ser observadas na tabela 18 e figura 15.

Figura 15 - Gráfico de Pareto demonstrando as variáveis significativas frente a extração de fenólicos por maceração.



Quadro 8. Valores reais e respostas obtidas para o planejamento fatorial total 2^3 , com 6 pontos axiais e 3 pontos centrais para otimização da extração de compostos fenólicos por maceração.

Ensaio	Temperatura (°C)	Tempo (horas)	pH	Teor de Fenólicos Totais (EAG/g)
1	34	14,4	2,6	40,39
2	46	14,4	2,6	76,01
3	34	21,6	2,6	56,64
4	46	21,6	2,6	91,77
5	34	14,6	4,4	10,63
6	46	14,6	4,4	29,44
7	34	21,6	4,4	26,62
8	46	21,6	4,4	59,11
9	30	18,0	3,5	19,72
10	50	18,0	3,5	54,16
11	40	12,0	3,5	20,13
12	40	24,0	3,5	59,83
13	40	18,0	2,0	70,75
14	40	18,0	5,0	4,96
15	40	18,0	3,5	50,61
16	40	18,0	3,5	52,56
17	40	18,0	3,5	41,10

Tabela 18 - Coeficientes de regressão para o teor de fenólicos totais (FT) por maceração.

Fatores	Coeficiente de regressão	Erro padrão	t(7)	p-valor	Estimativa por Intervalo (95%)	
					Limite Inferior	Limite Superior
Média*	47,31	3,53	13,40	0,0055	32,12	62,50
(X ₁)Temperatura(L)*	13,22	3,33	7,94	0,0154	12,11	40,78
(X ₁)Temperatura(Q)	-1,46	3,70	-0,79	0,5114	-18,85	12,99
(X ₂)Tempo(L)*	10,77	3,35	6,41	0,0234	7,09	36,00
(X ₂) Tempo(Q)	-0,45	3,71	-0,24	0,8282	-16,91	15,07
(X ₃) pH(L)*	-18,45	3,33	-11,07	0,0080	-51,24	-22,57
(X ₃) pH(Q)	-1,13	3,70	-0,61	0,6018	-18,19	13,65
X ₁ X ₂ (L)	1,67	4,39	0,76	0,5256	-15,56	22,26
X ₁ X ₃ (L)	-2,45	4,33	-1,13	0,3750	-23,56	13,74
X ₂ X ₃ (L)	1,98	4,39	0,90	0,4625	-14,96	22,88

A equação a seguir descreve o rendimento previsto pelo modelo em função das variáveis codificadas, no modelo reparametrizado que contém apenas os termos estatisticamente significativos.

$$FT = 47,31 + 13,22 X_1 + 10,77 X_2 - 18,45 X_3$$

Os resultados da análise de variância podem ser observados na Tabela 19, podemos observar que o modelo obtido é capaz de explicar 92,11% da variação.

Tabela 19 - ANOVA para o teor de fenólicos totais por maceração.

Fonte de variação	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Quadrado médio	F _{calc}	p-valor
Regressão	8472,34	3	2824,11	50,61	<0,0001
Resíduos	725,29	13	55,79		
Total	9197,63	16			

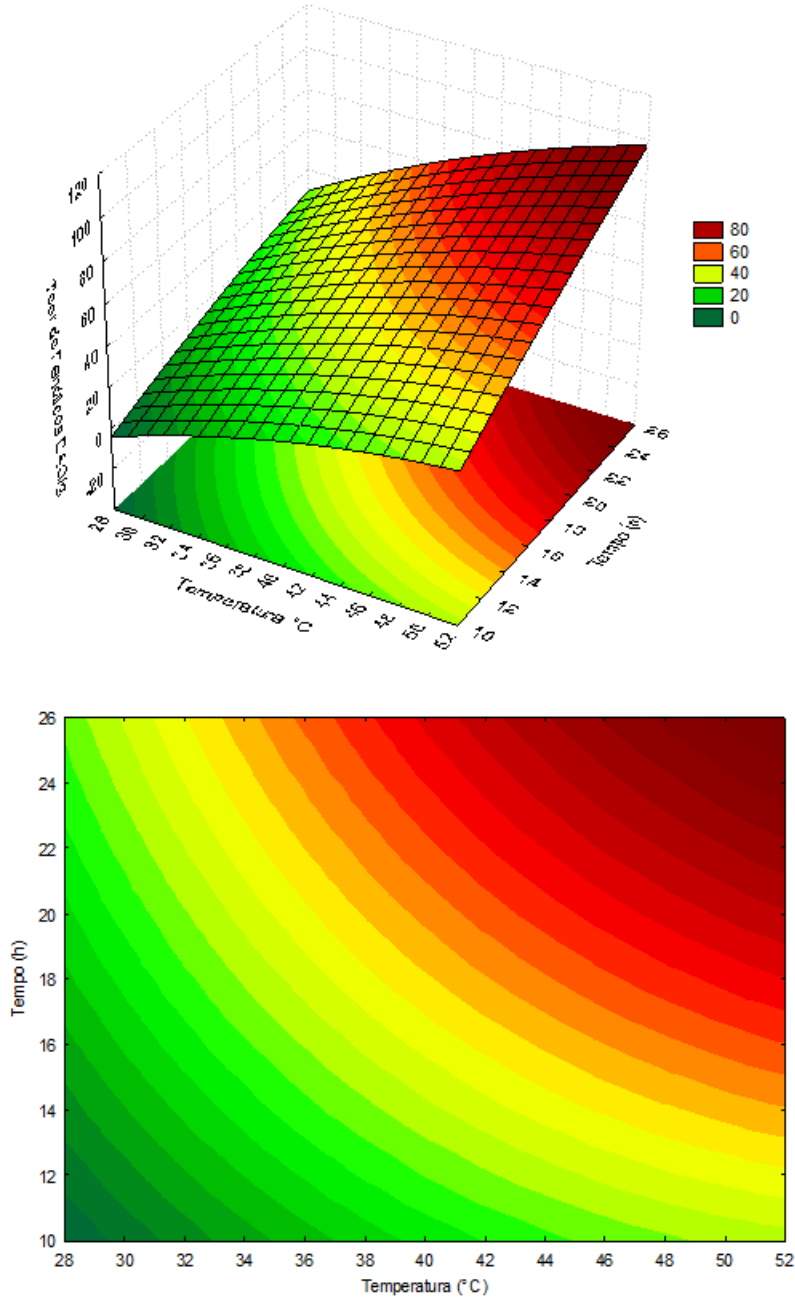
% variação explicada (R^2) = 92,11%

Através do modelo descrito observamos que a extração dos fenólicos da *Solanum paniculatum* por maceração sobre influência positiva da temperatura e do tempo, e negativa do pH, visto que apresenta relação negativa com a variável resposta, o que é caracterizado pela redução do seu valor elevar a extração de fenólicos. No modelo descrito conseguimos elevar a extração de um mínimo de 4,96 EAG/g para um máximo de 91,77 EAG/g.

Observamos nas Figuras 16, 17 e 18 as análises de superfície de resposta e as curvas de contorno para os fatores avaliados, onde a área vermelha prediz a melhor situação para uma maior extração de fenólicos totais para a técnica de extração por maceração aplicada as raízes da *Solanum paniculatum*.

Sarkis et al. (2014) avaliou a influência de três fatores, razão massa/solvente, etanol/água e temperatura, para extração de fenólicos e da atividade sequestrante do radical ABTS⁺ utilizando percolação. Conseguindo elevar a extração de 129,7 para 355,3 EAG/g e elevar a atividade antirradicalar de 8460 para 24311 μ M ET.

Figura 16. Superfície de resposta e curva de contorno para o teor de fenólicos totais (EAG/g) em função da temperatura e do tempo para extração por maceração.



Figuri 17. Superfície de resposta e curva de contorno para o teor de fenólicos totais (EAG/g) em função da temperatura e do pH para extração por maceração.

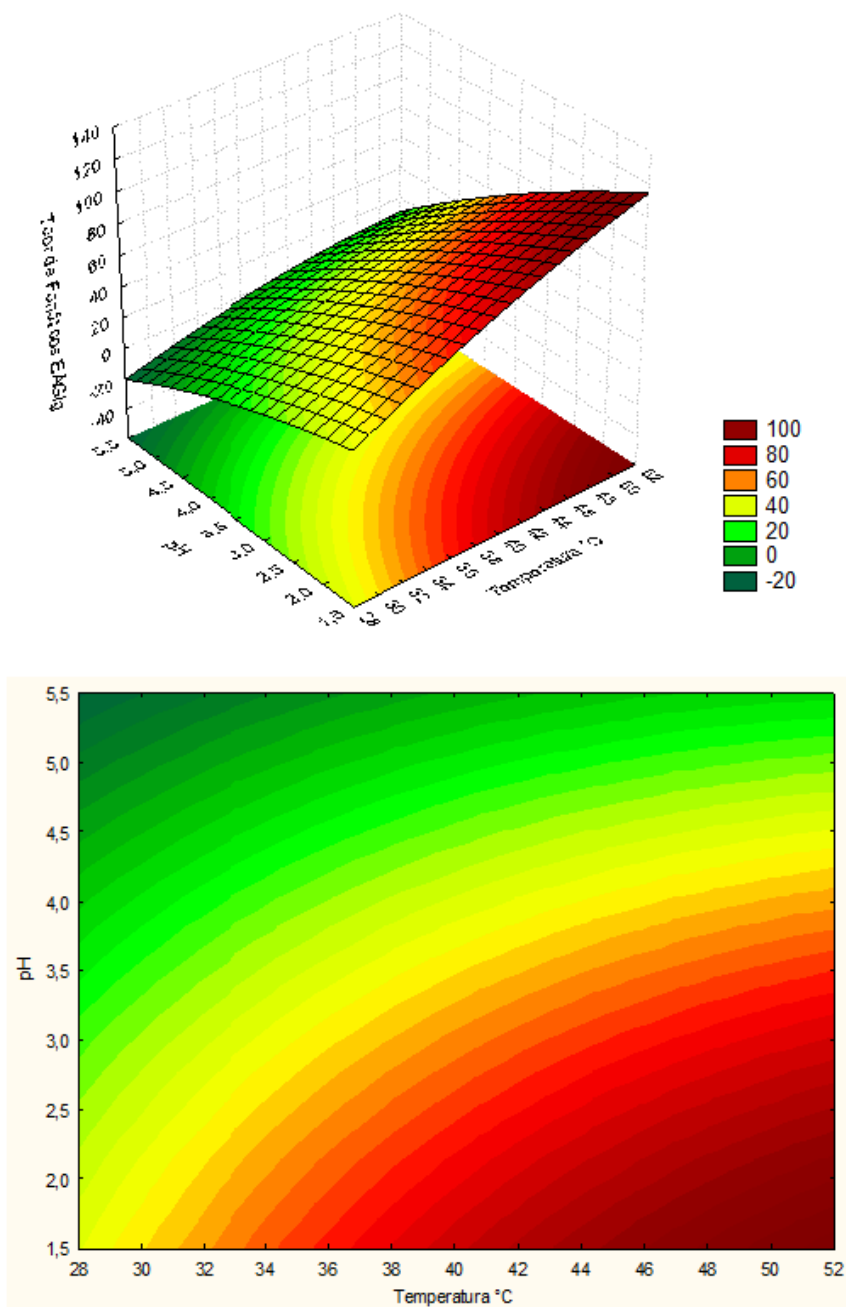
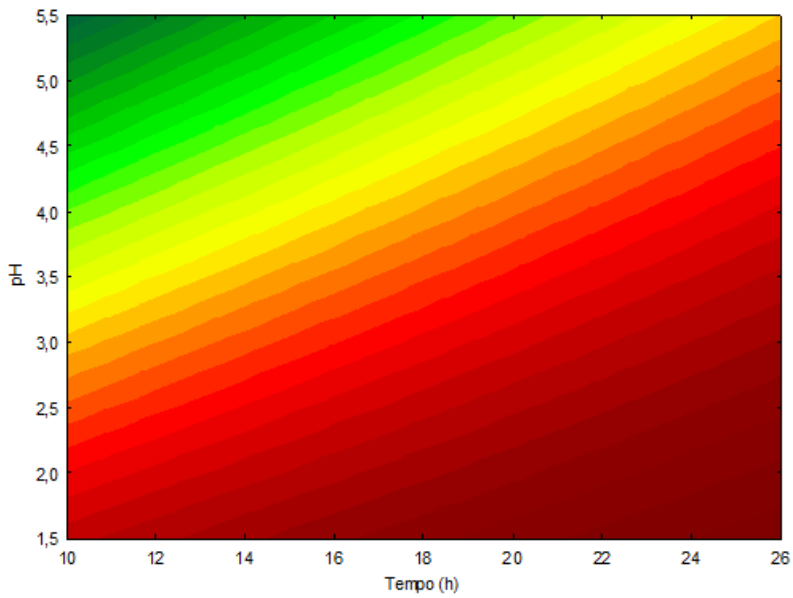
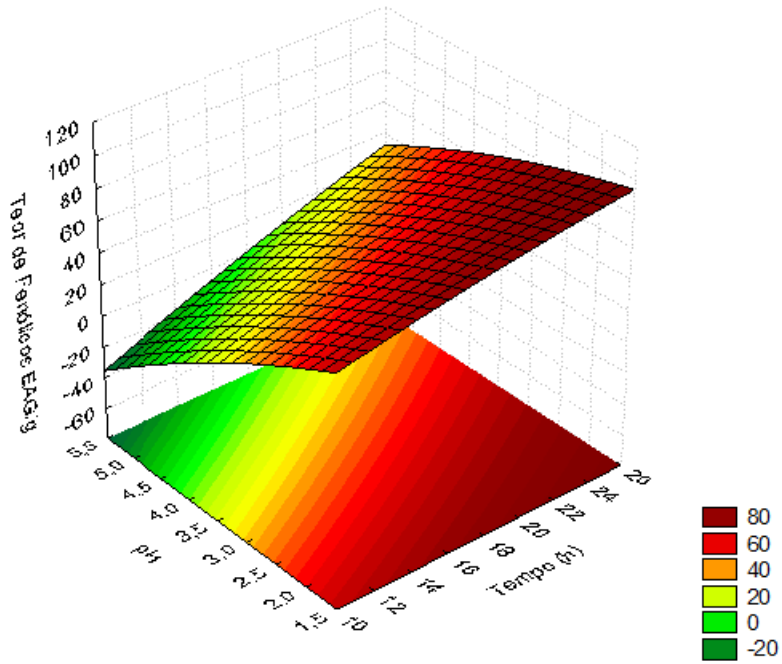


Figura 18. Superfície de resposta e curva de contorno para o teor de fenólicos totais (EAG/g) em função da temperatura e do pH para extração por maceração.



4.10 Otimização da extração de compostos fenólicos das raízes de *Solanum paniculatum* L. por ultrassom

Para a extração utilizando ultrassom escolhemos 2 variáveis do processo, sendo elas, tempo e pH, a temperatura foi mantida a 40°C devido a limitações do aparelho. A partir da escolha dos fatores foi escolhido o modelo do delineamento do composto central rotacional, sua matriz de planejamento com os valores reais podem ser observadas no quadro 9 juntamente com o teor de fenólicos obtidas para cada análise.

Quadro 9. Valores reais e respostas obtidas para o planejamento fatorial total 2², com 4 pontos axiais e 4 pontos centrais para otimização da extração de compostos fenólicos por maceração.

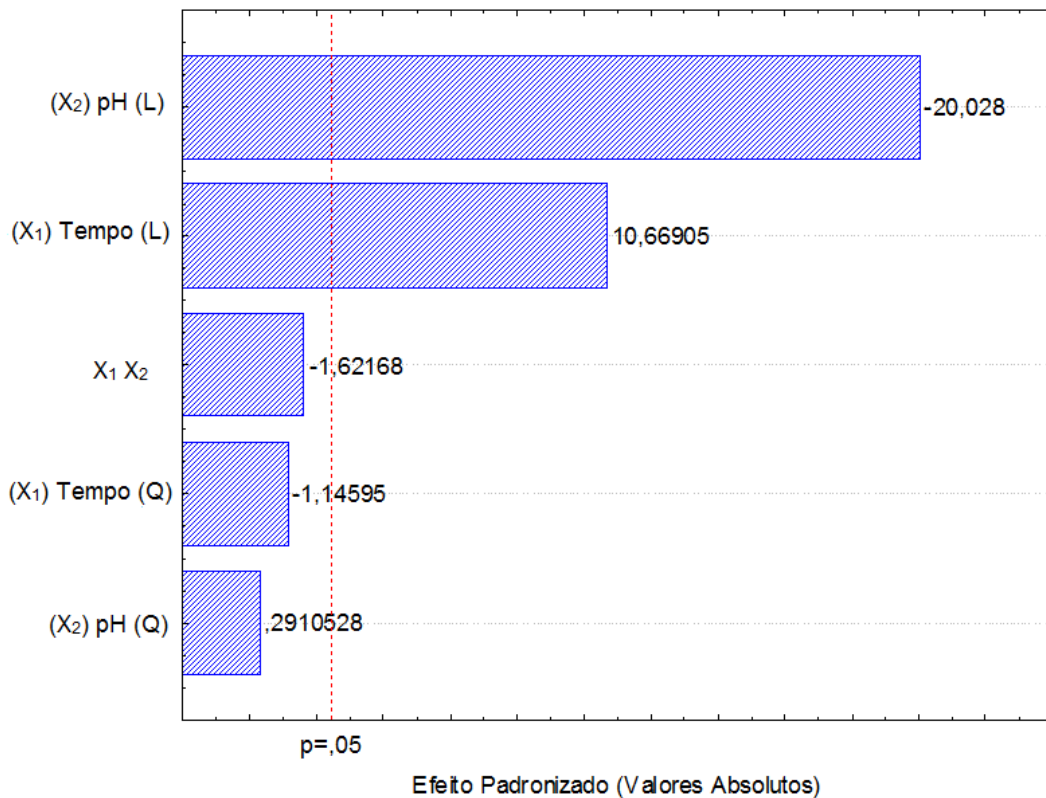
Ensaio	Tempo (min)	pH	Teor de Fenólicos Totais (EAG/g)
1	13	2,5	149,24
2	27	2,5	217,3
3	13	4,5	47,66
4	27	4,5	89,73
5	10	3,5	62,68
6	30	3,5	155,72
7	20	2	198,58
8	20	5	39,41
9	20	3,5	122
10	20	3,5	124,75
11	20	3,5	120,15
12	20	3,5	121,79

Os resultados da análise de regressão podem ser observados na tabela 20 e Figura 19, onde é possível encontrar as variáveis significativas do processo.

Tabela 20 - Coeficientes de regressão para o teor de fenólicos totais (FT) por ultrassom.

