

**CAMILO AMARO DE CARVALHO**

**CARACTERIZAÇÃO BOTÂNICA, FITOQUÍMICA E AVALIAÇÃO DA  
ATIVIDADE BIOLÓGICA DE EXTRATOS DE *Piptadenia gonoacantha*  
(Mart.) J.F. Macbr (FABACEAE)**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

VIÇOSA  
MINAS GERAIS – BRASIL  
2012

**Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e  
Classificação da Biblioteca Central da UFV**

T

C331c  
2012

Carvalho, Camilo Amaro de, 1981-  
Caracterização botânica, fitoquímica e avaliação da atividade biológica de extratos de *Piptadenia gonoacantha* (Mart.) J. F. Macbr (FABACEAE) / Camilo Amaro de Carvalho. – Viçosa, MG, 2012.  
x, 59f. : il. (algumas color.) ; 29cm.

Texto em inglês e português  
Orientador: Leandro Licursi de Oliveira  
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.  
Inclui bibliografia.

1. Agentes anti-inflamatórios. 2. *Piptadenia gonoacantha*.  
3. Agentes antiinfeciosos. 4. Botânica - Morfologia.  
5. Fitoquímicos. I. Universidade Federal de Viçosa.  
Departamento de Biologia Geral. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural. II. Título.

CDD 22. ed. 572.592

**CAMILO AMARO DE CARVALHO**

**CARACTERIZAÇÃO BOTÂNICA, FITOQUÍMICA E AVALIAÇÃO DA  
ATIVIDADE BIOLÓGICA DE EXTRATOS DE *Piptadenia gonoacantha*  
(Mart.) J.F. Macbr (FABACEAE)**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

APROVADA: 22 de novembro 2012.

---

Marcelo Barreto da Silva

---

Claudio Cesar Fonseca

---

Rodrigo Siqueira Batista

---

Luciana Moreira Lima

---

Leandro Licursi de Oliveira  
(Orientador)

*“Nem olhos viram, nem ouvidos ouviram,  
nem jamais penetrou em coração  
humano o que Deus tem preparado para  
aqueles que o amam.”  
1 Coríntios 2.9*

*Dedico este trabalho aos meus pais e irmãos*

*A minha sempre companheira, amiga e esposa Marilane*

*Aos meus amigos, sogro e sogra, Vera Lúcia e Antônio Fani*

*Aos meus tesouros preciosos Caroline, Carine, Samuel e Davi*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por ter me dado força, sabedoria e a oportunidade de concluir este sonho. Obrigado Senhor! Toda honra e toda glória sejam dadas a Ti.

Aos meus pais e irmãos, que sempre acreditaram em mim e me apoiaram. Obrigado por todos os ensinamentos!

A minha esposa Marilane, pelo constante apoio, amizade e amor dedicado durante todos estes tempos. Não conseguiria mais esta vitória sem a sua ajuda e compreensão. Vencemos mais uma batalha, te amo!

À Universidade Federal de Viçosa pelo apoio e à brilhante contribuição na capacitação de novos profissionais.

Ao meu orientador e amigo Prof. Dr. Leandro de O. Licursi, por sempre acreditar em mim e fazer de mim uma pessoa e profissional mais capacitada e crítica.

Aos professores da banca Prof. Dr. Claudio Cesar Fonseca, Prof. Dr. Marcelo Barreto, Prof. Dr. Rodrigo Siqueira, Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Luciana Moreira, por todas as considerações que certamente contribuirão para a melhoria deste trabalho.

À UNIVIÇOSA pelos ensinamentos profissionais e pessoais, que muito contribuíram para a execução deste trabalho.

Aos meus alunos da Univiçosa em especial aos alunos e ex-alunos do grupo de pesquisa FITOFÁRMACOS, Ana Helena, Beatriz Vieira, Cristina Campos, Gabriela Santana, Gelson G., Gilson Miranda, Kelly, Mariana Aguiar, Mariana Saraiva, Patrícia Saraiva, Sara Mendes, Thais Viana e Umbeila. Obrigado por toda a experiência vivida e por toda torcida para a conquista desta etapa. Vocês são responsáveis por essa busca em aprimorar a cada dia meus conhecimentos.

Aos meus colaboradores do grupo de pesquisa FITOFÁRMACOS, Prof. Rogério Pinto, Ricardo Zatti, Érica N., Adriane Franco e Délia Chaves. Valeu pessoal!

Ao prof. Dr. Marcelo Barcellos da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), amigo e colaborador do grupo de pesquisa FITOFÁRMACOS. Obrigado por todos os insumos doados, colaborações e instruções. Valeu

professor! Isto é só uma demonstração das parcerias de trabalho e da verdadeira amizade que construímos.

