



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE FARMÁCIA, ODONTOLOGIA E ENFERMAGEM
DEPARTAMENTO DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

THIALA SOARES JOSINO DA SILVA

DESENVOLVIMENTO E OTIMIZAÇÃO DO EXTRATO PADRONIZADO DE
***Spondias mombin* (CAJAZEIRA): ATIVIDADES ANTI-INFLAMATÓRIA E ANTI-**
HERPES DO EXTRATO E DA GERANIINA

FORTALEZA

2016

THIALA SOARES JOSINO DA SILVA

DESENVOLVIMENTO E OTIMIZAÇÃO DO EXTRATO PADRONIZADO DE *Spondias mombin* (CAJAZEIRA): ATIVIDADES ANTI-INFLAMATÓRIA E ANTI-HERPES DO EXTRATO E DA GERANIINA

Dissertação apresentada à Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para a Obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Luzia Kalyne Almeida Moreira Leal

FORTALEZA

2016

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

- D11d da Silva, Thiala Soares Josino.
DESENVOLVIMENTO E OTIMIZAÇÃO DO EXTRATO PADRONIZADO DE *Spondias mombin* (CAJAZEIRA) : ATIVIDADES ANTI-INFLAMATORIA E ANTI-HERPES DO EXTRATO E DA GERANIINA / Thiala Soares Josino da Silva. – 2016.
110 f. : il. color.
- Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Fortaleza, 2016.
Orientação: Profa. Dra. Luzia Kalyne Almeida Moreira Leal.
1. *S. mombin*. 2. Ácido clorogênico. 3. Geraniina. 4. Anti-inflamatória. 5. Anti-herpes. I. Título.
CDD 615
-

THIALA SOARES JOSINO DA SILVA

DESENVOLVIMENTO E OTIMIZAÇÃO DO EXTRATO PADRONIZADO DE *Spondias mombin* (CAJAZEIRA): ATIVIDADES ANTI-INFLAMATÓRIA E ANTI-HERPES DO EXTRATO E DA GERANIINA

Dissertação apresentada à Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para a Obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Luzia Kalyne Almeida Moreira Leal

Aprovada em ____/____/____

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Luzia Kalyne Almeida Moreira Leal (Orientadora)

Universidade Federal do Ceará (UFC)

Profa. Dra. Maria Goretti de Vasconcelos Silva

Universidade Federal do Ceará (UFC)

Profa. Dra. Antônia Torres Ávila Pimenta

Universidade Federal do Ceará (UFC)

À Deus que me deu forças para não desistir.
Aos meus pais e irmãs que, independente de
qualquer situação, sempre me apoiam e
ajudam a alcançar meus sonhos.

AGRADECIMENTOS

À Deus, meu incentivador, que sempre me escuta e sempre me atende! Obrigada por me ajudar a construir a minha história. Obrigada por não me deixar esmorecer frente aos insucessos. Eu creio em ti Senhor e sei que o melhor ainda está por vir.

Aos meus pais Valter e Fátima que sempre se esforçaram para que nada me faltasse, que em frente a todas as adversidades, nunca deixaram de priorizar minha educação. Esta vitória é de vocês. Obrigada especial ao meu pai amado, que muitas vezes tira do dele para dar aos outros, que sempre está do meu lado, eu te amo muito.

A minhas irmãs Michelle e Alessandra, que mesmo distantes, me acompanham e torcem por mim. Olho para trás, vejo o que passamos e o que conquistamos hoje. Michelinha com sua vida profissional em ascensão, Lelé com sua família perfeita, com minhas sobrinhas lindas, são os meus exemplos para o futuro. Amo vocês. Obrigada também aos meus cunhados Gilberto e Soleno e as minhas sobrinhas Giovanna e Isabelle, que são a felicidade da titia.

À minha orientadora, Prof^a. Dr^a. Luzia Kalyne A. M. Leal por me ajudar a desenvolver este projeto de vida. Obrigada pela orientação, paciência (porque sei que perturbei muito rsrs) e todos os ensinamentos.

Ao Dr Afrânio Craveiro e Dr Alexandre Craveiro por terem sido os idealizadores deste estudo. À Cristina Barroso por sua amizade, compreensão e apoio. E à toda equipe da Polymar e do Padetec

À Bianca, amiga fundamental para o início deste projeto. Obrigada por toda a ajuda e conselhos para que eu desse início a esse projeto de vida.

À Karla, grande amiga que a profissão me deu. Obrigada por toda a ajuda, por toda a confiança, todos os conselhos que você me deu e por todas as risadas rsrsrs.

Ao Anderson, meu grande e fiel amigo, por toda a ajuda, conselhos, momentos de descontração. Você foi peça fundamental para o início e conclusão do meu Mestrado.

Ao Diogo, por todos os ensinamentos transmitidos, pela ajuda nos experimentos e por toda a paciência (que ele não tem) comigo rsrs.

A todos os companheiros de laboratório Elizama, Lyara, Talita, Ana Paula, Luciana, Amanda, Rayane, Aline Holanda, Aline, Taiana, Emanuel, Pedro, Kaike, Thalisson, Germana, Juliana, Jack, Fernanda, Mariana, Hilmará.

À Prof Arlete por ceder a estrutura do Laboratório de Morfologia e Anatomia Vegetal e ao Robson e Lauana que me ajudaram com a descrição da anatomia das folhas

Ao Prof Luis Carlos, Áurea, Raissa, Cristiane e todos os demais integrantes do Laboratório de Desenvolvimento Industrial Farmacêutico da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP de Ribeirão Preto.

A todos meus companheiros e companheiras de treino da Crossfit Dragão do Mar, especialmente as Delícias, rsrs, que me proporcionaram ótimos momentos e me ajudaram a desestressar várias vezes.

Aos amigos Flávio pai, Farleide e Flávio por terem me apoiado durante tantos meses e terem sido uma segunda família para mim. Obrigada Flávio por ter me ajudado tantas vezes a secar minhas folhas rsrs

Ao Filipe, que escutou todos os meus dilemas por vários meses, me ajudando a enxergar a melhor decisão.

Aos amigos Flávius, Gigi, Carol, Débora, Alice, Manu, Rebeca, Nayana, Diego, Fernanda, Camila, Ilana, Ivana, Dani, Ingrid, Guigui, Maritza, Allan, Aline, Gustavo, Daniel, Anaiara, Sâmia, Kátia, Nathália, Stephanie pela amizade, convivência, momentos de descontração, conselhos, apoio. Todos vocês me ajudaram de alguma forma em concluir esse trabalho.

À secretaria da Pós graduação, Raimundinha, William e Jéssica pela disposição em ajudar e resolver tudo.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES pela bolsa de estudos concedida.

A todos que direta ou indiretamente permitiram a concretização de um sonho!

Muito obrigada!!!!

“Ao contrário do que muita gente imagina, nós não nascemos prontos e vamos nos gastando, nós nascemos não prontos e vamos nos fazendo.” Mario Sergio Cortella

“Eu cheguei onde cheguei, porque tudo que planejei deu errado. É a pura verdade!” Rubem Alves

RESUMO

DESENVOLVIMENTO E OTIMIZAÇÃO DO EXTRATO PADRONIZADO DE *Spondias mombin* (CAJAZEIRA): ATIVIDADES ANTI-INFLAMATÓRIA E ANTI-HERPES DO EXTRATO E DA GERANIINA Thiala Soares Josino da Silva. Orientadora: Prof^a. Dr^a. Luzia Kalyne Almeida Moreira Leal. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. Departamento de Farmácia. Universidade Federal do Ceará, 2016.

Spondias mombin L. (Anacardiaceae) é uma árvore de porte elevado, frutífera, frequente no Oeste da Índia, México, Peru, Brasil e conhecida popularmente como cajazeira. Todas as suas partes têm sido utilizadas pela medicina tradicional. A planta faz parte da REPLAME (Relação de Plantas Medicinais) do estado do Ceará e do projeto Farmácias Vivas com a indicação para o tratamento da herpes. O objetivo do presente estudo foi desenvolver um fitoproduto padronizado a partir das folhas de *S. mombin*, e avaliar seu potencial anti-inflamatório e antiviral (*Herpes simplex* 1). Para isso, inicialmente, foram estabelecidos o método de preparação (secagem em estufa com circulação/ renovação de ar) a 60 ± 5 °C por 4 horas e as especificações para o controle de qualidade da droga vegetal (DV). O método extrativo para obtenção do extrato padronizado de *S. mombin* foi a maceração dinâmica por 2,5 h, a 30 °C e relação DV:solvente (etanol 30 % em água) de 0,3, caracterizado pelo teor de fenóis totais (FT: 17,52 mg/mL), resíduo seco (RS: 7,12 %, p/v) e perfil cromatográfico por CLAE-DAD (Ácido clorogênico - AC: 0,83 mg/mL e Geraniina - GR: 7,37 mg/mL). Na avaliação do potencial anti-inflamatório, extrato de *S. mombin* (ESM) (1, 10, 50, 100 µg/mL) inibiu parcialmente a liberação de MPO (Mieloperoxidase) induzida por PMA (Folbol-12-miristato-13-acetato), sendo observado melhor efeito na maior concentração (% inibição: 50,4), enquanto que o padrão GR (1, 10, 25, 50 e 100 µg/mL) promoveu um efeito dual, ampliando a desgranulação de neutrófilo induzida por PMA nas menores concentrações (1 – 25 µg/mL) e inibindo esta (40,3 e 83,5 %) nas maiores concentrações (50 e 100 µg/mL). Apenas a concentração de 200 µg/mL do ESM mostrou citotoxicidade em neutrófilos humanos no teste do MTT. Na avaliação da citotoxicidade em células VERO, o ESM apresentou $CC_{50} = 1680$ µg/mL e a GR $CC_{50} = 392,5$ µg/mL, enquanto que o padrão PFA (Ácido fosfonofórmico) apresentou $CC_{50} = 392,5$ µg/mL. Na avaliação do potencial antiviral, o ESM foi mais potente com $CI_{50} = 342,5$ µg/mL em relação a GR ($CI_{50} = 417,5$ µg/mL) e PFA ($CI_{50} = 570$ µg/mL), e teve um índice de seletividade (IS) próximo ao do PFA. O IS da GR foi

de 0,94. Os resultados obtidos no presente estudo permitiram estabelecer, de maneira inédita, métodos e especificações para a produção e controle de qualidade tanto da DV quanto do ESM. Além disso, tanto o ESM quanto a geraniina (marcador bioativo) possuem atividade anti-inflamatória e anti-herpes (*Herpes simplex 1*)

Palavras-chave: *S. mombin*. Ácido clorogênico. Geraniina. Anti-inflamatória. Anti-herpes.

ABSTRACT

DEVELOPMENT AND OPTIMIZATION OF STANDARDIZED EXTRACT OF *Spondias mombin* (CAJAZEIRA): ANTI-INFLAMMATORY AND ANTI-HERPES ACTIVITIES OF EXTRACT AND GERANIIN Thiala Soares Josino da Silva. Advisor: Prof^a. Dr^a. Luzia Kalyne Almeida Moreira Leal. Master degree. Program of Post-Graduate in Pharmaceutical Sciences. Department of Pharmacy. Federal University of Ceará, 2016.

Spondias mombin L. (Anacardiaceae) is a large-sized tree, fruitful, frequent in western India, Mexico, Peru, Brazil and popularly known as cajazeira. All the parts have been used by traditional medicine. The plant is part of REPLAME (List of Medicinal Plants) of the state of Ceará and Farmacias Vivas projects', indicated for the herpes treatment. The aim of this study was to develop a standardized product from the leaves of *S. mombin* and evaluate its antiviral (*Herpes Simplex* 1) and anti-inflammatory potential. Therefore, was initially established one method of preparation (drying oven with air circulation / renovation) under 60 ± 5 ° C heating 4 hours, and the specifications for quality control of plant drug (PD). The extractive method for obtaining a standardized extract of *S. mombin* was the dynamic maceration for 2.5 h at 30 ° C and a relation PD:solvent (30% ethanol in water) of 0.3, characterized as total phenols content (TF: 17.52 mg/mL), dry residue (7.12%, w/v) and chromatographic profile by HPLC-PAD (Chlorogenic acid - CA: 0.83 mg/mL and Geraniin - GR: 7.3 mg/mL). The evaluation of anti-inflammatory potential showed that extract of *S. mombin* (ESM) (1, 10, 50 and 100 µg/mL) partially inhibited MPO (Myeloperoxidase) release induced by PMA (Phorbol-12-Myristate-13-Acetate), with best effect seen at the biggest concentration (% inhibition: 50,4), while the standard GR (1, 10, 25, 50 and 100 µg/mL) promoted a dual effect, expanding the degranulation of neutrophils induced by PMA at low concentrations (1 - 25 µg/mL) and inhibiting (40.3 and 83.5%) at biggest concentrations (50 and 100 µg/mL). Only the concentration 200 µg/mL of ESM showed cytotoxicity on human neutrophils in MTT test. The evaluation of cytotoxicity on VERO cells, the ESM showed $CC_{50} = 1680$ µg/mL and a GR $CC_{50} = 392.5$ µg/mL, while the standard PFA (Phosphonoformic acid) showed $CC_{50} = 392.5$ µg/mL. The antiviral potential evaluation, the ESM was the most potent with $IC_{50} = 342.5$ µg/mL comparing to GR ($IC_{50} = 417.5$ µg/mL) and PFA ($IC_{50} = 570$ µg/mL), also had an selectivity index (SI) next to PFA. The SI GR was 0.94. The results obtained in this study allowed to establish, in an unprecedented way, methods and specifications for production and

quality control of PD and ESM. Furthermore, both ESM as geraniin (bioactive marker) possess anti-inflammatory and anti-herpes (*Herpes simplex 1*) activity.

Keywords: *S. mombin*. Chlorogenic acid. Geraniin.. Anti-inflammatory. Anti-herpes.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Cajazeira (<i>Spondias mombin</i> L.)	28
Figura 2: Representação estrutural de marcadores presentes em extratos de <i>S. mombin</i>	31
Figura 3: Secções transversais das folhas de <i>Spondias mombin</i>	56
Figura 4: Análise histoquímica das folhas de <i>Spondias mombin</i>	57
Figura 5: Distribuição granulométrica do pó das folhas de <i>S. mombin</i> secas em estufa com renovação e circulação de ar	63
Figura 6: Varredura espectrofotométrica para determinação da especificidade do método de análise do teor de fenóis totais no extrato de <i>S. mombin</i> (ESM)	66
Figura 7: Curva de analítica do ácido gálico obtida pelo método espectrofotométrico (715 nm)	68
Figura 8: Gráfico de resíduos obtidos da análise de regressão das curvas de calibração de ácido gálico	68
Figura 9: Superfície de resposta do rendimento de sólidos (RS) em função da relação DV:solvente e tempo no procedimento de extração por maceração	74
Figura 10: Superfície de resposta do teor de fenóis totais (FT) em função da relação DV:solvente e tempo no procedimento de extração por maceração	75
Figura 11: Superfície de resposta do rendimento de sólidos (RS) em função da relação DV:solvente e tempo no procedimento de extração por turbólise	77
Figura 12: Superfície de resposta do rendimento de sólidos em função do tempo (t) e velocidade de agitação (V)	78
Figura 13: Superfície de resposta do teor de fenóis totais (FT) em função da relação DV:solvente e tempo no procedimento de extração por turbólise	79
Figura 14: Superfície de resposta do teor de fenóis totais (FT) em função da relação DV:solvente e velocidade de agitação no procedimento de extração por turbólise	79
Figura 15: Rendimento de sólidos (RS) e Teor de fenóis totais (FT) obtidos pelos métodos estudados	81

Figura 16: Perfis cromatográficos dos marcadores e dos extratos de <i>S. mombin</i>	83
Figura 17: Perfis cromatográficos dos marcadores e dos extratos M6 e T6 de <i>S. mombin</i>	84
Figura 18: Gráfico da pureza de pico dos marcadores em extrato M6 de <i>S. mombin</i>	85
Figura 19: Representação gráfica da curva de calibração obtida por CLAE- DAD para ácido clorogênico (A) e geraniina (B)	86
Figura 20: Gráficos de resíduos obtidos da análise de regressão das curvas de calibração do ácido clorogênico (A) e geraniina (B)	87
Figura 21: Representação gráfica da correlação entre o teor de geraniina e o teor de fenóis totais nos extratos de <i>S. mombin</i>	89
Figura 22: Efeito do ESM padronizado sobre a citotoxicidade (teste de MTT)	91
Figura 23: Efeito do ESM padronizado e da GR sobre a desgranulação neutrofílica induzida por PMA determinada pela inibição da liberação da mieloperoxidase	93

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Identificação de patógenos nas folhas de <i>Spondias mombin</i>	40
Tabela 2: Concentrações e volumes de ácido gálico empregados na construção da curva padrão por espectrofotometria	43
Tabela 3: Preparo das soluções para o ensaio de exatidão/recuperação	44
Tabela 4: Fatores estudados no planejamento fatorial para avaliação da robustez e seus níveis +1, 0 e -1	44
Tabela 5: Planejamento Fatorial para avaliação da robustez	45
Tabela 6: Planejamento Box-Behnken do processo de Maceração Dinâmica, com fatores codificados	46
Tabela 7: Fatores estudados no planejamento Box-Behnken do processo extrativo Maceração Dinâmica e seus níveis +1, 0 e -1	46
Tabela 8: Planejamento Box-Behnken do processo de Turbólise, com fatores codificados	47
Tabela 9: Fatores estudados no planejamento Box-Behnken do processo extrativo Turbólise e seus níveis +1, 0 e -1	48
Tabela 10: Composição da fase móvel utilizada no método analítico para detecção e quantificação de AC e GR	50
Tabela 11: Programação gradiente para eluição da fase móvel utilizada no método analítico para detecção e quantificação de AC e GR em ESM por CLAE-DAD	50
Tabela 12: Concentrações e volumes de AC empregados na construção da curva padrão por CLAE	51
Tabela 13: Teor de umidade da droga vegetal de <i>Spondias mombin</i> em diferentes tempos de secagem em estufa com circulação e renovação de ar	59
Tabela 14: Testes de prospecção química para ESM	60
Tabela 15: Análises microbiológicas do pó das folhas da droga vegetal de <i>Spondias mombin</i>	62
Tabela 16: Caracterização farmacognóstica da droga vegetal de <i>S. mombin</i>	64
Tabela 17: Valores de absorvâncias do ácido gálico obtidos por espectrofotometria (715 nm)	67
Tabela 18: Avaliação da precisão intermediária do método para análise de fenóis totais no ESM por espectrofotometria	69

Tabela 19: Determinação da exatidão (recuperação) por adição de três diferentes concentrações de ácido gálico ao ESM	70
Tabela 20: Avaliação da robustez do método desenvolvido por espectrofotometria para quantificação de fenóis totais no ESM	71
Tabela 21: Resultados obtidos nos experimentos de extração por maceração dinâmica	73
Tabela 22: Análise de variância (ANOVA) dos dados referentes ao RS do procedimento de extração por maceração	73
Tabela 23: Análise de variância (ANOVA) dos dados referentes ao FT do procedimento de extração por maceração	74
Tabela 24: Resultados obtidos nos experimentos de extração por turbólise	76
Tabela 25: Análise de variância (ANOVA) dos dados referentes ao RS do procedimento de extração por turbólise	77
Tabela 26: Análise de variância (ANOVA) dos dados referentes ao FT do procedimento de extração por turbólise	78
Tabela 27: Caracterização dos extratos obtidos na condição 6 do método de extração maceração dinâmica	82
Tabela 28: Valores de p e F obtidos por análise de variância (ANOVA) das curvas padrões de AC e GR	87
Tabela 29: Determinação do teor de Ácido clorogênico nos extratos de <i>S. mombin</i>	88
Tabela 30: Determinação do teor de Geraniina nos extratos de <i>S. mombin</i>	88
Tabela 31: Concentrações citotóxicas 50 % (CC ₅₀), Concentrações inibitórias (CI ₅₀) e Índice de seletividade (IS) do ESM, GR e controle positivo (PFA)	95

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

% IV	Porcentagem de inibição viral
Abs	Absorvância
AC	Ácido clorogênico
AcOEt	Fração acetato de etila
ANOVA	Análise de variância
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ATCC	American Type Culture Collection
BR	Brasil
ButOH	Fração <i>n</i> -butanólica
CC ₅₀	Concentração citotóxica 50 %
CCD	Cromatografia em camada delgada
CLAE	Cromatografia Líquida em Alta Eficiência
Cmf	Células ricas em material fenólico
CNPq	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
Co	Parênquima colenquimatoso
CO ₂	Gás carbônico
COX-2	Cicloxigenase 2
CPE	Efeito citopático
CS	Carbonato de sódio
Cs	Cavidade secretora
Ct	Cutícula
DAD	Detector de arranjo de foto diodos
Dcm	Fração diclorometânica
DISC	Disabled Infectives Singles Cycle
DL ₅₀	Dose letal para 50 %
DMEM	Meio de Eagle modificado por Dulbecco
DMSO	Dimetilsulfóxido
DP	Desvio padrão
DPR	Desvio Padrão Relativo
DST	Doença sexualmente transmissível

DV	Droga vegetal
EAG	Equivalentes de ácido gálico
ESM	Extrato de <i>S. mombin</i>
EHfl	Extrato hidroalcoólico de folhas secas
Epi	Epiderme abaxial
EPM	Erro padrão da média
Eps	Epiderme adaxial
Es	Estômato
EtOH	Etanol
EUA	Estados Unidos da América
Exp	Experimento
FARM. BRAS.	Farmacopeia Brasileira
FC	Folin-Ciocalteau
Fd	Fator de diluição
FeCl ₃	Cloreto férrico
Fl	Floema
FT	Teor de fenóis totais
Fv	Feixe vascular
GLM	Modelo linear geral
GR	Geraniina
H	Hora
HBSS	Hanks' Balanced Salt Solution
HCl-R	Ácido clorídrico concentrado
Hex	Fração <i>n</i> -hexânica
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
HSV-1	Herpes simples tipo 1
HSV-2	Herpes simples tipo 2
i.p	Intraperitoneal
CI ₅₀	Concentração inibitória 50 %
Id	Idioblastos
IMPPG	Instituto Microbiologia Professor Paulo Góes
INDO	Indometacina

INPI	Instituto Nacional de Propriedade Intelectual
IS	Índice de seletividade
K ₂ Cr ₂ O ₇	Dicromato de potássio
KOH	Hidróxido de potássio
MeOH	Metanol
Mg	Magnésio
MPO	Mieloperoxidase
Ms:Mp	Massa solvente:Massa planta
MTT	Brometo 3[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolio
Na ₂ CO ₃	Carbonato de sódio
NF-κB	Fator nuclear kappa B
NUFITO	Núcleo de Fitoterápicos
p/p	Peso por peso
p/v	Peso por volume
PADETEC	Parque de Desenvolvimento Tecnológico
Pes	Parênquima esponjoso
PFA	Ácido fosfonofórmico
PMA	Forbol-12-miristato-13-acetato
PMN	Polimorfonucleares
Pp	Parênquima paliçádico
PVDF	Fluoreto de polivinilideno
q.s.p	Quantidade suficiente para
RDC	Resolução da diretoria colegiada
RE	Resolução Específica
REPLAME	Relação Estadual de Plantas Medicinais
Rpm	Rotações por minuto
RS	Rendimento de sólidos
SAE	Solução amostra do extrato
SEAC	Solução Estoque de ácido clorogênico
SEGR	Solução estoque de geraniina
SEPAG	Solução estoque padrão de ácido gálico
SFB	Soro fetal bovino

SUS	Sistema Único de Saúde
T	Tempo
T	Temperatura
TCID ₅₀	Dose infecciosa das culturas de tecidos 50 %
Tr	Tricoma
TR	Tempo de retenção
UFC	Universidade Federal do Ceará
UFC/g	Unidade formadora de colônias por grama
UFRJ	Universidade Federal do Rio de Janeiro
USP	Farmacopeia dos Estados Unidos
UV	Ultravioleta
V	Velocidade
VERO	Células renais de macaco verde Africano
Xi	Xilema

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA	24
1.1 Infecções virais: Herpes simples	24
1.2 <i>Spondias mombin</i> L. (Anacardiaceae)	27
1.2.1 Aspectos geográficos, botânicos e etnofarmacológicos	27
1.2.2 Aspectos químicos, farmacológicos e toxicológicos	29
1.3 Produtos terapêuticos derivados de plantas medicinais	32
2 OBJETIVOS	35
2.1 Geral	35
2.2 Específicos	35
3 MATERIAIS E MÉTODOS	36
3.1 Materiais	36
3.1.1 Acesso ao patrimônio genético	36
3.1.2 Aspectos éticos	36
3.1.3 Material botânico	36
3.1.4 Células e vírus	36
3.1.5 Drogas, reagentes e padrões de trabalho	37
3.2 Métodos	37
3.2.1 Descrição microscópica de folhas de <i>S. mombin</i>	37
3.2.2 Desenvolvimento de método de preparação e caracterização da droga vegetal (<i>Spondias mombin</i> L.)	38
3.2.2.1 Prospecção química do extrato das folhas de <i>S. mombin</i>	38
3.2.2.2 Secagem e cominuição do material vegetal	38
3.2.2.3 Determinação do teor de umidade em balança de infravermelho	38
3.2.2.4 Controle microbiológico da droga vegetal	39
3.2.2.5 Análise granulométrica	39
3.2.2.6 Determinação do teor de cinzas totais	40
3.2.2.7 Determinação do teor de cinzas insolúveis em ácido	40
3.2.2.8 Determinação do Índice de intumescência	41
3.2.3 Validação de método analítico para quantificação, por espectrofotometria, de fenóis totais, marcador químico, no extrato de <i>S. mombin</i>	41
3.2.3.1 Preparo da solução padrão de ácido gálico	41
3.2.3.2 Preparo do extrato de <i>S. mombin</i> utilizado no processo de validação	41

3.2.3.3 Validação de metodologia analítica para determinação do teor de fenóis totais	42
.....	42
3.2.4 Desenvolvimento e seleção do método de produção do extrato de <i>S. mombin</i> (ESM)	45
.....	45
3.2.4.1 Planejamento experimental e métodos de obtenção dos extratos	45
3.2.5 Caracterização do extrato de <i>S. mombin</i>	48
3.2.5.1 Determinação de fenóis totais por espectrofotometria	48
3.2.5.2 Rendimento de sólidos	48
3.2.5.3 pH	49
3.2.5.4 Densidade relativa	49
3.2.5.5 Detecção e determinação do teor de Geraniina (GR) e Ácido clorogênico (AC)	
por CLAE-DAD	49
3.2.6 Avaliação da atividade anti-inflamatória	52
3.2.6.1 Isolamento de polimorfonucleados (PMN)	52
3.2.6.2 Teste do MTT	52
3.2.6.3 Determinação da concentração de mieloperoxidase (MPO)	52
3.2.7 Avaliação da atividade anti-herpética <i>in vitro</i>	53
3.2.7.1 Cultivo de células e vírus	53
3.2.7.2 Teste de citotoxicidade	53
3.2.7.3 Ensaio Anti-herpes. Titulação Viral (Método Reed & Muench)	53
3.2.8 Análise estatística	54
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	55
4.1 Descrição anatômica da folha de <i>S. mombin</i>	55
4.2 Preparação e caracterização farmacognóstica da Droga Vegetal (DV) de <i>S. mombin</i>: prospecção química, teor de umidade, controle microbiológico, teor de cinzas, granulometria e determinação do índice de intumescência	58
.....	58
4.3 Validação de método analítico para determinação do teor de fenóis totais no extrato de <i>S. mombin</i> (ESM) por espectrofotometria	64
4.3.1 Especificidade	65
4.3.2 Linearidade e faixa de trabalho	67
4.3.3 Precisão	68
4.3.4 Exatidão	70
4.3.5 Robustez	70

4.4 Desenvolvimento e seleção do método de produção do extrato de <i>S. mombin</i> (ESM): maceração dinâmica e turbólise	71
4.5 Análise do teor de geraniina (GR) e do ácido clorogênico (AC) no extrato das folhas de <i>S. mombin</i> por CLAE-DAD	82
4.6 Atividades anti-inflamatória e anti-herpética do ESM padronizado e da GR	90
5 CONCLUSÃO	96
REFERÊNCIAS	97

1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

1.1 Infecções virais: Herpes simples

O Herpes é um vírus pertencente à família Herpesviridae, a qual engloba oito vírus herpéticos humanos existentes, sendo eles: vírus herpes simples tipo 1, herpes simples tipo 2, varicela-zoster, Epstein-Barr, citomegalovírus e vírus herpes humanos tipos 6, 7 e 8. Todos possuem a designação comum de herpesvírus humano, sendo que o determinante da diferença entre eles é a numeração (1 a 8) que sucede suas denominações. Estes vírus podem infectar diferentes e variados tipos de células e possuem características biológicas particulares, como a ampla gama de possíveis hospedeiros e a capacidade de se manter latente em suas células por tempo indeterminado. Dessa forma, pode vir a ser reativado, originando lesões que se localizam no próprio sítio da infecção primária inicial ou próximas a ele (MARTINHO, 2003).

O herpes simples tem sido considerado como um dos mais comuns agentes de contaminação viral em humanos (GOPAL *et al.*, 2000), sendo também a doença sexualmente transmissível de maior ocorrência (SAUERBREI & WUTZLER, 2007). Conforme descrito anteriormente, o mesmo é subdividido em dois grupos: tipo 1 (HSV-1) e tipo 2 (HSV-2). Este vírus tem como reservatório o homem e seu modo de transmissão é por meio do contato íntimo com o indivíduo transmissor (BRASIL, 2010), dessa forma o vírus penetra no corpo por invasão das mucosas ou lesões de descontinuidade da pele. O vírus sofre, então, replicação nas células situadas na base do sítio de entrada, dissemina-se para células nervosas adjacentes, até os gânglios sensitivos regionais, onde permanecem em latência até ser rompido por fatores desencadeantes, como estresse, febre, trauma, mudanças hormonais, radiação ultra-violeta e depois migra para as células da pele ou mucosa, ocasionando lesões vesiculares (CLEMENTS *et al.*, 1990; LUPI & PEREIRA JR, 2000; FICARRA & BIEK, 2009; SAWAIR *et al.*, 2010).

As infecções agudas causadas pelo herpes simples tipo 1 ou 2 são caracterizadas pelo desenvolvimento de uma ou mais vesículas pequenas e cheias de líquido, as quais formam elevações na pele ou qualquer outra membrana mucosa do corpo, como forma de manifestação primária ou reativação do vírus. Tais vesículas comumente se rompem e causam dor. Logo após a fase aguda ocorrem, alternadamente, períodos de latência e de reativação (GOPAL *et al.*, 2000). A reativação do vírus permite a infecção de novos

hospedeiros e o indivíduo infectado mantém-se com uma reserva de infecção para toda a vida (SCHUSTER & BUSS, 2009).

As lesões do herpes genital e oral são decorrentes de infecção pelo vírus herpes simples. O vírus HSV-1 é o agente etiológico principal das lesões vesiculares da região orofacial, enquanto o HSV-2 é a causa principal das lesões na região genital (COREY & SPEAR, 1986; GUPTA *et al.*, 2007). Entretanto, o HSV-1 pode levar a lesões na região genital e, embora mais raro, o HSV-2 pode ser manifestado na região orofacial (KHAN *et al.*, 2005; AZWA & BARTON, 2009).

A maioria dos problemas causados pelo HSV-1 é autolimitada em imunocompetentes, com presença de feridas e vesículas na região orofacial (ALCHÉ *et al.*, 2002), entretanto pode ser um grande problema em pacientes imunocomprometidos, incluindo recém nascidos, pacientes HIV positivos ou que são submetidos a tratamento imunossupressor, transplantados, diabéticos descontrolados, podendo causar graves doenças sistêmicas e risco de vida, devido a debilidade do sistema imunológico (SOUSA *et al.*, 2000; HARDEN *et al.*, 2009; AKHTAR & SHUKLA, 2009), além de também estar associado a diversas doenças oculares como a ceratite herpética estromal (HSK) que pode causar cegueira (BRANDÃO *et al.*, 2010).

Em se tratando de epidemiologia, sabe-se que o herpes é uma doença de distribuição universal. O herpes genital é uma das mais prevalentes doenças sexualmente transmissíveis (DST) no mundo, com aproximadamente 22 % dos adultos nos EUA, 15 % na Europa, 50 % em alguns países em desenvolvimento da África Subariana sendo HSV-2 positivos (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2001); no Brasil, estima-se que a cada ano 640 mil novos casos de herpes genital são diagnosticados (PASSOS, 2002). Em relação ao herpes labial, é sabido que este é uma infecção muito comum, afetando 45 % a 98 % da população mundial (XIANG *et al.*, 2008), com taxa de prevalência maior que 40 % aos 15 anos de idade, aumentando para 60 a 90 % em adultos (GELLER *et al.*, 2012); nos EUA 90 % da população são carreadoras do vírus (BENTLEY *et al.*, 2003), no Brasil, a prevalência de anticorpos para HSV-1 chega a 67,2% (CLEMENS & FARHAT, 2010).