Fatores	Coeficiente de regressão	Erro padrão	t(6)	p-valor	Estimativa por Intervalo (95%)	
					Limite Inferior	Limite Superior
Média*	122,57	4,00	30,62	<0,0001	112,78	132,36
(X ₁)Tempo(L)*	30,07	2,81	10,66	<0,0001	46,35	73,94
(X ₁)Tempo(Q)	-3,59	3,13	-1,14	0,2954	-22,55	8,16
(X ₂)pH(L)*	-55,04	2,74	-20,02	<0,0001	-123,54	-96,64
(X ₂) pH(Q)	0,84	2,89	0,29	0,7808	-12,47	15,84
X ₁ X ₂ (L)	-6,49	4,00	-1,62	0,1559	-32,60	6,61

Figura 19 - Gráfico de Pareto sobre efeito do tempo e do pH frente a extração de fenólicos por ultrassom.



A equação a seguir descreve o rendimento previsto pelo modelo em função das variáveis codificadas, no modelo reparametrizado que levando em consideração apenas os fatores estatisticamente significativos.

$$FT = 122,57 + 30,07 \cdot X_1 - 55,04 \cdot X_2$$

Os resultados da análise de variância são observados na tabela 21, demonstrando que o modelo é capaz de explicar 98,04% da variação.

Tabela 21- ANOVA para o teor de fenólicos totais por ultrassom.

Fonte de variação	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Quadrado médio	F _{calc}	p-valor
Regressão	33066,30	2	16533,15	225,65	<0,0001
Resíduos	659,40	9	73,27		
Total	33725,71	11			

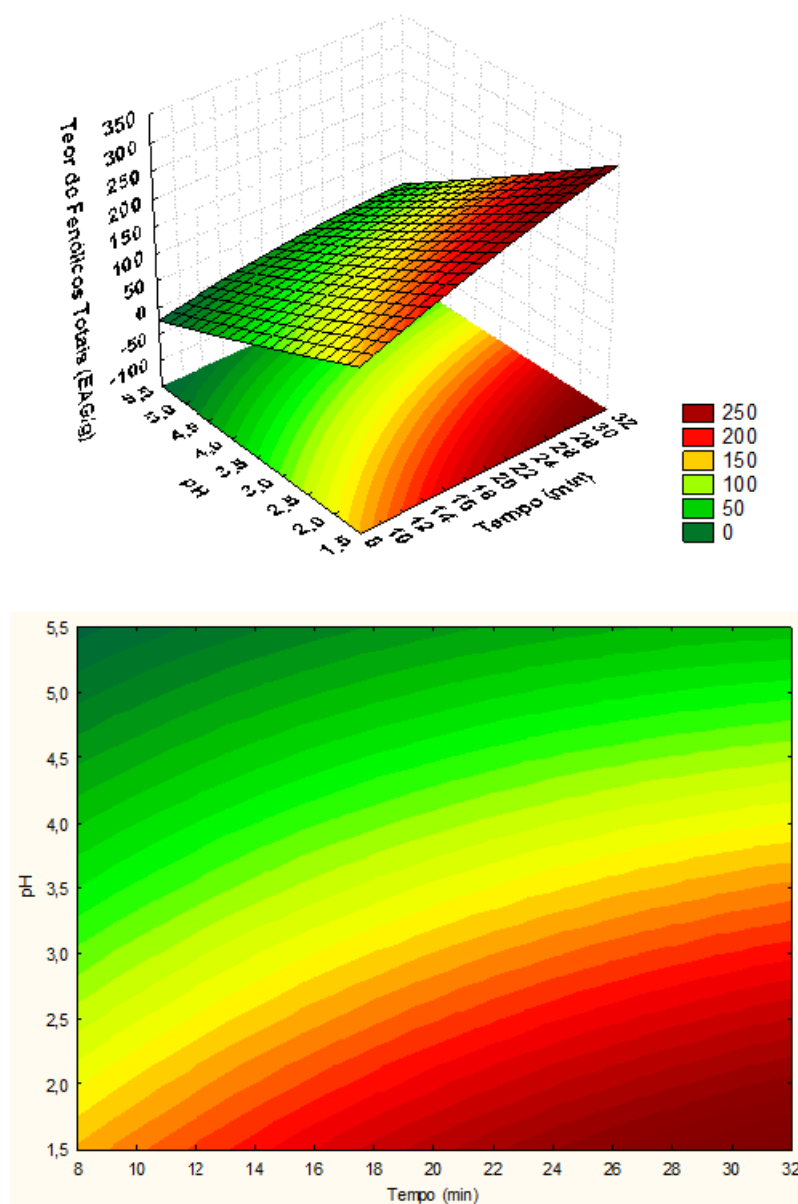
% variação explicada (R^2) = 98,04 %

A análise de superfície de resposta juntamente com a curva de contorno é observada na figura 20. Onde a área em vermelho indica o caminho para resposta máxima da extração por ultrassom para as raízes da *Solanum paniculatum*. No modelo desenvolvido foi possível elevar a extração dos fenólicos de 39,4 para 217,3 EAG/g.

A extração assistida por ultrassom é eficiente devido ao aumento da transferência de massa, principalmente devido as forças geradas pela implosão das bolhas de cavitação que geram um aumento drástico da pressão (na região de formação de bolhas). Este efeito pode ocasionar o rompimento das paredes celulares facilitando a infiltração do solvente, o que pode conduzir a um maior rendimento em diversos processos de extração sólido-líquido (KAUL, 2011).

Em um design experimental realizado por Rodrigues et al. (2015) para extração assistida por ultrassom visando a otimização da extração de fenólicos totais, antocianinas monoméricas, cianidina-3-O-glicosídeo e ácido elágico, frente as variáveis pH, %etanol e tempo, foi determinado para o teor de fenólicos totais e de antocianinas a condição ótima com pH 2, 38% de etanol e tempo de 60 minutos, conseguindo otimizar a extração de 124,14 para 579,49 $\mu\text{g}/100\mu\text{L}$ e de 79,69 para 373,72 mg/L, respectivamente. Já para extração da cianidina-3-O-glicosídeo e do ácido elágico as melhores condições foram pH 0,98, 25% de etanol por 40 minutos, proporcionando um aumento do rendimento de 97,38 para 316,80 $\mu\text{g}/\text{mL}$ e 183,12 para 342,11 $\mu\text{g}/\text{mL}$, respectivamente.

Figura 20 - Superfície de resposta e curva de contorno para o teor de fenólicos totais (EAG/g) em função da temperatura e do tempo para extração com ultrassom.



4.11 Otimização da extração de compostos fenólicos das raízes de *Solanum paniculatum* L. por microondas

Para a extração assistida por micro-ondas escolhemos 3 variáveis do processo, sendo elas, temperatura, tempo e pH. Após escolha dos fatores escolhemos o modelo do delineamento do composto central rotacional, onde sua

matriz de planejamento com os valores reais podem ser observadas no quadro 10 juntamente com o teor de fenólicos obtidas para cada análise

Quadro 10 - Valores reais e respostas obtidas para o planejamento fatorial total 2^3 , com 6 pontos axiais e 3 pontos centrais para otimização da extração de compostos fenólicos por microondas.

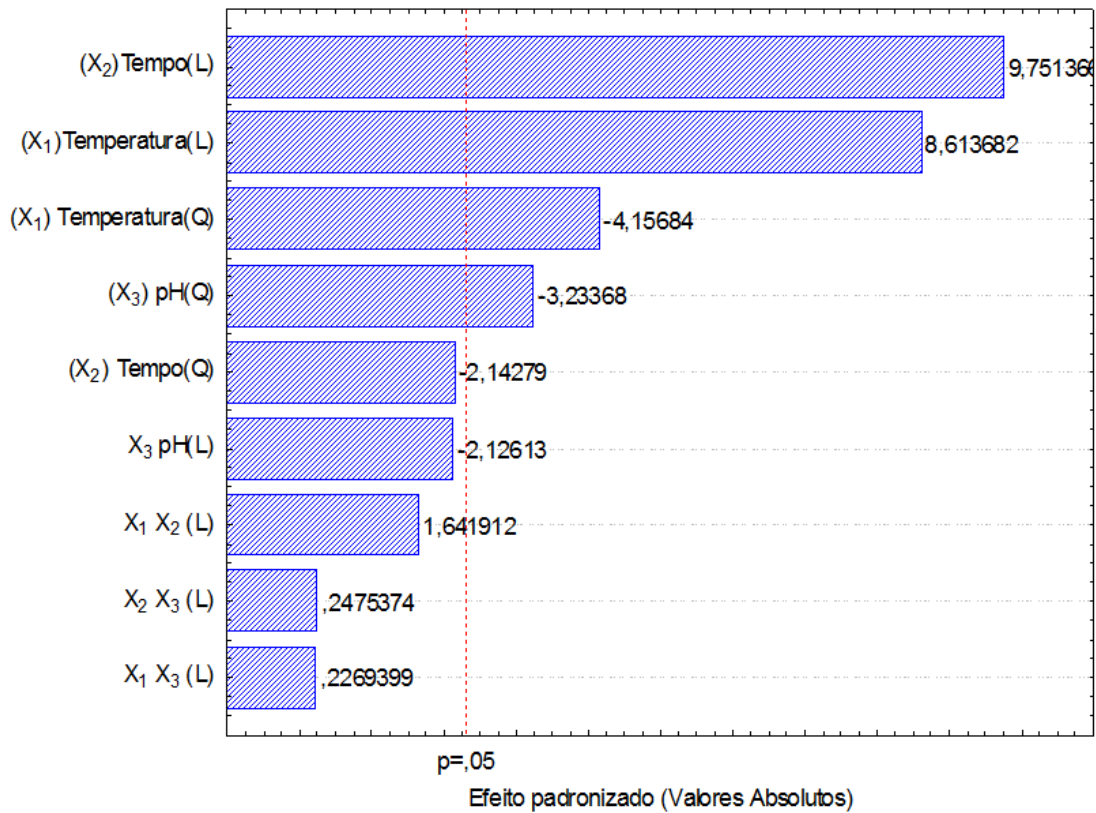
Ensaio	Temperatura (°C)	Tempo (horas)	pH	Teor de Fenólicos Totais (EAG/g)
1	38,00	1,80	1,80	203,78
2	62,00	1,80	1,80	258,48
3	38,00	4,20	1,80	249,89
4	62,00	4,20	1,80	369,63
5	38,00	1,80	2,70	162,42
6	62,00	1,80	2,70	243,69
7	38,00	4,20	2,70	235,66
8	62,00	4,20	2,70	341,17
9	30,00	3,00	2,25	157,76
10	70,00	3,00	2,25	306,84
11	50,00	1,00	2,25	154,25
12	50,00	5,00	2,25	371,59
13	50,00	3,00	1,50	261,83
14	50,00	3,00	3,00	230,84
15	50,00	3,00	2,25	309,22
16	50,00	3,00	2,25	305,6
17	50,00	3,00	2,25	300,01
18	50,00	3,00	2,25	305,9

Os resultados da análise de regressão encontram-se na tabela 22 e figura 21, onde observamos as variáveis significativas suficientes para elaboração do modelo preditivo neste processo.

Tabela 22 - Coeficientes de regressão para o teor de fenólicos totais (FT) por micro-ondas.

Fatores	Coeficiente de regressão	Erro padrão	t(8)	p-valor	Estimativa por Intervalo (95%)	
					Limite Inferior	Limite Superior
Média*	304,21	9,58	31,72	<0,0001	282,10	326,32
(X ₁)Temperatura(L)*	44,97	5,22	8,61	<0,0001	65,87	114,03
(X ₁)Temperatura(Q)*	-22,75	5,47	-4,15	0,0031	-70,74	-20,25
(X ₂)Tempo(L)*	50,91	5,22	9,75	<0,0001	77,75	125,91
(X ₂) Tempo(Q)	-11,72	5,47	-2,14	0,0644	-48,69	1,78
(X ₃) pH(L)	-11,10	5,22	-2,12	0,0661	-46,28	1,87
(X ₃) pH(Q)*	-17,69	5,47	-3,23	0,0119	-60,63	-10,15
X ₁ X ₂ (L)	11,16	6,79	1,64	0,1392	-9,02	53,66
X ₁ X ₃ (L)	1,54	6,79	0,22	0,8261	-28,26	34,43
X ₂ X ₃ (L)	1,68	6,79	0,24	0,8107	-27,98	34,71

Figura 21 - Gráfico de Pareto sobre efeito do tempo, temperatura e do pH frente a extração de fenólicos por microondas.



A equação a seguir descreve o rendimento previsto pelo modelo em função das variáveis codificadas, no modelo reparametrizado que contém apenas os termos estatisticamente significativos.

$$FT = 304,21 + 44,97 X_1 - 22,75 (X_1)^2 + 50,91 X_2 - 17,69 (X_3)^2$$

Os resultados da análise de variância é observada na tabela 23, onde o modelo possui a capacidade de explicar 83,24% da variação.

Tabela 23 - ANOVA para o teor de fenólicos totais por micro-ondas.

Fonte de variação	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Quadrado médio	F _{calc}	p-valor
Regressão	64236,36	3	21412,12	23,19	<0,0001
Resíduos	12926,38	14	923,31		
Total	77162,74	17			

% variação explicada (R^2) = 83,24 %

A análise de superfície de resposta e a curva de contorno são observadas nas figuras 22, 23 e 24. A região do ótimo é indicada em vermelho demonstrando as melhores condições para um maior rendimento da extração, para o modelo predito foi indicado que o maior rendimento da extração dos fenólicos de *Solanum paniculatum* L. são nas seguintes condições:

- Temperatura 57 °C
- Tempo 4 min
- pH 2,21

Ao analisar as respostas da extração assistida por micro-ondas, observa-se a elevação da concentração de fenólicos de 154,25 EAG/g para 371,59 EAG/g, representando um aumento de cerca de 241% da extração.

Se observarmos o resultado obtido para a extração por maceração clássica, onde apenas as raízes ficam em contato com o solvente, na temperatura de 40° C por um tempo de 18 horas e pH 5 foi obtido, apenas, um teor de fenólicos totais de 4,96 EAG/g, se comparamos com a extração assistida por micro-ondas, na temperatura de 50°C por um tempo de 5 minutos e pH 2,25, atingimos uma concentração de fenólicos de 371,59 EAG/g, fato que ressalta a importância da escolha do melhor método e a aplicação de um planejamento experimental para processos extrativos.

Figura 22 - Superfície de resposta e curva de contorno para o teor de fenólicos totais (EAG/g) em função da temperatura e do tempo para extração por microondas.

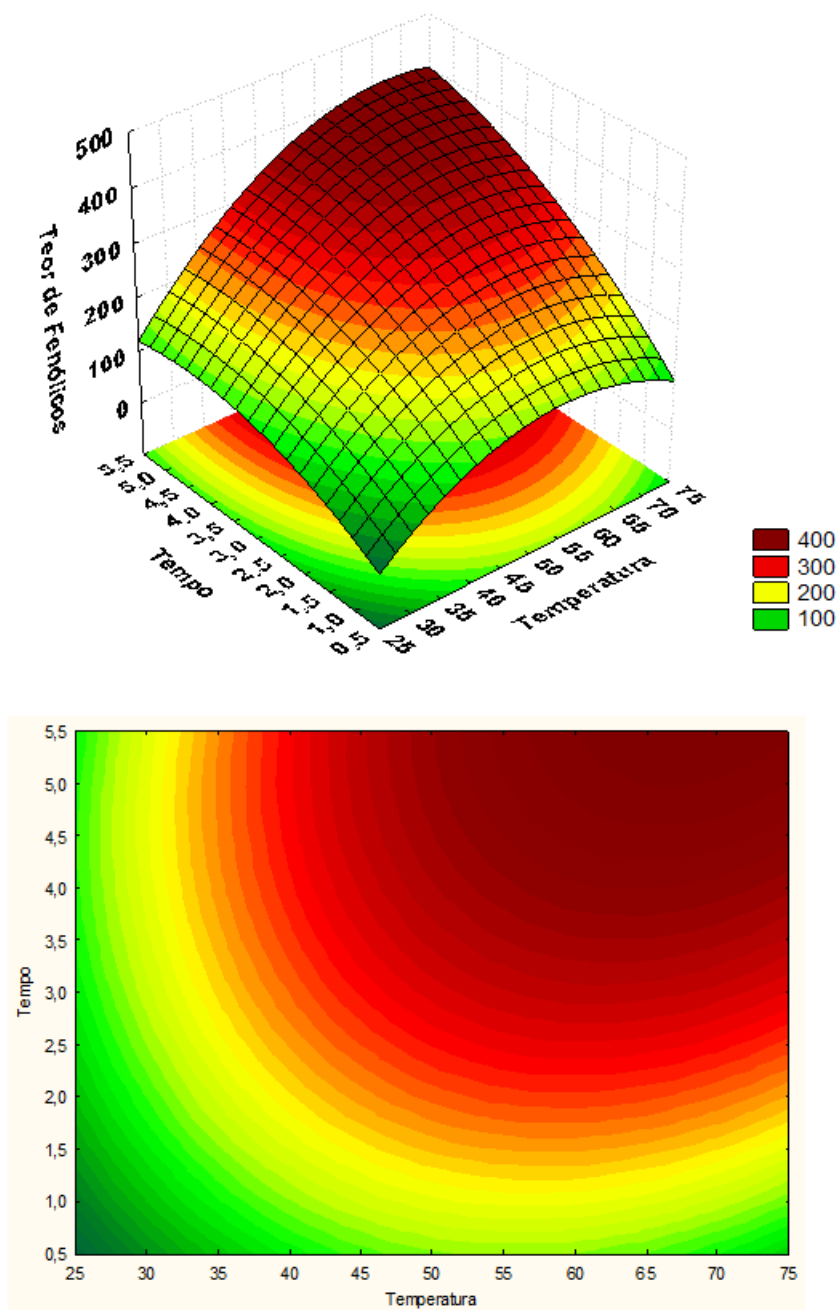


Figura 23 - Superfície de resposta e curva de contorno para o teor de fenólicos totais (EAG/g) em função da temperatura e do pH para extração por microndas.