*Meu muito obrigado!*

*Camilo Amaro*

## SUMÁRIO

<b>RESUMO</b> .....	vii
<b>ABSTRACT</b> .....	ix
<b>INTRODUÇÃO GERAL</b> .....	1
<b>CAPÍTULO 1 - Artigo</b>	
<b>Morfoanatomia foliar e caulinar de <i>Piptadenia gonoacantha</i> (Mart.) J.F. Macbr (PAU JACARÉ)</b> .....	4
Resumo .....	5
Abstract .....	6
Introdução .....	6
Material e Métodos .....	9
Resultados e Discussão .....	9
Conclusões .....	13
Referências Bibliográficas .....	13
<b>CAPÍTULO 2</b>	
<b>Aspectos químicos e atividade antibacteriana de <i>Piptadenia gonoacantha</i> (Fabaceae)</b> .....	16
Introdução .....	17
Material e Métodos .....	18
Resultados e Discussão .....	23
Considerações finais.....	33
Referências Bibliográficas .....	33
<b>CAPÍTULO 3 - Artigo</b>	
<b>Antinociceptive and Anti-inflammatory Effects of Hydroalcoholic Extract of Leaves of <i>Piptadenia gonoacantha</i> (Mart.) Macbr. in Experimental Animal Models</b> .....	40
Resumo .....	41
Introdução .....	41
Material e Métodos .....	42
Resultados e Discussão .....	46
Conclusões .....	49
Referências Bibliográficas .....	50
<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	58

## RESUMO

CARVALHO, Camilo Amaro de, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, novembro de 2012. **Caracterização botânica, fitoquímica e avaliação da atividade biológica de extratos de *Piptadenia gonoacantha* (Mart.) J.F. Macbr (FABACEAE)**. Orientador: Leandro Licursi de Oliveira. Coorientador: Sérgio Oliveira de Paula.

Este trabalho teve o objetivo avaliar os aspectos farmacobotânicos, fitoquímicos, antibacteriano e anti-inflamatório de *Piptadenia gonoacantha*. Primeiramente, realizou-se uma descrição farmacobotânica, observando-se as características macroscópicas e algumas características microscópicas do caule e das folhas. Posteriormente, uma padronização dos extratos das folhas de *P. gonoacantha* e sua caracterização fitoquímica foram realizadas, onde as principais variáveis avaliadas foram: método de extração (maceração e banho de ultrassom), solvente (água, álcool e misturas hidroalcoólicas), temperatura de extração (30, 40 e 50°C) e influência do pH (2 a 12) sobre o coeficiente de extinção (absorbância) das mesmas. Além disto, foi realizada uma prospecção fitoquímica e a quantificação de polifenóis totais na amostra. Dentre os testes biológicos, foi realizada a avaliação da atividade antibacteriana *in vitro* e anti-inflamatória *in vivo*. A primeira análise da atividade biológica foi realizada através da adaptação do método de difusão em meio sólido com perfuração do ágar frente a *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*. Já a avaliação *in vivo* da atividade anti-inflamatória foi realizada em ratos Wistar por meio dos testes de edema de pata, contorção abdominal e teste da placa quente. Os extratos foram preparados nas doses de 50, 100 e 150 mg.kg<sup>-1</sup>. A caracterização farmacobotânica forneceu material para sua correta identificação, auxiliando futuros trabalhos. A avaliação química identificou a maneira mais eficiente de promover a extração dos seus constituintes devendo esta ser realizada por ultrassom, a 40°C, utilizando etanol 80% (v/v). O pH, promoveu modificações estruturais (deprotonação/protonação) dos constituintes químicos em extratos com valores de pH acima de 8. Além disso, a quantificação de fenóis totais indicou que grande proporção dos extratos é

constituída por compostos incluídos nesta classe, sendo confirmada pela prospecção fitoquímica onde pôde ser evidenciada a presença de flavonóides, taninos, cumarinas e antraquinonas. O extrato desta espécie apresentou atividade antibacteriana, especialmente com etanol 80% (v/v), tendo eficiente capacidade de inibir o crescimento da bactéria *S. aureus*. O mesmo extrato possui também atividade anti-inflamatória, principalmente na dose de 100 mg.kg<sup>-1</sup>, sendo algumas vezes, superior ao anti-inflamatório indometacina. Os dados obtidos sugerem que a espécie *P. gonoacantha* possui compostos promissores como fonte para obtenção de novos medicamentos no combate a microrganismos resistentes, ou capazes de reduzir a resposta inflamatória.

## ABSTRACT

CARVALHO, Camilo Amaro de, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, November, 2012. **Characterization botany, phytochemistry and evaluation of biological activity of extracts *Piptadenia gonoacantha* (Mart.) J.F. Macbr (FABACEAE)**. Adviser: Leandro Licursi de Oliveira. Co-adviser: Sérgio Oliveira de Paula.