O desenvolvimento de agentes terapêuticos anti-herpéticos tornou-se necessário, devido à incidência crescente do vírus HSV-1 e ao aparecimento de cepas resistentes a drogas sintéticas, como o aciclovir, especialmente em pacientes imunocomprometidos (PIRET & BOIVIN, 2011). Dessa forma, a descoberta de compostos antivirais pode ser comparada a revolução ocorrida na época do desenvolvimento dos antibióticos e anuncia uma nova era na medicina atual (SIMONI, 2003).

O tratamento existente para o herpes é utilizado para controle da doença e para prevenir recorrências (AZAMBUJA *et al.*, 2004). Em estudo de revisão, Tagliari *et al.* (2012) relata as principais opções terapêuticas para o tratamento das infecções causadas pelo HSV-1. Os autores concluíram que não há terapêutica eficaz contra o HSV-1, pois os tratamentos existentes apenas ajudam a minimizar as crises instaladas, aliviam o desconforto e distanciam o aparecimento de novas manifestações. Entre os tratamentos farmacológicos os autores citam os antivirais aciclovir e seus análogos fanciclovir e valaciclovir, como terapia de escolha; docosanol e penciclovir, como drogas eficazes na terapia tópica; lisina, como alternativa na diminuição da duração da doença; e as vacinas (Lupidon H® para o HSV-1, Lupidon G® para o HSV-2 e DISC - Disabled Infectives Singles Cycle).

Até o momento não existe tratamento eficaz contra o vírus da herpes e alguns episódios de herpes genital podem não ser reconhecidos, especialmente na fase assintomática ou de sintomas leves (LOU *et al.*, 2012). Esses fatos dificultam a aquisição das terapias antivirais pelos pacientes, contribuindo para a propagação da doença e aumento dos índices de transmissão, caso as taxas de adesão pelos pacientes não forem maiores que 90 % (GlaxoSmithKline, 2000). Tendo em vista tais fatores, há uma necessidade urgente de se estudar e desenvolver novos fármacos para o controle do herpes.

Nesse contexto, os produtos naturais têm sido uma fonte de interesse para a pesquisa de novos fármacos antivirais, inclusive algumas pesquisas têm demonstrado o potencial antiviral de alguns extratos e/ou moléculas de espécies vegetais (VANDEN BERGHE *et al.*, 1986; DE LOGU *et al.*, 2000). Como é o caso do extrato da planta *Uncaria tomentosa* (Imuno-Max®) e seus glicosídeos de ácido quinóico, os quais apresentaram atividade antiviral de acordo com estudos recentes (CALDAS *et al.*, 2010; SOUZA & CIMERMAN, 2010).

Outros autores também demonstraram que os extratos aquoso e etanólico de *Cajanus cajan* (L.) Millsp (ZU *et al.*, 2010), extrato hidroalcoólico de *Echinacea pallida* (SCHNEIDER *et al.*, 2010), extrato hidroalcoólico de folhas de *Araucaria angustifolia* (FREITAS *et al.*, 2009) apresentam atividade anti-herpética. Em se tratando de moléculas isoladas, a literatura relata que os taninos elágicos geraniina e galoilgeraniina isolados de *Spondias mombin* (CORTHOUT *et al.*, 1991), bem como o terpeno meliacina, isolado de *Melia azedarach* L., apresentaram atividade antiherpética em estudos *in vitro* (ALCHÉ *et al.*, 2002).

1.2 *Spondias mombin* L. (Anacardiaceae)

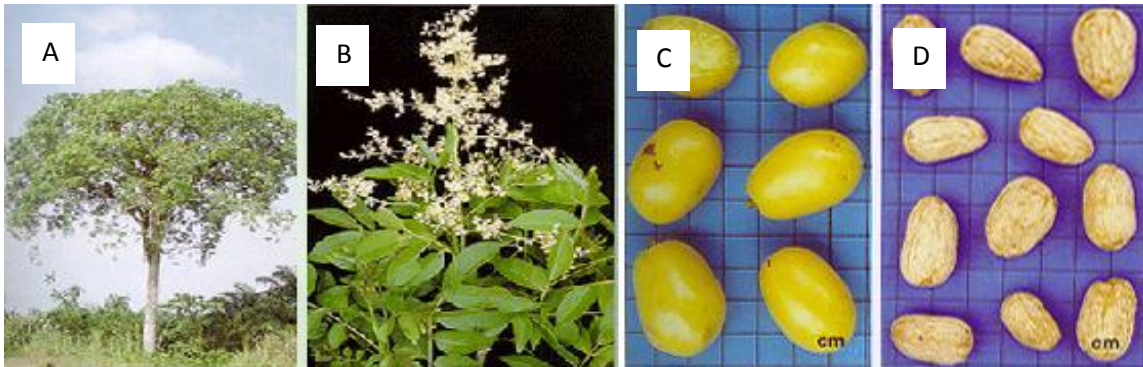
1.2.1 Aspectos geográficos, botânicos e etnofarmacológicos

A família Anacardiaceae possui 79 gêneros com distribuição predominantemente nas regiões tropicais e subtropicais do mundo (JOLY, 2002). Dentre as espécies pertencentes a esta família podemos relacionar *Spondias mombin* L., uma árvore nativa das terras baixas do México e das Américas Central e Sul (CROAT, 1974), comum no Oeste da Índia, nas florestas úmidas do Sul do México até o Peru estendendo-se até o Brasil (MORTON, 1987). No Brasil, a cajazeira é encontrada isolada ou agrupada, notadamente em regiões da Amazônia e da Mata Atlântica e nas zonas mais úmidas dos Estados do Nordeste, principalmente na faixa litorânea e nas serras, e de forma espontânea e subespontânea, em matas, campos de pastagens e pomares domésticos (SOUZA *et al.*, 2000). No Ceará, ocorre com maior frequência nas zonas litorâneas próximas a Fortaleza e nas serras de Guaramiranga, Baturité, Meruoca e Ibiapaba (SACRAMENTO & SOUZA, 2000).

Conhecida popularmente como cajazeira, cajá-pequeno, cajá-mirim, cajazeiro, cajazeiro miúdo, taperebá (LORENZI & MATOS, 2008), *S. mombin* L. é uma árvore (**Figura 1**) de porte elevado, frutífera, com casca do tronco muito rugosa, onde destacam-se pedaços grossos de súber, conhecidos pelo nome de caracas. As folhas, são compostas, decíduas, alternadas, imparipinadas, com 20 – 45 cm de comprimento. O fruto é uma drupa de cor amarelo-alaranjada, de sabor ácido, ovóide e oblongo com 3,2 a 4,0 cm de comprimento e 2,5 cm de largura. As flores pequenas, fragantes, esbranquiçadas, podem ser femininas, masculinas e bissexuais, dispostas em panícula com 15 a 30 cm de comprimento (MORTON, 1987; MATOS, 1998).

Todas as partes de *S. mombin* têm sido utilizadas pela medicina tradicional. O decocto das frutas é bebido como um diurético e febrífugo. A goma é utilizada como expectorante e vermífugo (RODRIGUES & HESSE, 2000). O suco e o pó de suas folhas são usados sob a forma de cataplasmas como cicatrizante e anti-inflamatório tópico. O decocto do caule e das folhas é usado como emético, antidiarréico e no tratamento de disenteria, hemorróidas, gonorréia e leucorréia (AKUBUE *et al.*, 1983). O chá das flores e das folhas é feito para aliviar estomatites, uretrite, cistite e inflamação da garganta (VILLEGAS *et al.*, 1997).

Figura 1 – Cajazeira (*Spondias mombin* L.).



Fonte: (<http://www.padetec.ufc.br/novapagina/vendas/cajazeira/cajazeira.php>. Acesso em: 19 dez. 2013).
A.Árvore; B. Flores; C. Frutos; D. Sementes. Fonte: *Spondias mombin* - Ação anti-herpes e anti-virótica

S. mombin faz parte da relação de plantas medicinais que compõem o Projeto Farmácias Vivas, idealizado pelo Prof. Francisco José Abreu de Matos e desenvolvido pelo Laboratório de Produtos Naturais da Universidade Federal do Ceará, no Brasil, com o intuito de promover a assistência social farmacêutica, voltada aos cuidados primários em saúde, às comunidades, através de Programas de Fitoterapia Municipal e Estadual no âmbito do Sistema Único de Saúde (SUS) (BRASIL, 2012). Matos (1998) indica a *S. mombin* para o tratamento do herpes labial e genital, da afta e de anginas herpéticas, através do uso de extrato aquoso obtido pelo cozimento por fervura de 50g das folhas e ramos finos da espécie em um copo d'água.

A *S. mombin* também faz parte da Relação Estadual de Plantas Mediciais (REPLAME) do Estado do Ceará (CEARÁ, 2012), sendo este fitoterápico disponibilizado à população de vários municípios do Estado (Fortaleza, Maracanaú, Viçosa, Quixeramobim, Camocim, Horizonte) pelo Núcleo de Fitoterápicos (NUFITO), o qual tem o, já citado, Projeto Farmácias Vivas como base científica.

É relevante considerar que há registros da comercialização do extrato hidroalcoólico das folhas da planta, citado no livro Coletânea científica de plantas de uso medicinal da Fiocruz de 2005, relatando a recomendação de uso do extrato: ingerir 20 gotas à noite e 20 pela manhã, diluídas em água; e a composição: cada mL contém 20 mg do extrato de folhas secas de *S. mombin*, 0,7 mL de etanol e 0,3 mL de água. Tal produto está sob registro de patente no Instituto Nacional de Propriedade Intelectual (INPI), número 0404307-3 A, porém já foi retirado do mercado por conta da atualização da legislação nacional (ANVISA).

Através de revisão bibliográfica, encontrou-se outra patente de *S. mombin*, depositada sob número 2182962 A1 em 2008 (Extrato de *S. mombin*, método de extração e uso de tal

extrato), em que a produção do extrato se dá por extração em Soxhlet de partes da planta (não revelado) com posterior evaporação parcial dos solventes (água, metanol, hexano ou acetato de etila) e os extratos obtidos são então avaliados quanto ao potencial inibidor da COX-2 ou da ativação de NF-kappa B ou no tratamento da inflamação ou câncer.

1.2.2 Aspectos químicos, farmacológicos e toxicológicos

Estudos químicos realizados por Hamano e Marcadante (2001) com auxílio de cromatografia de alta performance (CLAE) detectaram a presença de várias moléculas, como carotenoides, fitoeno, alfa-trans-beta-caroteno, alfa-caroteno, beta criptoxantinas (*cis* e *trans*), zeaxantina e luteína em *S. mombin*. Mais recentemente (IGWE *et al.*, 2010) realizando uma triagem química de extrato de folhas de *Spondias mombin*, revelaram a presença de saponinas ($4.80 \pm 0.35\%$), alcaloides ($3.40 \pm 0.10\%$), flavonoides ($2.80 \pm 0.36\%$), taninos ($1.47 \pm 0.06\%$), oxalato ($0.92 \pm 0.09\%$), fitato ($1.73 \pm 0.19\%$) e glicosídeos cianogênicos ($0.01 \pm 0.00\%$).

Carballo *et al.* (2004), avaliando o potencial antimalárico de plantas medicinais, relataram que a atividade antimalárica de *S. mombin* parece estar relacionada a uma gama de classes de compostos presente na planta, como antraquinonas, berberina, flavonoides, naftoquinonas, sesquiterpenos, quassinoides, alcaloides indólicos e quinolínicos. Outras ações farmacológicas também têm sido descritas para extratos (metanólico, etanólico ou aquoso) das folhas da cajá, incluindo efeitos ansiolítico (AYOKA *et al.*, 2005), sedativo, anti-epiléptico e antipsicótico em camundongos e ratos (AYOKA *et al.*, 2006).

Kozoic e Marcia (1998) e Okwu e Okwu (2004) citados por Okigbo *et al.* (2009) relataram a atividade antiviral e antibacteriana de *S. mombin* coletadas no sul da Nigéria e África. Estes efeitos foram atribuídos a presença de taninos, ésteres fenólicos, alcaloides e saponinas na planta.

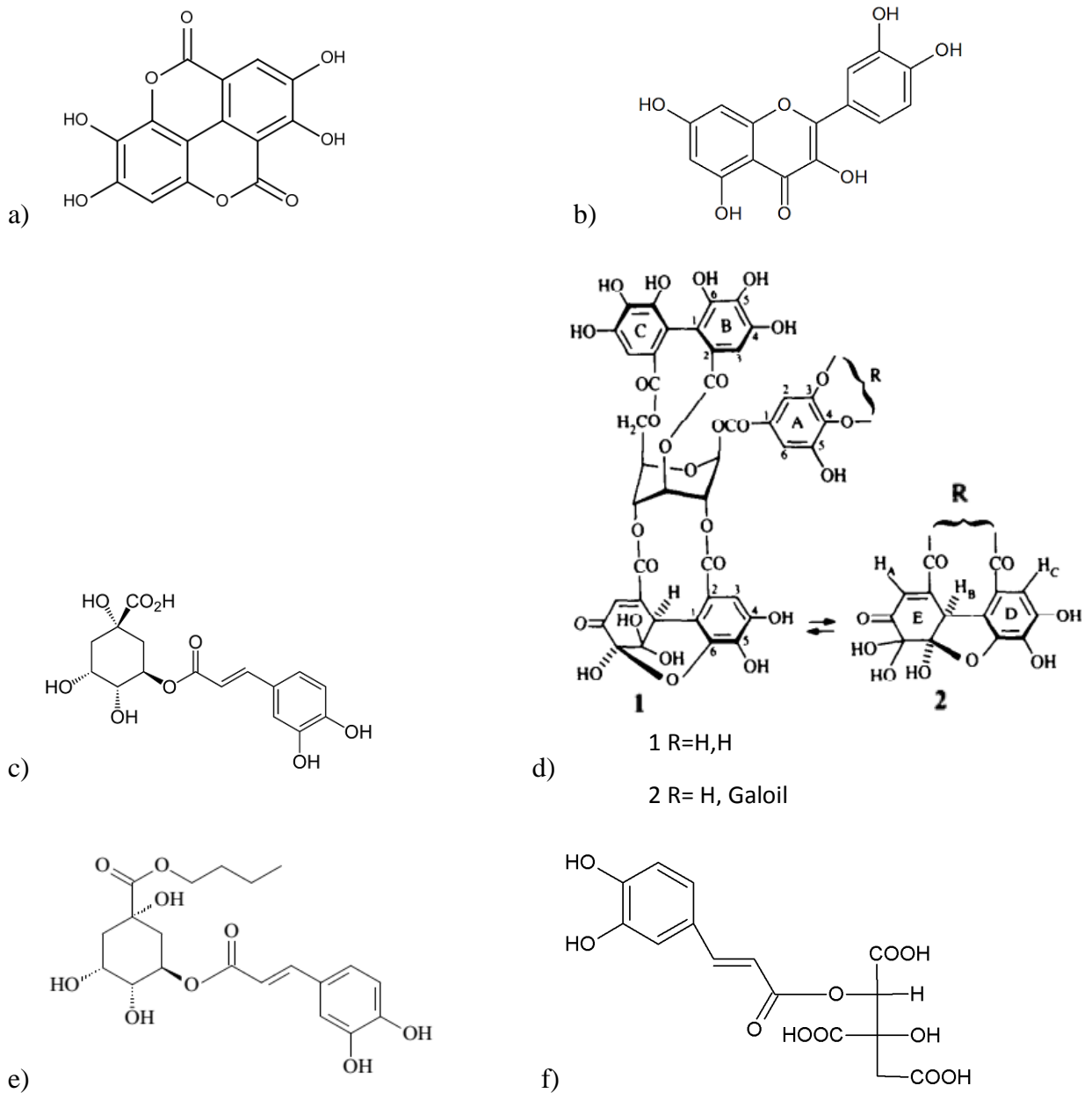
Flavonoides e outros derivados fenólicos têm sido identificados em folhas de *S. mombin* com propriedades antiherpes, antioxidante e antienvhecimento (CORTHOUT *et al.*, 1992). Silva *et al.* (2012) em trabalho que descreve a presença de flavonoides nas folhas de *S. mombin*, identificou em extrato hidrometanólico, quercetina (**Figura 2**). Além de flavonoides, a presença de alcaloides e taninos foi detectada em altas concentrações e tem sido associada a efeitos antimicrobianos observados em vários estudos com extratos da planta (NWAOGU *et al.*, 2007; CORTHOUT *et al.*, 1992, 1994).

Mais recentemente, Cabral (2014) buscou caracterizar os marcadores químicos e avaliar a atividade antiinflamatória, antioxidante, antiproliferativa e antimicrobiana de extrato hidroalcoólico de folhas secas (EHfl) de *S. mombin*, bem como de suas frações (*n*-hexânica (Hex), diclorometânica (Dcm), acetato de etila (AcOEt) e *n*-butanólica (ButOH). Por meio de análise por CLAE, foi possível a identificação e quantificação de ácido elágico e ácido clorogênico (**Figura 2**) no EHfl. Os resultados da avaliação da atividade anti-inflamatória, mostraram que o EHfl nas doses de 100, 200, 300 e 500 mg/kg, apresentou efeito de inibição da migração de leucócitos no modelo de peritonite aguda induzida por carragenina; todas as frações foram ativas, no entanto, a fração AcOEt na dose de 200 mg/kg apresentou melhor atividade em relação às outras. O EHfl e a fração AcOEt apresentaram melhor perfil de inibição bacteriana, principalmente frente à bactéria *S. flexneri*. O EHfl e as frações Dcm, AcOEt e ButOH apresentaram importante atividade antioxidante nos ensaios de DPPH, poder redutor e sequestro de radicais superóxidos e radicais hidroxilas. No que se refere à avaliação da citotoxicidade do EHfl e de suas respectivas frações frente à cultura de células de fibroblastos 3T3 não foi observada citotoxicidade significativa.

A atividade de *S. mombin* sobre o vírus Coxsakii B2 e Herpes Simples 1, responsáveis pelas crises de aftas dolorosas e pela herpes labial, respectivamente, foi determinada, através de um programa de triagem para propriedade antiviral de plantas, e então atribuída à presença de quatro substâncias da planta, sendo dois taninos (CORTHOUT *et al.*, 1991) e dois ésteres cafeoil (CORTHOUT *et al.*, 1992), isolados de extrato hidroetanólico a 80% (metodologia de preparo não revelada pelos autores) das folhas e do caule de *S. mombin*. Nesses estudos, os taninos elágicos geraniina e galoilgeraniina (**Figura 2**) mostraram atividade antiviral para *Coxsacki* B2 e *Herpes simplex* tipo 1, em uma concentração de 50 µ/mL (fator de redução do título viral 10³) (CORTHOUT *et al.*, 1991). Pela mesma técnica, os ésteres cafeoil (**Figura 2**) mostraram atividade antiviral, sendo que o éster butílico do ácido clorogênico mostrou uma redução do título viral para *Herpes simplex* tipo 1 igual a 10², numa concentração de 100 µg/mL (dose máxima não tóxica), enquanto o ácido 2-*o*-cafeoil-(+)-allohidroxicítrico mostrou um valor de 10² na dose máxima não tóxica de 100 µg/mL para *Coxacki* B₂ (CORTHOUT *et al.*, 1992).

Corroborando com o potencial antiviral da geraniina, Fukushi *et al.* (1989) em ensaio de formação de placa para *Herpes simplex* (HSV-1 cepa HF) em células renais de macaco verde Africano (VERO), mostraram ação antiviral com uma CE50 de 0,093 µg/mL, e, mais recentemente, Yang *et al.* (2007) mostraram que esta suprimiu a replicação do vírus da *Herpes simplex-2* com uma IC50 de 18.4 ± 2.0 µM *in vitro*.

Figura 2 – Representação estrutural de marcadores presentes em extratos de *S. mombin*



Fonte: CORTHOUT et al., 1991; REZENDE, 2010; CABRAL, 2014.

a) Quercetina b) Ácido elágico c) Ácido clorogênico d1) Geraniina d2) Galoilgeraniina e) Éster butílico do ácido clorogênico f) Ácido 2-o-caffeoil-(+)-allohidroxicátrico.

Ayoka *et al.* (2006) avaliaram extratos aquosos, metanólico e etanólico de folhas de *S. mombin L.* em camundongos e ratos. Os autores não informaram no estudo quais parâmetros foram avaliados na determinação da toxicidade, tendo, apenas, como resultado a produção ou não de efeito tóxico detectável. Os autores mostraram que a administração oral em dose única ou repetida dos três extratos de *S. mombin* (≤ 5 g/kg) não produziu nenhum efeito tóxico

detectável. Mesma observação foi obtida em relação a administração intraperitoneal (i.p.) do extrato aquoso (≤ 200 mg/kg), contudo os extratos etanólico e metanólico em doses superiores (> 100 mg/kg) produziram efeitos tóxicos. Efeitos letais foram observados em camundongos e ratos com os três extratos na maior dose (3,2 g/kg) i.p. A DL50 em camundongos, foi de 480 mg/kg, 1.1 g/kg i.p. e 1.36 g/kg para os extratos etanólico, metanólico e alcoólico, respectivamente; em ratos, a DL50 foi de 620 mg/kg i.p., 1.08 and 1.42 g/kg i.p. para os extratos etanólico, metanólico e aquoso, respectivamente.

Raji *et al.* (2006) em estudo também relacionado à avaliação da segurança não clínica de *S. mombin* envolvendo outro órgão vegetal (casca do caule), mostraram que o extrato aquoso quando administrado oralmente em dose única causou o decréscimo dose-dependente, quando comparado ao grupo controle, dos parâmetros motilidade do espermatozoide, viabilidade e quantidade de esperma e um acréscimo também dose-dependente do parâmetro morfologia do espermatozoide. Tais resultados demonstraram que o extrato aquoso de *S. mombin* pode prejudicar a fertilidade em ratos.

Diante do potencial farmacológico antiviral da *S. mombin*, cujo extrato tem demonstrado possuir derivados fenólicos com propriedades antiherpes e antioxidante, e que já tem sido formulado para esses usos no Brasil (CORTHOUT *et al.*, 1992; CASTNER, *et al.*, 1998; SHULTES & RAFFAUF, 1990), pode ser observado que *S. mombin* tem sido extensivamente investigada nos últimos anos, o que corrobora para a realização de estudos farmacêuticos visando a obtenção desde matérias-primas a produtos acabados padronizados.

1.3 Produtos terapêuticos derivados de plantas medicinais

A fitoterapia é a ciência que estuda a utilização de produtos de origem vegetal com finalidade terapêutica, para prevenir, atenuar ou curar um estado patológico (CARVALHO, 2005). Tais produtos de origem vegetal, utilizam plantas medicinais, isto é, espécies vegetais, cultivadas ou não, que são as responsáveis pela atividade terapêutica (BRASIL, 2014).

Quando a planta medicinal, ou suas partes, está na forma íntegra, rasurada, triturada ou pulverizada, estabilizada ou não, ela é denominada droga vegetal (BRASIL, 2014). O derivado vegetal é o produto da extração da planta medicinal fresca ou da droga vegetal, podendo ocorrer na forma de extrato, tintura, alcoolatura, óleo fixo e volátil, cera, exsudado e outros. Ao conjunto de todos os produtos utilizados no início no processo de fabricação dos medicamentos fitoterápicos (planta medicinal fresca, droga vegetal e derivado vegetal), chama-se de matéria-prima vegetal (BRASIL, 2014; CARVALHO, 2011).

A legislação vigente, RDC nº 26/2014, que dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos, define esta classe como aquela obtida de matéria-prima ativa vegetal com finalidade profilática, curativa ou paliativa. Não se considera medicamento fitoterápico, entretanto, aquele que inclui substâncias ativas isoladas, que recebem a denominação de fitofármacos ou as associações de fitofármacos com extratos vegetais (RATES, 2001a).

A etapa inicial do processo de desenvolvimento de um fitoterápico ocorre com a seleção da planta. A seleção pode ser feita com auxílio de pesquisa na literatura científica, da etnobotânica ou etnofarmacologia, da quimiotaxonomia, da toxicidade observada, além de estudos farmacológicos prévios. O passo seguinte diz respeito à coleta, identificação botânica e preparo de exsicata, bem como estabilização e extração dos constituintes da planta. A partir dos extratos, empregando-se métodos cromatográficos, podem ser obtidos compostos isolados. Nessa fase, são realizados testes de atividade biológica e de toxicidade, e ainda a determinação da estrutura química dos compostos ativos isolados, utilizando-se métodos espectroscópicos. A identificação da estrutura do composto permitirá, dessa forma, estudos subseqüentes da síntese total ou parcial do constituinte ativo, preparação de derivados e/ou análogos, modulação da atividade biológica e definição da relação estrutura-atividade. O ciclo de desenvolvimento de fitoterápicos é então finalizado com a produção em larga escala da matéria-prima ativa, aspectos relacionados à tecnologia farmacêutica e testes clínicos (RATES, 2001b).

Como descrito previamente, é possível observar que o desenvolvimento de fitoterápicos inclui várias etapas e envolve um processo interdisciplinar, multidisciplinar e muitas vezes interinstitucional. Para seu desenvolvimento tecnológico são necessários estudos prévios em diversas áreas de conhecimento, como estudos botânico, agrônomo, químico, de atividade biológica, incluindo estudos de segurança e eficácia não clínica e clínica (SONAGLIO *et al.*, 1999) e estudos de pré-formulação, na etapa de escolha da forma farmacêutica, onde são verificadas características do fármaco ou droga vegetal como seu aspecto, cor, sabor, suas características físico-químicas de solubilidade e coeficiente de partição e sua estabilidade física, química e microbiológica. Além disso, a via de administração mais adequada para ação do fármaco ou droga vegetal também deve ser considerada (AULTON, 2005).

A administração de agentes terapêuticos necessita da sua incorporação em uma forma farmacêutica, caracterizada normalmente pelo estado físico de apresentação, constituída de componentes farmacologicamente ativos e de adjuvantes farmacêuticos (TOLEDO *et al.*, 2003). Uma vez escolhida a planta medicinal e realizados todos os estudos já citados, esta

passa ainda por vários processos até a preparação das formas farmacêuticas a serem dispensadas. Dentre as formas de uso das plantas como fonte terapêutica incluem-se os chás, os extratos brutos ou suas frações padronizadas em preparações farmacêuticas e os compostos isolados, usados diretamente como drogas ou precursores em processos de síntese (RATES, 2001b). Vale ainda ressaltar que os extratos podem ser consumidos como produto final, sem modificações, ou podem ser produtos intermediários empregados em outras preparações farmacêuticas, para então dar origem ao produto final (AULTON, 2005; SIMÕES *et al.*, 2001), que entre as variadas formas, pode ser: cápsula, comprimido, drágea, pomada, creme, supositório, tintura, elixir ou xarope (TOLEDO *et al.*, 2003).

Há diversos processos extrativos descritos na literatura e que podem ser utilizados, sendo um fator importante a ser considerado de acordo com os objetivos da extração. Entre os métodos extrativos encontram-se métodos convencionais e clássicos como maceração estática, percolação e extração por Soxhlet os quais são geralmente recomendados pela Farmacopéia Brasileira (2010); e métodos extrativos mais modernos como maceração dinâmica (FERNANDES *et al.*, 2004; DENNY *et al.*, 2007; LOPES FILHO, 1999), turbo-extração, extração assistida por ultrassom (HU *et al.*, 2008; LIAO *et al.*, 2008) e microondas (TATKE & JAISWAL, 2011). Ademais, inúmeros são os fatores que influenciam os processos extrativos como a divisão da droga, o estado da droga, se fresca ou seca, massa utilizada de droga, natureza dos solventes, mistura dos solventes em diferentes proporções, volume de solvente, temperatura, agitação, pH e tempo de extração (PRISTA *et al.*, 1995; LIST & SCHMIDT, 1989; CHIRINOS *et al.*, 2007).

A necessidade crescente da Indústria Farmacêutica para a otimização de produtos e processos, minimizando custos e tempos, maximizando rendimento, produtividade e qualidade de produtos, tem levado profissionais a buscarem ferramentas técnicas sistemáticas de planejamento de experimentos. Qualquer processo farmacêutico que tenha, no mínimo, dois parâmetros, como temperatura e velocidade, os quais possam ter um valor mínimo e máximo atribuído e uma resposta igualmente mensurável, com limites de especificação determinados, é passível de ser estudado mediante o uso de planejamento de experimentos (DA SILVA, 2007).

Até recentemente a investigação e desenvolvimento de novas formulações e/ou processos eram realizados pela técnica de tentativa e erro, e, com avaliação de apenas um fator por vez. Esta forma de abordagem é reconhecidamente dispendiosa considerando o custo e o tempo necessários para sua execução. Além disto, a ausência de uma análise estatística adequada pode facilmente conduzir a conclusões equivocadas, especialmente quando

diferentes variáveis interagem (MYERS & MONTGOMERY, 1995; WHERLÉ *et al.*, 1993, 1995).

Desta forma, no desenvolvimento de formulações farmacêuticas e nos seus processos de fabricação em que há o envolvimento de muitas variáveis, torna-se sugestiva a utilização de técnicas de otimização, como por exemplo, os desenhos experimentais (ROTTHÄUSER *et al.*, 1998; LACHMAN *et al.*, 2001) com produtos farmacêuticos. Um deles é o planejamento Box-Behnken, o qual possui características estatísticas desejáveis com apenas uma fração do total de ensaios requeridos em um planejamento fatorial completo de três níveis. Os níveis de seus fatores se encontram no meio das arestas e no centro quando se observa sua representação gráfica sendo que a geometria deste planejamento sugere o formato de uma esfera dentro da região experimental (NIST & SEMATECH, 2011; MYERS, 2003). Assim, esta ferramenta é de grande valia para o presente trabalho a fim de otimizar as condições de extração para obtenção do extrato hidroetanólico das folhas de *S. mombin*.

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

Desenvolver um fitoproduto padronizado a partir das folhas de *Spondias mombin* e avaliar seu potencial antiviral – Herpes simples tipo 1 e anti-inflamatório.

2.2 Específicos

- Estabelecer método de preparação da droga vegetal (DV), a partir das folhas de *S. mombin*;
- Determinar parâmetros para controle de qualidade da planta *in natura* e DV das folhas de *S. mombin*;
- Validar metodologia analítica por espectrofotometria para quantificação de fenóis totais no extrato de *S. mombin* (ESM);
- Desenvolver metodologia analítica por CLAE-DAD para quantificação de geraniina (GR) e ácido clorogênico (AC);
- Desenvolver, otimizar e caracterizar o ESM, com análise de marcadores por espectrofotometria (fenóis totais) e CLAE-DAD (geraniina e ácido clorogênico);

- Avaliar a atividade anti-inflamatória do ESM padronizado e da GR sobre a desgranulação dos neutrófilos induzida por PMA, mensurada pela atividade da enzima mieloperoxidase (MPO);
- Investigar a atividade antiherpética do ESM padronizado e da GR sobre o vírus HSV-1 em modelo experimental com células VERO.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Materiais

3.1.1 Acesso ao patrimônio genético

Autorização de Acesso, Nº Processo: 010418/2014-8 (CNPq).

3.1.2 Aspectos éticos

Esse projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Humana (COMEPE) da Universidade Federal do Ceará sob o número CAAE 56722616.0.0000.5054.

3.1.3 Material botânico

As folhas de *Spondias mombin* L. foram coletadas no Parque de Desenvolvimento Tecnológico (PADETEC) da Universidade Federal do Ceará (UFC), apresentando coordenadas geográficas de 3° 44' 50'' de latitude sul e 38° 34' 22'' de longitude oeste. Exsicata da espécie (n° 38575) está registrada no Herbário Prisco Bezerra, Departamento de Biologia, UFC.

3.1.4 Células e Vírus

A linhagem celular utilizada foi a VERO (células de rim de macaco verde africano) provenientes da ATCC (American Type Culture Collection). Estas células foram cultivadas a 37 °C com meio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) suplementado com 10 % de soro fetal bovino (SFB) e adicionado dos antimicrobianos estreptomicina (100 µg/mL), penicilina (100 UI/mL) e anfotericina B (2,5 µg/mL). O vírus utilizado foi o herpes simples

tipo 1 (HSV-1) isolado de espécimes clínicos e fornecido pelo Departamento de Virologia (IMPPG/UFRJ, BR).

3.1.5 Drogas, reagentes e padrões de trabalho

Acetonitrila grau CLAE (Tédia; JT Baker, EUA); álcool comercial absoluto; geraniina (pureza $\geq 98,0\%$, grau CLAE); ácido gálico, dimetilsulfóxido (DMSO), brometo 3[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio (MTT), forbol-12-miristato-13-acetato (PMA), mieloperoxidase, indometacina, Triton X-100 (Sigma-Aldrich[®], EUA), reagente Folin-Ciocalteau (Merck, Alemanha); etanol, metanol (Vetec, Brasil); ácido fosfórico, trietilamina, ácido clorídrico, carbonato de sódio (Dinâmica, Brasil);

3.2 Métodos

As metodologias relacionadas aos estudos farmacêuticos foram delineadas com base nas orientações da RDC 26 (BRASIL, 2014), a qual dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos.