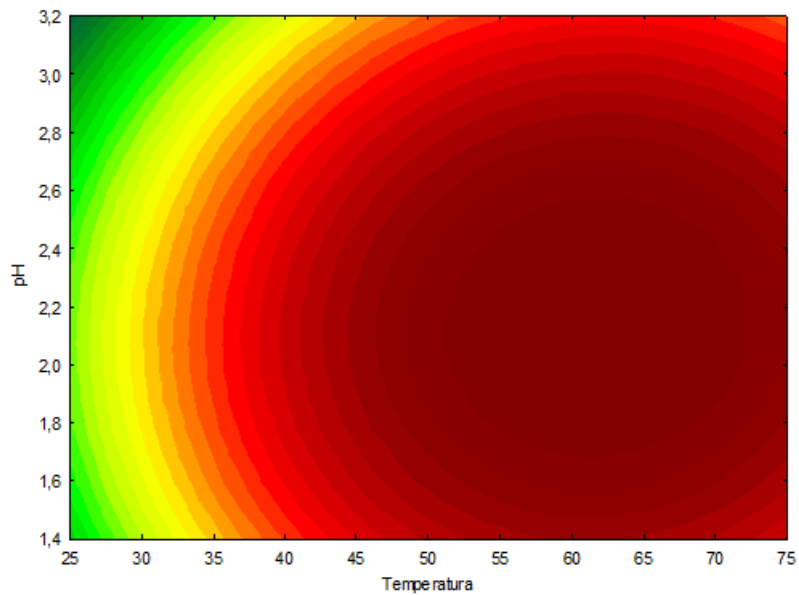
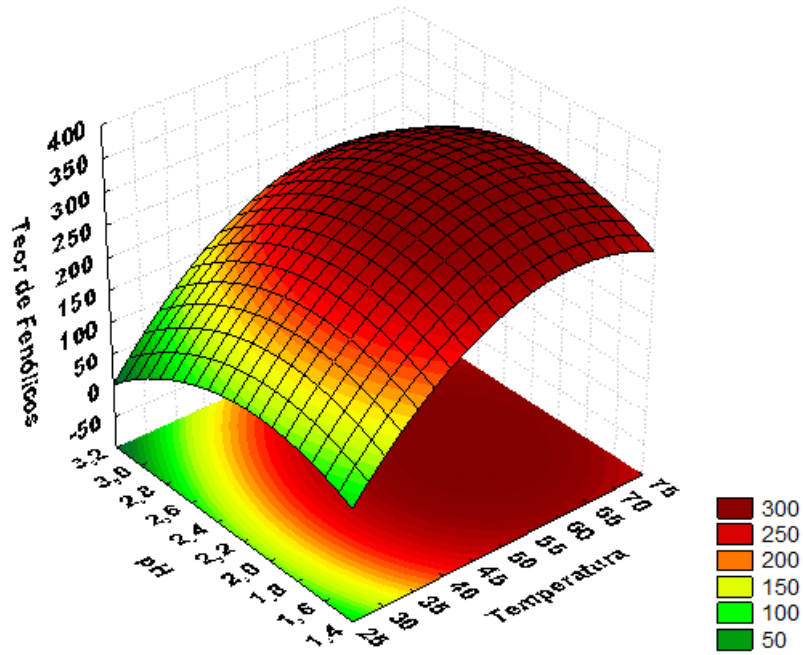
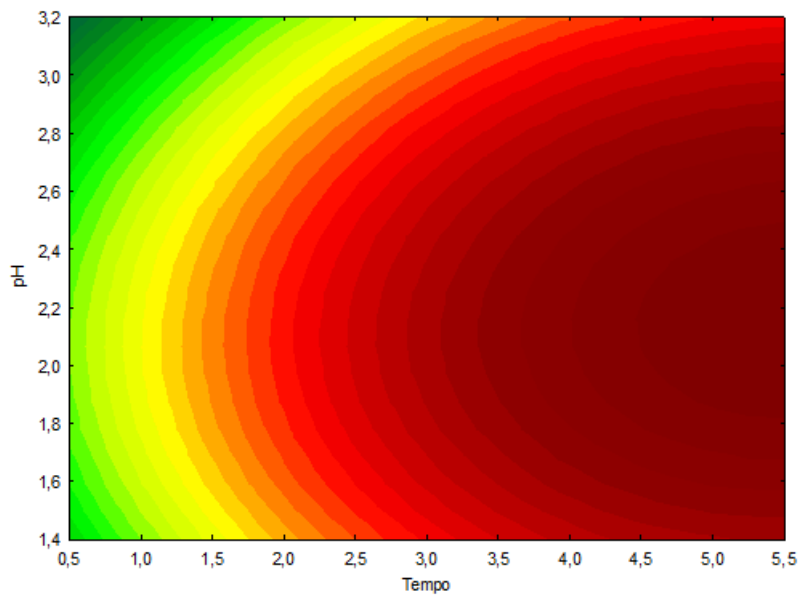
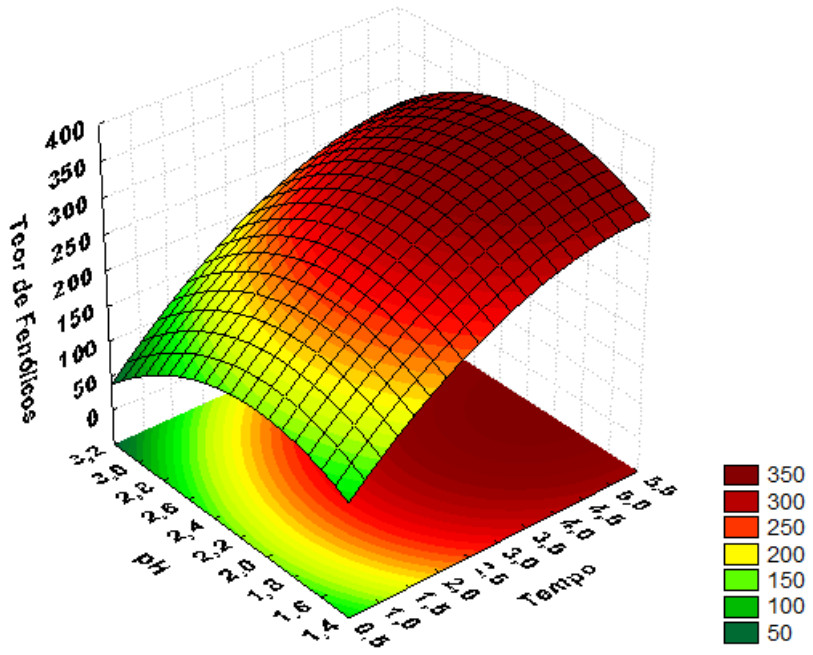


Figura 24 - Superfície de resposta e curva de contorno para o teor de fenólicos totais (EAG/g) em função da temperatura e do pH para extração por microondas.



Especificamente quanto à aplicação e o desempenho da extração assistida por micro-ondas aos compostos bioativos de vegetais, observa-se uma maior eficiência da técnica em relação aos métodos convencionais como maceração, soxhlet, extração por ultrassom e extração por aquecimento em refluxo simples (TSUKUI, 2014). O maior rendimento de extração de fenólicos totais, flavonoides totais, taninos condensados em menor tempo de extração pode ser devido a condução iônica e rotação de dipolo, que são os principais mecanismos de aquecimento por micro-ondas. A pressão aumenta dentro das células do vegetal conduzindo a uma liberação eficiente do conteúdo celular por meio da interação molecular com o campo eletromagnético e da rápida transferência de energia para o solvente de extração e dos componentes vegetais (DAHMOUNE, 2015).

Milutinovic e colaboradores (2014) avaliaram o teor de fenólicos totais e a atividade antioxidante (FRAP e DPPH), em extratos de resíduo de cavalinha (*Equisetum arvense*), empregando a extração assistida por micro-ondas e um método convencional (extração sólido-líquido com agitação). A melhor condição obtida foi a extração por micro-ondas utilizando 40 ml de etanol (solução 54%), 1 grama do resíduo de cavalinha e apenas 80 segundos de extração. Foi obtido um valor superior de polifenóis do que quando extraído por 12 h no método convencional (161,57 e 120,27 mg GAE/g, respectivamente). As condições que favoreceram o teor elevado de polifenóis também elevaram a atividade antioxidante em FRAP e DDPH (TSUKUI, 2014).

4.12 Investigação da Atividade Antimicrobiana

O ERSP apresentou atividade antimicrobiana frente a bactérias Gram - positivas, leveduras, fungos filamentosos e a *E. coli*, entretanto não apresentou atividade frente as bactérias gram-negativas *Pseudomona aeruginosa* e *Klebsiela pneumoniae* como observado na tabela 24.

Tabela 24. Determinação do halo de inibição (mm) do ERSP de *S. paniculatum* frente a microorganismos patogênicos.

Microorganismos	ERSP (1000µg/mL)	Cloranfenicol (40 µg/mL)	Rifampicina (120 µg/mL)	Nistatina (80 µg/mL)	Etanol
<i>S. aureus</i> (UFPEDA-02)	16,3 ± 0,5	42,0 ± 2,3			-
<i>B. subtilis</i> (UFPEDA- 86)	17,6 ± 0,5	39,6 ± 2,5			-
<i>E. faecalis</i> (UFPEDA-138)	15,3 ± 0,57	24,3 ± 0,5			-
<i>E. coli</i> (UFPEDA- 224)	16,0 ± 0,5	36,0 ± 0,1			-
<i>P. aeruginosa</i> (UFPEDA - 416)	-	23,6 ± 1,1			-
<i>K. pneumoniae</i> (UFPEDA - 396)	-	26,6 ± 1,1			-
<i>M. smegmatis</i> (UFPEDA - 81)	20,3 ± 1,1			60,0 ± 1,1	-
<i>C. albicans</i> (UFPEDA-1007)	14,0 ± 0,53		28,0 ± 0,0		-
<i>C. krusei</i> (UFPEDA-1002)	14,0 ± 0,53		24,0 ± 1,0		-
<i>A. niger</i> (UFPEDA - 2003)	12,0 ± 0,57		21,3 ± 0,5		-

Resultados expressos como média ± desvio-padrão.

O teste de microdiluição foi aplicado aos micro-organismos sensíveis no método de difusão em disco, com a intenção de determinar a concentração mínima microbicida e bacteriostática do ERSP (tabela 25).

Em estudo realizado por Lou et al. (2011), foi demonstrado a atividade antibacteriana do ácido clorogênico, seu mecanismo de ação está relacionado com o aumento da permeabilidade da membrana plasmática, resultando na perda da sua função protetora, induzindo a liberação do conteúdo citoplasmático e levando a morte dos micro-organismos. Com isso, a atividade antimicrobiana do ERSP possivelmente está relacionada a presença do ácido clorogênico.

Tabela 25 Determinação CMM e CMB do ERSP.

Microorganismos	ERSP($\mu\text{g/mL}$)	
	CMM	CMB
<i>M. smegmatis</i> (UFPEDA - 81)	<15	<15
<i>B. subtilis</i> (UFPEDA- 86)	<15	<15
<i>E. faecalis</i> (UFPEDA-138)	125	62
<i>E. coli</i> (UFPEDA-224)	250	125
<i>C. krusei</i> (UFPEA-1002)	250	125
<i>C. albicans</i> (UFPEDA-1007)	<15	<15
<i>S. aureus</i> (UFPEDA-02)	250	125

4.13 Estudo Toxicológico

4.13.1 Bioensaio com *Artemia salina* Leach

A avaliação preliminar de uma possível atividade citotóxica do ERSP foi realizada através do bioensaio com *Artemia salina*, onde foi encontrado uma $CL_{50} = 352,9 \mu\text{g/mL}$, com um intervalo de confiança entre 348,7 - 357,1 $\mu\text{g/mL}$.

A avaliação da toxicidade de produtos naturais pelo bioensaio de *A. salina* é utilizada como indício de atividades citotóxicas, visto que o microcrustáceo possui

metabolismo de purinas, valores da CL_{50} menores que 1000 $\mu\text{g/mL}$ representam produtos bioativos (SAHREEN et al., 2015).

Em estudo realizado por Silva, et al (2007) com o extrato etanólico das partes aéreas e dos frutos de *Solanum paniculatum* foi determinado uma CL_{50} de 953,9 e 823,2 $\mu\text{g/mL}$ frente a *A. salina*. Assim, o ERSP demonstrou-se mais bioativo quando comparado a estes resultados.

4.13. 2 Avaliação da citotoxicidade *in vitro* em linhagem cancerígenas humanas

A partir do resultado obtido no bioensaio com *A. salina*, partimos para a investigação da atividade citotóxica do ERSP frente as linhagens de células tumorais HT-29 e HL-60. Os resultados obtidos demonstram que o ERSP possui atividade citotóxica, inibindo a proliferação de cerca de 92% do crescimento celular das células HL-60 e 57% das células HT-29 (Tabela 26). Esta atividade pode estar relacionada a presença do ác. clorogênico, visto que estudos relatados na literatura demonstram suas atividades antioxidantes, antitumorais, antibacterianas, antifúngicas e anti-inflamatórias (GARAMBONE, 2007). A ação citotóxica do ác. clorogênico, está relacionada com a capacidade de regular a alteração fenotípica de células tumorais, apresentando ação antagônica a substâncias que induzem a mitose celular, sugerindo uma possível propriedade anticancerígena (BELKAID, 2006).

Tabela 26. Atividade do ERSP (50 $\mu\text{g/mL}$) frente a inibição do crescimento de células neoplásicas.

Células	%inibição
HL – 60	92 \pm 0,6
HT – 29	57 \pm 2,4

4.13.3 Investigação da citotoxicidade em eritrócitos

Algumas espécies vegetais possuem substâncias químicas que podem promover uma atividade hemolítica ou anti-hemolítica frente a eritrócitos. Alguns trabalhos relatam que as membranas dos eritrócitos diferem de acordo com o tipo sanguíneo, apresentando estabilidade variável. Alguns extratos de plantas podem lesionar a membrana plasmática das hemácias provocando anemia, sendo portanto, fundamental a investigação dos efeitos dos extratos vegetais quanto ao seu potencial hemolítico (Vinjamuri et al., 2015).

Na investigação da atividade hemolítica do ERSP em diferentes tipos de eritrócitos, foi observado que o ERSP apresenta uma CE_{50} acima de 1000 $\mu\text{g/mL}$, o que demonstra sua incapacidade de lesionar as membranas plasmáticas dos eritrócitos humanos e de camundongos (tabela 27), sendo considerado de baixa toxicidade, visto que amostras ativas são aquelas que apresentam $CE_{50} < 200 \mu\text{g/mL}$ (COSTA-LOTUFO et al., 2002).

Tabela 27 - Avaliação da atividade Hemolítica do ERSP.

Sangue	CE_{50} ($\mu\text{g/mL}$)
Tipo O	>1000
Tipo A	>1000
Tipo B	>1000
Tipo AB	>1000
Camundongo	>1000

4.13.4 Avaliação da Toxicidade Aguda

Na avaliação da toxicidade aguda do ERSP (2000 mg/Kg), foram observados comportamentos depressores, como perda do reflexo auricular, perda do reflexo

corneal, ambulação diminuída e analgesia até a segunda hora após a administração do ERSP. Durante o período de 14 dias, não foram observadas mortes, demonstrando que o ERSP possui uma DL_{50} acima de 2000 mg/Kg.

Não foram encontradas diferenças significativas nas análises do consumo de água, ração, peso corporal e peso dos órgãos quando comparados com o grupo controle negativo (Tabela 28, 29, 30 e 31). Nas análises anatomopatológicas dos órgãos não foram observadas alterações na coloração, anatomia, nem a presença de tumores, edemas e necrose. Nas análises histopatológicas do coração, pulmão, fígado, rins, baço e estômago não foram visualizadas alterações nas estruturas celulares destes tecidos quando comparados aos seus respectivos grupos controles.

Tabela 28 - Avaliação do consumo de água, ração e variação de peso na toxicidade aguda dos ratos.

Ratos	Dosagem	Água (ml)	Ração (g)	Peso (g)
Veículo	-	178,1 ± 1,67 [#]	143,3 ± 2,36	255,0 ± 0,71
ERSP	2000 mg/Kg	176,7 ± 1,06 [#]	138,5 ± 2,28	256,6 ± 0,99

Resultados expressos como média ± e.p.m. utilizando teste *t* de student. [#] Resultados expressos como média ± e.p.m. utilizando teste de mann-whitney.

Tabela 29 - Avaliação do consumo de água, ração e variação de peso na toxicidade aguda dos ratas.

Ratas	Dosagem	Água (ml)	Ração (g)	Peso (g)
Veículo	-	168,3 ± 0,99	111,9 ± 0,57	252,6 ± 0,52
ERSP	2000 mg/Kg	165,9 ± 1,02	110,6 ± 0,60	252,2 ± 0,48

Resultados expressos como média ± e.p.m. utilizando teste *t* de student.

Tabela 30 - Avaliação da variação dos pesos dos órgãos dos ratos após exposição aguda.

MACHOS	Coração (g)	Pulmão (g)	Fígado (g)	Rim (g)	Baço (g)	Estômago (g)
Veículo	1,11±0,01	1,87±0,01	10,58 ±0,49	2,60±0,14	1,04±0,05	1,76±0,01
ERSP	1,11±0,01	1,80±0,01	11,27 ±0,29	2,66±0,14	0,99±0,01	1,79±0,01

Resultados expressos como média ± e.p.m. utilizando teste *t* de student.

Tabela 31 - Avaliação da variação dos pesos dos órgãos dos ratas após exposição aguda.

Fêmeas	Coração (g)	Pulmão (g)	Fígado (g)	Rim (g)	Baço (g)	Estômago (g)
Veículo	1,01±0,03	1,84±0,02	10,40±0,47	2,95±0,22	1,01±0,05	1,70±0,030
ERSP	1,02±0,04	1,88±0,03	10,15±0,50	2,78±0,18	1,01±0,05	1,80±0,03

Resultados expressos como média ± e.p.m. utilizando teste *t* de student.

Nas tabelas 32 e 33 observamos os efeitos do ERSP frente aos parâmetros bioquímicos (TGO, TGP, FA, bilirrubina, uréia, creatinina), onde também não foram encontradas diferenças significativas em relação ao grupo controle, o que indica que o extrato não promoveu alterações metabólicas, principalmente, no fígado e rins. Estes achados corroboram com o evidenciado nas análises histopatológicas quanto a preservação dos tecidos.

Nas tabelas 34 e 35 são observados os valores referentes aos parâmetros hematológicos dos animais (Hemácias, hematócrito, plaquetas, VCM, HCM, CHCM, RDW, Leucócitos, segmentados, bastonetes, eosinófilos, basófilos, monócitos e linfócitos) após os 14 dias da administração do ERSP. Portanto, o ERSP apresentou baixa toxicidade frente ao modelo agudo na dose de 2000 mg/Kg.

Tabela 32. Avaliação dos parâmetros bioquímicos após exposição aguda dos ratos.

Parâmetros Bioquímicos	VEÍCULO	ERSP (2000 mg/Kg)
Ureia (mg/dL)	29,00±1,07	29,09±1,0
Creatinina (mg/dL)	0,29±0,02	0,29±0,03
TGO (U/L)	74,23±5,12	72,18±4,09
TGP (U/L)	41,77±4,28	40,97±3,26
Bilirrubina total (mg/dL)	10,97±2,87	11,09±2,03
Bilirrubina direta (mg/dL)	2,69±0,31	2,77±0,19
FA (mU/mL)	167.14±12.21	172.5±8.46

Resultados expressos como média ± e.p.m. utilizando teste *t* de student.

Tabela 33. Avaliação dos parâmetros bioquímicos após exposição aguda das ratas

	VEÍCULO	ERSP (2000 mg/Kg)
Ureia (mg/dL)	40,22±2,12	41,74±3,05
Creatinina (mg/dL)	0,35±0,04	0,35±0,05
TGO (U/L)	77,42±3,41	76,97±3,67
TGP (U/L)	37,68±3.57	36,22±3,83
Bilirrubina total (mg/dL)	12,21±2.45	12,93±1.88
Bilirrubina direta (mg/dL)	2,41±0,50	2,39±0,39
FA (mU/mL)	187,36±6.89	189,13±5.77

Resultados expressos como média ± e.p.m. utilizando teste *t* de student.

Tabela 34 - Hemograma dos ratos após exposição aguda.