This study aimed to evaluate the aspects pharmacobotanical phytochemicals, antibacterial and anti-inflammatory *Piptadenia gonoacantha*. First, there was a description pharmacobotany, observing some macroscopic features and microscopic characteristics of the stem and leaves. Subsequently, a standardized extract of the leaves of *P. gonoacantha* and its phytochemical characterization were performed, where the main variables were: extraction method (maceration and ultrasonic bath), solvent (water, alcohol and water mixtures), extraction temperature (30, 40 and 50°C) and influence pH (2 to 12) on the extinction coefficient (absorbance) thereof. In addition, we performed a phytochemical screening and quantification of total polyphenols in the sample. Among the biological testing was performed to evaluate the antibacterial activity *in vitro* and *in vivo* anti-inflammatory. The first analysis of the biological activity was performed by adapting the diffusion method on solid media with perforation of agar against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. The evaluation of the *in vivo* anti-inflammatory activity was performed in Wistar rats by means of tests of paw edema, writhing and hot plate test. The extracts were prepared in doses of 50, 100 and 150 mg.kg<sup>-1</sup>. The characterization pharmacobotany supplied materials for their correct identification, aiding future work. The chemical evaluation identified the most effective way to promote the extraction of its constituents should be performed with ultrasound at 40°C using ethanol 80% (v/v). The pH, promoted structural modification (deprotonation/ protonation) of chemical constituents in extracts with pH values above 8. Furthermore, quantification of total phenols indicated that a large proportion of extracts comprises compounds included in this class, confirmed by phytochemical which could be evidenced the presence of flavonoids, tannins, coumarins and anthraquinones. The extract of this species showed antibacterial activity, especially with ethanol 80% (v/v) and efficient capacity to inhibit the growth of

bacteria *S. aureus*. The crude extract also possesses anti-inflammatory activity, especially at a dose of 100 mg.kg<sup>-1</sup>, and sometimes superior to anti-inflammatory drug indomethacin. The data suggest that the species *P. gonoacantha* has promising compounds as a source for obtaining new drugs to combat resistant organisms, or can reduce the inflammatory response.

## INTRODUÇÃO GERAL

Um intenso interesse de pesquisadores em conhecer os verdadeiros potenciais químicos e biológicos responsáveis pelas ações das plantas medicinais tem sido verificado. Este fato tem ocorrido devido ao aumento na demanda de sua utilização e pelo fato de seu uso tradicional não serem suficientes para validá-las cientificamente como recurso terapêutico seguro e eficaz. Junto com este interesse, cresceu também a necessidade do desenvolvimento de métodos que facilitem a enorme tarefa de avaliar cientificamente o valor terapêutico destas espécies vegetais (Castardo et al. 2008).

O Brasil é o país com a maior diversidade genética vegetal do mundo, contando com mais de 55.000 espécies catalogadas de um total estimado entre 350.000 e 550.000 espécies. Várias destas espécies são endêmicas de uma região e ainda não foram avaliadas sobre o ponto de vista fitoquímico e farmacológico (Simões et al. 2004). Nesse contexto as plantas podem ser uma boa fonte para direcionar a busca por compostos promissores com esta atividade.

Neste contexto, o estudo de produtos naturais de origem vegetal com atividade antimicrobiana e anti-inflamatória tem apresentado amplas perspectivas (Santos et al. 2012). Outro ponto a ser ressaltado é a utilização desse estudo como primeiro screening na descoberta da atividade farmacológica de novos agentes, sendo de extrema importância, principalmente em um país como o Brasil que oferece uma imensa biodiversidade. Desta forma, tais pesquisas podem contribuir significativamente no desenvolvimento do campo da saúde em nível nacional e mundial, encontrando substâncias mais eficazes e menos tóxicas na “corrida” contra a resistência microbiana e no tratamento da dor (Barbosa-Filho et al. 2006).

*Piptadenia gonoacantha* (Fabaceae) é uma espécie arbórea frequente na Mata atlântica no sul e sudeste do Brasil. Esta espécie é facilmente identificada por suas asas lenhosas longitudinais repletas de acúleos

presente no tronco quando novo e nos galhos. Isto lhe confere os nomes vulgares como pau jacaré, jacaré, casco de jacaré, dentre outros (Carvalho et al. 2010).

Considerando-se que não há estudos sobre o potencial biológico da espécie *Piptadenia gonoacantha*, este trabalho tem por objetivo avaliar aspectos farmacobotânicos, químicos e biológicos do extrato hidroalcoólico das folhas desta espécie, representando uma promissora e inovadora descoberta científica.

### **Objetivos:**

➤ Determinar os parâmetros morfoanatômicos, por análise macro e microscópicas das folhas e caule desta espécie, auxiliando na sua identificação.