3.2.1 Descrição microscópica das folhas de *S. mombin*

Para análise anatômica foram utilizadas folhas completamente expandidas de três indivíduos cultivados no Horto de Plantas Medicinais Prof. Abreu Matos e no Parque de Desenvolvimento Tecnológico (UFC). Fragmentos da região mediana do limbo foram fixados em solução de paraformaldeído 4%, glutaraldeído 1% e tampão fosfato pH 7,2 (KARNOVSKY, 1965), desidratados em série etílica crescente (10% até 100%) (JOHANSEN, 1940), incluídos e emblocados em historresina (Leica). As secções de 5 μ m, obtidas em micrótomo automático Leica 2065, foram dispostas em lâminas histológicas, coradas em azul de astra e safranina 9:1 (BUKATSCH, 1972) e montadas em resina sintética (Entellan). Testes histoquímicos foram realizados com sulfato ferroso, para verificar a presença de compostos fenólicos, e reagente de sudan IV (GERLACH, 1984), para determinação de lipídios totais. Por fim, as análises do laminário e os resultados obtidos foram através do microscópio óptico Leica DM4000 B LED com sistema de captura de imagem acoplado.

3.2.2 Desenvolvimento de método de preparação e caracterização da droga vegetal (*Spondias mombin* L.)

3.2.2.1 Prospecção química do extrato das folhas de *S. mombin*

O estudo foi realizado segundo metodologias descritas por Matos e Matos (1989) e Matos (2009). Para determinação do perfil químico, foi utilizado o extrato obtido por maceração dinâmica, em uma proporção de 3g da droga vegetal para 10 mL do solvente (solução hidroetanólica a 70%).

O extrato foi submetido a uma triagem química preliminar, através de métodos convencionais, para determinação de alcaloides, flavonoides, cumarinas, taninos e heterósides saponínicos.

3.2.2.2 Secagem e cominuição do material vegetal

As folhas de *S. mombin* foram submetidas à desidratação em estufa com renovação e circulação de ar por períodos de 2, 4, 6, 8, 24, 48, 72, 96 e 120 h, sob temperatura de $60^{\circ} \pm 5^{\circ}\text{C}$. A cada intervalo de tempo, amostras foram retiradas e submetidas a determinações dos teores de umidade. Após secagem, o material foi submetido à cominuição em moinho de facas.

3.2.2.3 Determinação do teor de umidade em balança de infravermelho

Os parâmetros de análise do teor de umidade (quantidade de amostra, temperatura de análise, término da análise e intervalo entre as análises) foram estabelecidos de acordo com Borges *et al.* (2005) e padronizados para o órgão vegetal. Amostras (1 g) da droga vegetal foram submetidas ao aquecimento a 105°C em balança acoplada a sistema de secagem por radiação infravermelha (Marte, Brasil), considerando como término de análise a perda menor que 1 mg em 120 segundos e intervalo entre as análises de 5 minutos. Os resultados obtidos em perda de massa percentual foram expressos como média \pm desvio padrão (DPR) da análise de três amostras.

3.2.2.4 Controle microbiológico da droga vegetal

A contagem total de microorganismos foi realizada segundo metodologia descrita na Farmacopéia Brasileira 5ª Ed (2010). No procedimento adotado, foram transferidos, assepticamente, 10 g das folhas secas e trituradas para 90 mL de água peptonada tamponada. A amostra 1:10 foi submetida à agitação durante 10 min. Em seguida, foram realizadas mais duas diluições (1:100 e 1:1000), empregando o mesmo diluente. Após a homogeneização, foi pipetado 1 mL de cada solução e depositado em placas esterilizadas, sendo adicionados 20 mL de ágar soja-caseína para bactérias e ágar Sabouraud-dextrose para fungos e leveduras, ambos esterilizados e fundidos a cerca de 45 °C, utilizando-se duas placas para cada meio e diluição. Após a solidificação do meio de cultura, as placas foram incubadas a 32,5 °C ± 2,5 °C durante 3 - 5 dias e a 22,5 °C ± 2,5 °C durante 5 - 7 dias, para determinação do número de micro-organismos aeróbios totais e bolores e leveduras, respectivamente. Decorrido este período, foi realizada a contagem do número de colônias com o auxílio de contador. Tomando-se a média aritmética das placas de cada meio, o número de unidades formadoras de colônias (UFC/g) foi calculado. A identificação de patógenos, como *Salmonella spp* e *Escherichia coli* foi realizada segundo condições descritas na **Tabela 1**. Os testes confirmatórios da presença dos microorganismos foram realizados conforme descrito na Farmacopeia Brasileira 5ª (2010).

Tabela 1 – Identificação de patógenos nas folhas de *Spondias mombin*.

Microorganismo	Meio de enriquecimento	Temperatura/ Tempo de incubação	Meio seletivo	Temperatura/ Tempo de incubação
<i>Escherichia coli</i>	Caldo MacConkey	43 °C ± 1 °C /24 – 48 h	Ágar Mac Conkey	32,5 °C ± 2,5 °C /18 – 72 h
<i>Salmonella spp</i>	Caldo tetracionato	32,5 °C ± 2,5 °C /24 h	Ágar SS	32,5 °C ± 2,5 °C / 18 – 48 h

3.2.2.5 Análise granulométrica

A determinação granulométrica foi realizada conforme metodologia descrita pela Farm. Bras. 5ª Ed. (2010), na qual três amostras da droga vegetal (25 g cada) foram submetidas à passagem forçada por vibração através de tamises com abertura de malhas

correspondentes a 2,00; 0,710; 0,350; 0,250; 0,180; 0,125 mm e um coletor, durante 15 min. Terminado o processo, as frações foram retiradas dos tamises e do coletor para quantificação em relação à proporção percentual de massa retida em cada tamis.

O pó foi classificado quanto ao seu grau de divisão de acordo com a Farm. Bras. 5ª Ed. (2010) em grosso, moderadamente grosso, semifino, fino e finíssimo.

O tamanho médio das partículas foi determinado através de método aritmético (ALLEN *et al.*, 2007).

3.2.2.6 Determinação do teor de cinzas totais

Para determinação do teor de cinzas totais foram pesados exatamente 3,0 g da droga vegetal pulverizada, sendo transferidos para um cadinho de porcelana, previamente calcinado e pesado. A amostra foi incinerada, primeiramente em chama de bico de Bunsen e depois em forno mufla a até no máximo 600 ± 25 °C até completa eliminação do carvão (FARM. BRAS. 5ª Ed., 2010). Terminada a incineração, o cadinho foi resfriado em dessecador para posterior pesagem. A análise foi realizada em 3 réplicas. O percentual do teor de cinzas foi calculado em função da droga seca.

3.2.2.7 Determinação do teor de cinzas insolúveis em ácido

Ao resíduo obtido na determinação de cinzas totais, foram adicionados 25 mL de ácido clorídrico 7 % (p/v) e submetido à fervura durante 5 min. em cadinho coberto com vidro de relógio. Em seguida, o vidro de relógio foi lavado com 5 mL de água quente, sendo a mesma recolhida no próprio cadinho. O material insolúvel em ácido foi filtrado em papel de filtro isento de cinzas e lavado com água quente até obter um filtrado neutro. O papel de filtro contendo o resíduo foi transferido para o cadinho original e submetido à secagem prévia em chapa aquecedora e posterior incineração em forno mufla a 500 °C até peso constante (FARM. BRAS. 5ª Ed., 2010). A porcentagem de cinzas insolúveis em ácido foi calculada em relação ao material vegetal utilizado no início do ensaio do teor de cinzas totais conforme descrito no item anterior, e realizada a média de 3 determinações.

3.2.2.8 Determinação do Índice de Intumescência

Em uma proveta com tampa esmerilhada foi adicionado exatamente 1 g da droga vegetal pulverizada e acrescido 25 mL de água destilada. A proveta foi agitada a cada 10 min por uma hora e a mistura permaneceu em repouso por 3 horas, à temperatura ambiente. O volume ocupado pela droga pulverizada no início e no final do teste foi medido (FARM. BRAS. 5ª Ed., 2010). O índice de intumescência foi então calculado pela média de 3 determinações.

3.2.3 Validação de método analítico para quantificação, por espectrofotometria, de fenóis totais, marcador químico, no extrato de *S. mombin*

O reagente de Folin-Ciocalteu é uma mistura de dois ácidos, o fosfomolibdico e fosfotungstístico, os quais possuem, respectivamente, o molibdênio e o tungstênio no estado de oxidação 6⁺. Estes dois compostos quando estão na presença de agentes redutores, como polifenóis, mudam de estado oxidativo, levando a formação de coloração azul, cuja intensidade é medida por espectrofotometria. A metodologia seguiu o que foi descrito por Fogliano, *et al.* (1999) com algumas modificações de acordo com o item 3.2.5.1.

3.2.3.1 Preparo da solução padrão de ácido gálico

A solução padrão de ácido gálico (solução estoque) foi preparada dissolvendo-se o equivalente a 20 mg do padrão em 2 mL de etanol puro e completando-se o volume para 10 mL com água ultra-pura, obtendo-se uma solução de 2,0 mg/mL.

3.2.3.2 Preparo do extrato de *S. mombin* utilizado no processo de validação

O extrato utilizado no processo de validação foi obtido a partir da droga vegetal previamente seca e pulverizada com granulometria adequada, a qual foi submetida à extração por maceração dinâmica, em uma proporção de 3 g da droga vegetal para 10 mL do solvente (solução hidroetanólica a 70 %).

3.2.3.3 Validação de metodologia analítica para determinação do teor de fenóis totais

Para assegurar que um método analítico forneça informações confiáveis e interpretáveis sobre a amostra, este deve sofrer uma avaliação denominada validação. A validação é um processo que fornece uma evidência documentada de que o método realiza aquilo para o qual é indicado fazer, ou seja, ela garante, através de estudos experimentais, que o método atenda às exigências das aplicações analíticas, assegurando a confiabilidade dos resultados (RIBANI *et al.*, 2004; BRASIL, 2003).

De acordo com a finalidade do ensaio analítico, o Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos RE 899 (BRASIL, 2003) estabelece quatro categorias e relaciona os respectivos parâmetros necessários para validação do método. Nesse contexto, o estudo de validação do presente método, o qual se enquadra na categoria I (Testes quantitativos para a determinação do princípio ativo em produtos farmacêuticos ou matérias-primas), deu-se com a determinação dos seguintes parâmetros: especificidade, linearidade e faixa de trabalho, precisão por repetibilidade, precisão intermediária, exatidão e robustez (BRASIL, 2003). Os dados foram expressos como μg de EAG (equivalentes de ácido gálico) por mL de extrato.

Especificidade

Para verificação de possíveis interferentes, foram traçados espectros de absorção da amostra, ácido gálico ($3,33 \mu\text{g/mL}$) e de possíveis substâncias interferentes, glicose ($6,67 \mu\text{g/mL}$) e ácido cítrico ($6,67 \mu\text{g/mL}$), na faixa compreendida entre 400 – 900 nm.

Linearidade e intervalo

A linearidade do presente método foi investigada com emprego da solução padrão de ácido gálico. Os dados para comprovação da linearidade foram obtidos empregando-se o cálculo de regressão linear pelo método dos quadrados mínimos. Também foi determinado o coeficiente de correlação e o desvio padrão relativo. Segundo a RE nº 899 (BRASIL, 2003), o coeficiente de correção linear deve ser no mínimo 0,99. Contudo, para extratos vegetais e fitoterápicos esse valor passa a ser aceito como sendo igual ou superior a 0,98 (BRASIL, 2015).

A curva padrão foi construída com emprego de 5 (cinco) concentrações de ácido gálico, com faixa de trabalho entre $0,83$ e $6,67 \mu\text{g/mL}$, com emprego de solução estoque de

2000 µg/mL (**Tabela 2**). Para cada ponto da curva, foram utilizadas três réplicas de cada solução.

Tabela 2 – Concentrações e volumes de ácido gálico empregados na construção da curva padrão por espectrofotometria.

Nível	Volume (µL) de SEPAG (2000 µg/mL)	Volume final (µL)	Concentração final (µg/mL)
1	62,5	1500	0,83
2	125	1500	1,67
3	250	1500	3,33
4	375	1500	5,00
5	500	1500	6,67

SEPAG: solução estoque padrão ácido gálico

Precisão

Os ensaios para a determinação da precisão do método analítico foram realizados pelo estudo da repetibilidade e da precisão intermediária. Para a avaliação da repetibilidade, foram preparadas, sob as mesmas condições (mesmo analista e mesma instrumentação), seis soluções analíticas do extrato etanólico de *S. mombin* correspondente à concentração de fenóis totais a 100 % da concentração de trabalho.

A precisão intermediária foi realizada de maneira semelhante ao ensaio de repetibilidade, por dois analistas diferentes, utilizando seis soluções analíticas do extrato etanólico de *S. mombin* correspondente à concentração de fenóis totais a 100 % da concentração de trabalho.

Exatidão/Recuperação

Esta foi avaliada contemplando o intervalo linear do método, através da adição de quantidades conhecidas do padrão de ácido gálico na solução amostra do extrato, de forma a obter soluções com concentrações equivalentes a 25, 100 e 200% do valor esperado, as quais foram adicionadas do reagente de Folin-Ciocalteu conforme metodologia descrita anteriormente. As amostras foram preparadas sob as mesmas condições, com três réplicas de cada solução, conforme a **Tabela 3**. Os valores de absorvâncias foram usados para calcular o

valor médio das concentrações, taxa de recuperação, desvio padrão (DP) e desvio padrão relativo (DPR).

Tabela 3 – Preparo das soluções para o ensaio de exatidão/recuperação.

Nível de Recuperação (%)	Volume (µL) de SAE	Volume (µL) de SEPAG	Concentração da SEPAG
25	25	75	0,83
100	25	75	3,33
200	25	75	6,67

SAE: solução amostra do extrato; SEPAG: solução estoque padrão de ácido gálico.

Robustez

Para a avaliação da robustez foram realizadas variações deliberadas em fatores considerados críticos para o método analítico (volume de Folin-Ciocalteu e carbonato de sódio) por meio de um planejamento fatorial 2^2 com um ponto central, o qual pode ser observado nas **Tabelas 4 e 5**, e diferentes comprimentos de onda (715 e 785 nm). A variação nos volumes dos reagentes (Folin-Ciocalteu e Na_2CO_3 10%) foi determinada com auxílio dos certificados de calibração das pipetas automáticas empregadas na validação do método analítico. Os limites estabelecidos consideraram o erro de medida de cada pipeta ao qual foi multiplicado um fator de 3. Além disso, por conveniência, os valores foram ampliados para obtenção dos volumes descritos na **Tabela 5**. As amostras foram preparadas como descrito no item Precisão e cada preparação foi realizada em duplicata. Os resultados foram avaliados mediante comparação feita através do teste t e teste F.

Tabela 4 – Fatores estudados no planejamento fatorial para avaliação da robustez e seus níveis +1, 0 e -1.

Fatores	Denominação	Níveis		
	Não Codificados	-1	0	+1
Folin-Ciocalteu	FC	490 µL	500 µL	510 µL
Carbonato de sódio	CS	490 µL	500 µL	510 µL

Tabela 5 – Planejamento Fatorial para avaliação da robustez

Ensaio	FC (µL)	CS (µL)	Água (µL)
1	510	510	380
2	510	490	400
3	490	510	400
4	490	490	420
5	500	500	400

Os experimentos foram feitos em duplicata e as leituras foram realizadas em 715 e 785 nm.

3.2.4 Desenvolvimento e seleção do método de produção do extrato de *S. mombin* (ESM)

O estudo de extração a partir das folhas de *S. mombin* teve como objetivo a otimização do processo com avaliação da influência de alguns fatores sobre a extração de fenóis totais e rendimento de sólidos. Para tanto, foram empregados dois métodos extrativos: maceração dinâmica e turbólise. Para melhor entender tais processos, um planejamento fatorial do tipo Box-Behnken foi aplicado para cada procedimento extrativo. Esse modelo de planejamento fatorial fracionado tem três variáveis e três níveis, mas apenas quinze ensaios (BOX *et al.*, 1978). O planejamento experimental e a análise dos resultados foram realizados utilizando-se o *Software Statistica 10*.

Para determinar o volume de solvente que foi adicionado à massa de planta para obter o volume de 20 mL de extrato, foram realizados testes preliminares com cada quantidade de massa de planta utilizada. Desta forma, verifica-se qual a quantidade de solvente se adsorve à massa de planta e, assim, determina-se a quantidade de solvente a se adicionar na extração.

3.2.4.1 Planejamento experimental e métodos de obtenção dos extratos

O estudo de extração utilizando o procedimento de maceração dinâmica seguiu o planejamento experimental conforme descrito na **Tabela 6**, sendo os fatores estudados bem como os níveis selecionados (alto e baixo, usando a nomenclatura de +1 e -1 em sua forma codificada e 0 para o valor intermediário) demonstrados na **Tabela 7**.

Tabela 6 – Planejamento Box-Behnken do processo de Maceração Dinâmica, com fatores codificados.

Ensaio	X1	X2	X3
1	-1	-1	0
2	+1	-1	0
3	-1	+1	0
4	+1	+1	0
5	-1	0	-1
6	+1	0	-1
7	-1	0	+1
8	+1	0	+1
9	0	-1	-1
10	0	+1	-1
11	0	-1	+1
12	0	+1	+1
13	0	0	0
14	0	0	0
15	0	0	0

X1= Proporção droga vegetal:solvente (DV:solvente), X2= Tempo (t) e X3= Temperatura (T).

Tabela 7 – Fatores estudados no planejamento Box-Behnken do processo extrativo Maceração Dinâmica e seus níveis +1, 0 e -1.

Fatores	Denominação		Níveis		
	Codificados	Não Codificados	-1	0	+1
Proporção DV:solvente	X1	Ms:Mp	0,1	0,2	0,3
Tempo (horas)	X2	T	1	2,5	4
Temperatura (°C)	X3	T	30	45	60

No método de extração maceração dinâmica, a massa de planta foi adicionada ao solvente em erlenmeyer devidamente tampado, utilizando um agitador magnético de 15 pontos com controle de velocidade. Os frascos de extração foram mantidos em um banho termostático com ar de temperatura digital controle AB-15 (Labmaq do Brasil Ltda, SP). Ao final de cada tempo de extração determinado pelo planejamento experimental da **Tabela 6**, o residual de planta foi separado do extrato por meio de filtração à vácuo e o volume obtido em cada experimento foi determinado através de uma proveta graduada. Três quantidades de

massa de planta (2, 4 e 6 g) foram utilizadas e o solvente selecionado para a extração foi uma mistura de etanol e água na proporção 70 Álcool: 30 Água.

O estudo de extração utilizando o procedimento de turbólise seguiu o planejamento experimental conforme descrito na **Tabela 8**, sendo os fatores estudados bem como os níveis selecionados (alto e baixo, usando a nomenclatura de +1 e -1 em sua forma codificada e 0 para o valor intermediário) demonstrados na **Tabela 9**.

No método de extração turbólise, a massa de planta foi adicionada ao solvente em um frasco de vidro que possui uma camisa térmica, por onde circulava um fluido de um banho termostático a fim de evitar que a temperatura não ultrapassasse 35 °C. As folhas secas e moídas de *S. mombin* foram submetidas à extração sob agitação contínua em diferentes rpm, de acordo com o planejamento experimental da **Tabela 8**, em aparelho Ika Ultra Turrax (T25) por tempos pré-determinados. Após o término da extração, os extratos passaram por processo de filtração à vacuo e o volume obtido em cada experimento foi determinado através de uma proveta graduada. Três quantidades de massa de planta (2, 4 e 6 g) foram utilizadas e o solvente selecionado para a extração foi uma mistura de etanol e água na proporção 70 Álcool: 30 Água.

Tabela 8 – Planejamento Box-Behnken do processo de Turbólise, com fatores codificados.

Ensaio	X1	X2	X3
1	-1	-1	0
2	+1	-1	0
3	-1	+1	0
4	+1	+1	0
5	-1	0	-1
6	+1	0	-1
7	-1	0	+1
8	+1	0	+1
9	0	-1	-1
10	0	+1	-1
11	0	-1	+1
12	0	+1	+1
13	0	0	0
14	0	0	0
15	0	0	0

X1= Proporção droga vegetal:solvente (DV:solvente), X2= Tempo (t) e X3= Velocidade de agitação (v).

Tabela 9 – Fatores estudados no planejamento Box-Behnken do processo extrativo Turbólise e seus níveis +1, 0 e -1.

Fatores	Denominação		Níveis		
	Codificados	Não Codificados	-1	0	+1
Proporção DV:solvente	X1	Ms:Mp	0,1	0,2	0,3
Tempo (min)	X2	T	2	10	18
Velocidade de agitação (rpm)	X3	V	3200	10200	17200

3.2.5 Caracterização do extrato de *S. mombin*

Após a escolha da melhor condição de extração, produziu-se 2 replicatas do extrato obtido na condição escolhida e além do rendimento de sólidos e teor de fenóis totais, realizou-se a medida do pH e densidade relativa, a fim de mostrar a reprodutibilidade do processo extrativo, para posterior análise do teor de geraniina e ácido clorogênico.

3.2.5.1 Determinação de fenóis totais por espectrofotometria

Para determinação de fenóis totais foi empregado o método de Fogliano, *et al.* (1999) com adaptações. O método foi validado de acordo com o item 3.2.3.3. Alíquotas (100µL) das soluções amostra (extrato hidroetanólico de *S. mombin*) e padrão de trabalho (ácido gálico) foram transferidas para tudo de ensaio, onde foram adicionados 400 µL de água ultra-pura, 500 µL do reagente de Folin-Ciocalteu e 500 µL de Na₂CO₃ a 10%. Os tubos foram homogeneizados e mantidos no escuro por 1 h à temperatura ambiente, realizando-se, posteriormente, leitura das amostras e do branco (no qual a amostra foi substituída pelo mesmo volume de água) em 715 nm. As leituras foram realizadas em triplicata e os resultados expressos em equivalente de ácido gálico.

3.2.5.2 Rendimento de sólidos

O rendimento de sólidos, RS, foi calculado em função dos sólidos solúveis extraídos em relação à quantidade de material utilizada para a extração (p/p). Para determinar o teor de sólidos no extrato foi necessário determinar a umidade nos extratos, para tanto uma quantidade de extrato (aproximadamente 0,5 g) foi adicionada em uma balança analisadora de

umidade com lâmpada de halogênio (Ohaus MB 45). As leituras foram realizadas em triplicata e o resultado foi expresso em porcentagem de umidade, essa, retirada de 100% forneceu o teor de sólidos no extrato (TEIXEIRA, 2009).

3.2.5.3 pH

Para determinação do pH das soluções extrativas, 10,0 mL de cada solução em teste foi analisada em potenciômetro calibrado com solução tampão de fosfato e acetato, pH 7,0 e 4,0, respectivamente, à 25 °C. As análises foram realizadas em triplicata.

3.2.5.4 Densidade relativa

A densidade das soluções extrativas em teste foi determinada com auxílio de um picnômetro com capacidade de 5 mL previamente calibrado. A amostra foi transferida para o picnômetro, ajustando-se a temperatura para 20 °C, o excesso da substância foi removido e o picnômetro então pesado. A densidade relativa foi calculada de acordo com a equação abaixo. Os resultados foram expressos em g/mL e referem-se a média de três repetições.

$$\text{densidade relativa} = \frac{\text{peso do picnômetro (amostra)} - \text{peso do picnômetro vazio}}{\text{peso do picnômetro (água)} - \text{peso do picnômetro vazio}} \quad (1)$$

3.2.5.5 Detecção e determinação do teor de Geraniina (GR) e Ácido Clorogênico (AC) por CLAE-DAD

O perfil cromatográfico do ESM foi realizado por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência - CLAE. O aparelho utilizado foi Waters, modelo Alliance 2695, com detector de arranjo de foto diodos (DAD), modelo 2690, injetor automático e forno para coluna. As condições cromatográficas adotadas foram as seguintes: fluxo 1,5 mL/min, fase móvel (**Tabela 10**) acetonitrila (fase A) e solução ácido fosfórico 0,2 % e Trietilamina 0,2 % (fase B), pH 2,5, eluição gradiente (**Tabela 11**), volume de injeção 20 µL, detecção em 276 nm para a geraniina e 375 nm para ácido clorogênico, forno a 45 °C, coluna Phenomenex Kinetex Evo C18 com 150 mm x 4,6 mm e tamanho da partícula interna de 5 µm e pré-coluna (4,6 mm, Phenomenex) de constituição semelhante a da coluna.

Tabela 10 – Composição da fase móvel utilizada no método analítico para detecção e quantificação de AC e GR

Fase	Composição	Quantidade
Aquosa (A)	Ácido fosfórico	1 mL
	Trietilamina	1 ml
	Água MilliQ q.s.p	0,5 L
Orgânica (B)	Acetonitrila	Grau HPLC

Tabela 11 – Programação gradiente para eluição da fase móvel utilizada no método analítico para detecção e quantificação de AC e GR em ESM por CLAE-DAD

Tempo (min)	Fluxo (mL/min)	A (%)	B (%)
0	1,5	2,5	97,5
10	1,5	2,5	97,5
11	1,5	5,0	95,0
25	1,5	5,0	95,0
26	1,5	2,5	97,5

A água utilizada nas análises foi purificada através de sistema de filtração Mili-Q (Môlipore USA), a fase móvel foi filtrada em aparato de filtragem (Millipore, EUA) contendo membrana filtrante de 0,45 μm de poro (Millipore, EUA), os demais reagentes utilizados correspondem a reagentes grau HPLC. Os ativos geraniina (GR) e ácido clorogênico (AC) foram empregados como padrões, em que soluções de cada substância foram preparadas por dissolução com auxílio inicial de 2,0 mL de etanol e posterior diluição em água.

Os extratos obtidos por maceração dinâmica (M) e turbólise (T), incluindo àqueles que apresentaram as menores (M1 e T1) e maiores (M6 e T6) concentrações de fenóis totais foram os eleitos para a quantificação dos ativos. O volume de 100 μL de cada extrato foi transferido para um balão de 10 mL, com 1,0 mL de água, homogenizou-se e o volume foi completado com água. A solução resultante foi filtrada com auxílio de filtro para seringa PVDF com 25 mm de diâmetro e porosidade 0,45 μm (Millipore, EUA). Comparou-se os cromatogramas de M1 com M6 e T1 com T6 através do modo “Timed Wavelength”, com a detecção em 325 nm de 0 - 10 min e 276 de 10 – 30 min.

Nos cromatogramas dos extratos eleitos, a pureza de pico dos ativos foi determinada a fim de demonstrar a especificidade do método cromatográfico, para isso contou-se com auxílio do programa Empower 2[®] empregando para análise faixa de comprimento de onda entre 240 e 400 nm e *threshold* calculado com ruído (entre 0.25-0.75

min) mais a influência do solvente (mantido como 1°, ajuste padrão do programa Empower 2®).

Também realizou-se a quantificação dos ativos por padronização externa, através do ensaio de linearidade com a construção de curva de calibração utilizando 7 concentrações do padrão de AC e 5 concentrações de GR. Para realização deste ensaio, 12,5 mg de padrão de AC foram pesados e transferidos para balão volumétrico de 25 mL com 2,0 mL de etanol para completa solubilização do analito e o volume completado com água para obtenção da Solução Estoque de ácido clorogênico (SEAC) a 500 µg/mL; bem como 10,0 mg de padrão de GR foram pesados e transferidos para balão volumétrico de 5 mL com 2,0 mL de etanol para completa solubilização do analito e o volume completado com água para obtenção da Solução estoque de geraniina (SEGR) a 2000 µg/mL. A SEAC foi utilizada para obtenção de sete soluções mais diluídas com concentrações de 2,5; 5; 7; 10; 12,5; 15 e 17,5 µg/mL, contemplando o intervalo de 25 – 175 % (considerando 10 µg/mL de AC como 100%), as concentrações foram ajustadas, pois o padrão de AC utilizado era hemi-hidratado (**Tabela 12**). A SEGR foi utilizada para a obtenção de cinco soluções mais diluídas com concentrações de 16; 32; 48; 64 e 80 µg/mL, contemplando o intervalo de 33,33 – 166,67 % (considerando 48 µg/mL de geraniina como 100%).

As soluções foram preparadas em duplicata, sendo realizadas duas corridas em cada amostra. A linearidade da média das áreas dos picos obtidos nos cromatogramas pela concentração de AC ou de GR foi estimada pelo método dos mínimos quadrados.

Tabela 12 – Concentrações e volumes de AC empregados na construção da curva padrão por CLAE.

Nível	Volume (µL) de SEAC (500 µg/mL)	Concentração (µg/mL)	Concentração real (µg/mL)
1	50	2,50	2,45
2	100	5,00	4,90
3	150	7,50	7,35
4	200	10,00	9,80
5	250	12,50	12,15
6	300	15,00	14,70
7	350	17,50	17,15

SEAC: solução estoque padrão ácido clorogênico. Concentração real ajustada para AC hemi-hidratado

3.2.6 Avaliação da atividade anti-inflamatória

3.2.6.1 Isolamento de polimorfonucleados (PMN). Polimorfonucleares, predominantemente neutrófilos (80-90 %) com viabilidade de $90 \pm 2,0$ % (exclusão ao azul de Tripán), foram obtidos de sangue humano cedido pelo Centro de Hematologia e Hemoterapia do Ceará – HEMOCE (*buffy coat*) e isolados de acordo o método de Lucisano e Mantovani (1984). O sangue foi centrifugado, o plasma desprezado e o soro lavado diversas vezes com solução salina, utilizando solução de gelatina 2,5 % (p/v) para formar um gradiente de separação dos componentes sanguíneos.

3.2.6.2 Teste do MTT. A citotoxicidade foi avaliada através do ensaio MTT (MOSMANN, 1983). O ESM (1 – 200 $\mu\text{g/mL}$) e a GR (1 – 100 $\mu\text{g/mL}$) foram incubados com os neutrófilos isolados. Decorridos 30 min de incubação o meio foi descartado e incubado um novo meio (200 μL) contendo MTT na concentração de 5 mg/mL , para serem então incubadas por mais 3 h. Por fim, o sobrenadante foi descartado e adicionado então 150 μL de DMSO puro para a lise das células e solubilização do formazan, nesse instante as placas foram agitadas durante 15 min com auxílio de um agitador de placas. A absorbância foi medida em leitor de microplacas a 540 nm. A ausência da redução do MTT indica a diminuição da viabilidade celular. Os experimentos foram realizados pelo menos em triplicata, repetidos em três dias diferentes.

3.2.6.3 Determinação da concentração de mieloperoxidase (MPO). A suspensão de neutrófilos (5×10^6 céls/mL) foi pré-incubada durante 15 min a 37 °C com o ESM e GR em concentrações crescentes, veículo (controle) ou HBSS (células não tratadas). A seguir, foi adicionado PMA (0,1 μM) e manteve-se por mais 15 min a 37 °C. O sobrenadante obtido, rico em enzimas liberadas pela degranulação leucocitária, foi utilizado na determinação da concentração de MPO segundo metodologia descrita por Úbeda *et al.* (2002). A construção de uma curva padrão pela adição de quantidades crescentes de MPO (0,125 – 3 U/mL) relaciona a absorvância com as unidades enzimáticas/mL. Os resultados foram expressos como percentual de inibição da liberação de mieloperoxidase (DE YOUNG *et al.*, 1989). Foi empregado como padrão, indometacina – 36 $\mu\text{g/mL}$.

3.2.7 Avaliação da atividade anti-herpética in vitro

3.2.7.1 Cultivo das células e vírus. A linhagem celular Vero (células de rim de macaco verde africano, ATCC CCL-81), foram cultivadas a 37 °C com meio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) suplementado com 10 % de soro fetal bovino (SFB) e adicionado dos antimicrobianos estreptomicina (100 µg/mL), penicilina (100 UI/mL) e anfotericina B (2,5 µg/mL). Os vírus HSV-1 (Herpes simplex tipo-1) isolados a partir de espécimes clínicos foram cedidos pelo Depto de Virologia da UFRJ. O estoque viral foi preparado em células e estocado a – 20 °C com 10 % de glicerol.

3.2.7.2 Teste de citotoxicidade. A citotoxicidade do ESM e da molécula isolada, GR, em células VERO foi avaliada através do Ensaio de Proliferação celular MTT (brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio), de acordo com as especificações do fabricante. Assim, para a realização dos ensaios, células VERO foram cultivadas em microplacas de 96 poços (Nunc A/S, Roskilde) a 37 °C e 5 % de CO₂. Após a formação da monocamada com uma confluência de aproximadamente 70 %, as substâncias teste foram adicionadas em diferentes concentrações (125 - 1000 µg/mL) e incubada por 72 h a 37 °C. Após este período, determinou-se a viabilidade celular. A porcentagem de viabilidade celular foi calculada pela fórmula $[100 - (At/Ac) \times 100]$, onde At e Ac referem-se a absorbância dos compostos testados e do controle (células na ausência dos compostos), respectivamente. A concentração citotóxica de 50% (CC₅₀) foi calculada como a concentração da substância capaz de reduzir a densidade ótica do produto do MTT em 50 % em relação ao controle, por regressão linear.