	VEÍCULO	ERSP (2000 mg/Kg)
Hemácias ($10^6/\text{mm}^3$)	6,40 ± 0,85	6,51 ± 0,80
Hemoglobina (g/dL)	14,50 ± 0,82	14,79 ± 0,48
Hematócrito (%)	42,14 ± 1,95	41,72 ± 1,41
VCM (m^3)	51,96 ± 1,62	52,35 ± 1,94
HCM ($\text{g} \cdot 10^{-12}$)	16,21 ± 0,70	15,96 ± 0,72
CHCM (g/dL)	34,20 ± 1,75	33,83 ± 2,66
RDW (%)	14,50 ± 0,12	14,35 ± 0,20
Leucócitos ($10^3/\text{mm}^3$)	5,95 ± 0,94	6,13 ± 0,80
Segmentados (%)	27,8 ± 2,2	28,40 ± 1,2
Bastonetes (%)	0,40 ± 0,2	0,10 ± 0,1
Eosinófilos (%)	0,50 ± 0,2	0,60 ± 0,2
Linfócitos (%)	69,30 ± 2,0	68,80 ± 1,4
Monócitos (%)	2,20 ± 0,2	2,1 ± 0,5
Basófilos (%)	-	-

Resultados expressos como média ± e.p.m. utilizando teste *t* de student.

Tabela 35. Hemograma das ratas após exposição aguda.

	VEÍCULO	ERSP (2000 mg/Kg)
Hemácias ($10^6/\text{mm}^3$)	7,13 ± 0,47	7,38 ± 0,12
Hemoglobina (g/dL)	12,95 ± 0,94	12,07 ± 0,72
Hematócrito (%)	43,50 ± 1,55	42,59 ± 1,32
VCM (m^3)	48,50 ± 1,98	47,82 ± 2,46
HCM ($\text{g} \cdot 10^{-12}$)	14,36 ± 0,80	14,66 ± 0,90
CHCM (g/dL)	31,51 ± 1,98	32,04 ± 1,18
RDW (%)	14,20 ± 0,16	14,32 ± 0,10
Leucócitos ($10^3/\text{mm}^3$)	5,04 ± 0,62	5,35 ± 0,50
Segmentados (%)	24,3 ± 4,0	22,9 ± 3,6
Bastonetes (%)	1,2 ± 0,4	1,2 ± 0,5
Eosinófilos (%)	0,5 ± 0,2	0,7 ± 0,2
Linfócitos (%)	71,6 ± 2,2	72,4 ± 3,1
Monócitos (%)	2,4 ± 0,8	2,9 ± 0,4
Basófilos (%)	-	-

Resultados expressos como média ± e.p.m. utilizando teste *t* de student.

Vieira, et al. (2010) relatou que os extratos etanólicos tanto das folhas quanto dos frutos de *S. paniculatum* não apresentaram ação mutagênica em medula óssea de camundongos. No teste de toxicidade aguda realizado com a Ierobina®, produto fitofarmacêutico brasileiro composto por extratos fluidos de *Solanum paniculatum* (Solanaceae), *Remijia ferruginea* DC (Rubiaceae), *Jacaranda caroba* DC (Bignoniaceae) e *Erythraea Centaurium* (L.) Borkh. (Gentianaceae), as doses administradas não produziram nenhuma mortalidade e os sinais observados foram todos reversíveis (Tagliati, 2008). Corroborando com o observado em nosso estudo.

4.13.5 Avaliação da Toxicidade Subcrônica

Após a avaliação da toxicidade aguda, seguimos para a investigação de possíveis efeitos tóxicos em doses repetidas do ERSP a 500 mg/Kg. Na triagem comportamental foi observado um efeito antinociceptivo durante todo o período de análise, assim como observado na toxicidade aguda. Nenhuma morte ocorreu durante o tempo de monitoramento do experimento.

Não houve diferença significativa quanto ao consumo de água, ração e variação do peso dos animais (tabela 36 e 37). A análise anatomopatológica dos órgãos não revelou alterações quanto a consistência dos órgãos, presença de tumores, morfologia dos órgãos, coloração, corroborando com os dados obtidos quanto a massa dos órgãos analisados que não foram estatisticamente significantes (tabelas 38 e 39).

Tabela 36. Avaliação do consumo de água, ração e variação de peso durante 30 dias dos ratos.

Ratos	Dosagem	Água (ml)	Ração (g)	Peso (g)
Veículo	-	176.6 ± 1.50	148.9 ± 1.71	280.2 ± 2.08
ERSP	500 mg/Kg	176.1 ± 1.41	148.8 ± 1.86	282.6 ± 2.47
Satélite	500 mg/Kg	179.0 ± 1.43	148.2 ± 1.69	288.2 ± 2.53

Resultados expressos como média ± e.p.m. por análise de variância de uma via (ANOVA), seguido do pós-teste de Turkey.

Tabela 37. Avaliação do consumo de água, ração e variação de peso durante 30 dias dos ratas.

Ratas	Dosagem	Água (ml)	Ração (g)	Peso (g)
Veículo	-	150.4 ± 1.41	103.5 ± 1.32	255.6 ± 0.55
ERSP	500 mg/Kg	153.0 ± 1.50	104.5 ± 1.69	254.8 ± 0.42
Satélite	500 mg/Kg	151.3 ± 1.50	105.2 ± 1.33	254.2 ± 0.35

Resultados expressos como média ± e.p.m. por análise de variância de uma via (ANOVA), seguido do pós-teste de Turkey.

Tabela 38. Avaliação da variação dos pesos dos órgãos dos ratos após 30 dias.

MACHOS	Coração (g)	Pulmão (g)	Fígado (g)	Rim (g)	Baço (g)	Estômago (g)
Veículo	1.12±0.01	1.87±0.02	11.74±0.42	2.47±0.10	0.90±0.05	1.79±0.04
ERSP	1.12±0.02	1.88±0.03	12.31±0.49	2.61±0.11	0.93±0.04	1.87±0.05
Satélite	1.11±0.01	1.91±0.03	12.10±0.45	2.57±0.13	0.95±0.03	1.85±0.03

Resultados expressos como média ± e.p.m. por análise de variância de uma via (ANOVA), seguido do pós-teste de Turkey.

Tabela 39. Avaliação da variação dos pesos dos órgãos dos ratas após 30 dias.

FÊMEAS	Coração (g)	Pulmão (g)	Fígado (g)	Rim (g)	Baço (g)	Estômago (g)
Veículo	0.91±0.02	1.97±0.04	9.67±0.27	2.70±0.18	0.96±0.05	1.97±0.05
ERSP	0.98±0.03	2.01±0.04	10.16±0.25	2.72±0.12	0.99±0.04	2.03±0.09
Satélite	0.97±0.02	2.00±0.03	9.83±0.29	2.72±0.16	1.01±0.04	1.94±0.05

Resultados expressos como média ± e.p.m. por análise de variância de uma via (ANOVA), seguido do pós-teste de Turkey.

Nas análises histopatológicas, os tecidos se demonstraram preservados quanto às suas respectivas estruturas celulares, ratificando os resultados encontrados na análise dos parâmetros bioquímicos que demonstram que o ERSP não ocasionou alterações nas taxas dos marcadores do fígado e rins, nos animais de ambos os sexos (tabela 40 e 41).

Tabela 40. Avaliação dos parâmetros bioquímicos dos ratos no modelo crônico

	VEÍCULO	ERSP (500 mg/Kg)	SATÉLITE (500 mg/Kg)
Ureia (mg/dL)	31.00±1.09	31.13±0.8	31.33±0.9
Creatinina (mg/dL)	0.30±0.02	0.29±0.02	0.31±0.02
TGO (U/L)	71.65±3.45	72.80±2.36	73.13±2.36
TGP (U/L)	39.83±3.49	37.67±3.99	37.50±3.70
Bilirrubina total (mg/dL)	11.41±1.28	11.97±1.15	11.86±1.37
Bilirrubina direta (mg/dL)	2.77±0.37	3.03±0.30	3.33±0.44
FA (mU/mL)	159.70±10.07	181.5±7.57	186.5±6.10

Resultados expressos como média ± e.p.m. por análise de variância de uma via (ANOVA), seguido do pós-teste de Turkey.

Tabela 41. Avaliação dos parâmetros bioquímicos dos ratos no modelo crônico

	VEÍCULO	ERSP (500 mg/Kg)	SATÉLITE (500 mg/Kg)
Ureia (mg/dL)	43.93±3.46	47.37±3.19	48.68±3.98
Creatinina (mg/dL)	0.38±0.05	0.37±0.04	0.44±0.04
TGO (U/L)	74.75±3.79	76.05±4.71	75.35±3.20
TGP (U/L)	38.18±2.25	30.83±2.40	33.67±2.29
Bilirrubina total (mg/dL)	14.33±1.68	14.57±0.90	12.34±1.19
Bilirrubina direta (mg/dL)	2.67±0.35	2.43±0.17	2.55±0.20
FA (mU/mL)	166.50±5.78	170.80±2.91	171.70±1.84

Resultados expressos como média ± e.p.m. por análise de variância de uma via (ANOVA), seguido do pós-teste de Turkey.

Além disso, o ERSP não interferiu de forma significativa nos parâmetros hematológicos dos animais de ambos os sexos, tanto a série vermelha quanto a série branca foram preservadas, não apresentando eventos inflamatórios ou anemia, demonstrando a segurança do ERSP (tabelas 42 e 43).

Tabela 42. Hemograma dos ratos no modelo crônico

	VEÍCULO	ERSP (500 mg/Kg)	SATÉLITE (500 mg/Kg)
Hemácias ($10^6/\text{mm}^3$)	6.20 ± 0.60	6.72 ± 0.25	6.45 ± 0.32
Hemoglobina (g/dL)	15.45 ± 0.69	15.62 ± 0.26	15.63 ± 0.31
Hematócrito (%)	41.88 ± 1.53	43.52 ± 1.23	45.02 ± 1.47
VCM (m^3)	54.83 ± 1.76	52.83 ± 2.07	54.50 ± 2.50
HCM ($\text{g}\cdot 10^{-12}$)	16.33 ± 0.80	17.17 ± 0.87	16.83 ± 0.79
CHCM (g/dL)	32.33 ± 2.07	33.17 ± 2.26	37.67 ± 2.64
RDW (%)	14.33 ± 0.13	14.43 ± 0.13	14.40 ± 0.11
Leucócitos ($10^3/\text{mm}^3$)	5.38 ± 0.25	5.70 ± 0.17	5.55 ± 0.23

Segmentados (%)	32.8 ± 3.2	42.0 ± 3.8	23.5 ± 4,2
Bastonetes (%)	1.3 ± 0.4	1,6 ± 0,8	1,2 ± 0,3
Eosinófilos (%)	0.2 ± 0.2	0,6 ± 0,5	0,4 ± 0,2
Linfócitos (%)	60.4 ± 5.6	48.2 ± 3.1	53.0 ± 3.9
Monócitos (%)	2.6 ± 0.4	3.4 ± 0.7	2,7 ± 1,4
Basófilos (%)	-	-	-

Resultados expressos como média ± e.p.m. por análise de variância de uma via (ANOVA), seguido do pós-teste de Turkey.

Tabela 43. Hemograma das ratas no modelo crônico

	VEÍCULO	ERSP (500 mg/Kg)	SATÉLITE (500 mg/Kg)
Hemácias (10⁶/mm³)	8.23 ± 0.36	8.58 ± 0.20	8.65 ± 0.18
Hemoglobina (g/dL)	11.68 ± 0.54	10.95 ± 0.52	11.05 ± 0.46
Hematócrito (%)	43.50 ± 1.23	43.33 ± 1.26	42.17 ± 1.35
VCM (m³)	47.67 ± 1.43	45.33 ± 2.07	48.33 ± 2.03
HCM (g.10⁻¹²)	14.17 ± 0,94	14.83 ± 0,91	15.83 ± 0,79
CHCM (g/dL)	31.67 ± 1,63	33.17 ± 1.20	32.17 ± 1.49
RDW (%)	14.33 ± 0.14	14.48 ± 0.20	14.60 ± 0.15
Leucócitos (10³/mm³)	5.38 ± 0.25	5.70 ± 0.17	5.55 ± 0.23
Segmentados (%)	32.8 ± 3.2	42.0 ± 3.8	23.5 ± 4,2
Bastonetes (%)	1.3 ± 0.4	1,6 ± 0,8	1,2 ± 0,3
Eosinófilos (%)	0.2 ± 0.2	0,6 ± 0,5	0,4 ± 0,2
Linfócitos (%)	60.4 ± 5.6	48.2 ± 3.1	53.0 ± 3.9
Monócitos (%)	2.6 ± 0.4	3.4 ± 0.7	2,7 ± 1,4
Basófilos (%)	-	-	-

Resultados expressos como média ± e.p.m. por análise de variância de uma via (ANOVA), seguido do pós-teste de Turkey.

O estudo da toxicidade crônica realizado por Tagliati et al. (2008) com a lerobina®, não foram verificadas diferenças significativas nas análises hematológicas, na análises macroscópicas e microscópicas dos órgãos. Nos exames bioquímicos, encontraram diferença significativa na avaliação da alanina aminotransferase, aspartato aminotransferase e creatinina. Todavia, a lerobina® é composta por um complexo de espécies vegetais entre elas a *S. paniculatum*.

Contudo, observamos que o ERSP apresentou baixa toxicidade, na dose de 500 mg/Kg, frente ao modelo de doses repetidas por um período de trinta dias, indicando que o nível de efeito adverso não observado (NOAEL) pode ser maior ou igual a 500 mg/Kg, parâmetro este de grande importância para a escolha da dose para ensaios clínicos de fase I.

4.14 Avaliação da atividade antidiarreica

4.14.1 Diarreia induzida por óleo de rícino

Os resultados da avaliação do efeito do ERSP frente a diarreia induzida por óleo de rícino pode ser observada na tabela 44. O ERSP reduziu de forma significativa a diarreia em todas as doses avaliadas quando comparado ao grupo tratado apenas com o veículo.

Tabela 44. Efeito do ERSP frente a diarreia induzida por óleo de rícino em ratos.

Grupo	Dose (mg/Kg)	Peso das fezes (g)	Inibição (%)
Veículo	-	11.17 ± 0.70	-
Loperamida	5	3.81 ± 0.13 ^b	65.9
	125	6.54 ± 0.16 ^b	41.5
ERSP	250	6.26 ± 0.28 ^b	44.0
	500	5.59 ± 0.10 ^b	50.0

Valores expressos como Média ± e.p.m, ^b $p < 0.01$ em relação ao grupo veículo por análise de variância de uma via (ANOVA) seguido do teste de Turkey.

4.14.2 Acúmulo de fluido intestinal induzido por óleo de rícino

Na tabela 45 podem ser observados os resultados para o experimento de acúmulo de fluido intestinal induzido por óleo de rícino. A quantidade do conteúdo intestinal foi aumentado no grupo tratado com o veículo (3.277 ± 0.18) quando comparado ao grupo Scham (2.040 ± 0.03), que não recebeu nenhum tratamento. O grupo que recebeu a loperamida (fármaco de referência) apresentou uma redução

significativa (2.392 ± 0.05) quando comparado ao grupo veículo. Todos os grupos que foram administrados com o ERSP (125, 250 e 500 mg/Kg) reduziram significativamente o peso do conteúdo intestinal quando cotejados com o controle negativo.

Tabela 45 - Efeito do ERSP frente ao acúmulo de fluido intestinal induzido por óleo de rícino

Grupo	Dose (mg/Kg)	Conteúdo Intestinal (g)	Inibição (%)
Scham		2.040 ± 0.03	-
Veículo		3.277 ± 0.18	-
Loperamida	5	2.392 ± 0.05^b	27.0
	125	2.788 ± 0.08^a	14.9
ERSP	250	2.657 ± 0.08^a	18.9
	500	2.402 ± 0.14^b	26.7

Valores expressos como Média \pm e.p.m, ^a $p < 0.05$ e ^b $p < 0.01$ em relação ao grupo veículo por análise de variância de uma via (ANOVA) seguido do teste de Turkey.

4.14.3 Avaliação do ERSP frente a Motilidade Intestinal

Na tabela 46 podemos analisar os resultados para o efeito do ERSP frente a motilidade intestinal. O grupo controle positivo (veículo) apresentou a maior distância percorrida pelo carvão ativo em relação ao comprimento total do intestino delgado ($73.88 \pm 1.34\%$). Todos os grupos que foram tratados com o ERSP reduziram significativamente a motilidade intestinal quando comparados ao controle positivo, a resposta anti-motílica do ERSP apresentou um perfil dose-depente. O ERSP na dose de 500 mg/Kg apresentou efeito estatisticamente similar ao grupo tratado com a Loperamida (5 mg/Kg).

Tabela 46. Efeito do ERSP sobre o a motilidade intestinal

Grupo	Dose (mg/Kg)	Distância percorrida pelo carvão (%)	Inibição (%)
Veículo	-	73.88 ± 1.34	-
Loperamida	5	52.45 ± 2.28 ^b	47.5
	125	64.62 ± 1.87 ^a	35.4
ERSP	250	61.92 ± 1.80 ^a	38.0
	500	55.86 ± 3.40 ^b	44.1

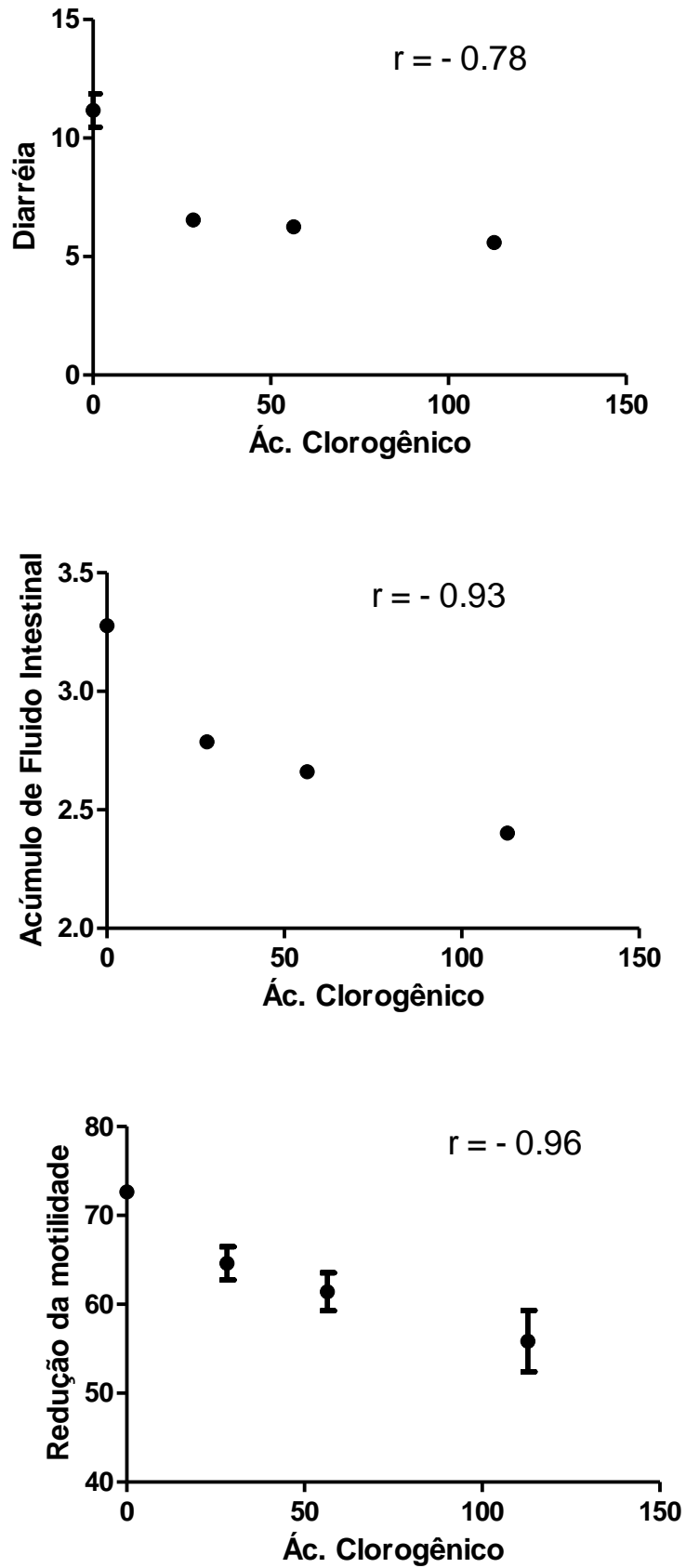
Valores expressos como Média ± e.p.m, ^a $p < 0.05$ e ^b $p < 0.01$ em relação ao grupo veículo por análise de variância de uma via (ANOVA) seguido do teste de Turkey.