3.2.7.3 Ensaio Anti-herpes. Titulação viral (Método Reed & Muench). A atividade antiviral do ESM e da molécula isolada, GR, foi avaliada seguindo método de Reed & Muench (1938) para obtenção da TCID₅₀ (dose que dá origem ao efeito citopático em 50% das culturas inoculadas) e da %IV (porcentagem de inibição viral). Este método estatístico é usado quando os vírus não formam plaques adequados para contagem. Neste teste são feitas 6 repetições por concentração. As células foram cultivadas em placas de 96 poços e o vírus inoculado, em diluições ao décimo (10^{-1} a 10^{-9}) na presença e ausência (controle de vírus) das substâncias testes. Após inoculação do vírus e tratamento com as substância, as placas foram incubadas em estufa de CO₂ a 37 °C durante 5 dias. Foram feitas leituras diárias para observação de efeito citopático (CPE) característico do vírus (+) ou não (-). Ácido fosfonofórmico- PFA 0,3-

10 mg/mL (Foscarnet®, Hospira, USA) foi usado como controle positivo. Após leitura final os dados foram computados e o cálculo do título feito pela seguinte fórmula:

$$\text{TCID}_{50} = \frac{\text{diluição infecciosa } \uparrow 50\%^* - 50\%}{\text{diluição infecciosa } \uparrow 50\% - \text{diluição infecciosa } \downarrow 50\%^**} \quad (2)$$

O resultado final foi expresso como título viral obtido por TCID_{50} . Assim foi possível obter dois títulos, isto é, o título do vírus controle e o do vírus tratado e calcular a porcentagem de inibição viral (%IV), de acordo com a seguinte fórmula:

$$\% \text{ de IV} = 1 - (\text{Título viral controle} / \text{Título viral tratado}) \times 100 \quad (3)$$

A concentração inibitória 50 % (CI_{50}) foi calculada como a concentração capaz de reduzir em 50 % o título viral e o Índice de seletividade (IS) foi calculado através da relação $\text{CC}_{50}/\text{CI}_{50}$.

3.2.8 Análise estatística

Os resultados da validação do método analítico e alguns relacionados com o preparo da droga vegetal, das soluções extrativas foram processados utilizando o programa Excel® 2010 (USA), adotando os valores de referências presentes na legislação vigente quando pertinente. Os dados oriundos dos planejamentos fatoriais foram processados utilizando o *Software Estatística 10* ($p \leq 0,05$), usando o GLM (Modelo linear geral). A análise estatística dos ensaios biológicos foi realizada com auxílio do programa Graph Pad Prism® 4.0 (USA), sendo os resultados expressos como a média \pm erro padrão da média (EPM). A comparação entre as médias foi realizada utilizando-se o teste “t” de Student seguida pelo teste de Tukey, como teste post hoc ($p \leq 0,05$).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

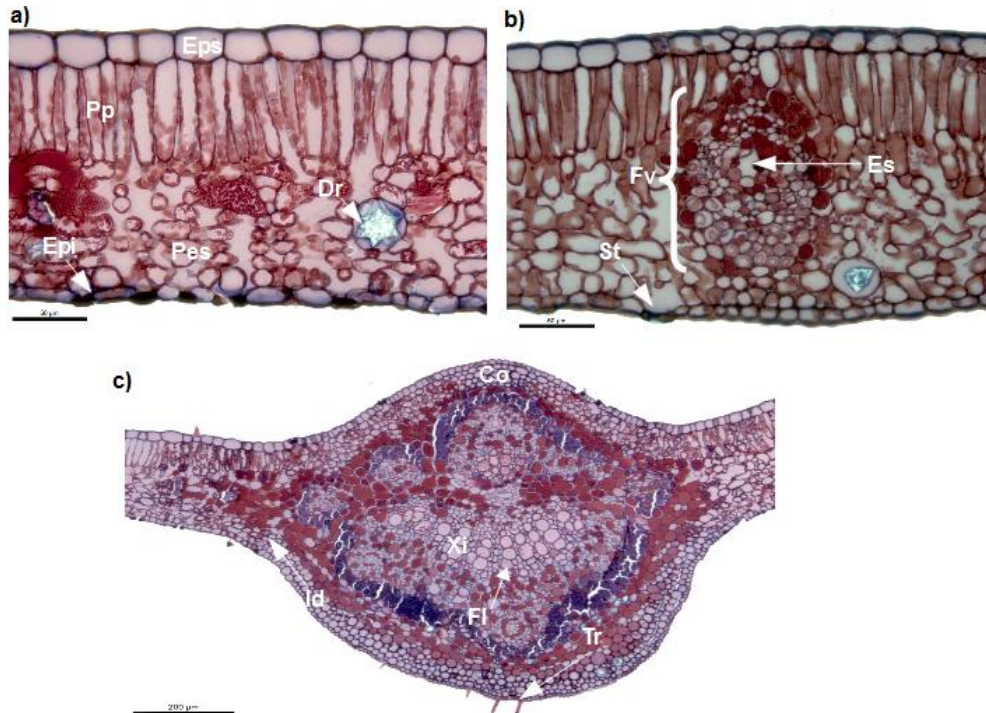
O Brasil, em especial o Nordeste, possui uma cultura forte quanto ao uso de plantas medicinais. Nas últimas décadas, várias espécies têm sido estudadas, o que é imprescindível para o cumprimento de critérios mínimos necessários para o desenvolvimento de um medicamento fitoterápico (BRASIL, 2014; WHO, 1998). Nesse contexto, foi realizado estudo interdisciplinar (botânico, farmacognóstico e farmacológico) das folhas de *S. mombin* visando a obtenção de um medicamento antiviral.

4.1 Descrição anatômica da folha de *S. mombin*

A etapa inicial do estudo de plantas medicinais consiste na confirmação da identidade das mesmas, com base em descrições macro e microscópicas associadas a análise química do órgão vegetal e, em alguns casos, à análise molecular (LIN *et al.*, 2015). Tais informações são importantes no controle de qualidade farmacobotânico de matérias-primas vegetais, proporcionando condições para a identificação de lotes adulterados (SANCHES, 2007).

Análise microscópica da folha de *S. mombin* (**Figura 3**) mostrou que esta é uma folha peciolada, simples, anfiestomática com epiderme uniestratificada nas faces adaxial e abaxial com mesofilo heterogêneo dorsiventral (**Figura 3a**), composto por uma camada de parênquima clorofiliano paliçádico e sete a oito camadas de parênquima clorofiliano esponjoso. Na porção do parênquima esponjoso encontraram-se idioblastos contendo drusas. As células parenquimáticas em geral apresentaram vacúolo que empurra o citoplasma e os cloroplastos para junto da parede celular. Nos feixes vasculares (**Figura 3b**), observou-se uma bainha de feixe de células ricas em compostos fenólicos. Na porção do floema, foi observado estrutura secretora revestida de células epiteliais arredondadas e de citoplasma denso. Na região da nervura central (**Figura 3c**), pode ser observado que o floema envolve o xilema com discreto crescimento secundário (protoxilema, metaxilema, faixa cambial). Também foi possível observar que na face abaxial, há uma ou duas camadas de parênquima colenquimatoso e parênquima com inúmeros idioblastos contendo compostos fenólicos, formando uma bainha em torno do feixe. Já na face adaxial foi possível visualizar o parênquima clorofiliano, além de tricomas tectores.

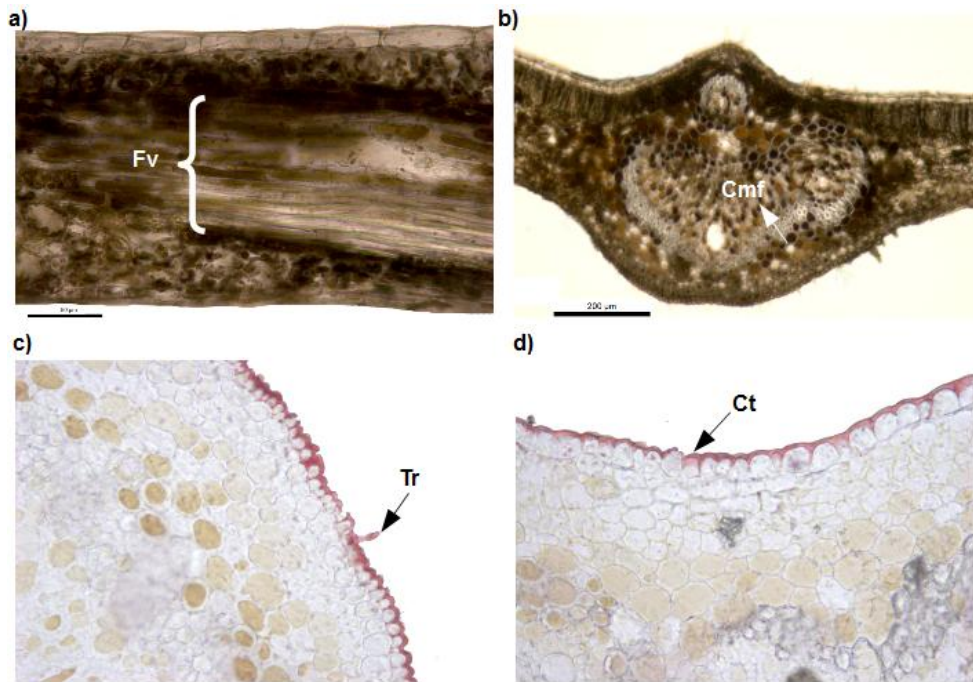
Figura 3 – Secções transversais das folhas de *Spondias mombin*.



a) Aspecto geral do mesofilo mostrando parênquima paliçádico (Pp), parênquima esponjoso (Pes), detalhe de idioblasto contendo drusa (Dr), epiderme adaxial (Eps) e epiderme abaxial (Epi); b) epiderme da face abaxial da folha com estômato (St) e estrutura secretora (Es) junto ao feixe vascular (Fv); c) Aspecto da nervura central revelando idioblastos (Id), tricomas (Tr), floema (Fl), xilema (Xi) e parênquima colenquimatoso (Co); Legenda: a, b, c – coloração safrablau.

A avaliação histoquímica das folhas de cajá para compostos fenólicos, comprovou a presença de inúmeras células com material fenólico, enquanto que o teste com Sudan IV evidenciou apenas a cutícula delgada (**Figura 4**).

Figura 4 – Análise histoquímica das folhas de *Spondias mombin*.



a) Feixe vascular (Fv); b) Panorâmica da nervura central indicando inúmeras células com material fenólico (Cmf); c) Tricoma (Tr); d) Cutícula delgada (Ct). Legenda: a, b – teste com solução de sulfato ferroso para compostos fenólicos totais; c, d – teste com sudan IV para lipídios totais.

Alguns estudos têm sido realizados a fim de elucidar a morfoanatomia de espécies relevantes para a família Anacardiaceae. Entre as estruturas principais podem-se citar estômatos anomocíticos, tricomas simples, cristais de oxalato de cálcio, mesófilo dorsiventral e nervura central com vários feixes vasculares colaterais dispostos em anel. Além disso, outras características associadas à família é a presença de canais secretores ou ductos resiníferos geralmente associados ao floema (METCALFE & CHALCK, 1950 *apud* DUARTE *et al.*, 2007; CRONQUIST, 1981 *apud* NASCIMENTO-SILVA *et al.*, 2011; RIBEIRO *et al.*, 1999 *apud* NASCIMENTO-SILVA *et al.*, 2011; MILLIAN & CEVALLOS-FERRIZ, 2005; TATKE *et al.*, 2012).

Em estudo morfoanatômico de *Spondias tuberosa*, Nascimento-Silva & Paiva (2007) mostraram que as folhas desta espécie possuem as seguintes características: lâmina hipostomática, epiderme uniestratificada, cutícula delgada, tricomas tectores simples, estômatos anomocíticos e tetracíticos, mesófilo dorsiventral, parênquima paliçádico uniestratificado, parênquima esponjoso com 4-6 camadas celulares e idioblastos com cristais de oxalato de cálcio em forma de drusas. Observa-se que algumas destas características foram apresentadas por *S. mombin* no presente estudo.

Ghazalli & Mohammad (2014) em estudo anatômico de folhas de *S. cytherea* e *S. pinnata* também mostraram a presença de estômatos anomocíticos, drusas no parênquima das nervuras de folhas e de parênquima paliçádico composto de uma única camada. Além disso, no mesmo trabalho, os autores descrevem a estrutura da nervura central em seção transversal para ambas espécies, similar ao observado em *S. mombin* (**Figura 3c**).

Outros estudos de avaliação histoquímica também evidenciaram a presença de compostos fenólicos em espécies da família Anacardiaceae, como o de Duarte *et al.* (2007) com *Schinus terebinthifolius*, Nascimento-Silva *et al.* (2011) com *Myracrodruon urundeuna* e Nascimento-Silva *et al.* (2008) com *Spondias tuberosa*.

A presença de cutícula delgada também foi observada por Nascimento-Silva & Paiva (2007) em *Spondias tuberosa* e por Tatke *et al.* (2012) em *Anacardium occidentale*, também da família Anacardiaceae.

De acordo com o observado nas espécies de Anacardiaceae acima citadas, é possível observar algumas características que diferenciam a espécie *S. mombin* das demais: 1. presença de um maior número de camadas de células no parênquima paliçádico esponjoso (7 a 8 camadas) em *S. mombin* quando comparado com *S. tuberosa* (4 a 6 camadas celulares), *M. urundeuna* (3 camadas celulares) e *A. occidentale* (4 a 5 camadas celulares); 2. Folhas anfiestomáticas em *S. mombin*, enquanto que em *S. tuberosa* a lâmina foliar é hipostomática; 3. presença de drusas no mesofilo em *S. mombin*, enquanto que *S. tuberosa* possui drusas distribuídas predominantemente ao longo da nervura central e raramente no mesofilo; 4. Ausência de hipoderme em *S. mombin* quando comparada com a presença de hipoderme na maioria das espécies de Anacardiaceae (NASCIMENTO-SILVA & PAIVA, 2007; NASCIMENTO-SILVA *et al.*, 2008; NASCIMENTO-SILVA *et al.*, 2011; TATKE *et al.*, 2012; METCALFE & CHALCK, 1950 *apud* DUARTE *et al.*, 2007). Estas diferenças podem auxiliar na comprovação da autenticidade de *S. mombin*.

Os resultados indicam que a descrição anatômica da folha de *S. mombin* e as análises histoquímicas realizadas neste trabalho são importantes para a comprovação da autenticidade desta espécie vegetal, pois estabelece, de maneira inédita, especificações que complementam o que já foi descrito por Chisom *et al.* (2014), uma vez que não existe monografia da espécie em farmacopeias nacional e internacional.

4.2 Preparação e caracterização farmacognóstica da Droga Vegetal (DV) de *S. mombin*: prospecção química, teor de umidade, controle microbiológico, teor de cinzas, granulometria e determinação do índice de intumescência

Prosseguindo os estudos de caracterização da DV de *S. mombin* foram determinados parâmetro físico-químicos e de pureza da planta.

A secagem do material vegetal é o método mais comumente empregado na preparação da DV, que propicia a redução do teor de água, facilitando assim a conservação do material considerando que a presença excessiva de umidade em drogas vegetais pode levar a hidrólise de seus constituintes químicos, além de favorecer o crescimento de fungos e bactérias e insetos (SHARAPIN, 2000; FARM. BRAS. 5ª Ed., 2010). Dessa maneira, é sempre importante determinar o teor de água residual presente nas drogas vegetais, uma vez que esse parâmetro é determinante para a garantia da qualidade desse produto.

No presente estudo a preparação da DV de *S. mombin* deu-se por secagem em estufa com circulação e renovação de ar. Para tanto, inicialmente foi determinado o teor de umidade na planta antes ($75,13 \pm 1,3$) e durante vários períodos de secagem (2, 4, 6, 8, 24, 48, 72, 96 e 120 h). Na **Tabela 13** pode ser observado que o teor de umidade na DV decaiu bruscamente nas primeiras 4 horas, e manteve-se praticamente constante nas próximas horas. Dessa forma, a secagem das folhas de *S. mombin* por 4 horas foi a condição eleita para a preparação, considerando que o teor de umidade encontrado nesse período foi muito próximo a 8%, nível mínimo (8 – 14 %) preconizado pelas farmacopeias para drogas vegetais (FARIAS, 2003).

Tabela 13 – Teor de umidade da droga vegetal de *Spondias mombin* em diferentes tempos de secagem em estufa com circulação e renovação de ar

Tempo de secagem (h) das folhas <i>S. mombin</i>	Teor de umidade (%)
0	$75,13 \pm 1,3$ (1,74)
2	$36,6 \pm 1,16$ (3,16)
4	$7,45 \pm 0,06$ (0,79)
6	$5,12 \pm 0,19$ (3,63)
8	$4,83 \pm 0,13$ (2,64)
24	$4,87 \pm 0,21$ (4,27)
48	$4,72 \pm 0,1$ (2,12)
72	$4,52 \pm 0,18$ (4,03)
96	$4,43 \pm 0,15$ (3,42)
120	$4,39 \pm 0,14$ (3,13)

Os valores estão expressos como média \pm DP (DPR). As análises foram realizadas em triplicata. As folhas foram submetidas à secagem em estufa a 60 ± 5 °C.

Prosseguindo o estudo de caracterização das folhas de *S. mombin*, através da análise fitoquímica preliminar do extrato hidroetanólico (30 % EtOH em água) obtido a partir da DV da planta, foram observadas a presença de algumas classes de metabólitos secundários como taninos e alcaloides (**Tabela 14**). Esses resultados foram corroborados por estudos anteriores (SILVA, 2012; TATKE *et al.*, 2012; BANDEIRA *et al.*, 2013) que observaram também a presença de taninos, flavonoides, além de saponinas em espécie do gênero *Spondias* (*S. tuberosa*) e em anacardeáceas, como *Miracrodruon urundeuva* e *Anacardium occidentale*. Ainda, mais recentemente Cabral (2014) determinou a presença de flavonoides (quercetina, rutina e canferol) e de dois ácidos fenólicos (elágico e clorogênico) em extrato hidroetanólico das folhas de *S. mombin*. Possivelmente a ausência de flavonoides e saponinas no extrato hidroetanólico de *S. mombin* observado no presente estudo, esteja relacionado às condições de preparação deste, além de fatores relacionados ao cultivo e coleta da planta que interferem na composição dos metabólitos secundários, como a sazonalidade, ritmo circadiano, idade e desenvolvimento da planta e disponibilidade hídrica, entre outros (GLOBO-NETO & LOPES, 2006).

Tabela 14 – Testes de prospecção química para ESM

Classe Química	Indicativo de reação positiva	Reagente/Procedimento	Resultado
Alcaloides	Precipitado branco ou leve	Mayer	-
	Turvação branca	Bertrand	+
	Precipitado laranja	Dragendorff	+
	Avermelhado	Bouchardat	-
Flavonoides	Precipitado amarelo	Hager	-
	Coloração vermelha	HCl-R e fita de Mg	-
Cumarinas	Fluorescência verde sob luz UV (365 nm)	CCD em placa de sílica Hex: AcOEt: MeOH (6:13:1) revelada com KOH 5%	-
Saponínicos	Camada de espuma estável por mais de 30 min	Agitação vigorosa	-
Taninos	Mudança de coloração ou formação de precipitado	Solução alcaloídica	+
		Acetato de cobre 4%	+
		Dicromato de potássio 10%	+
		Cloreto férrico 2%	+
		Acetato de chumbo 10%	+

(-): ausente; (+): presente; HCl-R: ácido clorídrico concentrado; Mg: Magnésio; FeCl₃: cloreto férrico; K₂Cr₂O₇: dicromato de potássio; UV: ultravioleta; CCD: cromatografia em camada delgada; Hex: hexano; AcOEt: acetato de etila; MeOH: metanol; KOH: hidróxido de potássio.

Os resultados até então obtidos permitiram estabelecer parâmetros para a identificação botânica e química das folhas de *Spondias mombin*, diferenciando-a de outras espécies do gênero, e auxiliando assim no cumprimento de uma das etapas do controle de qualidade da matéria-prima vegetal bioativa, relacionada a determinação da autenticidade da mesma. Entretanto, para garantir a qualidade de uma matéria-prima vegetal, planta fresca ou droga vegetal (DV), são necessários parâmetros adicionais como àqueles relacionados a avaliação da pureza do material vegetal (BRASIL, 2014). Nesse sentido, várias organizações nacionais e internacionais (BRASIL, 2014; WHO, 1998) recomendam a determinação de especificações de pureza de produtos vegetais determinados através de alguns ensaios como teor de cinzas, teor de cinzas insolúveis em ácido e determinação de contaminantes microbiológicos.

Os materiais vegetais, em geral, contêm um grande número de fungos e bactérias pertencentes a sua microbiota natural ou que são introduzidos durante a sua manipulação, intensificando a contaminação com o tempo e comprometendo tanto o material quanto o usuário. As análises visam assegurar o consumo de produtos com boa qualidade com um limite aceitável de microrganismos e a isenção de microrganismos potencialmente prejudiciais (MIGLIATO *et al.*, 2007).

Os resultados do controle microbiológico da DV de *S. mombin* estão descritos na **Tabela 15**, onde pode ser observado que esse produto quando preparado nas condições determinadas no presente estudo, não apresentou crescimento microbiano de *Escherichia coli* e *Salmonella* sp., os quais são considerados microrganismos patogênicos, e, tanto na contagem do número total de bactérias quanto na de fungos e leveduras, o crescimento foi menor que 10^1 UFC/g. Dessa forma, os resultados determinados na análise microbiológica de *S. mombin* mantiveram-se dentro dos limites farmacopéicos (FARM. BRAS. 5ª Ed., 2010) estipulados tanto para os processos extrativos a frio quanto a quente da planta, mostrando assim que as condições de preparo empregadas na preparação da DV de *S. mombin* no presente estudo permitiram a obtenção de um produto apropriado para uso humano.

Tabela 15 – Análises microbiológicas do pó das folhas da droga vegetal de *Spondias mombin*

Microorganismo	Resultados	Farmacopeia brasileira	
		Extrato a quente	Extrato a frio
Bactérias aeróbias	< 10 ¹ UFC/g	10 ⁷	10 ⁴
Fungos e leveduras	< 10 ¹ UFC/g	10 ⁵	10 ³
<i>Escherichia coli</i>	Ausente	10 ²	10 ¹
<i>Salmonella sp</i>	Ausente	Ausência	Ausência

Fonte: Farmacopeia Brasileira V Ed. (2010).

Na **Tabela 16** estão descritos os teores de cinzas (totais: $5,79 \pm 3,10\%$; insolúveis em ácido: $0,629 \pm 6,25$) para a droga vegetal. A determinação do teor de cinzas totais permite a verificação de impurezas inorgânicas não voláteis, como carbonatos, cloretos e diversos tipos de óxidos, que podem estar presentes como contaminantes (FARIAS, 2003; COSTA, 1982) enquanto que a determinação do teor de cinzas insolúveis em ácido destina-se à verificação da presença de sílica e constituintes silicosos da droga (FARM. BRAS. 5^a Ed., 2010). Estas duas análises constituem referências de qualidade e caracterização da matéria-prima, servindo como método para avaliar a pureza do material (SILVA JÚNIOR, 2006). Nesse contexto, os teores de cinzas de *S. mombin* determinados no presente estudo são importantes do ponto de vista da padronização da planta, pois estabelecem de maneira inédita especificações para o controle de qualidade dessa droga vegetal, uma vez que não existe monografia farmacopéica da espécie, nem dados destes parâmetros na literatura.

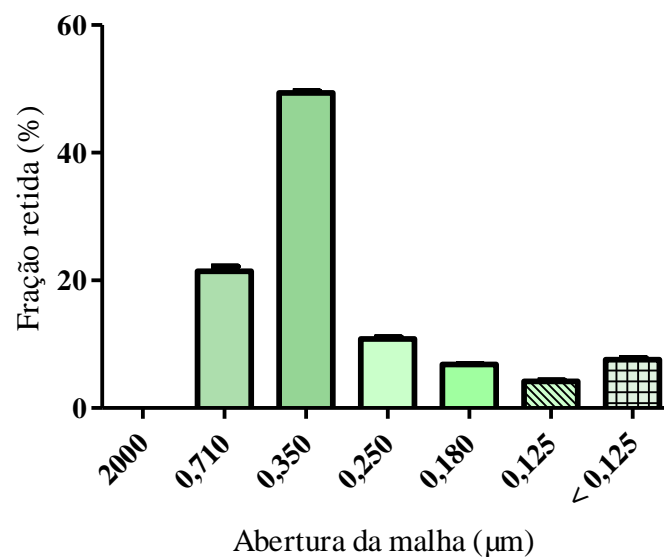
Visando contribuir para a padronização da DV a ser empregada na produção de produtos derivados, como extratos vegetais, esta foi submetida a cominuição para análise da sua granulometria, e foi determinado também o índice de intumescência desta (**Tabela 16**). O processo de pulverização da matéria-prima vegetal constitui uma etapa crítica na produção de medicamentos fitoterápicos, uma vez que o produto pulverizado representa na maioria das vezes o insumo indispensável para obtenção de preparações intermediárias (SILVA JÚNIOR, 2006) e que o tamanho de suas partículas influencia diretamente sobre a eficiência do processo extrativo.

Partículas maiores, com diâmetro médio acima de 0,8 mm, podem prejudicar a extração por não permitir a completa penetração do líquido extrator no interior das células e partículas menores, com diâmetro médio inferior a 0,2 mm, podem ocasionar a compactação do pó, dificultando a passagem do solvente no caso da percolação ou mesmo a passagem de

partículas muito finas para o extrato, conferindo-lhe uma aparência turva e também interferindo negativamente na extração (ALBERTON *et al.*, 2001; SHARAPIN, 2000). Diante do exposto, a natureza moderadamente grossa do pó da DV de *S. mombin*, constitui um aspecto positivo para o desenvolvimento de produtos derivados a partir dessa espécie, considerando que pós com essa característica são os mais recomendados no desenvolvimento de medicamentos fitoterápicos (SHARAPIN, 2000).

Na **Figura 5**, estão descritos os resultados obtidos na determinação granulométrica do pó das folhas *S. mombin*. Dentre os tamises empregados no estudo (2000, 710, 350, 250, 180 e 125 μm), o tamis com abertura de malha de 350 μm foi o que reteve maior porcentagem de droga vegetal (49,36%), apresentando um diâmetro médio das partículas de 0,369 mm (**Tabela 16**), característico de pó moderadamente grosso (FARM. BRAS. 5^a Ed., 2010).

Figura 5 – Distribuição granulométrica do pó das folhas de *S. mombin* secas em estufa com renovação e circulação de ar



Após secagem, a droga vegetal foi pulverizada em moinho de facas e determinada a granulometria. Os valores representam a média \pm desvio padrão.

O índice de intumescência determina o quanto a droga vegetal absorve do solvente, sendo assim um dado útil quando se deseja estimar o volume a ser utilizado na extração. O índice de intumescimento obtido para a DV de *S. mombin* foi de $2,3 \pm 0,1$ mL (**Tabela 16**), ou seja uma massa de 10 g de droga vegetal absorve cerca de 23,1 mL de água. Dessa forma não é interessante utilizar para extração um volume inferior ao volume de intumescimento, pois a recuperação do extrato pode ser prejudicada.

Tabela 16 – Caracterização farmacognóstica da droga vegetal de *S. mombin*.

Parâmetros	Resultados obtidos
Diâmetro médio das partículas	0,369 ± 0,007 (2,01)
Cinzas totais	5,79 ± 0,180 (3,10)
Cinzas insolúveis em ácido	0,629 ± 0,039 (6,25)
Índice de intumescência	2,3 ± 0,1 (0,03)

Os valores estão expressos como média ± DP (DPR). Análises foram realizadas em triplicata.

Para assegurarmos a qualidade de uma matéria-prima vegetal ativa, produto derivado e de um fitoterápico é essencial definirmos e determinarmos o (s) marcador(es) desses produtos, a ser empregado no monitoramento das várias etapas relacionadas ao processo de produção destes. Segundo a regulamentação atual para registro de fitoterápicos (BRASIL, 2014) o marcador compreende uma substância ou classe de substâncias utilizada como referência no controle da qualidade da matéria-prima vegetal e do fitoterápico, preferencialmente tendo correlação com o efeito terapêutico, embora possa empregar-se também um marcador puramente analítico.

Estudos anteriores (CARABALLO *et al.*, 2004; KOZOIC & MARCIA, 1998; OKWU & OKWU, 2004; CORTHOUT, 1991; CORTHOUT, 1992) têm mostrado o papel importante dos fenóis, incluindo taninos, nas atividades antimalárica, antiviral, antibacteriana, antioxidante de extratos das folhas de *S. mombin*. Ademais, no presente estudo pode ser observado a presença de fenóis na planta através de análises histoquímicas e químicas (reação geral de caracterização). Dessa forma, visando o desenvolvimento de um produto padronizado a partir das folhas de *S. mombin*, foram realizados estudos relacionados ao desenvolvimento e validação de método espectrofotométrico para determinação do teor de fenóis totais no extrato das folhas de *S. mombin*.

4.3 Validação de método analítico para determinação do teor de fenóis totais no extrato de *S. mombin* (ESM) por espectrofotometria

Para análise do teor de fenóis totais no ESM foi empregado um método clássico (Folin-Ciocalteu) com algumas modificações necessárias à adequabilidade do método à natureza da amostra (extrato vegetal). Esse método foi então submetido aos estudos de validação a fim de comprovar a sua possível aplicabilidade ao objetivo proposto.

4.3.1 Especificidade

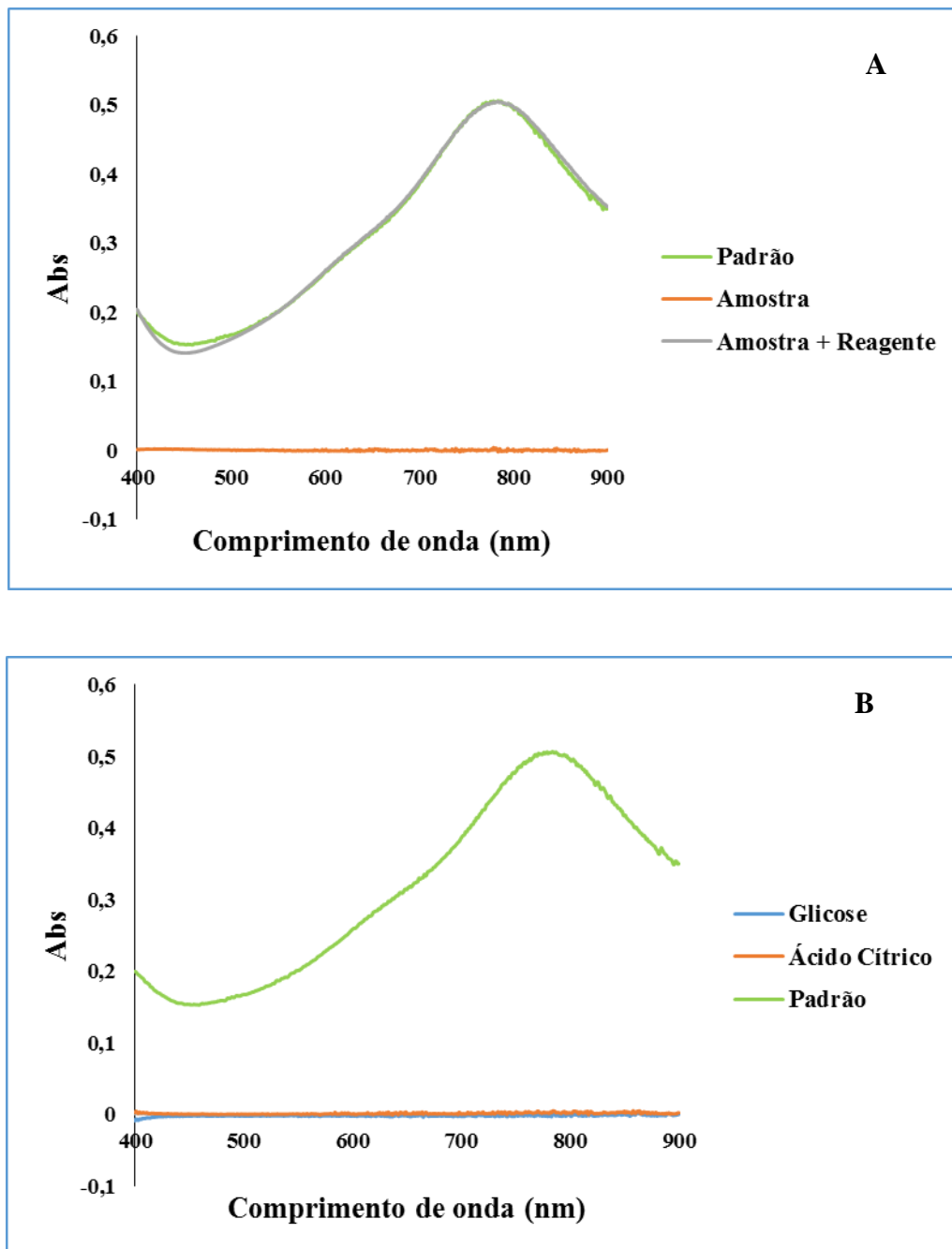
A especificidade de um método instrumental refere-se à sua capacidade em medir o analito de interesse mesmo na presença dos demais componentes da amostra (matriz) (BRASIL, 2003; BERTOL, 2010).

Os perfis espectrais da solução padrão de ácido gálico, do extrato hidroetanólico de *S. mombin*, da glicose e do ácido cítrico após reação com o reagente Folin-Ciocalteau estão representados na **Figura 6**.

Os espectros de absorvância (400 - 900 nm) obtidos mostraram que ao se comparar a reação parcial com a total, percebe-se que a amostra não interfere na leitura, pois na reação parcial a absorvância é igual a zero, enquanto que com a adição do reagente de Folin-Ciocalteau, a reação é equivalente ao que ocorre com o padrão.

A glicose e o ácido cítrico são produtos do metabolismo de organismos vivos que podem estar presentes no extrato das folhas de *S. mombin* e possuem em sua estrutura a presença de hidroxilas alcoólicas e de ácido carboxílico, respectivamente. Estes dois compostos não apresentaram coloração azulada após reação com reagente de Folin-Ciocalteau, pois não houve leitura como observado na **Figura 6**. Portanto, pode-se inferir que a quantificação de fenóis na matriz (extrato) é possível mesmo na presença de outros constituintes da planta e de outras substâncias que possuem hidroxilas em sua estrutura, como glicose e ácido cítrico, o que constitui um indicativo de especificidade do presente método à hidroxilas fenólicas.

Figura 6 – Varredura espectrofotométrica para determinação da especificidade do método de análise do teor de fenóis totais no extrato de *S. mombin* (ESM).



(A) Padrão: Ácido gálico (3,33 $\mu\text{g/mL}$); Amostra: extrato hidroetanólico de *Spondias mombin* (17,52 mg EAG/mL) sem adição do reagente Folin-Ciocalteu; Amostra + Reagente: extrato hidroetanólico de *Spondias mombin* (17,52 mg EAG/mL) após reação com reagente Folin-Ciocalteu. (B) Glicose (3,33 $\mu\text{g/mL}$) e ácido cítrico após reação com reagente Folin-Ciocalteu. A análise foi realizada entre 400 e 900 nm. Eixo das abscissas (x) = concentração; Eixo das ordenadas (y) = abs. Abs = absorvância.

4.3.2 Linearidade e intervalo

A linearidade dos métodos analíticos quantitativos é a capacidade do método demonstrar que os resultados obtidos são diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra, dentro de um intervalo especificado (ALBANO, 2009).

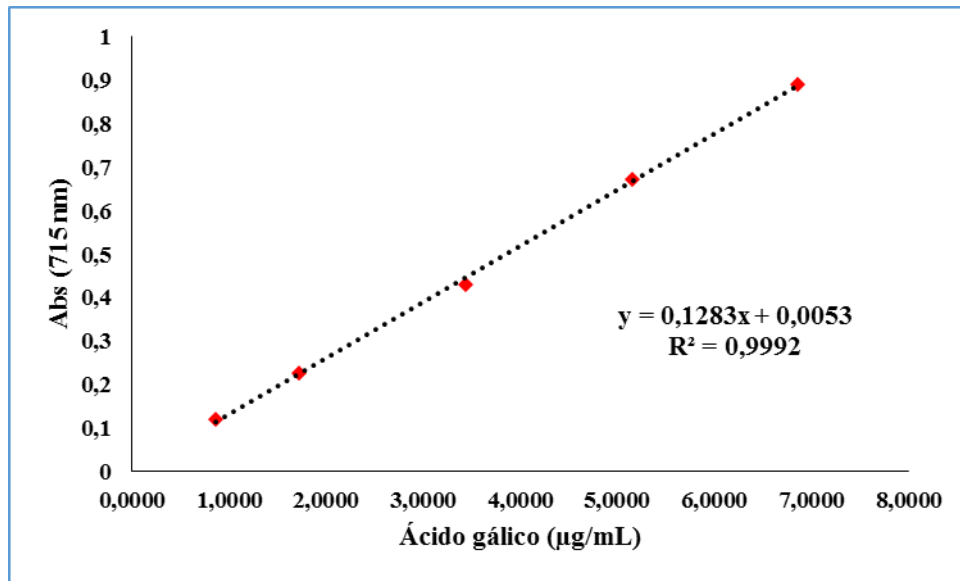
A avaliação da linearidade do método foi investigada pelo uso de padrão externo. A curva de calibração foi construída com emprego de soluções de concentrações crescentes (n=5) de ácido gálico em uma faixa de trabalho de 0,83 – 6,67 µg/mL. Análises das soluções de ácido gálico por espectrofotometria com o comprimento de onda eleito (715 nm) permitiram determinar as absorvâncias, em que pode ser observado (**Tabela 17**) que a maioria das concentrações mostraram um DPR bem inferior ou próximo a 5,0 %, valor normalmente considerado pelos órgãos regulatórios (BRASIL, 2003), sendo mais flexível para fitoterápicos (DPR ≤ 15,0 %) (BRASIL, 2015). Análise de regressão linear dos resultados obtidos permitiu determinar a equação da reta, relacionando as variáveis independente (concentração da solução padrão) e dependente (absorvâncias), e os coeficientes de correlação (r) para ácido gálico ($r^2 = 0,9992$) (**Figura 7**). O gráfico de resíduos dos resultados obtidos está apresentado na **Figura 8**, onde pode ser observado que a maioria dos resultados estão distribuídos próximos ao zero. Análise estatística da regressão linear mostrou que as variáveis x e y, ou seja, concentração de padrão e absorvância, respectivamente, estão relacionadas ($p < 0,05$, ANOVA).

Tabela 17 – Valores de absorvâncias do ácido gálico obtidos por espectrofotometria (715 nm).

Concentração (µg/mL)	Absorvância ± DP	DPR (%)
0,83	0,121 ± 0,0037	3,02
1,67	0,227 ± 0,0192	8,44
3,33	0,431 ± 0,0222	5,15
5,00	0,671 ± 0,0052	0,78
6,67	0,889 ± 0,0178	2,01

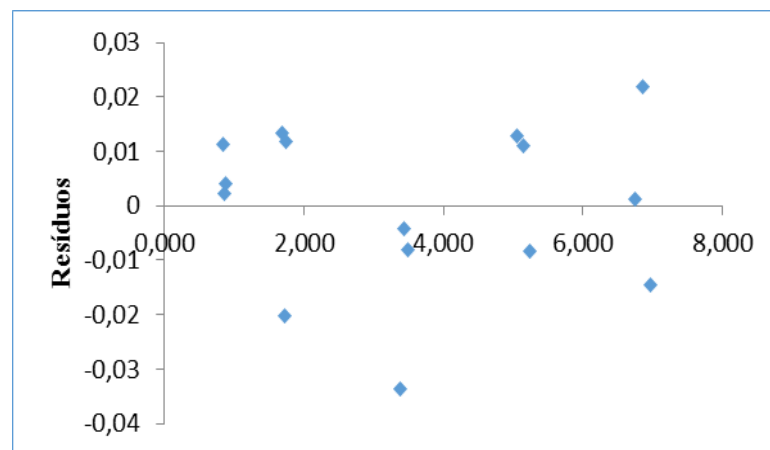
Os valores de absorvância estão expressos como média ± DP. As análises foram realizadas em triplicata. DP = desvio padrão; DPR = desvio padrão relativo.

Figura 7 – Curva analítica do ácido gálico obtida pelo método espectrofotométrico (715 nm).



Curva com padrão de Ácido gálico; os resultados representam a média de três determinações. A equação da reta foi obtida por regressão linear.

Figura 8 – Gráfico de resíduos obtidos da análise de regressão das curvas de calibração de ácido gálico



4.3.3 Precisão

A precisão foi avaliada pelos estudos de repetibilidade e precisão intermediária. A precisão por repetibilidade foi avaliada por meio de seis determinações a 100 % da concentração de trabalho e a precisão intermediária foi realizada através do resultado de dois analistas diferentes, utilizando a mesma concentração.

Na avaliação da precisão do método por repetibilidade, o valor médio de fenóis totais no extrato etanólico de *S. mombin* foi de 20,66 mg de Equivalentes de Ácido Gálico por mL (EAG/mL) de extrato, com DPR de 2,51 % (**Tabela 18**).

Na **Tabela 18**, estão relacionados os resultados da avaliação da precisão intermediária. Os valores médios de fenóis totais determinados pelos analistas I e II ($20,66 \pm 0,5$ e $19,33 \pm 0,85$ EAG mg/mL de extrato, respectivamente) não diferiram estatisticamente ($F_0 = 2,66$; $F_{crítico} = 5,05$; $p = 0,153$) e apresentaram DPR de 4,83 % (BRASIL, 2003).

Tabela 18 – Avaliação da precisão intermediária do método para análise de fenóis totais no ESM por espectrofotometria.

Analista	Absorvância (nm)	Concentração (mg EAG/mL)
I	$0,416 \pm 0,01$ (2,59)	$20,66 \pm 0,50$ (2,51)
II	$0,367 \pm 0,01$ (4,37)	$19,33 \pm 0,85$ (4,38)
Precisão intermediária		$19,99 \pm 0,97$ (4,83)
Valor p – Teste F		0,153
Valor F_0		2,66

Os valores estão expressos como média \pm DP (DPR). Análises realizadas com três réplicas. As concentrações foram expressas como mg de EAG (equivalentes de ácido gálico) por mL de extrato. (Nível de significância: $p < 0,05$)

4.3.4 Exatidão

Exatidão é o grau de concordância entre o resultado de uma medição e um valor verdadeiro de um mensurado, isto é, ela traduz a concordância dos valores experimentais com o verdadeiro (ALBANO, 2009). No presente trabalho, a exatidão foi determinada como porcentagem de recuperação da quantidade conhecida de marcador adicionada à matriz. O ensaio de recuperação foi executado para o marcador ácido gálico a partir de três concentrações (baixa, média, alta), com três réplicas cada. Alíquotas de solução padrão foram adicionadas ao extrato etanólico de *S. mombin*, de forma a obter concentrações que correspondiam a 25 %, 100 % e 200 % do teor de marcador determinado no extrato empregado.

A **Tabela 19** apresenta os valores de recuperação de ácido gálico adicionado ao extrato etanólico de *S. mombin*. Os valores variaram entre 95,1 e 102,4 %, dentro do preconizado pela USP (2015) que é de 90 – 110 %, além de apresentarem DPR menor que 5,0 % (BRASIL, 2003).

Tabela 19 – Determinação da exatidão (recuperação) por adição de três diferentes concentrações de ácido gálico ao ESM.

Concentração final obtida após adição de ácido gálico	Recuperação (%) DP	Média (DP)	DPR (%)
25 %	95,1 (0,03)		
100 %	102,4 (0,01)	100,4 (0,04)	3,58
200 %	101,9 (0,01)		

Média de três determinações. A concentração de padrão adicionado foi estabelecida em função do teor de fenóis totais no extrato. DP=desvio padrão; DPR=desvio padrão relativo.

4.3.5 Robustez

A avaliação da robustez de um método tem um papel importante porque permite determinar a suscetibilidade de um método analítico frente a pequenas alterações das condições experimentais, as quais podem ser condições de armazenamento, ambientais, diferentes preparações da amostra ou outras pequenas alterações (ALBANO, 2009).

Para a avaliação da robustez foram realizadas variações deliberadas nos parâmetros volume de FC e CS e comprimento de onda. Na **Tabela 20**, é possível observar que as variações nos volumes de FC e CS não ocasionaram alterações significativas nas absorvâncias. Além disso, a média das absorvâncias determinadas nos comprimentos de onda investigados não diferiram significativamente, e todos os resultados apresentaram um grau de dispersão aceitável com DPR < 5,0% (0,33 a 4,17 %).

Através da comparação das absorvâncias obtidas de cada condição experimental em 715 nm com as obtidas em 785 nm, também foi possível observar que as alterações propostas não apresentaram variação significativa em termos de quantificação, tendo em vista que os valores de p obtidos na análise estatística do teste T ($p = 0,3441$) e teste F ($p = 0,2480$) foram maiores que 0,05, mostrando, assim, que o método foi robusto quanto aos parâmetros avaliados.

Tabela 20 – Avaliação da robustez do método desenvolvido por espectrofotometria para quantificação de fenóis totais no ESM.

Exp.	Abs (715 nm)	Média (DPR)		
		715 nm	785 nm	
1	0,423 ± 0,00 (0,33)		0,509 ± 0,00 (0,83)	
2	0,404 ± 0,00 (1,23)		0,490 ± 0,01 (2,89)	
3	0,419 ± 0,01 (2,03)	0,421 (2,73)	0,502 ± 0,00 (0,85)	0,506 (3,01)
4	0,424 ± 0,01 (2,00)		0,502 ± 0,00 (0,42)	
5	0,434 ± 0,01 (1,79)		0,526 ± 0,02 (4,17)	

Os valores estão expressos como média ± DP (DPR). Análises realizadas com duas réplicas.

Diante dos resultados obtidos, o método para dosagem de fenóis no ESM mostrou-se robusto a pequenas variações no volume do reagente de FC e CS. Ademais, as leituras espectrofotométricas podem dar-se alternativamente em 715, além de 785 nm.

4.4 Desenvolvimento e seleção do método de produção do extrato de *S. mombin* (ESM): maceração dinâmica e turbólise

No desenvolvimento tecnológico de fitoterápicos padronizados, um dos aspectos críticos é a seleção do método de preparação de extratos vegetais (produtos derivados), bem como seu controle de produção (MIGLIATO *et al.*, 2011; SONAGLIO *et al.*, 2004). Os extratos vegetais são preparações farmacêuticas obtidas a partir de matérias-primas vegetais, onde podem ser empregados diversos métodos extrativos, incluindo variações na técnica de extração, natureza do solvente e proporção entre a quantidade de droga vegetal e o volume de solvente empregado (SIMÕES *et al.*, 2004; PRISTA *et al.*, 1996).

No desenvolvimento e seleção do método de produção do ESM foram investigados dois métodos de extração: maceração dinâmica e turbólise. E aplicado um planejamento fatorial do tipo Box-Behnken com três variáveis em três níveis. Silva (2013) em estudo anterior avaliou alguns fatores (temperatura e proporção de álcool) sobre a extração do pó de folhas de *S. mombin*, determinando que o melhor solvente a ser usado é o EtOH 30 % em água, sendo este então o eleito para a produção do ESM no presente estudo.

Maceração é o processo no qual a droga vegetal pulverizada fica em contato com o líquido extrator em recipiente fechado, em temperatura ambiente ou mais elevada (digestão), durante um longo período (horas ou dias), sob agitação ocasional (estática) ou constante

(dinâmica) sem renovação do líquido extrator. Essa técnica não leva ao esgotamento total da droga vegetal devido à saturação do solvente e/ou ao estabelecimento de um equilíbrio entre o solvente e o interior da célula. Também depende de fatores como granulometria, teor de umidade, concentração e seletividade do solvente e grau de intumescimento das células (SONAGLIO *et al.*, 2004).

Na **Tabela 21** podem ser observadas a influência dos três fatores investigados (tempo, temperatura e proporção DV:solvente) sobre o teor de resíduo sólido (RS) e a concentração de fenóis totais (FT) do extrato hidroetanólico (EtOH 30% em água) das folhas de *S. mombin* produzido por maceração dinâmica.

A análise dos ensaios realizados (total=15) revelou que o percentual RS nos extratos variou de 3,2 a 7,1 %, enquanto a concentração de FT praticamente triplicou, se compararmos os experimentos 1 e 4 (FT: $6,1 \pm 0,01$ e $17,9 \pm 0,04$ mg/mL, respectivamente). Dentre os fatores investigados, a proporção DV:solvente e o tempo de extração interferiram significativamente ($p < 0,05$, ANOVA) e de maneira positiva no percentual de RS, como pode ser observado no gráfico de superfície apresentado na **Figura 9** e de acordo com a **Tabela 22**. Em relação ao tempo de extração, este influenciou de maneira mais sutil no teor de RS, mas os maiores percentuais de RS foram determinados nos extratos submetidos a maceração por 2,5 e 4 horas, quando a proporção DV:solvente foi de 0,3. Respostas semelhantes foram encontradas para o teor de FT frente os fatores investigados, onde os extratos que apresentaram maiores concentrações de FT, foram àqueles com maior proporção de DV:solvente, como observado no experimento 6 (FT: $17,7 \pm 0,02$ mg/mL) em relação ao experimento 5 (FT: $7,6 \pm 0,01$ mg/mL), onde as proporções de DV:solvente foram de 0,3 e 0,1, respectivamente. Mais uma vez a temperatura não interferiu, enquanto o tempo à semelhança da proporção DV:solvente interferiu significativamente no teor de FT (**Tabela 23** e **Figura 10**). Um aspecto importante a destacar, é que no presente estudo não foi observada uma interação significativa entre os fatores investigados sobre o percentual de resíduo sólido ou teor de FT.

A influência significativa da proporção de DV:solvente sobre a produção de extratos vegetais tem sido bem relatada na literatura (TACON & FREITAS, 2013; TEXEIRA, 2009), ratificando o presente estudo. Entretanto, com base nos resultados obtidos, são necessários estudos adicionais no sentido de determinar sob que condições há um esgotamento da planta quanto ao teor de fenóis totais.

Tabela 21 – Resultados obtidos nos experimentos de extração por maceração dinâmica

Exp	Dv:solvente	t (h)	T (°C)	RS (%)	FT (mg/mL)
1	0,1	1	45	3,18 ± 0,07 (2,09)	6,19 ± 0,01 (6,22)
2	0,3	1	45	6,36 ± 0,07 (1,10)	12,99 ± 0,0 (0,53)
3	0,1	4	45	3,5 ± 0,15 (4,21)	7,80 ± 0,02 (9,08)
4	0,3	4	45	6,93 ± 0,05 (0,73)	17,90 ± 0,04 (6,43)
5	0,1	2,5	30	3,14 ± 0,16 (4,96)	7,60 ± 0,01 (3,77)
6	0,3	2,5	30	7,12 ± 0,28 (3,86)	17,52 ± 0,02 (3,84)
7	0,1	2,5	60	3,33 ± 0,14 (4,27)	7,29 ± 0,01 (4,6)
8	0,3	2,5	60	6,67 ± 0,09 (1,36)	16,50 ± 0,02 (3,01)
9	0,2	1	30	4,67 ± 0,19 (4,02)	10,28 ± 0,02 (5,80)
10	0,2	4	30	5,4 ± 0,14 (2,57)	12,80 ± 0,03 (7,61)
11	0,2	1	60	5,44 ± 0,28 (5,08)	12,20 ± 0,01 (3,58)
12	0,2	4	60	5,45 ± 0,12 (2,16)	10,61 ± 0,0 (0,78)
13	0,2	2,5	45	5,6 ± 0,21 (3,68)	14,21 ± 0,0 (0,43)
14	0,2	2,5	45	5,73 ± 0,05 (0,79)	13,62 ± 0,02 (2,67)
15	0,2	2,5	45	5,58 ± 0,15 (2,66)	13,62 ± 0,01 (0,95)

Os resultados estão expressos como Média ± DP (DPR). As análises foram realizadas em triplicata. RS = resíduo sólido. FT = fenóis totais

Tabela 22 – Análise de variância (ANOVA) dos dados referentes ao RS do procedimento de extração por maceração

Variável	Soma dos quadrados	Grau de liberdade	Quadrado médio	F	p-valor
DV:solvente	24,256	1	24,256	539,273	0,000003*
DV:solvente ²	0,619	1	0,619	13,771	0,013841*
T	0,332	1	0,332	7,384	0,041909*
t ²	0,203	1	0,203	4,517	0,086907
T	0,039	1	0,039	0,872	0,393386
T ²	0,097	1	0,097	2,157	0,201893
DV:solvente x t	0,016	1	0,016	0,347	0,581218
DV:solvente x T	0,102	1	0,102	2,277	0,191710
t x T	0,130	1	0,130	2,881	0,150367
Erro	0,225	5	0,045		

*variável significante a 5%

Figura 9 – Superfície de resposta do rendimento de sólidos (RS) em função da relação DV:solvente e tempo no procedimento de extração por maceração

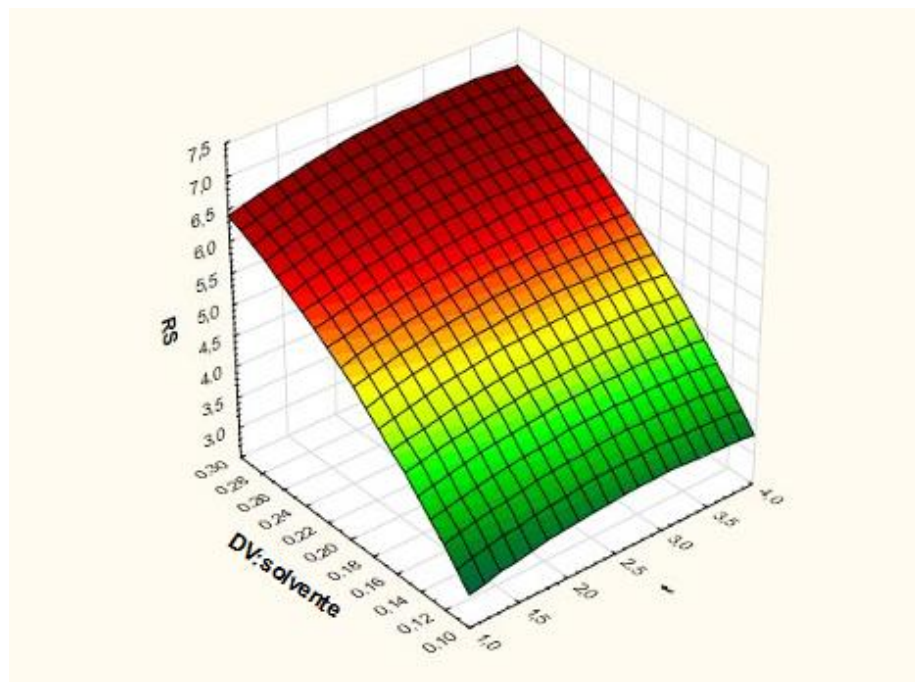
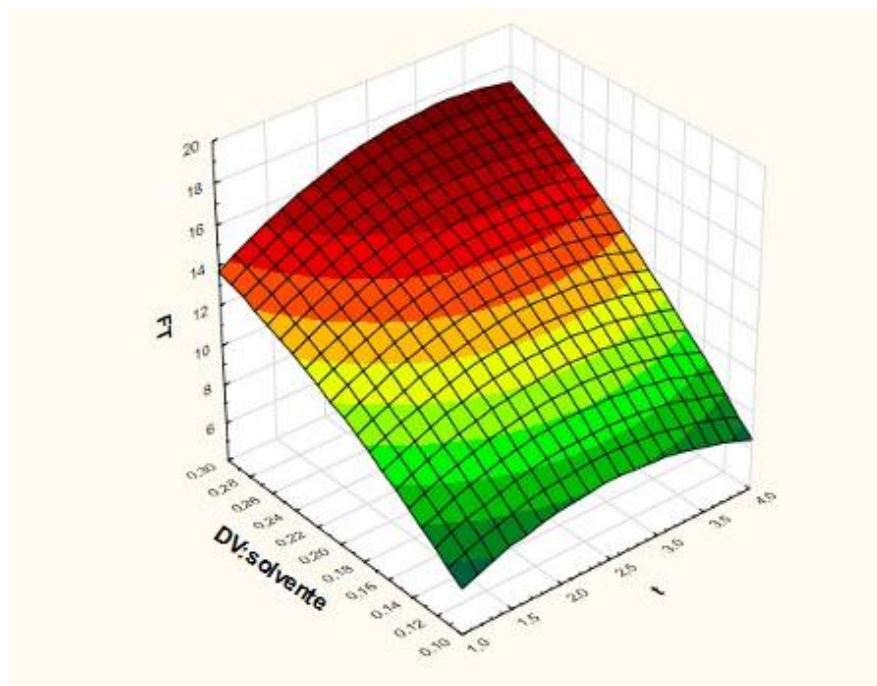


Tabela 23 – Análise de variância (ANOVA) dos dados referentes ao FT do procedimento de extração por maceração

Variável	Soma dos quadrados	Grau de liberdade	Quadrado médio	F	p-valor
DV:solvente	162,270	1	162,270	165,577	0,000050*
DV:solvente ²	3,131	1	3,131	3,195	0,133920
T	6,938	1	6,938	7,079	0,044848*
t ²	10,370	1	10,370	10,581	0,022625*
T	0,320	1	0,320	0,327	0,592441
T ²	1,649	1	1,649	1,6829	0,251175
DV:solvente x t	2,723	1	2,723	2,778	0,156446
DV:solvente x T	0,126	1	0,126	0,129	0,734539
t x T	4,223	1	4,223	4,309	0,092551
Erro	4,900	5	0,980		

*variável significativa a 5%

Figura 10 – Superfície de resposta do teor de fenóis totais (FT) em função da relação DV:solvente e tempo no procedimento de extração por maceração



De acordo com os resultados obtidos para RS e FT pode-se afirmar que a melhor condição para a extração por maceração é a realizada com a maior proporção DV:solvente e maior tempo. A temperatura não foi estatisticamente significativa para influenciar nos resultados. Assim, tem-se as condições 4 e 6 como as melhores, com maior RS (6,9 e 7,1, respectivamente) e maior teor de FT (17,9 e 17,5 mg/mL, respectivamente), sugerindo que com essas duas condições pode-se obter o máximo de extração com o método da maceração dinâmica. Entre as duas condições, considerando a economia de tempo, a não necessidade do uso de aquecimento e a proximidade entre os resultados, a condição 6 foi, então, a eleita.

A turbólise baseia-se na extração com simultânea redução do tamanho de partícula devido à aplicação de elevadas forças de cisalhamento, geradas no pequeno espaço compreendido entre o estator e um rotor de alta velocidade (5000 a 20000 rpm). Essa redução de tamanho favorece a rápida dissolução das substâncias químicas. As vantagens desse método são a rapidez e o quase esgotamento da droga vegetal, mas há inconvenientes como dificuldade na separação da solução extrativa por filtração, geração de calor durante o procedimento e limitação quando se trata de caules, raízes ou materiais de elevada dureza (SONAGLIO *et al.*, 2004). Assim, prosseguindo os estudos, foi investigado com auxílio de um novo planejamento fatorial (fatores: proporção DV: solvente, tempo de extração e

velocidade de agitação), a influência de outro método extrativo, turbólise, sobre a qualidade do extrato de *S. mombin*, mensurada novamente pelo RS e teor de FT.

A análise dos ensaios realizados (**Tabela 24**) revelou que o percentual RS nos extratos variou de 2,8 a 7,5 %, enquanto a concentração de FT praticamente quintuplicou, se compararmos os experimentos 1 e 6 (FT: $3,36 \pm 0,01$ e $14,73 \pm 0,02$ mg/mL, respectivamente).

Tabela 24 – Resultados obtidos nos experimentos de extração por turbólise

Exp	DV:solvente	t (min)	V (rpm)	RS (%)	FT (mg/mL)
1	0,1	2	10200	$2,76 \pm 0,05$ (1,79)	$3,36 \pm 0,01$ (7,36)
2	0,3	2	10200	$5,92 \pm 0,14$ (2,41)	$11,31 \pm 0,0$ (0,61)
3	0,1	18	10200	$3,09 \pm 0,10$ (3,25)	$4,74 \pm 0,01$ (4,84)
4	0,3	18	10200	$6,44 \pm 0,13$ (2,02)	$12,35 \pm 0,0$ (1,3)
5	0,1	10	3200	$3,21 \pm 0,13$ (4,00)	$4,97 \pm 0,01$ (9,68)
6	0,3	10	3200	$7,52 \pm 0,17$ (2,24)	$14,73 \pm 0,02$ (4,33)
7	0,1	10	17200	$3,08 \pm 0,14$ (4,39)	$4,36 \pm 0,01$ (7,18)
8	0,3	10	17200	$6,39 \pm 0,09$ (1,36)	$12,31 \pm 0,01$ (2,52)
9	0,2	2	3200	$4,04 \pm 0,04$ (0,89)	$6,37 \pm 0,01$ (5,79)
10	0,2	18	3200	$5,71 \pm 0,20$ (3,54)	$9,95 \pm 0,0$ (1,15)
11	0,2	2	17200	$4,98 \pm 0,10$ (1,93)	$8,87 \pm 0,0$ (1,33)
12	0,2	18	17200	$4,82 \pm 0,0$ (4,48)	$8,78 \pm 0,0$ (1,16)
13	0,2	10	10200	$4,82 \pm 0,01$ (4,43)	$8,92 \pm 0,01$ (2,25)
14	0,2	10	10200	$4,69 \pm 0,01$ (1,28)	$8,50 \pm 0,01$ (4,47)
15	0,2	10	10200	$4,69 \pm 0,01$ (0,33)	$7,22 \pm 0,01$ (2,41)

Os resultados estão expressos como Média \pm DP (DPR). As análises foram realizadas em triplicata.

Na extração por turbólise, dentre os fatores investigados, dois (DV:solvente e tempo de extração) influenciaram significativamente ($p < 0,05$, ANOVA) e positivamente no percentual de RS (**Tabela 25** e **Figura 11**). Ainda, na **Figura 12** pode-se verificar a influência negativa da interação $V \cdot t$, ou seja, a velocidade de agitação diminui a influência do tempo no RS e por sua vez o tempo também diminui a influência da velocidade de agitação no RS.

Tabela 25 – Análise de variância (ANOVA) dos dados referentes ao RS do procedimento de extração por turbólise

Variável	Soma dos quadrados	Grau de liberdade	Quadrado médio	F	p-valor
DV:solvente	24,957	1	24,957	287,364	
DV:solvente ²	0,000	1	0,000	0,004	0,954655
T	0,696	1	0,696	8,016	0,036619*
t ²	0,109	1	0,109	1,253	0,313873
V	0,183	1	0,183	2,107	0,206314
V ²	0,392	1	0,392	4,514	0,087004
DV:solvente x t	0,009	1	0,009	0,104	0,760222
DV:solvente x V	0,250	1	0,250	2,879	0,150528
t x V	0,837	1	0,837	9,64	0,026706*
Erro	0,434	5	0,087		

*variável significativa a 5%

Figura 11 – Superfície de resposta do rendimento de sólidos (RS) em função da relação DV:solvente e tempo no procedimento de extração por turbólise

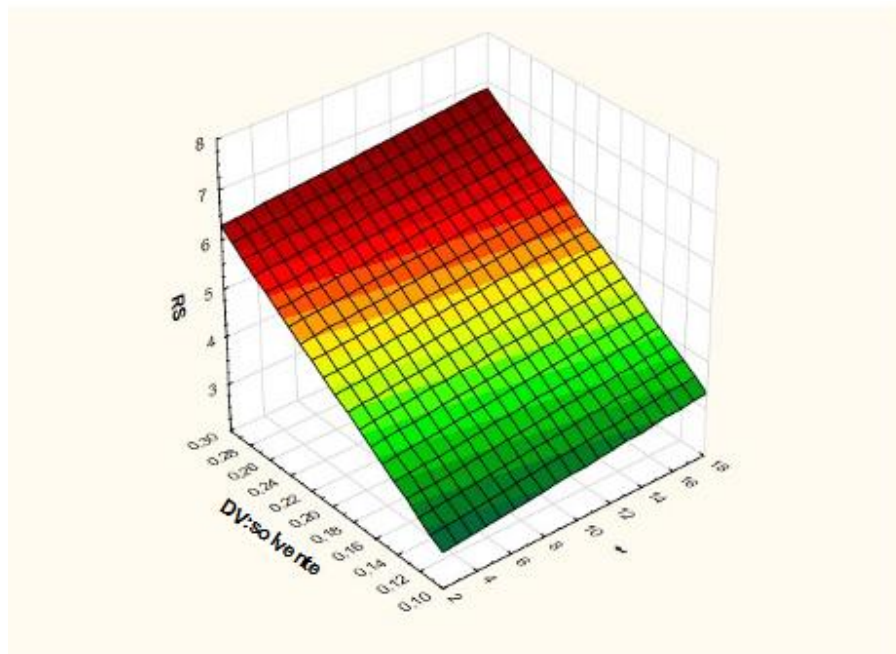
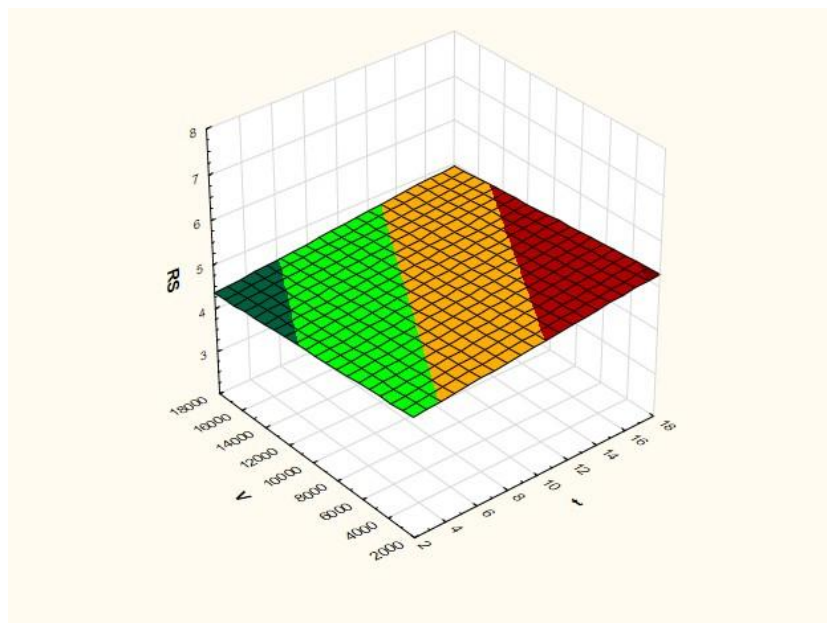


Figura 12 – Superfície de resposta do rendimento de sólidos (RS) em função do tempo (t) e velocidade de agitação (V)



Quanto ao teor de FT no extrato de *S. mombin* produzido por turbólise, foi verificado que apenas a variação na proporção de DV:solvente (0,1; 0,2 e 0,3) interferiu significativamente e positivamente no teor de FT. Ademais, não foi observado interação entre os fatores avaliados (**Tabela 26, Figuras 13 e 14**).