Diarreia é a passagem frequente de fezes líquidas que envolve tanto um aumento da motilidade do trato gastrointestinal, quanto o aumento da secreção e redução da absorção de água e eletrólitos (WANG et al., 2015). O modelo de trânsito gastrointestinal utilizando o carvão ativado como marcador, tem sido utilizado há mais de 60 anos como uma ferramenta simples e eficaz para avaliar o efeito de laxantes. Este método indica a distância máxima percorrida pelo marcador, carvão ativado, no intestino delgado em um intervalo de tempo após a sua administração. (SILVA et al, 2012). De acordo com este modelo, os extratos (ERSP) nas diferentes doses avaliadas reduziram significativamente a motilidade intestinal com uma relação dose-dependente quando comparados ao grupo veículo (tabela 46), os animais que receberam o SPRE na concentração de 500 mg/Kg apresentaram uma diminuição de cerca de 44%, o que demonstra que o SPRE possui efeito positivo na redução do trânsito intestinal.

O óleo Rícino induz a diarreia por provocar o aumento da secreção de fluídos e eletrólitos na luz intestinal através da mucosa intestinal, o que provoca um acúmulo de fluído e um conteúdo luminal aquoso que percorre rapidamente através do intestino (WANG et al., 2015). A liberação do ácido ricinoleico produz mudanças

no transporte de água e eletrólitos, reduzindo a absorção de Na^+ e K^+ , diminuindo a atividade da Na^+ , K^+ -ATPase no intestino delgado e no colón, resultando numa resposta hipersecretória e num trânsito intestinal rápido (DASH et al., 2014). O óleo Rícino aumenta a produção ou liberação de prostaglandinas (SAITO et al., 2002), causa mudança na permeabilidade, injúrias na mucosa e estimula a biossíntese de PAF (fator de agregação plaquetário) (IZZIO et al., 1998) que pode resultar numa inflamação na mucosa intestinal. O extrato das raízes de *Solanum paniculatum* L. no modelo de diarreia induzida por óleo Rícino reduziu significativamente a diarreia, em todas as doses testadas, quando comparada ao grupo controle que recebeu apenas o veículo (tabela 44). Apresentou uma redução de cerca de 50% da diarreia, além de fezes com consistência sólida e uma frequência de evacuações reduzidas em relação ao grupo controle.

Outro resultado observado neste trabalho foi a redução do acúmulo de fluido intestinal induzido por óleo Rícino, os extratos de *S. paniculatum* reduziram o acúmulo de fluido intestinal em todas as doses avaliadas 125, 250 e 500 mg/Kg, apresentando uma porcentagem de inibição de 14.9%, 18.9% e 26.7%, respectivamente, demonstrando uma relação de dose-dependência. A dose de 500 mg/Kg exibiu os melhores resultados com uma taxa de inibição semelhante a Loperamida (tabela 45). A redução do acúmulo de fluido intestinal promovido pelo SPRE pode estar relacionado a presença do ácido clorogênico, visto que a hipersecreção intestinal do modelo de acúmulo de fluido envolve uma resposta inflamatória (IZZIO et al., 1998), sendo a atividade anti-inflamatória do ácido clorogênico amplamente conhecida (GUO, 2015). Para evidenciarmos a hipótese da atividade antidiarreica estar relacionada ao ácido clorogênico, realizamos uma análise de correlação de Pearson levando em consideração o teor de ácido clorogênico presente nas diferentes doses do ERSP analisadas e as respostas obtidas para os diferentes modelos investigados (figura 25).

Figura 25 - Análise de Correlação de Pearson entre a atividade antidiarreica e o teor de Ác.

Observamos que no modelo de diarreia induzida por óleo de rícino a redução da diarreia promovida pelo ERSP está correlacionada, de modo inversamente proporcional, com a presença do ácido clorogênico ($r = -0.78$), o que pode indicar que o ácido clorogênico está contribuindo com a atividade, entretanto não é o único responsável, indicando que outras substâncias bioativas presentes no ERSP também estão exercendo influência na resposta. Já para a redução no acúmulo de fluido intestinal induzido por óleo de rícino e do efeito anti-motílico provocado pelo ERSP, foram encontrados índices de correlação de -0.93 e -0.96 , respectivamente, indicando que o efeito promovido pelo ERSP está fortemente correlacionado com a presença do ácido clorogênico.

Assim, o extrato das raízes de *Solanum paniculatum* L. possui atividade antidiarreica diminuindo o peso das fezes, minimizando o acúmulo de fluido intestinal e reduzindo o trânsito intestinal, estando estes efeitos correlacionado com a presença do ácido clorogênico, corroborando com os dados etnofarmacológicos da medicina popular brasileira.

4.15 Atividade anti-inflamatória

4.15.1 Edema de pata induzido por carragenina

No modelo de edema de pata induzido por carragenina, o ERSP reduziu significativamente o edema até a quarta hora, em todas as doses avaliadas, o edema produzido (Tabela 47, Figura 26).

O modelo de edema de pata em ratos tem sido amplamente utilizado na pesquisa de novas drogas. A inflamação induzida pela carragenina é um processo agudo, altamente reproduzível e bem estudado. O desenvolvimento do edema induzido por carragenina é um modelo bifásico, com vários mediadores atuando em sequência para produzir a resposta inflamatória. Na fase inicial (1-2 h) ocorre liberação de histamina, serotonina, bradicinina e citocinas que promovendo vasodilatação e o aumento da permeabilidade vascular. Além de desencadearem a formação do edema, estes mediadores contribuem fortemente com a migração celular, principalmente de neutrófilos para o sítio inflamatório. A fase posterior (3-4 h)

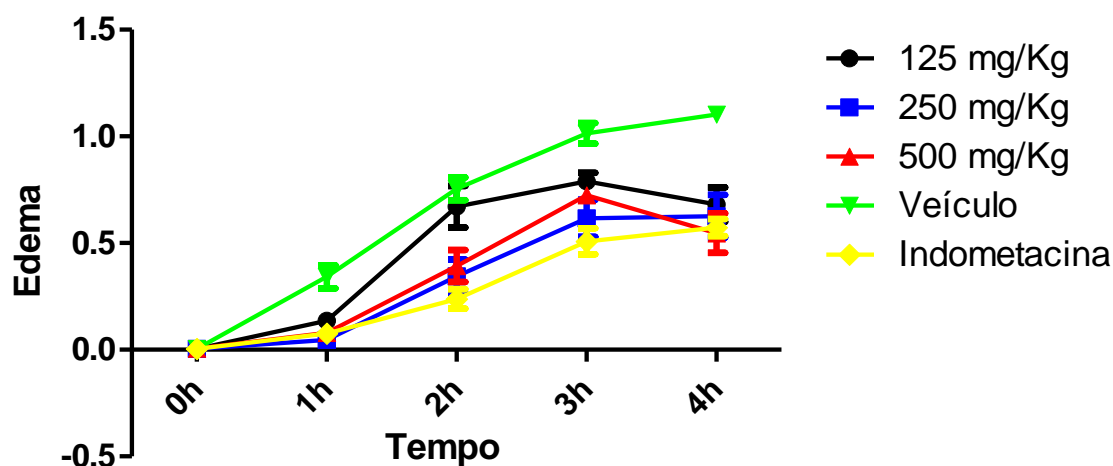
esta correlacionada com elevada produção de prostaglandinas, ativação da COX-2 e liberação de NO.

Tabela 47. Efeito do ERSP no edema de pata induzido por carragenina

Grupo	Dose (mg/Kg)	Volume Edema de pata (mL)			
		1h	2h	3h	4h
Veículo	-	0,34 ± 0,05	0,75 ± 0,05	1,01 ± 0,04	1,10 ± 0,17
ERSP	125	0,13 ± 0,01*	0,67 ± 0,09	0,79 ± 0,03*	0,68 ± 0,08*
	250	0,04 ± 0,03**	0,34 ± 0,07**	0,61 ± 0,08**	0,62 ± 0,10**
	500	0,08 ± 0,01**	0,39 ± 0,07**	0,72 ± 0,03**	0,54 ± 0,09**
Indometacina	10	0,07 ± 0,02**	0,23 ± 0,04**	0,50 ± 0,06**	0,57 ± 0,04**

Resultados expressos como média ± d.p. por análise de variância de duas vias (ANOVA) seguido do teste de Bonferroni. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

Figura 26 - Resultados do ERSP frente ao edema de pata.

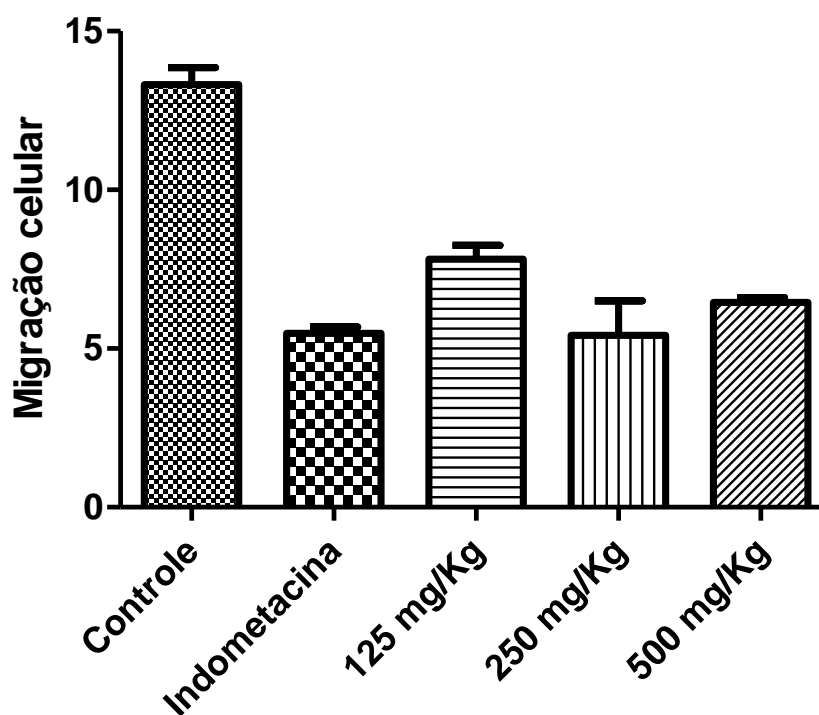


O ERSP em todas as doses (125, 250 e 500 mg/kg) causaram inibição do edema na fase inicial da resposta inflamatória induzida por carragenina. Com base nesta observação, pode-se sugerir seu efeito anti-inflamatório está relacionado a inibição da liberação de mediadores inflamatórios relacionados a inflamação aguda, especificamente os mediadores liberados na primeira fase, como histamina, serotonina e bradicinina.

4.15.2 Método do Bolsão de Ar Subcutâneo

Os resultados da atividade anti-inflamatória para este teste encontram-se na figura 27. Todas as doses apresentaram atividade anti-inflamatória indicada por uma diminuição significativa na migração celular quando comparados ao controle negativo. Os resultados mostraram que as melhores doses foram 250 e 500 mg/kg reduzindo a migração celular.

Figura 27 -Efeito do ERSP frente a migração celular no modelo de bolsão.



O modelo de bolsão de ar é comumente usado nos testes de triagem de drogas para o tratamento da artrite, pois mimetiza a membrana sinovial inflamada de pacientes com artrite reumatoide, com infiltração de polimorfonucleares e liberação de mediadores pro-inflamatórios.

4.15.3 Determinação dos Níveis de TNF- α

A dose de 500 mg/Kg do ERSP foi escolhida para determinação da concentração de TNF- α do exsudato inflamatório do teste do bolsão de ar. Visto que esta dose apresentou a melhor resposta no modelo de bolsão de ar.

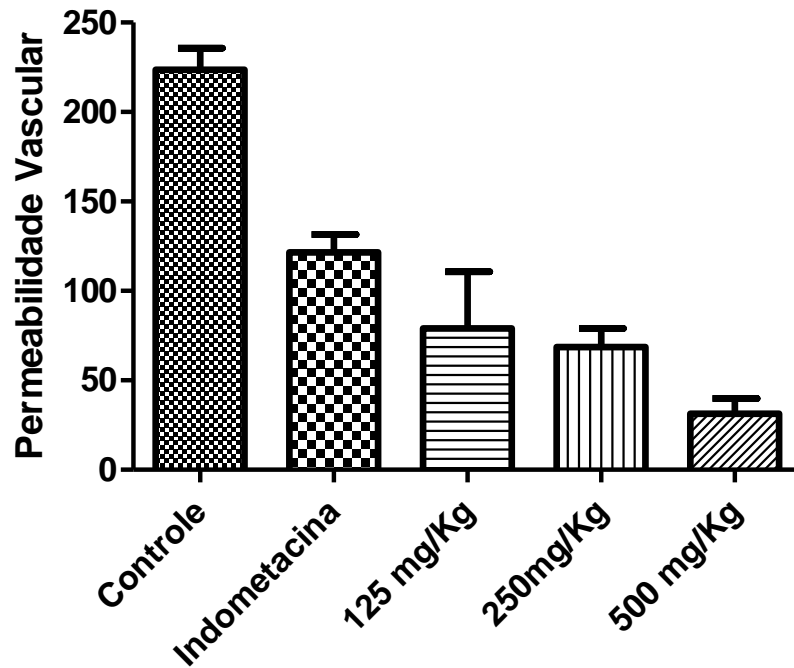
Foi observado que o ERSP 500 mg/Kg apresentou uma concentração de $388,70 \pm 17,35$ pg/mL de TNF- α , resultado significativamente inferior quando comparado ao fármaco de referência (indometacina) que expressou o resultado de $425,17 \pm 16,15$ pg/Kg.

Portanto a atividade anti-inflamatória do ERSP está relacionada, em parte, com a redução da transmigração de células polimorfonucleares para o local da inflamação, por diminuir a liberação de TNF- α .

4.15.4 Permeabilidade Vascular

O ERSP apresentou influência sobre a permeabilidade vascular, reduzindo significativamente a passagem do azul de Evans quando comparado com o grupo controle negativo de forma dose-dependente. Além disso, todas as doses apresentaram diferença significativa em relação a indometacina (Figura 28).

Figura 28 - Efeito do ERSP frente a permeabilidade Vascular.



O ácido acético utilizado neste modelo, atua liberando mediadores endógenos que provocam, em nível peritoneal, um aumento nos índices de PGE₂ e PGF₂, serotonina, histamina, bradicinina e citocinas, como TNF- α e IL-8 (RIBEIRO et al., 2000).

Portanto, os resultados obtidos no modelo de permeabilidade vascular corrobora o fato do ERSP apresentar atividade anti-inflamatória por atuar na liberação de aminas vasoativas, reduzindo a migração de leucócitos, minimizando a formação de edema e a permeabilidade vascular de exsudato.

5 CONCLUSÃO

A *S. paniculatum* L. possui afinidade por solos ricos em cálcio existindo uma correlação positiva na absorção do cálcio com o ferro, sódio, potássio e negativa do cálcio, magnésio e zinco;

As raízes da *S. paniculatum* possui valor nutricional, sendo predominante a presença de carboidratos e fibras, além de diversidade no conteúdo de minerais com prevalência do cálcio;

O ERSP possui como marcador químico o ácido clorogênico, o qual pode ser caracterizado pela metodologia desenvolvida e validada pela RE 899/2003, além de apresentar estabilidade térmica e um perfil de degradação, caracterizado em treze etapas por TG e DTA;

O emprego de técnicas estatísticas de otimização de processos possibilitaram um aumento significativo na extração dos compostos fenólicos por maceração, ultrassom e micro-ondas;

O ERSP apresentou atividade antimicrobiana frente a micro-organismos patogênicos e prolongou o período de oxidação do óleo de soja em métodos acelerados;

O ERSP demonstra-se seguro em ratos frente à exposição aguda e subcrônica, apresenta atividade antidiarreica pela capacidade de reduzir o acúmulo de fluido intestinal, minimizar a diarreia e moderar o trânsito intestinal e possui atividade anti-inflamatória, provavelmente por atuar na liberação de aminas vasoativas, reduzir a migração de leucócitos, minimizar a formação de edema e a permeabilidade vascular.

Estas análises contribuem para o controle de qualidade de *S. paniculatum*, envolvendo a padronização do solo, teor de metabólitos primários, valor energético e nutricional, perfil de degradação térmico, teor de fenólicos totais, definição do marcador químico e validação de metodologia para sua análise, além de ser determinada a sua segurança e eficácia farmacológica pré-clínica, pontos estes fundamentais para o desenvolvimento de um produto a base da *Solanum paniculatum* L.