Tabela 26 – Análise de variância (ANOVA) dos dados referentes ao FT do procedimento de extração por turbólise

Variável	Soma dos quadrados	Grau de liberdade	Quadrado médio	F	p-valor
DV:solvente	138,362	1	138,362	148,285	0,000066*
DV:solvente ²	0,099	1	0,099	0,106	0,758403
T	4,366	1	4,366	4,679	0,082858
t ²	0,704	1	0,704	0,755	0,424767
V	0,361	1	0,361	0,387	0,561068
V ²	1,892	1	1,892	2,028	0,213753
DV:solvente x t	0,029	1	0,029	0,031	0,867207
Dv:solvente x V	0,819	1	0,819	0,878	0,391825
t x V	3,367	1	3,367	3,609	0,115913
Erro	4,665	5	0,933		

*variável significativa a 5%

Figura 13 – Superfície de resposta do teor de fenóis totais (FT) em função da relação DV:solvente e tempo no procedimento de extração por turbólise

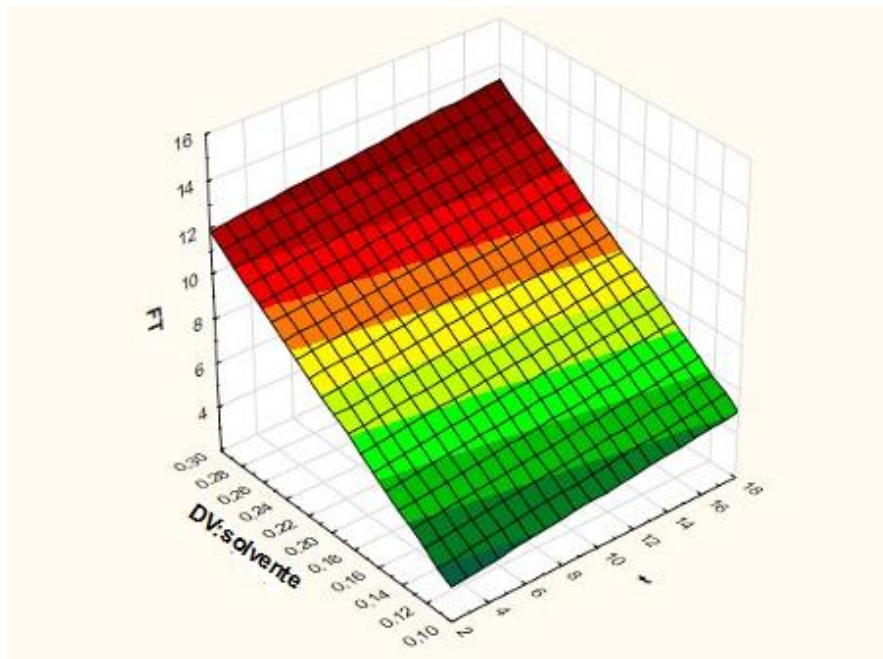
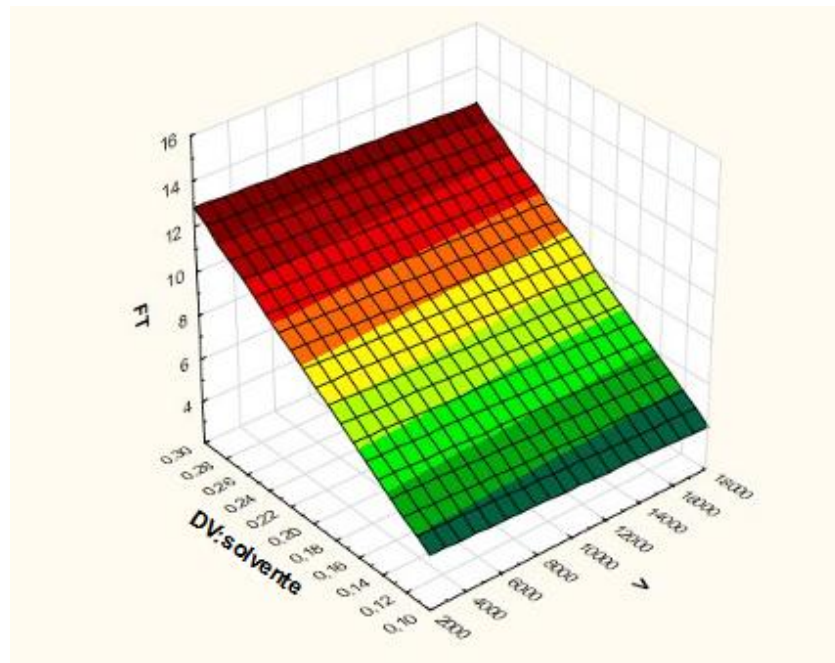


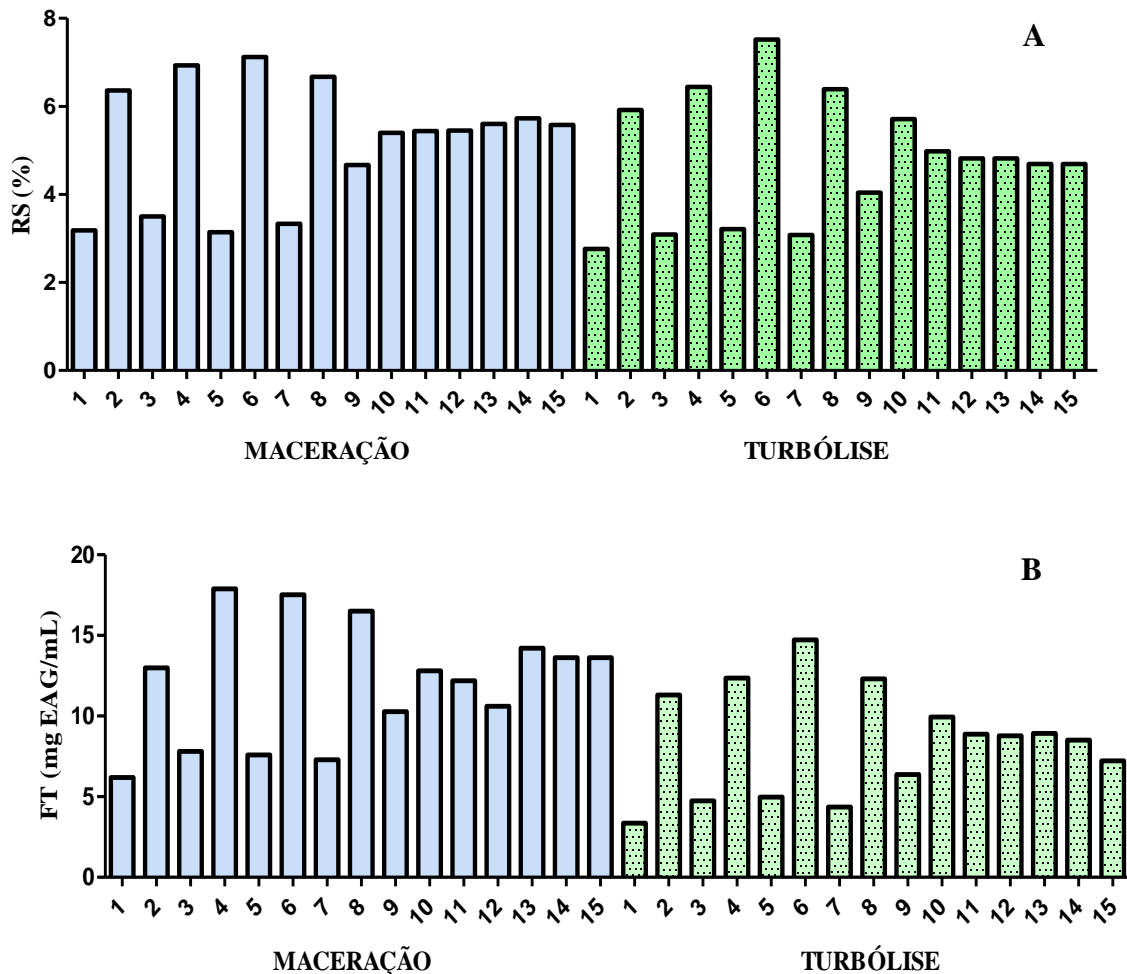
Figura 14 – Superfície de resposta do teor de fenóis totais (FT) em função da relação DV:solvente e velocidade de agitação no procedimento de extração por turbólise



De acordo com os resultados obtidos para RS e FT pode-se afirmar que a melhor condição para a extração por turbólise é a realizada com maior relação Dv:solvente. O tempo e a velocidade agitação não foram estatisticamente significantes. Dessa forma, tem-se a condição 6 como a melhor com maior RS e FT, sugerindo que com essa condição pode-se obter o máximo de extração com o método turbólise.

Na escolha de um processo extrativo, diversos fatores devem ser avaliados, dentre eles, a rapidez do método, o custo, a extração exaustiva dos princípios ativos, sua simplicidade e a capacidade de automatização (WIJESEKERA, 1991; SHARAPIN, 2000). No presente estudo, foi observado que a extração das folhas de *S. mombin* por maceração dinâmica (experimento 6) produziu um extrato com 7,1 % de RS, comparável ao produzido por turbólise (experimento 6: 7,5 %), mas com maior teor de FT (17,5 mg/mL) em relação ao extrato obtido por turbólise (14,7 mg/mL) (Figura 15 A e B). Dessa forma, diante dos resultados obtidos o método de maceração dinâmica (experimento 6) foi selecionado para prosseguir os estudos do extrato de *S. mombin*, como análise por CLAE-DAD para detecção e determinação do teor de dois fenóis, geraniina e ácido clorogênico.

Figura 15 – Rendimento de sólidos (RS) e Teor de fenóis totais (FT) obtidos pelos métodos estudados



4.5 Análise do teor de geraniina (GR) e do ácido clorogênico (AC) no extrato das folhas de *S. mombin* por CLAE-DAD

A análise do extrato hidroetanólico de *S. mombin* por CLAE-DAD, previamente caracterizado (pH, densidade, teor de FT e RS) (**Tabela 27**), permitiu a determinação de seu perfil cromatográfico, incluindo a identificação de dois marcadores químicos bioativos, ácido clorogênico - AC (Tr: 9,2 min) e geraniina - GR (Tr: 23,0 min), realizada com auxílio de dados espectroscópicos de UV e por comparação do tempo de retenção dos padrões de trabalho (**Figura 16**). Considerando que a análise espectrofotométrica empregada no desenvolvimento do extrato padronizado de *S. mombin*, possui menor seletividade em relação à CLAE-DAD, foi realizado um estudo analítico comparativo com os extratos obtidos por maceração dinâmica (M) e turbólise (T), incluindo àqueles que apresentaram as menores (M1

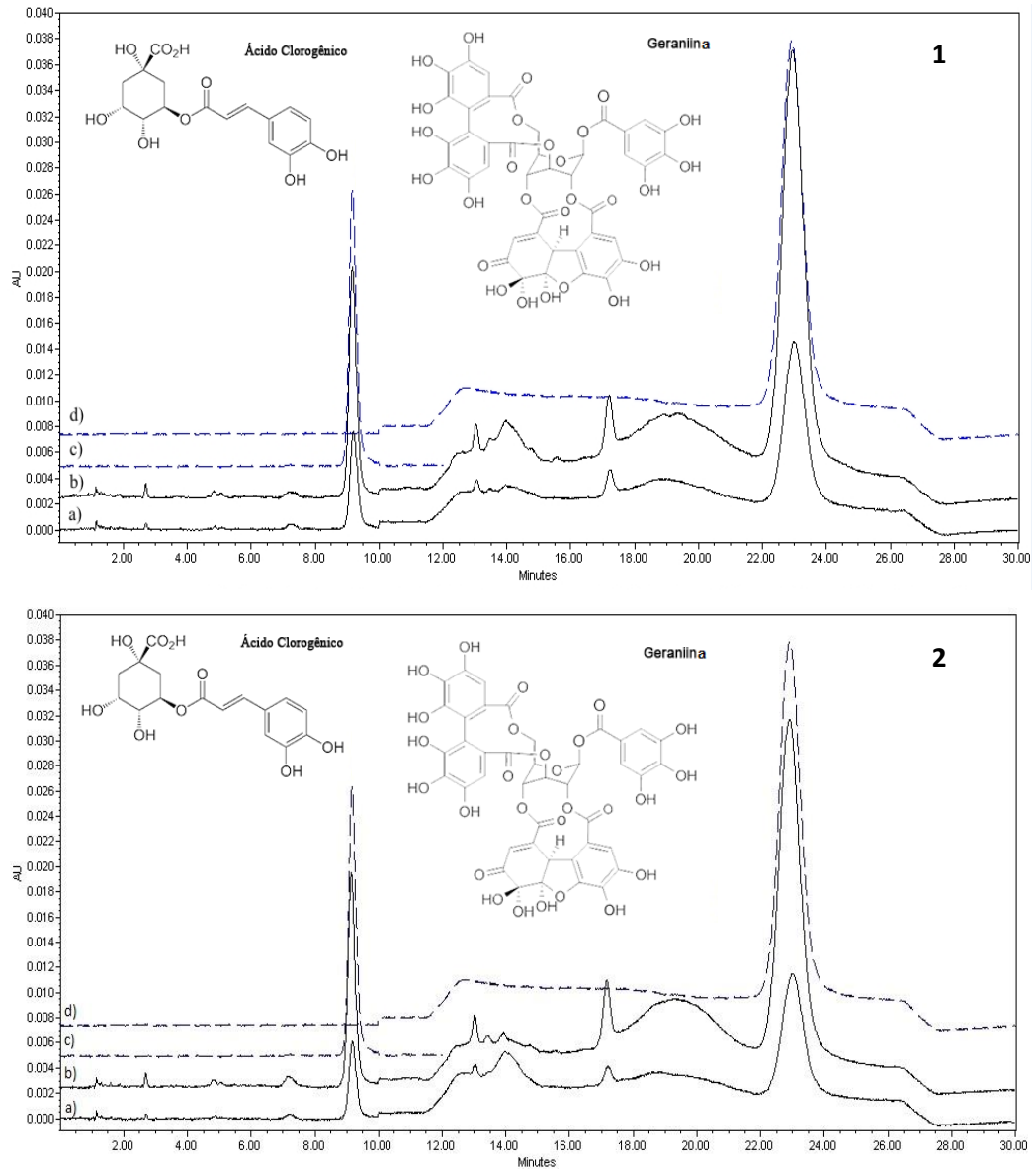
e T1) e maiores (M6 e T6) concentrações de fenóis totais. Na **Figura 16**, pode ser observado que todos os extratos (M1, M6, T1 e T6) mostraram a presença do AC e da GR, e que seus perfis cromatográficos mostraram similaridades do ponto de vista qualitativo. Porém, em algumas circunstâncias houveram variações, como no perfil cromatográfico do extrato T1 em relação ao extrato T6 (Tr: ~ 14 min.), e deste último em relação ao extrato M6 (Tr:~14 min) (**Figuras 16 e 17**). Essas variações, estão possivelmente relacionadas a natureza distinta das condições de extração envolvendo um mesmo método ou métodos distintos (M e T). Contudo, estudos adicionais são ainda necessários, visando a identificação da natureza química dos demais picos presentes no cromatograma do extrato de *S. mombin* (M6), que auxiliará na melhor descrição do *fingerprint* da espécie, uma ferramenta importante e recomendada no controle de qualidade de insumos farmacêuticos e medicamentos de origem vegetal (BRASIL, 2014, 2015; ZHAO *et al.*, 2005; ZHANG *et al.*, 2005; LIU *et al.*, 2007).

Tabela 27 – Caracterização dos extratos obtidos na condição 6 do método de extração maceração dinâmica

Extrato	pH	Densidade (g/mL)	Rendimento de sólidos (%)	Teor de fenóis totais mg de EAG/mL
1	3,29 ± 0,04 (1,26)	0,941 ± 0,003 (0,33)	7,12 ± 0,28 (3,9)	17,52 ± 0,01 (3,77)
2	3,24 ± 0,01 (0,31)	0,935 ± 0,001 (0,11)	6,63 ± 0,09 (1,42)	18,58 ± 0,02 (2,29)
3	3,30 ± 0,04 (1,22)	0,938 ± 0,001 (0,06)	6,07 ± 0,04 (0,72)	18,74 ± 0,00 (0,60)
Média	3,28 ± 0,03 (0,98)	0,938 ± 0,00 (0,32)	6,61 ± 0,53 (7,95)	18,28 ± 0,66 (3,63)

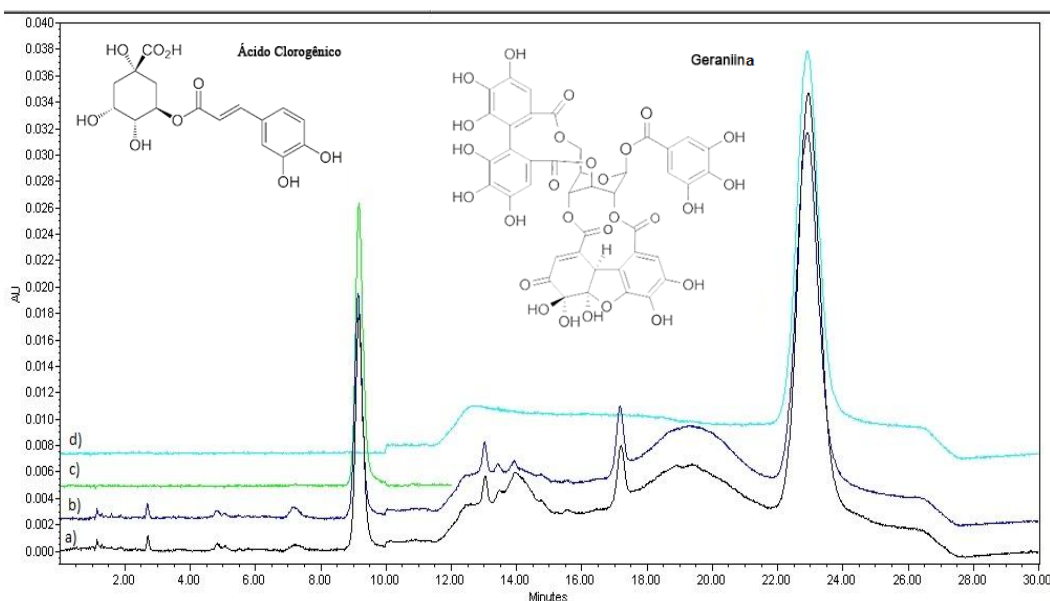
Os valores estão expressos como média ± DP (DPR). As análises foram realizadas em triplicata. DP = desvio padrão; DPR = desvio padrão relativo; EAG: equivalentes de ácido gálico

Figura 16 – Perfis cromatográficos dos marcadores e dos extratos de *S. mombin*



Cromatogramas no modo “Timed Wavelength” sendo de 0 – 10 min em 325 nm e de 10 – 30 min em 276 nm. 1. a) Extrato M1; b) Extrato M6; c) Ácido clorogênico 9,8 µg/mL; d) Geraniina 64,08 µg/mL. 2. a) Extrato T1; b) Extrato T6; c) Ácido clorogênico 9,8 µg/mL; d) Geraniina 64,08 µg/mL.

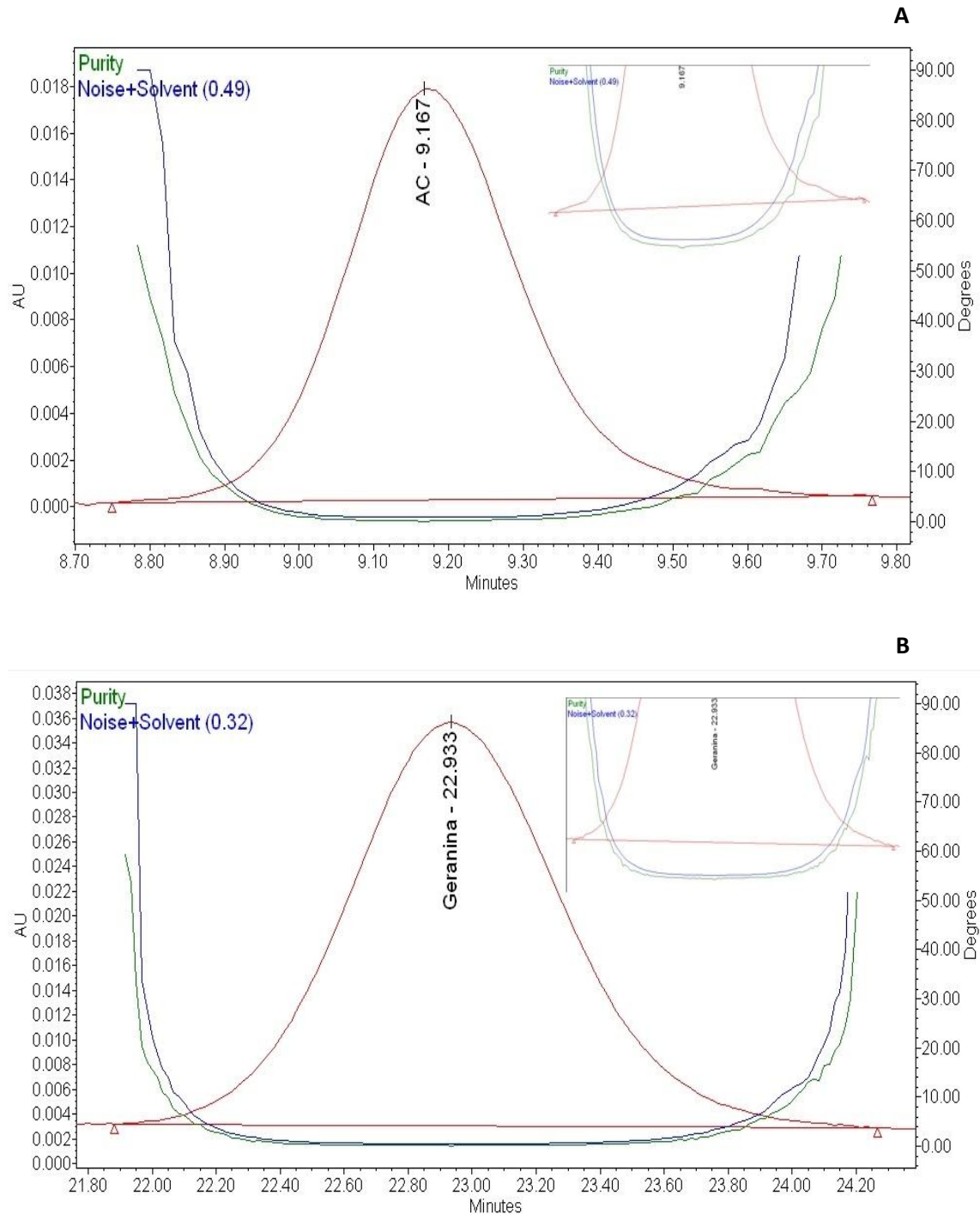
Figura 17 – Perfis cromatográficos dos marcadores e dos extratos M6 e T6 de *S. mombin*



Cromatogramas no modo “*Timed Wavelength*” sendo de 0 – 10 min em 325 nm e de 10 – 30 min em 276 nm. a) Extrato M6; b) Extrato T6; c) Ácido clorogênico 9,8 µg/mL; d) Geraniina 64,08 µg/mL.

A análise por CLAE-DAD tem sido extensivamente empregada e muito útil na análise da qualidade de produtos naturais (ARARUNA *et al.*, 2013; DA COSTA *et al.*, 2015). Contudo, para assegurar a especificidade dessas, em especial em matrizes complexas, como os extratos vegetais, é fundamental avaliar a pureza dos picos detectados, que podem ocorrer associados ou não a outros constituintes da matriz e/ou impurezas, por exemplo. Nesse contexto, foi investigado no presente estudo a pureza dos picos do AC e da GR, que se mostraram puros, considerando que seus ângulos de pureza (0,554 e 0,346 respectivamente) foram menores em relação ao ângulo threshold (1,648 e 1,334 respectivamente), e não foram observadas interseções entre as curvas de pureza (curva verde) e *threshold* (curva azul) (**Figura 18**). Esse resultado foi importante para assegurar a especificidade do presente método, e constitui um indicativo de exatidão deste nas análises do AC e da GR no ESM.

Figura 18 – Gráfico da pureza de pico dos marcadores em extrato M6 de *S. mombin*.



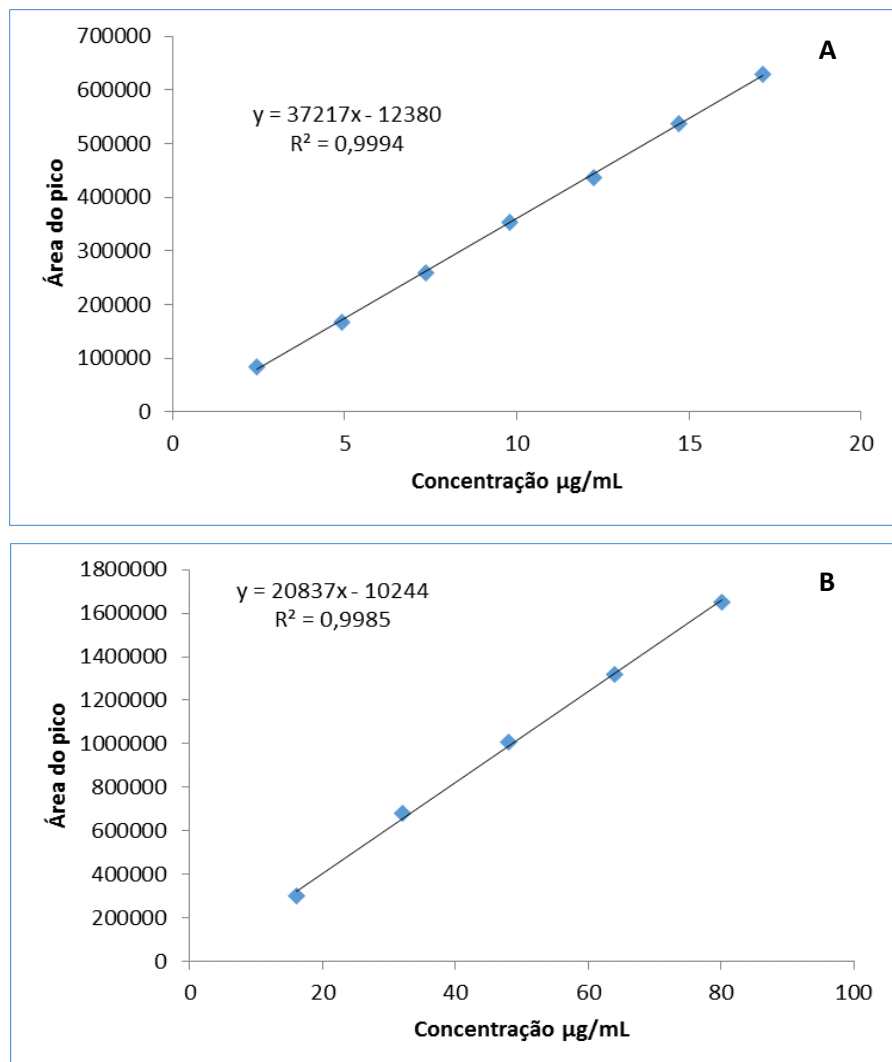
Faixa de 240 – 400 nm. Solvent (0,32) + noise como threshold. A) Pureza de pico do AC no extrato M6; B) Pureza de pico da GR no extrato M6.

Prosseguindo os estudos, foi investigada a linearidade do método CLAE para análise de AC e GR no ESM (**Figura 19**). Análises de regressão linear das curvas de calibração construídas com emprego de padrões externos (AC e GR) permitiram determinar as equações da reta e coeficientes de correlação ($r > 0,99$), que demonstraram a linearidade do método.

Ademais, a análise de variância dos resultados comprovou que as variáveis x e y estão relacionadas (**Tabela 28**).

Os gráficos de resíduos dos resultados obtidos estão apresentados na **Figura 20**, onde a maioria dos resultados estão distribuídos próximos ao zero. Não foi detectada tendência na distribuição dos resíduos nem a presença de valores atípicos e, por isso, os resíduos foram considerados como tendo distribuição normal sem valores atípicos, indicando a adequabilidade do modelo linear proposto.

Figura 19 – Representação gráfica da curva de calibração obtida por CLAE- DAD para ácido clorogênico (A) e geraniina (B)



Foram preparadas 7 concentrações de solução padrão de AC (2,45 – 17,15 µg/mL) e de 5 de GR (16 – 80 µg/mL), obtidas a partir da SEAC (500 µg/mL) e da SEGR (2000 µg/mL), respectivamente.

Figura 20 – Gráficos de resíduos obtidos da análise de regressão das curvas de calibração do ácido clorogênico (A) e geraniina (B)

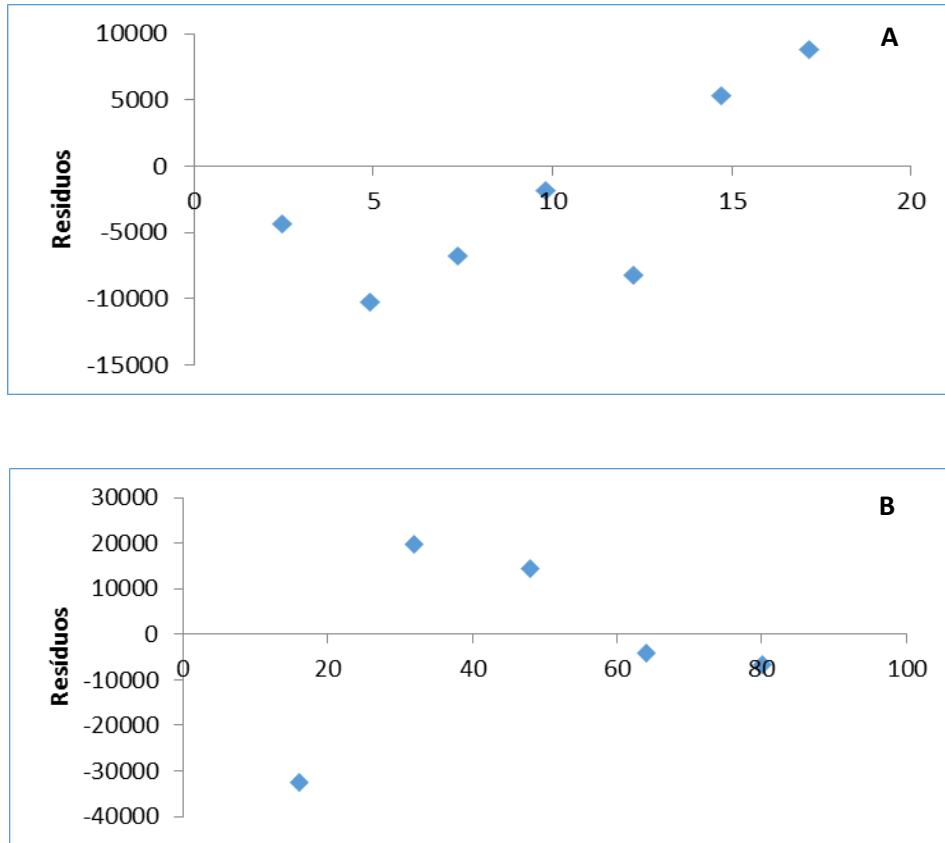


Tabela 28 – Valores de p e F obtidos por análise de variância (ANOVA) das curvas padrões de AC e GR

Padrão	F	Valor-p
Ácido clorogênico	19039,77	9,77E-12*
Geraniina	13955,56	3,08E-08*

P < 0,05

Análise comparativa do teor de AC e GR nos extratos de *S. mombin* (M1, M6, T1 e T6) por CLAE-DAD (**Tabelas 29 e 30**) ratificou os resultados obtidos nas análises espectrofotométricas da planta, onde os extratos M6 e T6 apresentaram as maiores concentrações de fenóis totais em relação aos extratos M1 e T1. A concentração de AC e de GR praticamente não diferiram nos extratos M6 (0,828 e 7,37 mg/mL, respectivamente) e T6 (0,786 e 6,19 mg/mL, respectivamente), e o teor de GR nos extratos (M6 e T6) é cerca de 8 vezes maior em relação ao AC.

Tabela 29 – Determinação do teor de ácido clorogênico nos extratos de *S. mombin*

Extrato	Área (325 nm)	Conc. (mg/mL)	Conc. (%)
M1	118621,5 ± 3,19	0,328	0,033
M6	299736,25 ± 1,86	0,828	0,083
T1	103199,5 ± 4,41	0,285	0,029
T6	284507,75 ± 1,87	0,786	0,079

Os resultados representam a área do pico e estão expressos como média ± DPR. Para o cálculo das concentrações foi usado o fator de diluição (Fd) =100.

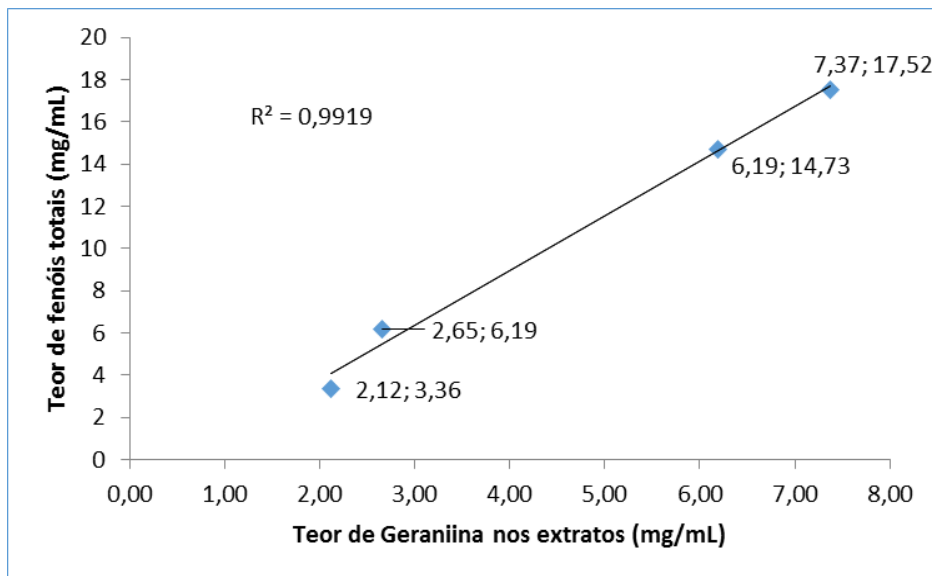
Tabela 30 – Determinação do teor de geraniina nos extratos de *S. mombin*

Extrato	Área (276 nm)	Conc. (mg/mL)	Conc. (%)
M1	548064,75 ± 4,58	2,65	0,27
M6	1523711,75 ± 1,93	7,37	0,74
T1	438853 ± 3,48	2,12	0,21
T6	1279690,25 ± 2,27	6,19	0,62

Os resultados representam a área do pico e estão expressos como média ± DPR. Para o cálculo das concentrações foi usado o fator de diluição (Fd) =100.

Com os valores de teor obtidos para o marcador geraniina, também foi possível comparar o teor deste marcador com o de fenóis totais de cada extrato (item 4.4), através de um gráfico de correlação (**Figura 21**). É possível observar, pela análise do gráfico, que quando se tem um baixo teor de geraniina, tem-se também um baixo teor de polifenóis. Além disso, o coeficiente de determinação (r^2) obtido foi igual a 0,9919, indicando que 99,19 % da variação no teor de fenóis totais pode ser explicado pela concentração de geraniina. Assim, pode-se afirmar que a geraniina é o principal polifenol dos extratos obtidos neste trabalho.

Figura 21 – Representação gráfica da correlação entre o teor de geraniina e o teor de fenóis totais nos extratos de *S. mombin*



Os extratos referidos foram os eleitos para este estudo: M1, M6, T1 e T6.

Considerando os resultados obtidos até o momento, o presente estudo permitiu determinar métodos de produção da droga vegetal e produto derivado, desenvolver e validar método analítico e estabelecer especificações para o controle de qualidade desde a planta *in natura* ao extrato hidroetanólico de *S. mombin*. Ademais, a otimização do processo de produção desse extrato, permitiu o desenvolvimento de um produto inédito e padronizado pelo teor de marcadores bioativos (fenóis totais, GR e AC).

Estudos anteriores tem mostrado o potencial farmacológico de extratos e constituintes químicos de *S. mombin*, incluindo atividades anti-inflamatória (AKUBUE *et al.*, 1983; CABRAL, 2014), antioxidante (PANLY & FLERRY, 2002), antibacteriana (AJAO *et al.*, 1985), antiviral (CORTHOUT *et al.*, 1991, 1992), anti-helmíntica (ADEMOLA *et al.*, 2005), anti-epiléptica (AYOKA *et al.*, 2006), antipsicótica (AJAO *et al.*, 1985). Dessa forma, torna-se imprescindível avaliar se o novo extrato padronizado de *S. mombin* produzido no presente estudo com especificações de qualidade ainda não descritas na literatura possui propriedades farmacológicas de interesse para o tratamento do herpes labial. Nesse sentido, foram investigadas as atividades anti-inflamatória e antiviral (*Herpes simplex 1*) de *S. mombin*.

4.6 Atividades anti-inflamatória e anti-herpética do ESM padronizado e da GR

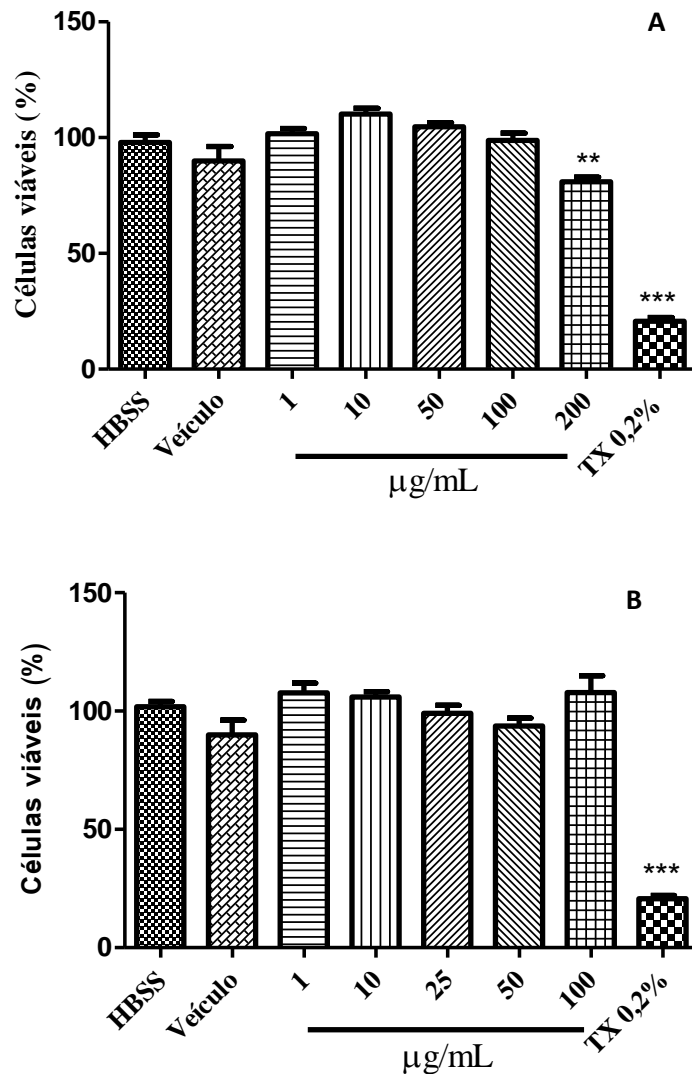
A infecção viral pelo *Herpes simplex* caracteriza-se clinicamente, dentre outros aspectos, como um processo inflamatório com formação de vesículas túrgidas e brilhantes, dispostas em grupo de 5 a 10 lesões que lembram cacho de uva, em torno de orifícios (boca, vulva e ânus), essas vesículas se rompem com facilidade, e expõem um líquido que representa um exsudato inflamatório (AZULAY, 2008; CONSOLARO & CONSOLARO, 2009).

A avaliação do potencial anti-inflamatório do ESM padronizado e da GR foi realizada através do modelo de desgranulação em neutrófilo humano, mensurada pela atividade da mieloperoxidase. Para tanto, inicialmente foi investigada a possível citotoxicidade dos produtos através do teste do MTT, um ensaio colorimétrico, baseado na redução do brometo de 3-[4,5-dimetiltiazol-2il]-2,5-difeniltetrazólio (MTT) pelas mitocôndrias viáveis a um sal (Formazan), sendo a quantidade deste um indicativo da viabilidade celular (MOSMANN, 1983).

Na **Figura 22** pode ser observado que adição de concentrações crescentes do ESM padronizado ou GR (1 – 100 µg/mL) não reduziu significativamente o percentual de células viáveis em relação ao grupo controle/veículo. Por outro lado, o ESM padronizado na maior concentração (200 µg/mL) reduziu significativamente a viabilidade celular (% redução: 17,33), o mesmo sendo observado pela adição de Triton-x100 (padrão citotóxico) à suspensão de neutrófilos, que induziu uma redução da viabilidade celular (78,87 %) bem superior em relação ao grupo ESM. O tratamento das células com GR até a concentração de 100 µg/mL, não promoveu redução significativa da viabilidade celular ($107,7 \pm 4,14$; $105,9 \pm 2,28$; $99,1 \pm 3,30$; $93,67 \pm 3,44$; $107,9 \pm 7,11$ %) quando comparado ao grupo controle/veículo ($101,8 \pm 1,46$ %).

Tais resultados sugerem ausência de toxicidade do ESM padronizado e da GR (1-100 µg/mL) sobre o metabolismo de neutrófilo humano, particularmente relacionado à atividade da enzima mitocondrial succinato desidrogenase.

Figura 22 – Efeito do ESM padronizado e GR sobre a citotoxicidade (teste de MTT).



Neutrófilos (5×10^6 células/mL) foram incubados com as substâncias em estudo e 3h depois foi avaliada a viabilidade celular através do teste de MTT. HBSS: células não tratadas; Tx: Triton X – 100 (0,2%, v/v) – padrão citotóxico; Veículo: DMSO 1%. Os resultados estão sendo expressos como média \pm E.P.M. * vs Controle ($p < 0,005$ – ANOVA e Teste de Tukey). A) ESM (1, 10, 50, 100 e 200 $\mu\text{g/mL}$); B) GR (1, 10, 25, 50 e 100 $\mu\text{g/mL}$).

Diante dos resultados obtidos, foi investigado o potencial anti-inflamatório do ESM padronizado e da GR em neutrófilo humano, empregando concentrações que se mostraram seguras (1- 100 $\mu\text{g/mL}$). Para tanto, foi empregado o modelo de desgranulação de neutrófilo humano mensurada pela atividade da mieloperoxidase.

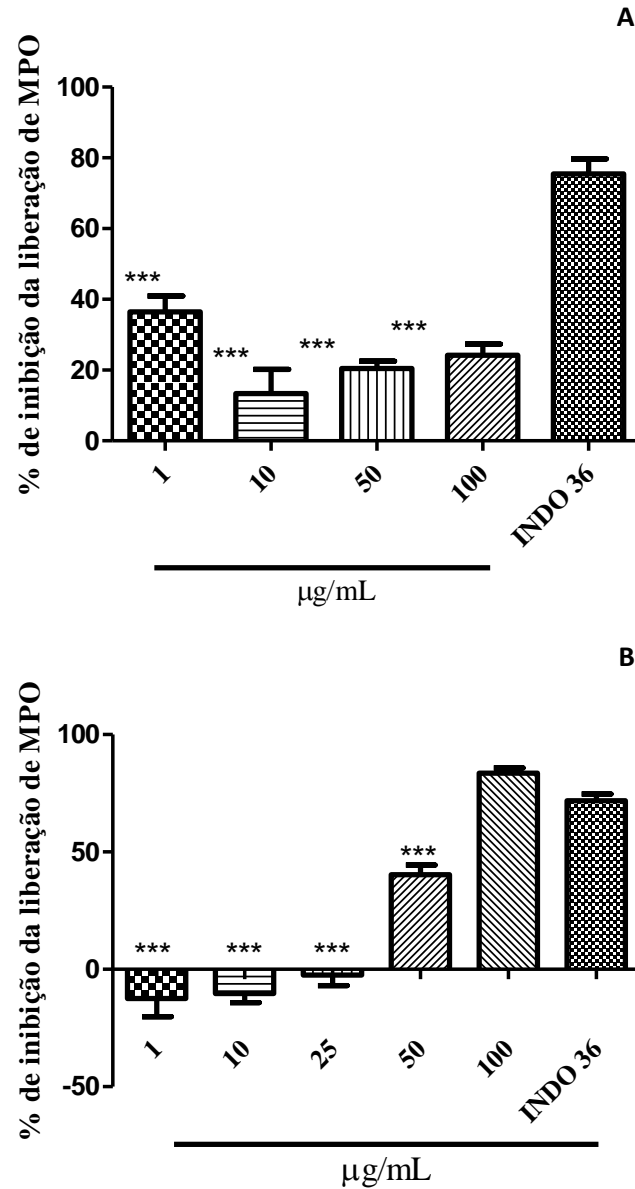
Os neutrófilos estão entre as células mais prevalentes na resposta aguda, constituindo cerca de 50 a 70% do total de leucócitos circulantes (KOBAYASHI *et al.*, 2003). Estas células respondem aos mediadores inflamatórios através da migração e eventualmente

fagocitose, acabando por resultar em resolução da inflamação, reparo tecidual e recuperação da homeostase (FOLLIN, 1999; TERUI *et al.*, 2000). São provavelmente os mais importantes fagócitos, primeiras células a chegar ao local da agressão, grandes produtores de metabólitos oxidativos e estão prontos para matar o organismo ou agente causador da inflamação (MAYER-SCHOLL *et al.*, 2004).

Os grânulos azurófilos de neutrófilos humanos constituem uma das principais fontes de MPO, uma hemoproteína responsável por converter o H_2O_2 em ácido hipocloroso (HOCl), um agente oxidante bactericida poderoso que destrói os microrganismos pela halogenação ou pela oxidação de proteínas e lipídios (peroxidação lipídica) (ARNHOLD, 2004; SEGAL, 2005; FAURSCHOU & BORREGAARD, 2003; HAMPTON *et al.*, 1998). A MPO também pode ser encontrada em macrófagos, fluidos biológicos, coração, rins e outros. Dessa forma, experimentalmente o nível de MPO tem sido utilizado como índice de migração e ativação de neutrófilos (PEDRO *et al.*, 2003)

No presente estudo a adição de PMA (0,1 μ M) à suspensão de neutrófilo humano induziu a ativação celular, com liberação significativa de MPO (Abs: $1,922 \pm 0,65$) em relação ao grupo não tratado/HBSS (Abs: $0,403 \pm 0,13$). Porém, a adição do ESM padronizado inibiu parcialmente a liberação de MPO induzida por PMA, sendo observado melhor efeito na menor concentração do extrato (1 μ g/mL). O tratamento das células com GR (1-100 μ g/mL), por sua vez, promoveu um efeito dual, ampliando a desgranulação de neutrófilo induzida por PMA nas menores concentrações (1 – 25 μ g/mL) e inibindo esta (40,3 e 83,5 %) nas maiores concentrações (50 e 100 μ g/mL). Na maior concentração, a GR induziu um efeito anti-inflamatório comparável a indometacina (% inibição: 71,8 %) (**Figura 23**).

Figura 23 – Efeito do ESM padronizado e GR sobre a desgranulação neutrofílica induzida por PMA determinada pela inibição da liberação da mieloperoxidase.



Neutrófilos ($2,5 \times 10^6$ células/mL) foram incubados com as substâncias teste e posteriormente estimulados com PMA ($0,1 \mu\text{mol}$); INDO: indometacina, droga padrão. Os resultados obtidos na presença de GR foram comparados ao grupo controle (100% da liberação de MPO). Os valores estão sendo expressos como média \pm E.P.M. As análises foram realizadas em triplicatas em três dias diferentes. * vs INDO 36 $\mu\text{g/mL}$ ($p < 0,05$ - ANOVA e Teste de Tukey). A) ESM (1, 10, 50, 100, 200 $\mu\text{g/mL}$); B) GR (1, 10, 25, 50, 100 $\mu\text{g/mL}$).

O comportamento inverso do extrato em relação a GR, quanto as concentrações que se mostraram mais eficazes, pode estar relacionado a natureza complexa do extrato, onde a geraniina não constitui o único metabólito secundário bioativo do produto, outras moléculas,

incluindo ácidos fenólicos (p.ex.: ácido clorogênico) e taninos, podem estar contribuindo nessa resposta. Em relação ao efeito dual observado, estudos adicionais com avaliação do possível mecanismo de ação molecular poderão auxiliar na compreensão dessa resposta.

O PMA (forbol-miristato-acetato), representante mais difundido dos análogos de ésteres de forbol, é um composto sintético que induz a desgranulação de neutrófilos, ativando diretamente a proteína quinase C (PKC), resultando na reorganização do citoesqueleto, fosforilação de proteínas e ativação de NADPH oxidase (THELEN *et al.*, 1993; EDWARDS, 1996; DOWNEY *et al.*, 1992). Dessa forma, parte do efeito anti-inflamatório do ESM e da GR pode estar relacionado a uma ação direta sobre a enzima PKC e/ou modulação dos mecanismos que sucedem a ativação dessa enzima.

A atividade anti-inflamatória do ESM padronizado e da GR, determinada no presente estudo foi corroborada por estudos anteriores que demonstraram a atividade anti-inflamatória de taninos hidrolizáveis (LIU *et al.*, 2015) e mais especificamente de elagitaninos (PIWOWARSKI & KISS, 2014), que inibiram a liberação de MPO induzida por citocalina A / fMLP. Ademais, estudos (ABAD *et al.*, 1996; NWORU *et al.*, 2011; CABRAL, 2014) com extratos etanólico, metanólico ou hidroetanólico de *S. mombin* (folhas ou caule) também observaram a atividade anti-inflamatória da planta em modelos experimentais de inflamação em roedores, como edema de pata ou peritonite induzida por carragenina.

O mecanismo de ação inflamatória induzida por carragenina em roedores está bem descrito na literatura (WINTER *et al.*, 1962; DI ROSA *et al.*, 1971; POSADAS *et al.*, 2004; GUAY *et al.*, 2004), envolvendo a participação de vários mediadores inflamatórios (prostaglandinas, óxido nítrico, mieloperoxidase, etc) e intensa celularidade, predominantemente polimorfonucleares, como neutrófilos. Assim, o potencial modulador do ESM e da GR sobre a ativação de neutrófilo humano determinado no presente estudo, constitui um indício para explicar, pelo menos em parte, como essa planta pode ter mostrado efeito anti-inflamatório nos modelos experimentais de inflamação induzido por carragenina.

É importante para a prevenção da infecção viral que a transmissão da patogênese seja inibida. Um dos meios é a utilização de um agente antimicrobiano. No presente estudo, foi investigada a eficiência do extrato hidroetanólico de *S. mombin* e do elagitanino geraniina na inativação do vírus HSV-1 em células VERO. Para tanto realizou-se um ensaio de citotoxicidade, através do método MTT, bem como o ensaio anti-herpes com as drogas testes citadas acima.

Na avaliação da citotoxicidade do extrato e da GR em células VERO, foi observado uma redução da viabilidade celular a partir da concentração de 250 µg/mL, com uma CC₅₀ de 1680

$\mu\text{g/mL}$ e $392,5 \mu\text{g/mL}$, respectivamente, enquanto o PFA (antiviral padrão) apresentou uma CC_{50} de $3450 \mu\text{g/mL}$ (**Tabela 31**). Realizando uma análise comparativa, foi observado a seguinte ordem de citotoxicidade $\text{GR} > \text{ESM} > \text{PFA}$.

Na avaliação do potencial antiviral, o ESM foi mais potente (CI_{50} : $342,5 \mu\text{g/mL}$), em relação a GR (CI_{50} : $417,5 \mu\text{g/mL}$) e PFA (CI_{50} : $570 \mu\text{g/mL}$), e teve um índice de seletividade (IS) próximo ao do PFA. O IS da GR foi de $0,94$ (**Tabela 31**).

Tabela 31 – Concentrações citotóxicas 50 % (CC_{50}), Concentrações inibitórias (CI_{50}) e Índice de seletividade (IS) do ESM, GR e controle positivo (PFA)

Substância	CC_{50} ($\mu\text{g/mL}$) ^a	CI_{50} ($\mu\text{g/mL}$) ^b	IS ^c
Extrato de <i>S. mombin</i>	1680	342,5	4,9
Geraniina	392,5	417,5	0,94
PFA	3450	570	6,05

a) CC_{50} : concentração do fármaco em $\mu\text{g/mL}$ citotóxica para 50% das células VERO; b) CI_{50} : concentração de cada fármaco efetiva para inibir em 50% o título viral, em $\mu\text{g/mL}$; c) IS: índice de seletividade; relação entre a CC_{50} e a CI_{50} . PFA: Ácido fosfonofórmico.

Os resultados obtidos no presente estudo demonstram o papel importante da GR na atividade anti-herpes (*Herpes simplex 1*) de *S. mombin*, contudo, não pode ser descartada a contribuição de outros constituintes presentes nos extratos das folhas de *S. mombin*, que, por sua vez, mostrou um potencial antiviral superior a GR.

Ácidos fenólicos e outros taninos presentes nas folhas de *S. mombin*, tais como galoilgeraniina, têm possivelmente um papel importante na atividade antiviral dessa espécie (ÖZÇELİK *et al.*, 2011; SHENG *et al.*, 2008; CORTHOUT *et al.*, 1991, 1992). Ratificando essa hipótese, Fukushi *et al.* (1989) testando a atividade antiviral de taninos sobre HSV-1 em ensaio de formação de placa, relata que os taninos hidrolisáveis monoméricos, os elagitaninos oligoméricos e os taninos condensados, tendo grupos galoil ou grupos hexahidroxidifenoil, foram os que mostraram atividade anti- HSV mais potente.

O presente estudo estabeleceu as condições ideais de preparação da droga vegetal e extratos de *S. mombin*, incluindo a caracterização física e/ ou química dos mesmos com emprego de método analítico espectrofotométrico validado e cromatográfico. Além disso, o extrato padronizado e/ou constituinte químico (marcador/princípio ativo) de *S. mombin* mostraram um potencial anti-inflamatório e anti-herpético. Contudo, estudos adicionais são necessários, relacionados ao desenvolvimento de extrato seco (spray-dryer) da planta

padronizado e avaliação do potencial anti-inflamatório e antiviral *in vivo*, com determinação do possível mecanismo de ação.

5 CONCLUSÃO

Diante dos resultados obtidos no presente estudo farmacêutico e farmacológico de *S. mombin*, podemos concluir que:

- A condição de preparo da DV constitui na secagem em estufa com circulação e renovação de ar a 60 ± 5 °C por 4 h. Nessas condições obtém-se uma matéria-prima vegetal ativa com especificações farmacognósticas (autenticidade, pureza e integridade) compatíveis para uso farmacêutico;
- O estudo permitiu desenvolver e validar método analítico que viabilizou o desenvolvimento e otimização de extrato padronizado de *S. mombin* (fenóis totais: 17,5 mg/mL; ácido clorogênico: 0,83 mg/mL e geraniina: 7,37 mg/mL) por maceração dinâmica, com emprego das seguintes condições: tempo de extração: 2,5 h, 30 °C e proporção DV:solvente de 0,3. Isso, considerando aspectos químicos (teor de fenóis totais e resíduo seco), de infraestrutura e execução;
- O extrato padronizado de *S. mombin* e a GR possuem atividade anti-inflamatória por inibir parcialmente a desgranulação de neutrófilos humano induzida por PMA, mensurada pela atividade da MPO. Isso, sem interferir significativamente na viabilidade celular, determinada pelo teste do MTT;
- O extrato padronizado de *S. mombin* e a geraniina mostraram atividade anti-herpes (*Herpes simplex 1*) em cultura de células Vero.

Dessa forma, os resultados obtidos permitiram estabelecer, de maneira inédita, métodos e especificações para a produção e controle de qualidade tanto da DV quanto do extrato das folhas de *S. mombin* (ESM). Além disso, tanto o ESM quanto a geraniina (marcador bioativo majoritário) possuem atividades anti-inflamatória e anti-herpes (*Herpes simplex 1*).

REFERÊNCIAS

- ABAD, M. J.; BERMEJO, P.; CARRETERO, E.; MARTINEZACITORES, C. Anti-inflammatory activity of some medical plant extracts from Venezuela. **Journal of Ethnopharmacology**, v.55, n.1, p: 63 – 68, 1996.
- ADEMOLA, I. O.; FAGBEMI, B. O.; IDOWU, S. O. Anthelmintic activity of extract of *Spondias mombin* against gastrointestinal nematodes of sheep; studies in vitro and in vivo. **Tropical Animal Health and Production**, v.37, n.3, p: 223 – 235, 2005.
- AJAO, A. O.; SHONUKAN, O. Antibacterial effect of aqueous and alcohol extracts of *Spondias mombin* and *Alchomea cordifolia*: 2 local antimicrobial remedies. **International Journal of Crude Drug Research**, v. 23, p: 67 – 72, 1985.
- AKHTAR, J.; SHUKLA, D. Viral entry mechanisms: cellular and viral mediators of herpes simplex virus entry. **FEBS Journal**, v. 276, p. 7228 -7236, 2009.
- AKUBUE, P. I.; MITTALAND G. C.; AGUNA, C. N. Preliminary pharmacological study of some Nigerian Medical plants. **J. Ethnopharmacol.**, v. 8, p. 53-63, 1983
- ALBANO, Filipe de Medeiros. **Validação e garantia da qualidade de ensaios laboratoriais**. Porto Alegre: Rede Metrológica RS, 2009, p. 136.
- ALBERTON, J. R.; RIBEIRO, A.; SACRAMENTO, L. V. S.; FRANCO, S. L.; LIMA, M. A. P. Caracterização farmacognóstica do jambolão (*Syzygium cumini* (L.) Skeels). **Rev. Bras. Farmacogn.**, v. 1, p. 37-50, 2001.
- ALCHÉ, L. E.; BARQUERO, A. A.; SANJUAN, N. A.; COTO, C. E. An antiviral principle present in a purified fraction from *Melia azedarach* L. leaf aqueous extract restrains herpes simplex vírus type1 propagation. **Phytotherapy Research**, v. 16, p. 348 – 352, 2002.
- ALLEN, L.V.; POPOVICH, N. G.; ANSEL, H. C. **Formas Farmacêuticas e Sistemas de Liberação de Fármacos**. 8. ed. Porto Alegre: Artmed, 2007, p. 776.
- ARARUNA, S. M; SILVA, A. H.; CANUTO, K. M.; SILVEIRA, E. R; LEAL, L. K. A. M. Influence of process conditions on the physicochemical characteristics of cumaru (*Amburana cearensis*) powder produced by spray drying. **Revista Brasileira de Farmacognosia** (Impresso), v. 23, p. 132-137, 2013.
- ARNHOLD, J. Properties, functions and secretion of human myeloperoxidase. **Biochemistry**, v. 69, p. 4-9, 2004.
- AULTON, M.E. **Delineamento de Formas Farmacêuticas**. 2 ed. São Paulo: Artmed, 2005, p.678.
- AYOKA, A. O.; AKOMOLAFE, R. O.; IWALEWA, E. O.; AKANMU, M. A.; UKPONMWAN, O. E. Sedative, antiepileptic and antipsychotic effects of *Spondias mombin* L. (*Anacardiaceae*) in mice and rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 103, p. 166 – 175, 2006.

AYOKA, A. O.; AKOMOLAFE, R. O.; IWALEWA, E. O.; UKPONMWAN, O. E. Studies on the anxiolytic effects of *Spondias mombin* L. (Anacardiaceae) extracts. **African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicine**, v. 2, n. 2, p. 153 – 165, 2005.

AZAMBUJA, T. W. F.; BERCINI, F.; FURLANETTO, T. W. Herpes simples: revisão da literatura. **Rev Fac Odontol**, v. 45, n.2, p. 43-46, Janeiro, 2004.

AZULAY, R. D. **Dermatologia**. 5. Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008, cap. 19.

AZWA, A.; BARTON, S. E. Aspects of herpes simplex vírus: a clinical review. **Journal of Family Planning & Reproductive health Care**, v. 35, n. 4, p. 237 – 242, 2009.

BANDEIRA, M. A. M.; VIANA, G. S. B.; GALVÃO, W. R. A; FILHO, R. B; MATOS, F. J. A. *Myracrodruon urundeuva* Fr. All. In: VIANA, G. S. B; LEAL, L. K. A. M; VASCONCELOS, S. M. M (Org). **Plantas medicinais da caatinga: atividades biológicas e potencial terapêutico**. Fortaleza: Expressão Gráfica e Editora, 2013, p.317-350.

BENTLEY, J. M.; BARANKIN B.; GUENTHER L. C. A review of common pediatric lip lesions: herpes simplex/recurrent herpes labialis, impetigo, mucocelos, and hemangiomas. **Clin Pediatr** (Phila), v. 42, n. 6, p 475-82, jul./ago. 2003.

BERTOL, G. **Desenvolvimento e validação de métodos analíticos para controle de qualidade de matérias-primas e produtos contendo *Uncaria tomentosa* (Willd.) DC. – Rubiaceae**. 2010. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2010.

BORGES, D. B.; FARIAS, M. R.; SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P. Comparação das metodologias da Farmacopeia Brasileira para determinação de água em matérias-primas vegetais, e validação da determinação de água em analisador de umidade para *Calendula officinalis* L., *Foeniculum vulgare* Miller, *Maytenus ilicifolia* Mart. ex. Reissek e *Passiflora alata* Curtis. **Rev. Bras. Farmacogn.**, v. 15, n. 3, p. 229-236, 2005.

BOX, M.; HUNTER, W. G.; HUNTER, J. S. **Statistics for experimenters**. N. York: John Wiley & Sons, 1978.

BRANDÃO, G. C.; KROON E. G.; DOS SANTOS, J. R.; STEHMANN, J. R.; LOMBARDI, J. A.; OLIVEIRA, A. B. Antiviral activity of Bignoniaceae species occurring in the State of Minas Gerais (Brazil): part 1. **Lett Appl Microbiol**, v. 51, n. 4, p. 469-476, 2010.

BRASIL. ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Consolidado de normas (COFID). Versão V – Brasília, DF, 2015.

BRASIL. ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC N° 26, de 13 de maio de 2014 - Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos e o registro e a notificação de produtos tradicionais fitoterápicos. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 2014.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução – RE n° 899 de 29 de maio de 2003. Determina a publicação do guia para validação de métodos

analíticos e bioanalíticos. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 2003.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. Práticas integrativas e complementares: plantas medicinais e fitoterapia na Atenção Básica/Ministério da Saúde, p. 97-110. Brasília: Ministério da Saúde, 2012.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Doenças infecciosas e parasitárias: guia de bolso/ Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica – 8ª ed. – Brasília: Ministério da Saúde, 2010.

BUKATSCH, F. Bemerkungen zur Doppelfärbung Astrablau-Safranin. **Mikrokosmos**, v 61, p 255, 1972.

CABRAL, B. **Caracterização dos marcadores químicos e avaliação de atividades biológicas do extrato de *Spondias mombin***. 2014. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2014.

CALDAS, L. Q. A.; OLEJ, B; SLOMP, H; TIMÓTEO, M. O.; VELARDE, L. G.; DUARTE, H; ROSATI, J. L. R.; MORENO, S. R. F.; SILVA, L. M. L.; DO DESTÊRRO, V. P.; VALLE, F. M.; SERRA, T. O. Uncaria tormentosa in the treatment of the herpes labialis: randomized double-blind Trial. **Jornal Brasileiro de Doenças Sexualmente Transmissíveis**, Rio de Janeiro, v. 22, n. 2, p. 57-59, 2010.

CARABALLO, A.; CARABALLO, B.; RODRIGUEZ-ACOSTA, A. Preliminary assessment of medicinal plants used as antimalarials in the South-Eastern Venezuelan Amazon. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 37, n. 2, p. 186 – 188, 2004.

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

CASTNER, J. L.; TIMME, S. L.; DUKE, J. A. **A Field Guide to Medicinal and Useful Plants of the Upper Amazon**. Gainsville: Feline Press, 1998.