REFERÊNCIAS

- ADEBAL, A. F; DÉLIO, C.; DIAS, M.B. **Toxicologia na prática clínica**. Belo Horizonte: Folium, 2001.
- AGRA, M. F. Estudo taxonômico do gênero *Solanum* L. (Solanaceae) em João Pessoa, Paraíba, Brasil. 1991. Dissertação (Mestrado em Botânica)-Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 1991.
- AGRA, M. F. Plantas da medicina popular dos Cariris Velhos, Paraíba, Brasil. **João Pessoa, Editora União**, 1996.
- AGRA, M. F., BARACHO, G. S., NURIT, K., BASÍLIO, I.J.L.D., COELHO, V. P. M. Medicinal and poisonous diversity of the flora of “Cariri Paraibano, Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 111, n. 2, p. 383-395, 2007.
- AGRA, M.F. A new species of *Solanum* subgenus *Leptostemonum* (Solanaceae) from Chapada da Diamantina, Bahia, Brazil. **Novon**, v.9, n.3, p.292-295, 1999a.
- AGRA, M.F. **Revisão Taxonômica de *Solanum* sect. *Erythrotrichum* Child (Solanaceae)**. São Paulo, 292p. Tese de Doutorado em Ciências Biológicas, Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, 2000.
- AGRA, M.F.; BHATTACHARYYA, J. Ethnomedicinal and phytochemical investigation of the *Solanum* species in the Northeast of Brazil. In: NEE, M.S., D.E.; LESRER, R.N.; JESSOP, J.P. Solanaceae IV. **Royal Botanic Gardens**, Kew, p. 341 343, 1999b.
- AGRA. Diversidade e Endemismo das Solanaceae no Brasil. In: Loiola, M. I. B., Baseia, I. G., Lichston, J. E. (orgs.). **Atualidades, Desafios e Perspectivas da Botânica no Brasil**. Natal: Imagem Gráfica, v. 1, 285-287, 2008.
- AHMED S, HASAN MM, AHMED SW, MAHMOOD ZA, AZHAR I AND HABTEMARIAM S. Anti-emetic effects of bioactive natural products. **Phytoparmacol.**, 4: 390-433, 2013.
- ALMEIDA R.N; FALCÃO A.C.G.M; DINIZ R.S.T; QUINTANS-JÚNIOR L.J; POLARI R.M; BARBOSA-FILHO J.M; AGRA M.F; DUARTE J.C; FERREIRA C.D; ANTONIOLLI A.R; ARAÚJO C.C. Metodologia para avaliação de plantas com atividade no Sistema Nervoso Central e alguns dados experimentais. **Rev Bras Farmacogn.**, 80:72-6, 1999.
- ALMEIDA, R. N. **Psicofarmacologia – Fundamentos Práticos**, Editora Guanabara Koogan S.A., Rio de Janeiro, p. 131-137, 2006.
- ALVES, M.J.Q.F. Estudos pré-clínicos com plantas medicinais: base para a fitoterapia. In: FERRO, D. **Fitoterapia: conceitos clínicos**. Sao Paulo, Editora Atheneu, 2006.

ANDRADE, A. A. B. D.; ARAUJO, A. L.; DINIZ, M. F. F. M.; OLIVEIRA, R. A. G.; MENDONÇA, F.; MENDONÇA, D. Use of medicinal plants during the puerperal gravid cycle. **Jornal Brasileiro de Ginecologia**, v. 106, n. 5, p.177 - 185, 1996.

ANTUNES, R. M. P. **Espécies vegetais com atividade antibacteriana sobre bactérias fitopatogênicas da batata**. 2001. Dissertação (Mestrado em Desenvolvimento e Meio Ambiente) - Universidade Estadual da Paraíba, Campina Grande, 2001.

APAC - AGÊNCIA PERNAMBUCANA DE ÁGUAS E CLIMA. **Boletim de informações climáticas do mês de janeiro de 2012**, ano II, n. 1, 2012.

ARAN, H. D. V., do Carmo VIEIRA, M., HEREDIA-ZÁRATE, N. A., GONÇALVES, W. V., & LIMA, V. T. Desenvolvimento Inicial de Jurubeba (*Solanum paniculatum* L.) em Substratos Contendo Resíduos Orgânicos e Calcário. **Cadernos de Agroecologia**, v. 9, n. 4, 2014.

BALICK, M. J.; COX, P. A. Plants, People and Culture: the Science of Ethnobotany. Scientific American Library, New York, **Journal of Natural Products**, v. 60, p. 428–429, 1997.

BARROS, S. B. M.; DAVINO, S. C. Avaliação da toxicidade. In: OGA, S. **Fundamentos de toxicologia**. 3a ed., São Paulo: Atheneu, p. 59-70, 2008.

BELKAID, A., CURRIE, J. C., DESGAGNÉS, J., & ANNABI, B. The chemopreventive properties of chlorogenic acid reveal a potential new role for the microsomal glucose-6-phosphatase translocase in brain tumor progression. **Cancer Cell Int.**, v. 6, n.1, p. 7-18, 2006.

BENTO, A.F.; AZEVEDO, M.S.; LUIZ, A.P.; MOURA, J.A.; SANTOS, A.R.S. Atividade antinoceptiva do extrato etanólico do fruto de *Solanum acanthodes* Hook.f. em camundongos. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.14, n.1, p.9-10, 2004.

BILATE, A. M. B. Inflamação, citocinas, proteínas de fase aguda e implicações terapêuticas. **Temas de reumatologia clínica**, v. 8, n. 2, p. 47-50, 2007.

BOHS, L. **Major clades in *Solanum* based on ndhF sequence data**. In: A Festschrift for William G. D'Arcy. Missouri Botanical Garden. Saint Louis. 27-49, 2007.

BOTION, L. M., FERREIRA, A. V. M., CÔRTEZ, S. F., LEMOS, V. S., BRAGA, F. C. Effects of the Brazilian phytopharmaceutical product Ierobina® on lipid metabolism and intestinal tonus. **Journal of ethnopharmacology**, v. 102, n. 2, p. 137-142, 2005.

BRANDÃO, M. G. L.; COSENZA, G. P.; STANISLAU, A. M.; FERNANDES, G. W. Influence of Brazilian herbal regulations on the use and conservation of native medicinal plants. **Environmental Monitoring Assessment**, v. 164, p. 369-377, 2010.

BRANDAO, M.; BOTELHO, M.; KRETTLI, E. Antimalarial experimental chemotherapy using natural products. **Ciencia Cultura**, v. 37, n. 7, p. 1152- 1163, 1985.

BRASIL, Resolução RE. nº 899, de 29 de maio de 2003. **Guia para validação de métodos analíticos**, 2003.

BRASIL. Agencia Nacional de Vigilancia Sanitaria. **Formulario de Fitoterpicos da Farmacopeia Brasileira**. Brasilia: Anvisa, 126p., 2011.

BRASIL. [DECRETO Nº 5.813, DE 22 DE JUNHO DE 2006](http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/Ato2004-2006/2006/Decreto/D5813.htm). Disponível em: http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/Ato2004-2006/2006/Decreto/D5813.htm. Acesso em 22 jul. 2015 b.

BRASIL. Portal Saúde. Disponível em http://portal.saude.gov.br/portal/saude/profissional/visualizar_texto.cfm?idtxt=30780. Acesso em 20 jul. 2015 a.

BRASIL. Relação nacional de plantas medicinais de interesse ao SUS. Espécies vegetais. Fev, 2009.

BRASIL. **Rotulagem nutricional obrigatória: manual de orientação às indústrias de Alimentos - 2º Versão** / Agência Nacional de Vigilância Sanitária – Ministério da Saúde/ Universidade de Brasília, 2005.

BRAZ-FILHO, R. Química de produtos naturais: importancia, interdisciplinaridade, dificuldades e perspectivas. **Química Nova**, v. 17, n. 5, p.405-445, 1999.

BRITO, A. R.M. S. Toxicologia pré-clínica de plantas medicinais. In: DI STASI, L. C. **Plantas medicinais: arte e ciência. Um guia de estudo interdisciplinar**. São Paulo: Ed. Da Universidade Estadual Paulista, p. 99-108, 1996.

BROWN, J.H.T., PALMER. Agonistas e antagonistas dos receptores muscarinicos. In: HARDMAN, J.G.L., L. E.; GILMAN, A. G. **As Bases Farmacológicas da Terapêutica**. 10.ed. Rio de Janeiro: Mc Graw Hill,. p.125-132, 2003.

BRUNTON, L.L.; LAZO, J.S.; PARKER, K.L. **Goodman e Gilman: as bases farmacológicas da terapêutica**. 12ª ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill; 2011.

BUCKEL, P. Toward a new natural medicine. **Naturwissenschaften**, v. 85, p. 155-163, 1998.

BUTTON, S. T. **Metodologia para planejamento experimental e análise de resultados**. 2005. Disponível em: <<http://www.fem.unicamp.br/~sergio1/pos-graduacao/IM317/apostila.pdf>>. Acessado em 03/05/2014.

CALADO, VERÔNICA; MONTGOMERY, D. C. Planejamento de Experimentos usando o. **Statistica**, p. 260, 2003.

CALIXTO, J. B. Twenty-five years of research on medicinal plants in LatinAmerica. A personal view. **Journal of Ethnopharmacology** v.100, p.131–134, 2005.

CAMBIAGHI, S.; DRADI, E.; LONGO, R. Structure and absolute configuration of new alkaloids from *Solanum paniculatum* L. **Annali di Chimica**, v. 61, n. 1, p. 99-101, 1971.

CAPASSO, F.; PINTO, A.; MASCOLO, N.; AUTORE, G.; FRANCO, M. Effects of flavonoids on PGE2 and LTD induced contractions on guinea pig isolated ileum. **Pharmacol Res Commun.** 20, 201–201. 1988.

.CASTAÑO, A.; LECHÓN, M. J. G. Comparison of basal cytotoxicity data between mammalian and fish cell lines: A literatura survey. **Toxicology in Vitro**, v. 19, p. 695-705, 2005.

CAVALCANTI, B. C.; ROSA, R. M.; MOURA, D. J.; SILVEIRA, E. R.; MORAES, M.O.; COSTA-LOTUFO, L. V.; BURBANO, R. R.; RAO, V. S. N.; PESSOA, C. Genotoxicity evaluation of kaurenoic acid, a bioactive diterpenoid present in Copaiba oil. **Food and Chemical Toxicology**, v. 44, p. 388-392, 2006.

CECHINEL-FILHO, V.; YUNES, R. A. Estrategias para obtencao de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais. Conceitos sobre modificacao estrutural para otimizacao da atividade. **Química Nova**. v.21. n.1, 1998.

CHETTY, VENKATESWARI J.; NARVÁEZ-VÁSQUEZ, JAVIER; OROZCO-CÁRDENAS, MARTHA L. Potato (*Solanum tuberosum* L.). In: **Agrobacterium Protocols**. Springer New York, p. 85-96, 2015.

CHIAPPETA, A. D. A.; MELLO, J. F.; MACIEL, G. M. Higher plants with biological activity - Plants of Pernambuco. I. Revista do Instituto de Antibióticos Universidade Federal de Pernambuco Recife, v. 21, n. ., p.43-50, 1983.

CLERICI, M. T. P. S., KALLMANN, C., GASPI, F. O. G., MORGANO, M. A., MARTINEZ-BUSTOS, F., & CHANG, Y. K. Physical, chemical and technological characteristics of *Solanum lycocarpum* A. St. - HILL (Solanaceae) fruit flour and starch. **Food Research International**, v. 44, n. 7, p. 2143–2150, 2011.

COLLINS, T. Acute and chronic inflammation. In: CONTRAN, R.S.; KUMAR, V.; COLLINS, T.; ROBBINS. **Pathologic basis of disease**. Philadelphia: WB Saunders Company, 1999.

COMMITTEE FOR MEDICINAL PRODUCTS FOR HUMAN USE et al. Committee for Medicinal Products for Human Use (CHMP) guideline on the choice of the non-inferiority margin. **Statistics in medicine**, v. 25, n. 10, p. 1628, 2006.

CORDEIRO, J. M. P.; FÉLIX, L. P. Conhecimento botânico medicinal sobre espécies vegetais nativas da caatinga e plantas espontâneas no agreste da Paraíba, Brasil. **Rev. bras. plantas med**, v. 16, n. 3, supl. 1, p. 685-692, 2014.

CORREA, M. P. Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas. Rio de Janeiro: Ministerio da Agricultura, Instituto Brasileiro de Desenvolvimento Florestal, v. 4, 1969.

COSTA-LOTUFO, L. V., CUNHA, G., FARIAS, P., VIANA, G., CUNHA, K., PESSOA, C., Moraes, M.O., Silveira, E.R., Gramosa, N.V., Rao, V.S.N. The cytotoxic and embryotoxic effects of kaurenoic acid, a diterpene isolated from *Copaifera langsdorffii* oleo-resin. **Toxicon**, v. 40, p.1231–1234, 2002.

CRUVINEL, W. D. M., MESQUITA JÚNIOR, D., ARAÚJO, J. A. P., CATELAN, T. T. T., SOUZA, A. W. S. D., SILVA, N. P. D., & ANDRADE, L. E. C. Sistema imunitário: Parte I. Fundamentos da imunidade inata com ênfase nos mecanismos moleculares e celulares da resposta inflamatória. **Rev. bras. reumatol**, v. 50, n. 4, p. 434-447, 2010.

CUNICO, M. W. M., CUNICO, M. M., MIGUEL, O. G., ZAWADZKI, S. F., PERALTA-ZAMORA, P., VOLPATO, N. Planejamento fatorial: uma ferramenta estatística valiosa para a definição de parâmetros experimentais empregados na pesquisa científica. **Visão Acadêmica**, v. 9, n. 1, p. 23-32, 2008.

CUZZOCREA, S. Shock, inflammation and PARP. **Pharmacological Research**, v.52,n. 1, p. 72-82, julho. 2005.

D'ARCY, W. G. The Classification of Solanaceae. In: HAWKES, J. G.; LESTER, R. N.; SKELDING, A. D. (eds.). *The Biology and Taxonomy of the Solanaceae*. London: Academic Press, p. 579-580, 1979.

D'ARCY, W.G. The Solanaceae since 1976, with a review of its biogeography. In: *Solanaceae III: taxonomy, chemistry, evolution*. Eds. Hawkes, J.G., Lester, R.N., Nee, M. and Estrada, N. 75-137. London: Kew Royal Botanical Gardens, 1991.

DA SILVA, J. E. **Aplicação de arranjos plackett-burman na modelagem de séries temporais lineares**. Tese de Doutorado. UNIVERSIDADE FEDERAL DE ITAJUBÁ, 2013.

DASH PR, NASRIN M, RAIHAN SZ, ALI MS. Study of antidiarrhoeal activity of two medicinal plants of Bangladesh in castor-oil induced diarrhea. **Int J Pharmaceut Sci Res**. 5:3864-68, 2014.

DAUNTER, B.; CHAM, B. E. Solasodine glycosides. In vitro preferential cytotoxicity for human cancer cells. **Cancer letters**, v. 55, n. 3, p. 209-220, 1990.

DE ALBUQUERQUE UP, DE MEDEIROS PM, DE ALMEIDA ALS, MONTEIRO JM, DE FREITAS LINS NETO EM, DE MELO JG AND DOS SANTOS JP . Medicinal plants of the caatinga (semi-arid) vegetation of NE Brazil: A quantitative approach. **J. Ethnopharmacol.**, 114: 325- 354, 2007.

DE MARZO, A. M.; PLATZ, E. A.; SUTCLIFFE, S.; XU, J.; GRÖNBERG, H.; DRAKE, C. G.; NAKAI, Y.; ISAACS, W. B.; NELSON, W. G. Inflammation in prostate carcinogenesis. **Nature Reviews Cancer**, v. 7, n. 4, p. 256-269, 2007.

DIOMANDE, L. B., AKOTTO, O. F., KANKO, C., TIA, V. E., & YAO-KOUAME, A. Occurrence and chemical composition of essential oil from *Lippia multiflora* M.(Verbenaceae) leaves as affected by soil carbon, nitrogen and phosphorus

contents in the centre Côte d'Ivoire. **International Journal of Agricultural Policy and Research**, v. 3, n. 1, p. 44-52, 2015.

DISTL, M.; WINK, M. Identification and Quantification of Steroidal Alkaloids from Wild Tuber-Bearing Solanum species by HPLC and LC-ESI-MS. **Potato Research**, v.52, n.1, p.79-104, 2009

DOLABELA, M. F. **Triagem in vitro para a atividade antitumoral e anti – T. Cruzei de extratos vegetais, produtos naturais e substâncias sintéticas**. 1997. 128 p. Tese (Mestrado) - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

DUAILIBE, S. A., MACEDO-COSTA, M. R. M., LIMA, K., & UZEDA, M. In vitro antibacterial activity of two plant extracts against Enterococcus faecalis. **African Journal of Microbiology Research**, v. 9, n. 14, p. 1020-1025, 2015.

EATON, D. L.; GILBERT S. G. Principles of toxicology. In: KLAASSEN, C. D. **Casarett & Doull's Toxicology: The basic science of poisons**, 7.ed. New York: MacGraw-Hill, cap. 2, p. 11-43, 2008.

EICH, ECKART. **Solanaceae and Convolvulaceae: Secondary metabolites: Biosynthesis, chemotaxonomy, biological and economic significance (a handbook)**. Springer Science & Business Media, 2008.

EMBRAPA. **Análises Químicas para Determinação da Fertilidade do Solo**. Circular Técnica, n. 3, 1998.

EMBRAPA. **Adubação e Correção do Solo: Procedimentos a Serem Adotados em Função dos Resultados da Análise do Solo**. Circular Técnica, n. 63, 2002.

EMERENCIANO, D. P., DA CRUZ, Â. M. F., DOS SANTOS PEREIRA, J. D., DE MOURA, M. D. F. V., & MACIEL, M. A. M. Determinação da Propriedade Antioxidante e Teores de Minerais Presentes nas Folhas de Azadirachta Indica A. Juss. **Revista Fitos Eletrônica**, v. 8, n. 2, p. 147-156, 2013.

ENDRINGER, D. C., VALADARES, Y. M., CAMPANA, P. R. V., CAMPOS, J. J., GUIMARÃES, K. G., PEZZUTO, J. M., BRAGA, F. C. Evaluation of Brazilian plants on cancer chemoprevention targets in vitro. **Phytotherapy Research**, v. 24, n. 6, p. 928-933, 2010.

FARMACOPÉIA DOS ESTADOS UNIDOS DO BRASIL. 2 ed. São Paulo, Ed. Gráfica Siqueira. p. 543-544, 1959. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br>.

FERREIRA S.H.; LORENZETTI, B.B.; POOLE, S. Bradykinin initiates cytokine mediated inflammatory hyperalgesia. **British Journal of Pharmacology**, v. 110, n. 3, p. 1227–1231, novembro. 1993.

FERREIRA, V. F. A Fitoterapia no Mundo Atual. **Química Nova**, Vol. 33, No. 9, 1829, 2010.

FERRO, D. Historia da Fitoterapia. In: **Fitoterapia: conceitos clinicos**. São Paulo, Editora Atheneu, 2006.

FIELD, M. Intestinal ion transport and the pathophysiology of diarrhea. **J Clin Invest**, v.111, n.7, apr. p.931-943. 2003.

FIRMO, W. D. C. A., COSTA, H. D., MENDES, H. B. R., GOSTINSKI, L. F., DIAS, I. C. L., SABBADINI, P. S., & NUNES, G. S., WELLYSON DA CUNHA ARAÚJO. Atividade Antibacteriana de Plantas Mediciniais: Uma Prospecção Tecnológica. **GEINTEC-Gestão, Inovação e Tecnologias**, v. 4, n. 5, p. 1564-1573, 2014.