CEARÁ. Portaria nº 275/2012. Promulga a relação estadual de plantas medicinais (REPLAME) e dá outras providências. Diário Oficial do Estado do Ceará (DOECE). Fortaleza, 29 de mar. 2012. Disponível em <<http://www.jusbrasil.com.br/diarios/35754014/doesce-caderno-2-29-03-2012-pg-75>>. Acesso em: 12 nov. 2013.

CHIRINOS, R.; ROGEZ, H.; CAMPOSA, D.; PEDRESCHI, R. e LARONDELLE, Y. Optimization of extraction conditions of antioxidant phenolic compounds from mashua (*Tropaeolum tuberosum* Ruiz & Pavón) tubers. **Separation and Purification Technology**, v.55, p. 217-225, 2007.

CHISOM, I. F.; CHUKWU N., O.; OKEKE, C. U. A comparative foliar anatomical and morphological study on *Anacardium occidentale* L. and *Spondias mombin* L. **International Journal of Herbal Medicine**, v.2, n.2, p: 150-153, 2014.

CLEMENS, S. A. C.; FARHAT, C. K. Soroprevalência de anticorpos contra vírus herpes simples 1-2 no Brasil. **Rev. Saúde Pública**, v. 44, n. 4, p. 726-734, 2010.

CLEMENTS, J. B.; TIMBURY, M. C.; GRIFFITHS, P. D. Herpesviridae. In: COLLIER, L.H.; TYMBURY, M.C. (eds.) **Topley & Wilson's Principles of Bacteriology, virology and immunity**. 8 ed. London: Edward Arnold, 1990, v.4. p. 415-429.

CONSOLARO, A; CONSOLARO M. F. M-O. Diagnóstico e tratamento do herpes simples recorrente peribucal e intrabucal na prática ortodôntica. **R Dental Press Ortodon Ortop Facial**, v. 14, n. 3, p. 16-24, 2009.

COREY, L.; SPEAR, P. G. Infections with herpes simplex viruses. **N Engl J Med**, v. 314, n. 11, p. 686-691, 1986;

CORTHOUT, F. J.; PIETERS, L. A.; CLAEYS, M.; VANDEN BERGHE, D. A.; VLIETINCK, A. J. Antiviral; Ellagitannins from *Spondias mombin*. **Phytochemistry**, v. 30, p. 1190, 1991

CORTHOUT, J.; PIETERS, L. A.; CLAEYS, M.; VANDEN BERGHE, D. A.; VLIETINCK, A. J. Antiviral Caffeoyl; Esters from *Spondias Mombin*. **Phytochemistry** v. 31, p. 79, 1992.

CORTHOUT, J.; PIETERS, L. A.; CLAEYS, M.; VANDEN-BERGHE, D. A.; VILETINCK, A. J.. Antibacterial and molluscicidal phenolic acid from *Spondias mombin*. **Planta Medica**, v. 60, p. 460-463, 1994

COSTA, A. F. **Farmacognosia**. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 1982.

CROAT, T. B. A. Case for selection for deayed fruit maturation in *Spondias* (*Anacardiaceae*). **Biotropica**, v. 6, n. 2, p. 135-137, 1974.

DA COSTA, M. F; LIBÓRIO, A. B; TELES, F; MARTINS, C. D. A. S; SOARES, P. M; MENESES, G. C; RODRIGUES, F. A; LEAL, L. K; MIRON, D; SILVA, A. H; MARTINS, A. M. Red propolis ameliorates ischemic-reperfusion acute kidney injury. **Phytomedicine**, v.15;22 n.9, p:787-95, 2015.

DA SILVA, F. A. **Avaliação tecnológica e atividade antioxidante de produtos secos por spray-drying de *Ilex paraguariensis* A. St. Hill. - Aquifoliaceae (ervamate)**. 2007. 243 f. Tese (Doutorado Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2007.

DE LOGU, A.; LOY, G.; PELLERANO, M. L.; BONSIGNORE, L.; SCHIVO, M. L. Inactivation of HSV-1 and HSV-2 and prevention of cell-to-cell virus spread by *Santolina insularis* essential oil. **Antiviral Research**, v. 48, p. 177-185, 2000.

- DE YOUNG, L.M.; KHEIFETS, J.B.; BALLARON, S.J.; YOUNG, J.M. Edema and cell infiltration in the phorbol ester-treated mouse ear are temporally separated and can be differentially modulated by pharmacologic agents. **Agents Actions**, v.26, p.335-41, 1989.
- DENNY, C.; ZACHARIAS, M. E.; KOHN, L. K.; FOGLIO, M. A. e CARVALHO, J. E. Atividade antiproliferativa dos extratos e da fração orgânica obtidos das folhas de *Virola sebifera* Aubl. (Myristicaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, p. 598, 2007.
- DI ROSA, M.; GIROUD, J. P.; WILLOUGHBY, D. A. Studies on the mediators of the acute inflammatory response induced in rats in different sites by carrageenan and turpentine. **Journal of Pathology**. v. 104, p. 15-29, 1971.
- DOWNEY, G. P. *et al.* Phorbol ester-induced actin assembly in neutrophils: role of protein kinase C. **Journal of Cell Biology**, v. 116, n. 3, p. 695-706, 1992.
- DUARTE, M. R.; TOLEDO, M. G.; OLIVEIRA, R., BERNARDES, L. Diagnose morfoanatomica de Aroeira (*Schinus terebinthifolius* Raddi, Anacardiaceae). **Visão acadêmica**, v. 7, n. 2, 2007.
- EDWARDS, S. W. The O₂- generating NADPH oxidase of phagocytes: structure and methods of detection. **Methods: A companion to methods in enzymology**, v. 9, p. 563-77, 1996.
- FARIAS, M. R. Avaliação da qualidade de matérias-primas vegetais. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. (Org.). **Farmacognosia da Planta ao Medicamento**. Porto Alegre/Florianópolis: UFRGS/UFSC, 2003, p. 263-288.
- FARMACOPÉIA BRASILEIRA. 5. ed. Brasília: ANVISA, 2010.
- FAURSCHOU, M.; BORREGAARD, N. Neutrophil granules and secretory vesicles in inflammation. **Microbes and Infections**, v. 05, p. 1317-27, 2003.
- FERNANDES, C. A. D; NAKASHIMA, T. e SERRA, G. E. Novas contribuições ao estudo da galactomanana bruta extraída de sementes de *Senna spectabilis* DC. **Acta Farmaceutica Bonaerense**, v. 23, p. 353-358, 2004.
- FICARRA, G.; BIREK, C. Oral Herpes Simplex Vírus Infection in Pregnancy: What Are the Concerns? **Journal of the Canadian Dental Association**, Toronto, v. 75, n.7, p.523-526, 2009.
- FOGLIANO, V.; VERDE, V.; RANDAZZO, G.; RITIENI, A. Method for Measuring Antioxidant Activity and Its Application to Monitoring the Antioxidant Capacity of Wines. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 47, p. 1035-1040, 1999.
- FOLLIN, P. Skin chamber technique for study of in vivo exudated human neutrophils. **J Immunol Methods**, v.232, n 1-2, p: 55-65, 1999.
- FREITAS, A. M.; ALMEIDA, M. T.; ANDRIGHETTI-FRÖHNER, C. R.; CARDOZO, F. T.; BARARDI, C. R.; FARIAS, M. R.; SIMÕES, C. M. Antiviral activity-guided

fractionation from *Araucaria angustifolia* leaves extract. **Journal of Ethnopharmacology**, Limerick, v. 126, n. 3, p. 512-517, 2009.

FUKUCHI, K.; SAKAGAMI, H.; OKUDA, T.; HATANO, T.; TANUMA, S.; KITAJIMA, K.; INOUE, Y.; INOUE, S.; ICHIKAWA, S.; NONOYAMA, M.; KONINO, K. Inhibition of herpes simplex virus infection by tanins and related compounds. **Antiviral Research**, Tokyo, v. 11, p. 285-297, 1989.

GELLER, M.; NETO M. S.; RIBEIRO, M. G.; OLIVEIRA, L; NALIATO, E. C.; ABREU, C.; SCHECHTMAN, R. C. Herpes simples: Atualização Clínica, epidemiológica e terapêutica. DST - **J bras Doenças Sex Transm**, v 24, n. 4, p 260-266, 2012.

GERLACH, D. **Botanische Mikrotechnik**. Stuttgart: Georg Thieme Verlag., 1984.

GHAZALLI, M. N. AND MOHAMMAD, A. L. Comparative Leaves Anatomical Studies of *Bouea*, *Mangifera* and *Spondias* (Anacardiaceae) in Malaysia. **Journal of Life Sciences**, v 8, n. 9, set. 2014.

GlaxoSmithKline. Gsk data on file em 2000/00317/00.

GOBBO-NETO, L; LOPES, E. N. P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Quim. Nova**, v. 30, n. 2, p: 374-381, 2007.

GOPAL, R.; GIBBS, T.; SLOMKA, M. J; WITHWORTH, J.; CARPENTER, L. M; VYSE, A *et al.* A monoclonal blocking EIA for herpes simplex virus type 2 antibody: validation for seroepidemiological studies in Africa. **J Virol Methods**, v. 87, n. 1-2, p. 71-80, 2000.

GUAY, J.; BATEMAN, K.; GORDON, R.; MANCINI, J.; RIENDEAU, D. Carrageenan induced paw edema in rat elicits a predominant prostaglandin E2 (PGE2) response in the system associated with the induction of microsomal PGE2 synthase-1. **Journal of Biological Chemistry**. v. 279, p. 24866-72, 2004.

GUPTA, R.; WARREN, T.; WALD, A. Genital Herpes. **Lancet**, v. 370, p. 2127, 2007.

HAMANO, P. S.; MERCADANTE, A. Z. Composition of carotenoids from commercial products of caja (*Spondias luteas*). **J. Food Compos. Anal.**, Orlando, v.14, p.335-343, 2001.

HAMPTON, M. B.; KETTLE, A. J.; WINTERBOURN, C.C. Inside the Neutrophil Phagosome: Oxidants, Myeloperoxidase, and Bacterial Killing. **Blood**, v. 92, p. 3007-3017, 1998.

HARDEN, E. A.; FALSHAW, R.; CARNACHAN, S. M.; KERN, E. R.; PRICHARD, M. N. Virucidal activity of polysaccharide extracts from four algal species against herpes simplex virus. **Antiviral Research**, v. 83, p. 282-289, 2009.

HU, Z.; CAI, M. e LIANG, H. Desirability function approach for the optimization of microwave-assisted extraction of saikosaponins from *Radix bupleuri*. **Separation and Purification Technology**, v. 61, p. 266-275, 2008.

IGWE, C. U.; ONYEZE, G. O. C; ONWULIRI, V. A.; OSUAGWU, C. G.; OJIAKO, A. O. Evaluation of the Chemical Compositions of the Leaf of *Spondias mombin* Linn from Nigeria. **Australian Journal of Basic and Applied Sciences**, v. 4, n. 5, p. 706-710, 2010.

JOHANSEN, D. A. **Plant microtechnique**. New York: McGraw-Hill Book Co., 1940.

JOLY, A. B. **Botânica: introdução à taxonomia vegetal**. 13. ed. São Paulo: Editora Nacional, 2002, p. 777.

KARNOVSKY, M.J. A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy. **Journal of Cell Biology**, v. 27, p 137-138, 1965.

KHAN, M. T. H.; ATHER, A.; THOMPSON, K. D.; GAMBARI, R. Extracts and molecules from medicinal plants against herpes simplex viruses. **Antiviral Research**, v. 67, p. 107-119, 2005.

KOBAYASHI, S. D.; VOYICH, J. M; DELEO, F. R. Regulation of the neutrophil-mediated inflammatory response to infection. **Microbes and Infection**. Paris, v. 5, n. 14, p. 1337-1344, 2003.

KOZIOG, M. J; MARCIA, M. J. Chemical composition, nutritional evaluation and economic prospects of *Spondias purpurea* (Anacardiaceae). **Econ. Bot.**, v. 52, n. 4, p. 373-380, 1998.

LACHMAN, L., LIEBERMAN, H.A., KANIG, J.L. **Teoria e prática na indústria farmacêutica**. Lisboa: Fundação Calouste, 2001. 1517p

LIAO, Z-G.; WANG, G-F.; LIANG, X-L.; ZHAO, G-W. e JIANG, Q-Y. Optimization of microwave-assisted extraction of active components from *Yuanhu zhitong* prescription. **Separation and Purification Technology**, v. 63, 424-433, 2008.

LIN, W; WEN, C; CHEN, Y; HSIAO, P; LIAO, J; PENG, C; YANG, N. Integrative Approach to Analyze Biodiversity and Anti-Inflammatory Bioactivity of Wedelia Medicinal Plants. **PLoS ONE**, v.10, n.6, 2015.

LIST, P. H. e SCHMIDT, P. C. **Phytopharmaceutical technology**. Londres, 1989.

LIU, A. H. *et al.* Development of the fingerprints for the quality of the roots of *Salvia miltiorrhiza* and its related preparations by HPLC-DAD and LC-MSn. **Journal of Chromatography B**, v. 846, p. 32-41, 2007.

LIU, J. B; DING, Y; ZHANG, Y; CHEN, J; CUI, B; BAI, J; LIN, M; HOU, Q; ZHANG, P; LI, S. Anti-inflammatory Hydrolyzable Tannins from *Myricaria bracteata*. **J. Nat. Prod**,v.78, p:1015 –1025, 2015.

LOPES FILHO, J. F. Avaliação da maceração dinâmica do milho após um curto período de hidratação e subsequente quebra do pericarpo do grão. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.19, p. 322, 1999

LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. **Plantas medicinais no Brasil nativas e exóticas**. Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum, 2008. 298 p.

LUCISANO, Y. M.; MANTOVANI, B. Lysosomal enzyme release from polymorphonuclear leukocytes induced by immune complexes of IgM and IgG. **The Journal of Immunology**, v. 132, p. 2015-2020, 1984.

LUPI, O.; PEREIRA, JR, A.C. Herpes simples. In: LUPI, O.; DA SILVA, A.G.; FERREIRA JR, A.C. **Herpes – clínica, diagnóstico e tratamento**. Rio de Janeiro: Medsi, 2000, p. 43-70.

MARTINHO, A. **Herpesvirus humanos**. 2003. Monografia. Évora (Portugal): Universidade de Évora; 2003.

MATOS, F. J. A. **Farmácias vivas**. 3ª ed. Fortaleza: UFC Edições, 1998.

MATOS, F. J. A. **Introdução à Fitoquímica Experimental**. 3. ed. Fortaleza: EUFC, 2009.

MATOS, J. M. D.; MATOS, M. E. **Farmacognosia**. Fortaleza: UFC, 1989.

MAYER-SCHOLL, A.; AVERHOFF, P.; ZYCHLINSKY, A. How do neutrophils and pathogens interact EDWARDS, S. W. The O₂- generating NADPH oxidase of phagocytes: structure and methods of detection. **Methods: A companion to methods in enzymology**, v. 9, p. 563-77, 1996.

MIGLIATO, K. F.; MOREIRA, R. D.; MELLO, J. C. P.; SACRAMENTO, L. V. S.; SALGADO, H. R. N. Controle da qualidade do fruto de *Syzygium cumini* (L.) Skeels. **Rev. Bras. Farmacog.**, v.17, n.1, p 94-101, 2007.

MILLIAN, M.; CEVALLOS FERRIZ, S. R. S. Arquitectura foliar de Anacardiaceae. **Rev. Mex Biodiversidad**, v. 76, p 137 – 190, 2005.

MORTON, J. F. **Fruits of Warm Climates**. Miami: FL., 1987, p. 245-248.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, p. 55-63, 1983.

MYERS, H.R. & D.C. MONTGOMERY. **Response Surface Methodology: Process and product Optimization Using Designed Experiments**. New York: John Wiley, 1995.

MYERS, W. R. Response surface methodology. **Encyclopedia of Biopharmaceutical Statistics**, v. 1, p. 858-869, 2003.

NASCIMENTO-SILVA, O.; CHINALIA, L. A.; DE PAIVA, J. G. A. Caracterização histoquímica dos folíolos de *Spondias tuberosa* Arruda (Anacardiaceae Lindl.). **Caatinga** (Mossoró, Brasil), v.21, n.3, p 62-68, julho/setembro de 2008.

NASCIMENTO-SILVA, O.; DE PAIVA, J. G. A. Estudos morfológicos e anatômicos em folhas adultas de *Spondias tuberosa* Arruda (Anacardiaceae Lindley). **Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas**, v. 6, n. 2, p 36 -43, mar. 2007.

NASCIMENTO-SILVA, O.; LEITE, D. S.; BERNARDES, L.; DE PAIVA, J. G. A. Morphology, anatomy and histochemistry of the leaves of *Myracrodruon urundeuva* Allemão (Anacardiaceae). **Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas**, v. 10, n. 1, p. 56 – 66, 2011.

NIST/SEMATECH e-Handbook of Statistical Methods. Disponível em <<http://www.itl.nist.gov/div898/handbook/>>. Acesso em: 23 ago. 2011.

NWAOGU, L. A.; ALISI, C.S.; IBEGBULEM, C.O.; IGWE, C. U. Phytochemical and antimicrobial activity of ethanolic extract of *Landolphia owariensis* leaf. **Afri J Biotech.**, v. 6, n. 7, p. 890-893, 2007.

NWORU, C. S.; AKAH, P. A.; OKOYE, F. B.; TOUKAM, D. K.; UDEH, J.; ESIMONE, C. O. The leaf extract of *Spondias mombin* L. displays an anti-inflammatory effect and suppresses inducible formation of tumor necrosis factor- α and nitric oxide (NO). **Journal of Immunotoxicology**, v. 8, p.10-16, 2011.

OKIGBO, R. N.; ANUAGASI, C. L.; AMADI, J. E.. Advances in selected medicinal and aromatic plants indigenous to Africa. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 3, n. 2, p. 86-95, fev. 2009.

OKWU, D. E; OKWU, M. E. Chemical composition of *Spondias mombin* Linn.plant parts. **J. Sustain. Agric Environ**, v. 6, n. 2, p. 140-147, 2004.

OSONUGA, I. O.; LAMIDI, A. F. Reproductive, haematologic and biochemical profiles of male rats treated with aqueous extract of *Spondias mombin* bark. **International Journal of Pharmacology**, v. 2, n. 1, p. 126 – 130, 2006

ÖZÇELİK, B; KARTAL, M; ORHAN, I. Cytotoxicity, antiviral and antimicrobial activities of alkaloids, flavonoids and phenolic acids. **Pharmaceutical Biology**, v. 49, n.4, p: 396–402, 2011

PADETEC - Parque de Desenvolvimento tecnológico. Afrânio Aragão Craveiro, Maria Iracema Lacerda Machado, Francisco José de Abreu Matos. **Fitoterápico com atividade antivirótica**. BR n. 0404307-3 A, 19 ago. 2004, 04 abr. 2006.

PASSOS, M. R. L. Nosso compromisso e sua participação, 2 [editorial]. **J Bras Doencas Sex Transm**, v. 14, n. 3, p. 3, 2002.

PEDRO, A.J.; SIQUEIRA, M.C.; SILVA, M.; SILVA, Z.; FONTES, G.; GARD-BRITO, B.; RAMALHO, F.; CARNEIRO DE MOURA, M. Mieloperoxidase como marcador de stress oxidativo na cirrose hepática. **Jornal Português de Gastreenterologia**, v. 10, p. 209-214, 2003.

PIRET, J.; BOIVIN, G. Resistance of herpes simplex viruses to nucleoside analogues: mechanisms, prevalence, and management. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 55, p. 459–472, 2011.

PIWOWARSKI, J. B; KISS, A. K. Contribution of C-glucosidic ellagitannins to *Lythrum salicaria* L. influence on pro-inflammatory functions of human neutrophils. **J Nat Med**, v.69, p:100–110, 2014.

POSADAS, I.; BUCCI, M.; ROVIEZZO, F.; ROSSI, A.; PARENTE, L.; SAUTEBIN, L.; CIRINO, G. Carrageenan-induced mouse paw edema is biphasic, age-weight dependent and displays differential nitric oxide cyclooxygenase-2 expression. **British Journal of Pharmacology**. v. 142, p. 331-38, 2004.

PRISTA, L. N.; ALVES, A. C. e MORGADO, R. **Tecnologia farmacêutica**, 4 ed, v. 2, 1995.

PRISTA, L. N.; ALVES, A. C.; MORGADO, R. **Tecnologia farmacêutica**, v. 2, 4. ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 1996.

RAJI, Y.; GBADEGESIN, M. A.; OSONUGA, O. A.; ADISA, R. A.; AKINSOMISOYE, O. S.; AWOBAJO, F. O.; KUNLE-ALABI, O. T.; ESEGBUE PETERS, P. R. C.; OSONUGA, I. O.; LAMIDI, A. F. Reproductive, Haematologic and Biochemical profiles of male rats treated with aqueous extract of *Spondias mombin* bark, **International Journal of Pharmacology**, v. 2, n. 1, p. 126 – 130, 2006

RATES, S. M. K. Plants as source of drugs. **Toxicon**, v.39, p: 603-13, 2001b.

RATES, S. M. K. Promoção do uso racional de fitoterápicos: uma abordagem no ensino da farmacognosia. **Rev. Bras. Farmacogn**, v.11, n.2, p: 57-69, 2001a

REED, L.J., & MUENCH, H. (1938). A simple method of estimating fifty percent endpoints. **Am. J. Hygiene**, 27, 493-497.

REZENDE, L. C. **Avaliação da atividade antioxidante e composição química de seis frutas tropicais consumidas na bahia**. 2010. Tese (Doutorado em Química) – Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2010.

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

RIBEIRO, J. E. L. S; HOPKINS, M. J. G.; VICENTINI, A.; SOTHES, C. A.; COSTA, M. A. S.; BRITO, J.M.; SOUZA, M. A. D.; MARTINS, L. H. P.; LOHMANN, L. G.; ASSUNÇÃO, P. A. C..L.; PEREIRA, E. C.; SILVA, C. F.; MESQUITA, M.R.; PROCÓPIO, L. C. **Flora da Reserva de Ducke: Guia de identificação das plantas vasculares de uma floresta de terra-firme na Amazônia Central**. Ed. INPA, Manaus, Brasil, 1999, p. 544-545.

RODRIGUES, K. F.; HESSE, M. Antimicrobial activities of secondary metabolites produced by endophytic fungi from *Spondias mombin*. **Journal of Basic Microbiology**, v. 40, p. 261–267, 2000.

ROTHHAUSER B.: KRAUS, G.; SCHMIDT P.C., Optimization of an effervescent tablet formulation containing spray dried , l-leucine and polyethylene glycol 6000 as lubricants using a central composite design, **Eur. J. Pharm. Biopharm.** V.46, p: 85 - 94, 1998.

SACRAMENTO, C.K. do; SOUZA, F. X. **Cajá (Spondias mombin L.)**. Jaboticabal: Funep, 2. 42 p. (Série Frutas Nativas, 4), 2000.

SANCHES, A. C. C., LOPES, G. C., TOLEDO, C. E. M., SACRAMENTO, L. V. S., SAKURAGUI, C. M., MELLO, J. C. P. Estudo Morfológico Comparativo das Cascas e Folhas de *Stryphnodendron adstringens*, *S. polyphyllum* e *S. obovatum*- Leguminosae. **Lat. Am. J. Pharm**, v. 26, n. 3, p. 362-368, 2007.

SAUERBREI, A.; WUTZLER, P. *Herpes simplex* and *varicella-zoster* virus infections during pregnancy: current concepts of prevention, diagnosis and therapy. Part 1: herpes simplex virus infections. **Med Microbiol Immunol**, v. 196, n. 2, p.:89-94, 2007.

SAWAIR, F. A. *et al.* Epidemiologic aspects of recurrent herpes labialis among Jordanian University students. **Saudi medical Journal**, Riyadh, v. 31, n. 7, p. 808-813, 2010.

SCHNEIDER, S.; REICHLING, J; STINTZING, F. C; MESSERSCHMIDT, S.; MEYER, U.; SCHNITZLER, P. Anti-herpetic properties of hydroalcoholic extracts and pressed juice from *Echinacea pallida*. **Planta medica**, v. 76, n. 3, p. 265-272, 2010.

SCHUSTER L. C.; BUSS C. Do herpes e suas implicações audiológicas: uma revisão de literatura. **Rev. CEFAC**, v. 11, n. 4, p 695-700, out./dez. 2009.

SEGAL, A. W. How neutrophils kill microbes. **Annu Rev Immunol.**, v. 23, p. 197-223, 2005.

SELVAMEDICA. Matthew E. Burrow; Peter Koepke; Ven Subbiah. **Spondias mombin I. extract and methods of extracting and using such extract**. EP n. 2182962 A1, 30 jul. 2008, 12 mai. 2010.

SHARAPIN, N. **Fundamentos de tecnologia de produtos fitoterápicos**. 12. ed. Rio de Janeiro: Merck e Co, 2000, p. 87-89.

SHENG, X; XUE, X; ZHANG, H; LIU, Z. Anti-herpes Simplex Virus effect of Chlorogenic Acid in vitro. **Chinese journal of natural medicines**, v.6, n.3, 2008.

SHULTES, R. E.; RAFFAUF, R. F. **The Healing Forest: Medicinal and Toxic Plants of the Northwest Amazonia**. Portland, Oregon: Dioscorides Press, 1990

SILVA JÚNIOR, J. O. C. **Obtenção e avaliação de forma farmacêutica semi-sólida fitoterápica contendo extrato seco por nebulização de *Simphytum officinale* L. (confrei)**. 2006. Tese (Doutorado em Fármacos e Medicamentos), Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

SILVA, A. R. A.; MORAIS, S. M.; MARQUES, M. M. M.; OLIVEIRA, D. F.; BARROS, C. C.; ALMEIDA, R. R.; VIEIRA, I. G. P.; GUEDES, M. I. F. Chemical composition, antioxidant and antibacterial activities of two *Spondias* espécies from Northeastern Brasil. **Pharmaceutical Biology**, v. 6, p. 740-746, 2012.

SILVA, T. S. J. Evaluation of the phenolic total content and physico-chemical parameters in the *Spondias mombin* extraction process. In: 4 th BRAZILIAN CONFERENCE ON NATURAL PRODUCTS AND THE XXX MEETING ON MICROMOLECULAR, EVOLUTION, SYSTEMATIC AND ECOLOGY (RESEM), 2013. Natal.

SIMÕES, C. M. O. *et al.* **Farmacognosia da planta ao medicamento**. 5. ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFRGS/Editora da UFSC, 2004.

SIMÕES, Cláudia Maria Oliveira; SCHENKEL, Eloir Paulo; GOSMANN, Grace. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 3.ed. Florianópolis: Ed.UFSC; Porto Alegre: Ed. UFRGS, 2001.833p.

SIMONI, I. C. Tratamentos antivirais. *In:* Reunião Anual do Instituto Biológico, v. 65, n. 1-2, p. 41-44, 2003.

SONAGLIO, D.; ORTEGA, G. G.; PETROVICK, P. R.; BASSANI, V. L. Desenvolvimento tecnológico e produção de fitoterápicos. *In:* **Farmacognosia da planta ao medicamento**. 5. ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora UFRGS/Editora UFSC, cap. 13, p. 289-326, 2004.

SOUZA, A. L.; CIMERMAN, S. Uncaria tomentosa (Cat's claw): uma potencial estratégia terapêutica para herpes labial. **Revista Panamericana de Infectologia**, São Paulo, v. 12, n. 2, p. 51-57, 2010.

SOUZA, F. X. de.; SOUZA, F. H. L.; FREITAS, J. B. S.; ROSETTI, A. G. Aspectos morfológicos da unidade de dispersão de cajazeira. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.35, n. 1, p. 215-220, 2000.

TACON, L. A; FREITAS, L. A. P. Box-Behnken design to study the bergenin content and antioxidant activity of *Endopleura uchi* bark extracts obtained by dynamic maceration. **Revista Brasileira de Farmacognosia Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v.23, n.1, p: 65-71, 2013.

TAGLIARI, N. A. B., KELMANN, R. G., diefenthaler, h. Aspectos terapêuticos das infecções causadas pelo vírus herpes simples tipo 1. **Perspectiva**, Erechim. v.36, n.133, p.191-201, mar. 2012.

TATKE, P. e JAISWAL, Y. An overview of microwave assisted extraction and its applications in herbal drug research. **Research Journal of Medicinal Plant**, v. 5, p. 21-31, 2011.

TATKE, P.; JAISWAL, Y.; NAIK, V.; GABHE, S; VAIDYA, A. Pharmacognostic and preliminary phytochemical investigations of *Anacardium occidentale* (LINN.) leaves. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 4, n. 3, 2012.

TEIXEIRA, C. C. C. **Desenvolvimento tecnológico de fitoterápico a partir de rizomas de *Curcuma longa* L. e avaliação das atividades antioxidante, anti-inflamatória e antitumoral**. 2009. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP, Ribeirão Preto, 2009.

TERUI, T., OZAWA, M. et al. Role of neutrophils in induction of acute inflammation in T-cell-mediated immune dermatosis, psoriasis: a neutrophil-associated inflammation-boosting loop. **Exp Dermatol**, v.9, n.1, p: 1-10, 2000

THE UNITED STATES PHARMACOPEIA (USP), United States Pharmacopoeial Convention: Rockville, 2015.

THELEN, M.; DEWALD, B.; BAGGIOLINI, M. Neutrophil signal transduction and activation of the respiratory burst. **Physiological Reviews**, v. 73, p. 797-821, 1993.

TOLEDO, A. C. O; HIRATA, L. L; BUFFON, M. C. M; MIGUEL, M. D; MIGUEL, O. G. Fitoterápicos: uma abordagem farmacotécnica. **Revista Lecta**, v.2, n.1(1/2), p. 7-13, 2003.

ÚBEDA, A.; FERRÁNDIZ, M. L.; HERENCIA, F. Activación celular: desgranulación leucocitária. In: ALCARAZ, M. J.; CALIXTO, J. B.; DELGADO, R. **Técnicas in vitro para el estudio de fármacos antiinflamatorio**. CYTED – Subprograma X Proyecto X.6. Espanha, 2002.

VANDEN BERGHE, D. A.; VLIETINICK, A. J.; VAN HOOFF, L. Plant products as potential antiviral agents. **Bulletin de l'Institut Pasteur**, v. 84, p. 101-105.1986.

VILLEGAS, L. F.; FERNANDEZ, I. D.; MALDONADO, H.; TORRES, R.; ZAVALETA, A.; VAISBERG, A. J.; HAMMOND, G. B. Evaluation of the woundhealing activity of selected traditional medicinal plants from Peru. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 55, n. 3, p. 193-200, 1997.

WEHRLÉ, P.; MAGENHEIM, P.; BENITA, S. The influence of process parameters on the PLA nanoparticle size distribution evaluated by means of factorial design. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 41, p. 19-26, 1995.

WEHRLÉ, P.; NOBELIS, P.; CUINÉ, A.; STAMM, A. Response surface methodology: an interesting statistical tool for process optimization and validation. Example of wet granulation in a highshear mixer. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 19, p. 1637-1653, 1993.

WIJESEKERA, D R., R., O., B., **The Medicinal Plant Industry**. Boston: CRC Press, 248p., 1991.

WINTER, C. A.; RISELY, E. A.; NUSS, G. W. Carragenan-induced edema in the hind paw of the rat as an assay for anti-inflammatory drugs. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**. v. 111, p. 544-47, 1962.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Herpes simplex virus type 2: programmatic and research priorities in developing countries. Report of a WHO/UNAIDS/LSHTM workshop, London, 14–16 February 2001.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Quality control methods for medicinal plant materials. Geneva: WHO, 1998. 115p (WHO Library Cataloguing in Publication Data).

XIANG, Y.; PEI, Y.; WANG, Y. Current Status of Natural Products from Plants as Anti-herpes Simplex Virus 1 Agents. **Virologica Sinica**, v. 23, n. 5, p. 305-314, 2008.

YANG, CHIEN-MIN; CHENG, HUA-YEW; LIN, TA-CHEN; CHIANG, LIEN-CHAI; LIN, CHUN-CHING. The in vitro activity of geraniin and 1,3,4,6-tetra-O-galloyl--d-glucose isolated from *Phyllanthus urinaria* against herpes simplex virus type 1 and type 2 infection. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 110, p. 555–558, 2007.

ZHANG, J. L. *et al.* Chemical fingerprint and metabolic fingerprint analysis of Danshen injection by HPLC–UV and HPLC–MS methods. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 36, p. 1029–1035, 2005.

ZHAO, L. *et al.* Fingerprint analysis of *Psoralea corylifolia* L. by HPLC and LC–MS. **J Chromatogr B**, v. 821, p. 67–74, 2005.

ZU, Y.; FU, Y.; WANG, W.; WU, N.; LIU, W.; KONG, Y.; SCHIEBEL, H.-M.; SCHWARZ, G.; SCHNITZLER, P.; REICHLING, J. Comparative study on the antiherpetic activity of aqueous and ethanolic extracts derived from *Cajanus cajan* (L.) Millsp. **Forschende Komplementärmedizin**, Basel, v. 17, n. 1, p. 15-20, 2010.