FORNI-MARTINS, E. R.; MARQUES, M. C. M.; LEMES, M. R. Biologia floral e reprodução de *Solanum paniculatum* L.(Solanaceae) no estado de São Paulo, Brasil. **Brazilian Journal of Botany**, v. 21, n. 2, p. 117-124, 1998.

FOWLER, M. W. Review Plants, medicines and man. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 86, p. 1797-1804, 2006.

FRANKE, A.; LANTE, W.; FACKELDEY, V.; BECKER, H. P.; THODE, C.; KUHLMANN, W. D.; MARKEWITZ, A. Proinflammatory and antiinflammatory cytokines after cardiac operation: different cellular sources at different times. **The Annals of Thoracic Surgery**, v. 74, n. 2, p. 363-371, 2002.

FRIEDMAN, M. Potato glycoalkaloids and metabolites: Roles in the Plant and in the Diet. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 54 (23): 8655-8681, 2006.

GAROMBONE, E, ROSA, G. Possíveis benefícios do ácido clorogênico a saúde. **Alim. Nutr**, v. 18, p. 229-235, 2007.

GEPDIREMEN, A.; MSHVILDADZE, V.; SULEYMAN, H.; ELIAS, R. Acute and chronic anti-inflammatory effects of *Hedera colchica* in rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 94, n. 1, p. 191–195, 2004.

GOBBO-NETO, LEONARDO; LOPES, NORBERTO P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 374, 2007.

GOMES, A. D.; LIMA, R.A.; FACUNDO, V. A.. Identificação de classes de metabólitos secundários no extrato etanólico dos frutos de *solanum acanthodes* hook e seu potencial fungicida sobre *candida albicans* in vitro. **Revista Eletrônica em Gestão, Educação e Tecnologia Ambiental**, v. 18, n. 2, 2014.

GONG, F.; LIANG, Y.; XIE, P. et al. Information theory applied to chromatographic fingerprint of herbal medicine for quality control. **Journal of Chromatography A**, v.1002, p. 25 – 40, 2003.

GRIFFIN, J. W.; LINA, G. D. Chemotaxonomy and geographical distribution of tropane alkaloids. **Phytochemistry**, v. 53, n. 6, p. 623-637, 2000.

GUERRA A.S.H.S; MALTA D.J.N; LARANJEIRA L.P.M; MAIA M.B.S; COLAÇO N.C; LIMA M.C.A; GALDINO I.S.L; PITTA I.R; GONÇALVES-SILVA T. Anti-inflammatory and antinociceptive activities of indole-imidazolidine derivatives. **Int Immunopharmacol**. 11 (11): 1816-1822, 2011.

GUO Y.J.; LUO T.; WU F.; MEI Y.W.; PENG J.; LIU H.; LI H.R.; ZHANG S.L.; DONG J.H.; FANG Y.; ZHAO L. Involvement of TLR2 and TLR9 in the anti-inflammatory effects of chlorogenic acid in HSV-1-infected microglia. **Life Sci.**127:12-8, 2015.

GUZMÁN-RODRÍGUEZ, J. J.; OCHOA-ZARZOSA, A.; LÓPEZ-GÓMEZ, R.; LÓPEZ-MEZA, J. E. Plant Antimicrobial Peptides as Potential Anticancer Agents. **BioMed research international**, v. 2015, 2015.

HALL, C.A.; HOBBY, T.; CIPOLLINI, M. Efficacy and Mechanisms of α -Solasonine- and α -Solamargine-Induced Cytolysis on Two Strains of *Trypanosoma cruzi*. **Journal of Chemical Ecology**. v.32, n.1, p.2405-2416, 2006.

HEIDLAND, A; KLASSEN, A.; RUTKOWSKI, P.; BAHNER, U. The contribution of Rudolf Virchow to the concept of inflammation: what is still of importance? **Journal of Nephrology**, v.19, p. 102-109, maio/jun. 2006.

HUNZIKER, A.T. **The genera of Solanaceae**. Ruggell, A.R.G. Gantner, 2001.

IKEDA, T.; TSUMAGARI, H.; NOHARA, T.. Steroidal oligoglycosides from *Solanum nigrum*. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin-Tokyo**, v. 48, n. 7, p. 1062-1064, 2000.

INMET - Instituto Nacional de Meteorologia. **Banco de dados**: acessado em 28/07/2015 as 00:35.

INMETRO. **ABNT NBR ISO/IEC 17025: 2005-requisitos gerais para a competência de laboratórios de ensaio e calibração. General requirements for the competence of testing and calibration laboratories**. ABNT, 2005.

IWALEWA, E. O.; MCGAW, L. J.; NAIDOO, V.; ELOFF, J. N. Inflammation: the foundation of diseases and disorders. A review of phytomedicines of South African origin used to treat pain and inflammatory conditions. **African Journal of Biotechnology**, v. 6, n.25, p. 2868 2885, 2007.

IZZO AA, GAGINELLA TS, MASCOLO N, CAPASSO F. Recent findings on the mode of action of laxatives: the role of platelet activating factor and nitric oxide. **Trends Pharmacol Sci.**1998;19(10):403-5.

JOACHIMOVITS, R. The Uterotonic Activity of Several Brazilian Plants Including the Brazilian form of *Spartium Junceum*. **Scientia Pharmaceutica**, v. 22, p. 7, 1954.

JÚNIOR, G. M. V., DA ROCHA, C. Q., DE SOUZA RODRIGUES, T., HIRUMA-LIMA, C. A., & VILEGAS, W. New steroidal saponins and antiulcer activity from *Solanum paniculatum* L. **Food chemistry**, v. 186, p. 160-167, 2015.

JÚNIOR, O., SABINO, A. D. P., FIGUEIREDO, R. C., & RIOS, D. R. A. Inflammation and poor response to treatment with erythropoietin in chronic kidney disease. **Jornal Brasileiro de Nefrologia**, v. 37, n. 2, p. 255-263, 2015.

KAUR, H., SINGH, B. P., SINGH, H., & NAGPAL, A. K. Comparative Genomics of Ten Solanaceous Plastomes. **Advances in bioinformatics**, v. 2014, 2014.

KAZIYAMA, V.M.; FERNANDES, M.J.B.; SIMONI, I.C. Atividade antiviral de extratos de plantas medicinais disponíveis comercialmente frente aos herpesvírus suíno e bovino. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v.14, n.3, p.522-528, 2012.

KINGSTON, DAVID GI. Modern natural products drug discovery and its relevance to biodiversity conservation. **Journal of natural products**, v. 74, n. 3, p. 496-511, 2011.

KIRVESKARI, J.; HELINTO, M.; SAAREN-SEPPALA, H.; RENKONEN, R.; TERVO, T. Leukocyte rolling and extravasation in surgical inflammation after mechanical and laserinduced trauma in human patients. **Experimental Eye Research**, v. 77, n. 3, p. 387-390,2003.

KNAPP, S. Tobacco to tomatoes: a phylogenetic perspective on fruit diversity in the Solanaceae. **Journal of Experimental Botany**, v. 53, nº. 377, p. 2001-2022, 2002.

KNAPP, Sandra. Typification of *Solanum* (Solanaceae) species described by Martín de Sessé y Lacasta and José Mariano Mociño. In: **Anales del Jardín Botánico de Madrid**. p. 7-23, 2008.

KNAPP, S.; BOHS, L.; NEE, M.; SPOONER, D. M. Solanaceae - A model for linking Genomics with organisms. **International Plant & Animal Genomes XII Conference**, San Diego, CA. 5: 285–291, 2004.

KOLA, O., SIMSEK, M., DURAN, H., BOZKIR, H. HPLC Determination of Carotenoid, Organic Acid, and Sugar Content in Pepino (*Solanum muricatum*) Fruit During the Ripening Period. **Chemistry of Natural Compounds**, v. 51, n. 1, p. 132-136, 2015.

KONSMAN, J. P.; PARNET, P.; DANTZER, R. Cytokine-induced sickness behaviour: Mechanisms and implications. **Trends Neurosci**, v. 25, p. 154–159, 2002.

LEEKNING, M. E, ROCCA, M. A. Contribuicao para o estudo quimico dos frutos do *Solanum paniculatum* L. **Rev Fac Farm Odont Araraquara**, v.2, n. 2, p. 299–300, 1968.

LEMONS, J. R.; ARAUJO, J. L.. Estudo etnobotânico sobre plantas medicinais na comunidade de Curral Velho, Luís Correia, Piauí, Brasil. **Biotemas**, v. 28, n. 2, p. 125-136, 2015.

LI, H., DENG, Z., LIU, R., LOEWEN, S., TSAO, R. Bioaccessibility, in vitro antioxidant activities and in vivo anti-inflammatory activities of a purple tomato (*Solanum lycopersicum* L.). **Food chemistry**, v. 159, p. 353-360, 2014.

LÔBO, K.M.S.; ATHAYDE, A.C.R.; SILVA, A.M.A.; RODRIGUES, F.F.G.; LÔBO, I.S.; BEZERRA, D.A.C.; COSTA, J.G.M. Avaliação da atividade antibacteriana e prospecção fitoquímica de *Solanum paniculatum* L. e *Operculina hamiltonii* do semi-àrido paraibano **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v.12, n.2, p.127-233, 2010.

LOPES, W. B., MORONI, F. T., BRANDEBURGO, M. I. H., HAMAGUCHI, A. Desenvolvimento de um método alternativo ao uso de animais de laboratório para

avaliação da toxicidade de extratos vegetais. **Revista Eletrônica Horizonte Científico**, v. 1, p. 1-11, 2002.

LOU, Z., WANG, H., ZHU, S., MA, C., & WANG, Z. Antibacterial activity and mechanism of action of chlorogenic acid. **Journal of Food Science**, v. 76, n. 6, p. M398-M403, 2011.

LUBIAN, C. T, TEIXEIRA, J. M., LUND, R. G., NASCENTE, P. S., DEL PINO, F. A. B. Atividade antifúngica do extrato aquoso de *Arctium minus* (Hill) Bernh.(Asteraceae) sobre espécies orais de *Candida*. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 12, n. 2, p. 157-162, 2010.

LUNA, J. S.; SANTOS, A. F.; LIMA, M. R. F.; OMENA, M. C.; MENDONÇA, F. A. C.; BIEBER, L. W.; SANT'ANA, A. E. G. A study of the larvicidal and molluscicidal activities of some medicinal plants from northeast Brazil. **J. Ethnopharmacol.**, v. 97, p. 199-206, 2005.

MACEDO, M.; FERREIRA, A. R. Plantas hipoglicemiantes utilizadas por comunidades tradicionais na Bacia do Alto Paraguai e Vale do Guapore, Mato Grosso-Brasil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.14, supl.01, p.45-47,2004.

MACÊDO-COSTA, M. R., SETTE-DE-SOUZA, P. H., SILVA, J. F. E., DE FREITAS FERNANDES-PEDROSA, M., PEREIRA, M. D. S. V., & DE LIMA, K. C. Phytochemical screening and antibacterial activity of *Solanum paniculatum* Linn. against planktonic oral bacteria. **African Journal of Microbiology Research**, v. 8, n. 10, p. 1001-1005, 2014.

MAHATO, S. B.; GANGULY, A.N.; SAHU, N. P. Steroid saponins. **Phytochemistry**, v. 21, p. 959-978, 1982.

MALDINI, M. et al. Screening of the topical anti-inflammatory activity of the bark of *Acacia cornigera* Willdenow, *Byrsonima crassifolia* Kunth, *Sweetia panamensis* Yakovlev and the leaves of *Sphagneticola trilobata* Hitchcock. **Journal of Ethnopharmacology**, v.122, n.3, p.430-3, 2009.

MARCOS, L.A.; DUPONT, H,L. Advances in defining etiology and new therapeutic approaches in acute diarrhea. **J Infect.** 55, 385-393, 2007.

MARINHO, M. L.; ALVES, M. S.; RODRIGUES, M. L. C.; ROTONDANO, T. E. F.; VIDAL, L. F.; SILVA, W. W.; ATHAYDE, A. C. R. A utilização de plantas medicinais em medicina veterinária: um resgate do saber popular. **Rev. Bras. Pl. Med.** Botucatu, v. 9, n.3, p. 64-69, 2007.

MARQUES, RODRIGO DA SILVA; MIGUEL, JOÃO RODRIGUES; JASCONE, CARLOS EDUARDO SILVA. A família Solanaceae no Parque Natural Municipal da Taquara, Duque de Caxias, RJ, Brasil. **Saúde & Ambiente em Revista**, v. 7, n. 1, p. 19-23, 2012.

MARTÍN-FONTECHA, A.; THOMSEN, L. T.; BRETT, S.; GERARD, C.; LIPP, M.; LANZAVECCHIA, A.; SALLUSTO, F. Induced recruitment of NK cells to lymphnodes provides IFN- γ for TH1 priming. **Nature Immunology**. v. 5, n. 12, December, 2004.

MASCOLO, N.; IZZO, A.A.; AUTORE, G.; BARBATO, F.; CAPASSO, F. Nitric oxide and Castor oil-induced diarrhea. **J Pharmacol Exp Ther.** 268, 291–295. 1994.

MATEUS, N. B.; BARBIN, D.; CONAGIN, A.. Viabilidade de uso do delineamento composto central. **Acta Scientiarum. Technology**, v. 23, p. 1537-1546, 2008.

MATOS A.F.J. O Formulário Fitoterápico do prof. Dias da Rocha. **Coleção ESAM.** Ano XX, Vol CCLXV, 131–132, 1987.

MCDONALD, D. M.; THURSTON, G.; BALUK, P. Endothelial gaps as sites for plasma leakage in inflammation. **Microcirculation**, v. 6, p. 7-22, 1999.

MEIRA, P. **Dicionário brasileiro das plantas medicinais.** Sao Paulo: Kosmos, 1946.

MENDES, F. R., CARLINI, E. A. Brazilian plants as possible adaptogens: an ethnopharmacological survey of books edited in Brazil. **Journal of ethnopharmacology**, v. 109, n. 3, p. 493-500, 2007.

MESIA-VELA, S., SANTOS, M. T., SOUCCAR, C., LIMA-LANDMAN, M. T. R., LAPA, A. J. Solanum paniculatum L.(Jurubeba): Potent inhibitor of gastric acid secretion in mice. **Phytomedicine**, v. 9, n. 6, p. 508-514, 2002.

MESQUITA JÚNIOR, D., ARAÚJO, J. A. P., CATELAN, T. T. T., SOUZA, A. W. S. D., CRUVINEL, W. D. M., ANDRADE, L. E. C., & SILVA, N. P. D. Sistema imunitário-parte II: fundamentos da resposta imunológica mediada por linfócitos T e B. **Rev. bras. reumatol**, v. 50, n. 5, p. 552-580, 2010.

MEYER, B. N.; FERRIGNI, N. R.; PUTNAM, J. E.; JACOBSEN, L. B.; NICHOLS, D. E.; MCLAUGHLIN, J. L. Brine shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents. **Planta Med.**, v. 45, p. 31-4, 1982.

MEYER, O. Testing and assessment strategies, including alternative and new approaches. **Toxicology Letters**, Amsterdam, v.140, p. 21-30, 2003.

MILUTINOVIC, M.; RADOVANOVIC, N.; RAJILICSTOJANOVIC, M.; SILER-MARINKOVIC, S.; DIMITRIJEVIC, S.; DIMITRIJEVIC-BRANKOVIC, S. Microwave-assisted extraction for the recovery of antioxidants from waste Equisetum arvense. **Industrial Crops and Products**, 61, 388, 2014.

MINISTERIO DA SAUDE. Proposta da Política Nacional de Plantas Mediciniais e Fitoterapicos, 2001 [Online]. Home-page: http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/cd03_18.pdf.

MISSOURI BOTANICAL GARDEN. 2010. *Solanum paniculatum* L. Available at: <http://www.tropicos.org/Name/29600133> Access: 28 jul. 2015.

MOLMANN, J. A., STEINDAL, A. L., BENGTSSON, G. B., SELJÅSEN, R., LEA, P., SKARET, J., & JOHANSEN, T. J. Effects of temperature and photoperiod on sensory quality and contents of glucosinolates, flavonols and vitamin C in *Broccoli florets*. **Food chemistry**, v. 172, p. 47-55, 2015.

MONTGOMERY, D.C.; RUNGER, G.C. **Applied Statistics And Probability For Engineers**, Hoboken, John Wiley and Sons, 2007.

MOREIRA, R.R.D.; MARTINS, G.Z.; MAGALHÃES, N.O.; ALMEIDA, A.E.; PIETRO, R.C.L.R.; SILVA, F.A.J.; CICARELLI, R.M.B. In vitro trypanocidal activity of solamargine and extracts from *Solanum palinacanthum* and *Solanum lycocarpum* of brazilian cerrado. **Academia Brasileira de Ciências**, Rio de Janeiro, v. 85, n. 3, p. 903-907, 2013.

MORENO A. R. Two hundred sixty-eight Medicinal plants used to regulate fertility in some countries of South America. **Unpublished** (Stenciled) Review in spanish, Paraguay, 1975.

MURI, E. M. F.; SPOSITO, M. M. M.; METSAVAHT, L. Antiinflatórios nao-esteroidais e sua farmacologia local. **Acta fisiátrica**, v.16, n.4, p.186-190, 2009.

NAKAMURA, S.; HONGO, M.; SUGIMOTO, S.; MATSUDA, H.; YOSHIKAWA, M. Steroidal Saponins and Pseudoalkaloid Oligoglycoside from Brazilian 22 Natural Medicine, "Fruta do Lobo" (fruit of *Solanum lycocarpum*). **Phytochemistry**, v.69, n.1, p.1565-1572, 2008.

NASCIMENTO, J. E.; MELO, A. F. M.; LIMA E SILVA, T. C.; VERAS FILHO, J.; SANTOS, E. M.; ALBUQUERQUE, U. P.; AMORIM, E. L. C. Estudo fitoquímico e bioensaio toxicológico frente a larvas de *Artemia salina* Leach. de três espécies medicinais do gênero *Phyllanthus* (Phyllanthaceae). **Rev. Ciênc. Farm. Básica Apl.**, v. 29, p. 143-148, 2008.

NEE, M. Flora da Reserva Ducke, Amazonas, Brasil: Solanaceae. **Rodriguésia** 58 (3): 695-702, 2007.

NURIT SILVA, K.; BASÍLIO, I. J. L. D.; AGRA, M. F. Estudo farmacobotânico comparativo entre *Solanum paniculatum* L. e *Solanum rhytidoandrum* Sendtn. **R Bras Bioci**, v. 5, p. 243-245, 2007.

OBRADOVIC, M.; KRAJESEK, S. S.; DERMASTIA, M.; KREFT, S. A new method for the authentication of plant samples by analysing fingerprint chromatograms. **Phytochemical analysis**, v. 8, p. 123 – 132, 2007.

OLIVEIRA, G. A. A ação espasmolítica do óleo essencial de *Lippia microphylla* Cham. e de seus constituintes majoritários envolve o bloqueio do influxo de cálcio em íleo de cobaia. **Dissertação (Mestrado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos)**. Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, Paraíba, 2013.

OLMSTEAD, R. G.; LYNN BOHS, L.; MIGID, H. A.; SANTIAGO-VALENTIN, E.; GARCIA, V. F.; SARAH M. COLLIER, S. M. A molecular phylogeny of the Solanaceae. **Molecular Phylogenetics**, v. 57, p. 1159–1181, 2008.

PAWAR, N., GANDHI, K., PUROHIT, A., ARORA, S., & SINGH, R. R. B. Effect of added herb extracts on oxidative stability of ghee (butter oil) during accelerated oxidation condition. **Journal of food science and technology**, v. 51, n. 10, p. 2727-2733, 2014.

PERALTA-ZAMORA, P.; MORAIS, J. L.; NAGATA, N. Por que otimização cultivariada? **Engenharia Sanitária e Ambiental**, v. 10, n. 2, p. 106-110, 2005.

PIERCE, N.F.; CARPENTOR, C.C.J.; ELLIOR, H.; GREENOUGH, W.B. Effect of prostaglandin, theophyllin and cholera exotoxin upon transmucosal water and electrolyte movement in canine jejunum, **Gastroenterol.** 60, 22-32. 1971.

PINTO, A.C.; SILVA, D.H.S.; BOLZANI, V.D.; LOPES, N.P.; EPIFANIO, R.D. Current status, challenges and trends on natural products in Brazil. **Química Nova**, v.25, p.45-61, 2002.

PIO CORRÊA, M. **Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas**. Vol 4. Ministério da Agricultura, IBDF. Rio de Janeiro, 1969.

PISO, G.; MARCGRAVIUS, G. **Historia Naturalis Brasiliae**. Leiden Amsterdam, p. 122-123, 1648.

POTT, A. & POTT, V. **Plantas do Pantanal**. Embrapa. 1994.

RAMALHO, E. F. S. M.; ALBUQUERQUE, A. R.; SOUZA, A. L.; BARRO, A. K.; MAIA, A. S.; SANTOS, I. M. G.; SOUZA, A. G. Use of different techniques in the evaluation of the oxidative stability of poultry fat biodiesel. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 106, p. 787–791, 16 abr. 2011.

RAMOS, R. D. S.; RODRIGUES, A. B. L.; LOPES, G. A. D. C.; COSTA, J. D. S.; DOS SANTOS, C. B. R.; BEZERRA, R. M.; SOUTO, R. N. P.; ALMEIDA, S. S. M. D. S. D. Estudo físico-químico e avaliação do potencial larvicida do extrato etanólico das cascas do caule de *Licania macrophylla* benth. **biota amazônia**, v. 5, n. 1, p. 74-78, 2015.

RATES, S. M. K. Promoção do uso racional de fitoterápicos: uma abordagem no ensino de farmacognosia. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, 11: 57-69, 2001.

RATNAIKE, R.; MILTON, A.; NIGRO, O. Drug-associated diarrhoea and constipation in older people. 1. **Diarrhoea. Aust J Hosp Pharm.** 30, 165–169. 2000.

RENISUS, Ministério da Saúde – Brasil (2009). Disponível em: http://portal.saude.gov.br/portal/saude/profissional/visualizar_texto.cfm?idtxt=30277&janela=1.

RIBANI, M.; BOTTOLI, C. B. G.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F.; MELO, L. F. C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, v.27, n.5, p.771-780, 2004.

RIBEIRO, R. A.; FIUZA DE MELO, M. M. R.; DE BARROS, F.; GOMES, C.; TROLIN, G. Acute antihypertensive effect in conscious rats produced by some medicinal plants used in the state of Sao Paulo. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 15, n. 3, p. 261-269, 1986.

RIBEIRO, R.A.; VALE, M.L.; THOMAZZI, S.M. PASCHOALATO, A.B.P.; POOLE, S.; FERREIRA, S.H.; CUNHA, F.Q. Involvement of resident macrophages and mast cells

in the writhing nociceptive response induced by Zymosan and acetic acid in mice. **European Journal of Pharmacology**, v. 387, n. 1, p. 111-118, 2000.

RIPPERGER, H.; SCHREIBER, K. Structure of paniculonin A and B, two new spirostan glycosides from *Solanum paniculatum*. **Chemische Berichte**, v. 100, p. 240-2458, 1968.

RIPPERGER, H.; SCHREIBER, K.; BUDZIKIEWICZ, H. Isolation of neochlorogenin and paniculogenin from *Solanum paniculatum*: structure of paniculidine. **Chemische Berichte**, v. 100, p. 1741-1752. 1967b.

RODRIGUES, M. I., LEMMA, A. F. **Planejamento de Experimentos & Otimização de processos**. Editora Cárriita, 3ª edição, 2014.

RODRIGUEZ-VITA, J.; LAWRENCE, T. The resolution of inflammation and cancer. **Cytokine & Growth Factor Reviews**, v. 21, n.1, p. 61-65, 2010.

ROE, K.E.A Revision of *Solanum* section *Brevantherum* (Solanaceae). **Brittonia** **29**: 239-278, 1972.

ROSA C, CÂMARA SG, BÉRIA JU. Representações e intenção de uso da fitoterapia na atenção básica à saúde. **Ciênc Saúde Colet.**, v. 16, n.1, p. 311–318, 2012.

SÁ, R. C. S.; ALMEIDA, R. N. Toxicidade Aguda. In: ALMEIDA, R. N. **Psicofarmacologia – Fundamentos Práticos**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 124-130, 2006.

SAHREEN, S., KHAN, M. R., KHAN, R. A., & HADDA, T. B. Evaluation of phytochemical content, antimicrobial, cytotoxic and antitumor activities of extract from *Rumex hastatus* D. Don roots. **BMC complementary and alternative medicine**, v. 15, n. 1, p. 211, 2015.

SAITO T, MIZUTANI F, IWANAGA Y, MORIKAWA K, KATO H. Laxative and anti-diarrheal activity of polycarbophil in mice and rats. **Jpn J Pharmacol.**, 89(2):133-41, 2002.

SAMPAIO, VALÉRIA DA SILVA; AGRA, MARIA DE FÁTIMA. **O gênero SOLANUM L.(SOLANACEAE) Na Floresta Atlântica ao norte do Rio São Francisco**. Tese de Doutorado. Universidade Federal de Pernambuco, 2013.

SANTOS, L. S. **Estudo das alterações na cobertura vegetal ao longo de perfil topográfico, com ênfase em enclave de cerrado no agreste meridional de Pernambuco, Brasil**. Dissertação Mestrado. Universidade Federal de Pernambuco, 2014.

SCARPIGNATO, T. C.; BERTACCINI, G. Action of caerulein on gastric emptying of conscious rat. **Arch Int Pharmacodyn.** 246, 286-294, 1980.

SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; PETROVICK, P.R. Produtos de origem vegetal e o desenvolvimento de medicamentos. **Farmacognosia da planta ao medicamento**. Rio Grande do Sul e Santa Catarina: Editora da UFSC e UFRGS 1ª edicao, 1999.

SCHREIBER, K.; RIPPERGER, H.; BUDZIKIEWICZ, H. (22R: 25S)-3 β -amino-5 α -spirostan, ein steroidalalkaloid neuartigen strukturtyps aus *Solanum paniculatum* L. **Tetrahedron Letters**, v. 6, n. 45, p. 3999-4002, 1965.

SCHREIBER, K.; RIPPERGER, H. Solanum alkaloids LXVIII. Jurubine a novel type of steroidal saponin with (25S)-3 β -amino 5 α -furastan-22 α , 26-diol-O(26)-glucopyrinoside structure from *Solanum paniculatum* L. **Tetrahedron Letters**, v. 7, n. 48, p. 5997-6002, 1966.

SCHUTZE, M.D. ;WILLOUGHBY JR, R.E. Policy offers recommendations on managing *C. difficile* infections in pediatric patients. **AAP News**, v. 131, p.196 - 200, 2013.

SILVA, T.M.S.; AGRA, M.F.; BHATTACHARYYA, J. Studies on the alkaloids of *Solanum* of northeastern Brazil.**Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 15, n. 4, p. 292-293, 2005a.

SILVA, T. M. S.; COSTA, R. A.; OLIVEIRA, E. J.; BARBOSA-FILHO, J. M.; AGRA, M. F.; CAMARA, C. A. Complete ¹H and ¹³C NMR assignments of isojuripidine from *Solanum asterophorum* Mart. **Journal of the brazilian chemical society**.16 (6B): 1467 – 1471, 2005.

SILVA, T.M.S.; Nascimento, R. J. B., Batista, M. M., Agra, M. F., & Camara, C. A. Brine shrimp bioassay of some species of *Solanum* from Northeastern Brazil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, n. 1, p. 35-38, 2007.

SILVA, T.M.G. **Estudo químico e avaliação da atividade antioxidante das raízes de *solanum paniculatum* (solanaceae)**. Dissertação Mestrado. Universidade Federal Rural de Pernambuco, 2012.

SILVA, T.M.S. **Investigação Fitoquímica de *Solanum* L. (Solanaceae) do Nordeste do Brasil**. 52o Congresso Nacional de Botânica. Joao Pessoa, Paraíba: Resumos. 22 a 28 de julho, 2001.

SILVA, T.M.S., Camara, C. A., Freire, K. R., Silva, T. G. D., Agra, M. D. F., & Bhattacharyya, J. Steroidal glycoalkaloids and molluscicidal activity of *Solanum asperum* Rich. fruits. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 19, n. 5, p. 1048-1052, 2008.

SIMOES, C. M. O. (org). **Farmacognosia: da Planta ao Medicamento**. 5 ed., Porto Alegre: Editora da UFSC, 2003.

SINHABABU, Arijit; BANERJEE, Arpita. Medicinal Plants for the Treatment of Malaria used by Various Tribes of Bankura, West Bengal, India. **Research & Reviews: Journal of Botany**, v. 4, n. 1, p. 33-36, 2015.

SIQUEIRA - JUNIOR, J. F.; DANTAS, C. J. S. **Mecanismos celulares e moleculares da inflamação**. 1 ed. Rio de Janeiro: MEDSI, 2000.

SIQUEIRA NS, MACAN A. Cromatografia dos alcaloides da *Solanum paniculatum* L. **Trib Farm** 44(1-2): 101-105, 1976.

SIQUEIRA-JACCOUD, R. J.; PEREIRA, N. A.; LAINETTI, R. Jurubeba. **Revista Brasileira de Farmácia**, p. 121–131, 1982.

SIXEL, P.J.; PECINALLI, N.R. Características farmacológicas gerais das plantas medicinais. **Infarma**, v.16, p.13-14, 2005.

SOARES, E. L. C.; VIGNOLI-SILVA, M.; VENDRUSCOLO, G. S.; MENTZ, L. A. Solanaceae Nativas no Rio Grande do Sul, Brasil: Listagem I. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 5, n. 2, p. 1050-1052, 2007.

SOARES, E.L.C.; VIGNOLI-SILVA, M.; VENDRUSCOLO, G.S.; MENTZ, L.A. Solanaceae Nativas no Rio Grande do Sul, Brasil: Listagem I. **Revista Brasileira de Biociências**, v.5, n.2, p.1050-1052, 2007.

SORREANO, M. C. M., MALAVOLTA, E., DA SILVA, D. H., CABRAL, C. P., & RODRIGUES, R. R. Deficiency of macronutrients in sangra d'água (Croton urucurana, Baill.) seedlings. **Cerne**, v. 17, n. 3, p. 347-352, 2011.

SOUZA, M. P.; MATOS, M. E. Q.; MATOS, F. J. A.; MACHADO, M. I. L.; CRAVEIRO, A. A. **Constituintes químicos ativos das plantas medicinais brasileiras**. Fortaleza: Ed. da Universidade Federal do Ceara, 1991.

SOUZA, V.; LORENZI, H.. **Botânica sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de fanerógamas nativas e exóticas no Brasil**, baseado em APG II. 2008.

STEHMANN, J.R., MENTZ, L.A., AGRA, M.F., VIGNOLI-SILVA, M., GIACOMIN, L. 2010. Solanaceae. In: **Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro**. <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/2010/FB000225>>. Acesso em 04 de agosto de 2015.

STEHMANN, J. R.; GIACOMIN, L. L. *Markea atlantica* (Solanaceae): a new species of tribe Juanulloae disjunct from its core distribution. **Systematic Botany**, v. 37, n. 4, p. 1035-1042, 2012.

STEHMANN, João Renato; SEMIR, João. Reproductive biology of *Calibrachoa elegans* (Miers) Stehmann & Semir (Solanaceae). **Brazilian Journal of Botany**, v. 24, n. 1, p. 43-49, 2001.

STICKNEY, J.C.; NORTHUP, D.W. Effect of gastric emptying upon propulsive motility of small intestine of rats. **Proc Soc Exp Biol Med**. 101, 582-583, 1959.

TAGLIATI, C.; SILVA, R. P.; FERES, C. A. O.; JORGE, R. M.; ROCHA, O. A.; BRAGA, F. C. Acute and chronic toxicological studies of the Brazilian phytopharmaceutical product Ierobina. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. 18: 676-682, 2008.

TEIXEIRA, A. **A indústria farmacêutica no Brasil: um estudo do impacto socioeconômico dos medicamentos genéricos**. Trabalho de conclusão de curso (bacharelado - Ciências Econômicas) - Universidade Estadual Paulista Julio de Mesquita Filho, Faculdade de Ciências e Letras (Campus de Araraquara), 2014.

TESKE, M.; TRENTINI, A. M. **Compêndio de fitoterapia**. 2 ed. Curitiba: Herbarium, 1995.

TSUKUI, ANNA; REZENDE, CLAUDIA M. Extração Assistida por Micro-ondas e Química Verde. **Revista Virtual de Química**, v. 6, n. 6, p. 1713-1725, 2014.

VALADARES, Y. M.; BRANDAO, G. C.; KROONB, E. G.; FILHO, J. D. S.; OLIVEIRA, A. B.; BRAGA, F. C. Antiviral Activity of *Solanum paniculatum* Extract and Constituents. **Z. Naturforsch**, v. 64, p. 813 – 818, 2009.

VALE, M.L.; MARQUES, J.B.; MOREIRA, C.A.; ROCHA, F.A.C.; FERREIRA, S.H.; POOLE, S.; CUNHA, F.Q.; RIBEIRO, R.A. Antinociceptive Effects of Interleukin-4, -10, and -13 on the Writhing Response in Mice and Zymosan-Induced Knee Joint Incapacitation in Rats. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 304, p. 102-108, 2003.

VALERI, B.; USUBILLAGA A. Sapogenins from *Solanum meridense*. **Phytochemistry**, v.28, n.9, p.2509-2511, 1989.

VALEZE, F. H.; BRENZAN, M. A. Perfil de utilização de medicamentos fitoterápicos pela população do município de Boa Esperança – PR. **SaBios: Revista de Saúde e Biologia**, v. 6, n. 1, p. 17-24, 2011.

VAZ, N. P. **Alcalóides Esteroidais dos Frutos Maduros de *Solanum caavurana* Vell.101f**. Dissertação (Mestrado em Química) - Setor de Ciências Exatas, Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 2008.

VEIGA, V.F.J.; ANGELO, C. P. Plantas medicinais: Cura segura? **Química nova**, v.28, p. 519-528, 2005.

VIEGAS-JÚNIOR, C.; BOLZANI, V. S.; BARREIRO, E. J. Os produtos naturais e a química medicinal moderna. **Química Nova**, v. 29, n. 2, p. 326-337, 2006.

VIEIRA JÚNIOR, G.; FERREIRA, P.M.; MATOS, L.G.; FERREIRA, E.C.; RODOVALDO, W.; FERRI, P.H.; FERREIRA, H.D.; COSTA, E.A. Anti-inflammatory effect of *Solanum lycocarpum* fruits. **Phytotherapy Research**, London, v.17, n.8, p.892-896, 2003.

VIEIRA, P. M., MARINHO, L. P., FERRI, S., CHEN-CHEN, L. Protective effects of steroidal alkaloids isolated from *Solanum paniculatum* L. against mitomycin cytotoxic and genotoxic actions. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 85, n. 2, 553-560, 2011.

VIEIRA, PABLINE MARINHO; PAULA, JOSÉ REALINO; CHEN-CHEN, LEE. *Solanum paniculatum* L. leaf and fruit extracts: Assessment of modulation of cytotoxicity and genotoxicity by micronucleus test in mice. **Journal of medicinal food**, v. 13, n. 6, p. 1424-1430, 2010.

VINJAMURI, S.; SHANKER, D., RAMESH, R. S., & NAGARAJAN, S. In vitro evaluation of hemolytic activity and cell viability assay of hexanoic extracts of *Bridelia ferruginea* Benth. **World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 4, n. 7, 2015.

WALKER, P. S.; SCHARTON-KERSTEN, T.; KRIEG, A. M.; LOVE-HOMAN, L.; ROWTON, E. D.; UDEY, M. C.; VOGEL, J. C. Immunostimulatory oligodeoxynucleotides promote protective immunity and provide systemic therapy for leishmaniasis via IL-12- and IFN-g-dependent mechanisms. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. V. 96, p. 6970–6975, Junho, 1999.

WANG, H.H.; SHIEH, M.J.; LIAO, K.F. A blind, randomized comparison of racecadotril and loperamide for stopping acute diarrhea in adults. **World J Gastroenterol**. 11(10):1540-3, 2005.

WATKINS, L. R.; GOEHLER, L. E.; RELTON, J.; BREWER, M. T.; MAIER, S. F. Mechanisms of tumor necrosis factor- α (TNF- α) hyperalgesia. **Brain Research**. v. 692, p. 244–50, 1995.

WATSON, W.C.; GORDON, R. Studies on the digestion absorption and metabolism of castor oil. **Biochem Pharmacol**. 11, 229-236, 1962.

WEISSENBERG, M. Isolation of solasodine and other steroidal alkaloids and sapogenins by direct hydrolysis-extraction of *Solanum* plants or glycosides therefrom. **Phytochemistry**, v.58, n.1, p.501-508, 2001.

WEISSMAN, G. Inflammation: historical perspectives. In: Gallin J.L. et al. (Eds): *Inflammation: Basic principles and Clinical Correlates*. New York: **Raven Press**, p. 5, 1992.

WHITTLE, B. A. The use of changes in capillary permeability in mice to distinguish between narcotic and nonnarcotic analgesics. **British journal of pharmacology chemotherapy**, 22: 246-53, 1964.

WINTER C.A; RISLEY E.Q; NUSS G.W.: Carrageenan-induced edema in hind paw of rat as an assay for anti-inflammatory drugs. **Proc Soc Biol Med**. 11: 544–547, 1962.

ZAVALA, M.A.; PEREZ, S.; PEREZ, C.; VARGAL, R.; PEREZ, R.M. Antidiarrhoeal activity of *Waltheria americana*, *Commelins cuelestris* and *Alternanthera repens*. **J. Ethnopharmacol**. 61:41-47, 1998.

ZHOU, X.; HE, X.; WANG, G.; GAO, H.; ZHOU, G.; YE, W. & YAO X. Steroidal saponins from *Solanum nigrum*. **Journal of Natural Products** 69:1158-1163, 2006.