➤ Avaliar os aspectos químicos da espécie *P. gonoacantha* com relação às variações do perfil espectral e influência do pH nos extratos de suas folhas, decorrentes das diferentes condições a que foram submetidos durante o processo de extração. Avaliou-se também a nestes espectros e determinou-se o teor de compostos fenólicos totais.

➤ Avaliar a atividade antibacteriana *in vitro*, frente à *S. aureus* e *E. coli*.

➤ Investigar atividade analgésica e anti-inflamatória do extrato hidroalcoólico de *P. gonoacantha* (EPG), após administração oral em modelos animais experimentais. Sendo a atividade analgésica avaliada através da resposta de contorção induzida por ácido acético e teste da placa quente, e a atividade anti-inflamatória determinada pelo uso do modelo induzido por carragenina em modelo de edema da pata.

### **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

Barbosa-Filho JM, Piuvezam MR, Moura MD, Silva MSS, Lima KVB, Cunha EVL, Fachine IM, Takemura OS. Anti-inflammatory activity of alkaloids: A twenty-century review. *Brazilian Journal of Pharmacognosy* 2006; 16 (1):109-34.

Carvalho MG, Cardozo MA, Catunda Junior FE, Catunda Junior FEA, Carvalho AG. Chemical constituents of *Piptadenia gonoacantha* J.F. Macbr. *Anais da Academia Brasileira de Ciências* 2010; 82 (3):561-7.

Castardo JC, Prudente AS, Ferreira J, Guimarães CL, Monache FD, Filho VC, Otuki MF, Cabrini DA. Anti-inflammatory effects of hydroalcoholic extract and two biflavonoids from *Garcinia gardneriana* leaves in mouse paw oedema. *Journal of Ethnopharmacology* 2008; 118 (3):405-11.

Santos IJM, Matias EFF, Santos KKA, Braga MFBM, Andrade JC, Souza TM, Santos FAV, Sousa ACA, Costa JGM, Menezes IRA, Alves RRN, Almeida WO, Coutinho HDM. Evaluation of the Antimicrobial Activity of the Decoction of *Tropidurus hispidus* (Spix, 1825) and *Tropidurus semitaeniatus* (Spix, 1825) Used by the Traditional Medicine. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* 2012; 1:6.

Simões CMO, Schnkel EP, Gosmann G, Mello JCP de, Mentz LA, Petrovick PR. *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. Florianópolis: Editora da UFRGS 2004.

## **CAPÍTULO 1**

### **MORFOANATOMIA FOLIAR E CAULINAR DE *Piptadenia gonoacantha* (Mart.) J.F. Macbr (PAU JACARÉ)**

**MORFOANATOMIA FOLIAR E CAULINAR DE**  
***Piptadenia gonoacantha* (Mart.) J.F. Macbr (PAU DE JACARÉ)**

---

Camilo Amaro de Carvalho<sup>1,2\*</sup>, Gabriela Silva Santana<sup>1</sup>, Adriane Jane Franco<sup>1</sup>, Ricardo Antônio Zatti<sup>1</sup>, Leandro Licursi De Oliveira<sup>2</sup>; Marcelo Barcellos da Rosa<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Farmácia - FITOFÁRMACOS, União de Ensino Superior de Viçosa-UNIVIÇOSA, Av. Maria de Paula Santana 3815, Bairro Silvestre, 36570-000, Viçosa-MG, Brasil;

<sup>2</sup> Departamento de Biologia Geral, Universidade Federal de Viçosa-UFV, Av.P.H. Rolfs, s/n, Campus Universitário, 36570-000, Viçosa-MG, Brasil;

<sup>3</sup> Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas (PPGCF/UFSM), Av. Roraima 1000, Camobi, 97105-900, Santa Maria-RS, Brasil.

\*Autor para correspondência: [camiloamaro@yahoo.com.br](mailto:camiloamaro@yahoo.com.br)

**Resumo:**

A espécie *Piptadenia gonoacantha* é uma árvore encontrada na região da Mata-Atlântica. Neste trabalho determinaram-se parâmetros morfo-anatômicos, por análise macro e microscópicas das folhas e caule desta espécie, com o objetivo de auxiliar na sua identificação. Macroscopicamente, seu tronco apresenta cristas aculeadas, copa irregular, com acúleos nos ramos finos. As folhas são recompostas, com pecíolo canaliculado. Microscopicamente destaca-se a presença de tricomas por toda a extensão do caule e folhas. Estas características morfo-anatômicas, quando analisadas em conjunto, contribuem no controle de qualidade botânica desta espécie, que possui potencial de uso como insumo farmacêutico.

**Palavras Chave:** *Piptadenia gonoacantha*, Morfo-anatomia, Farmacobotânica

**Abstract:**

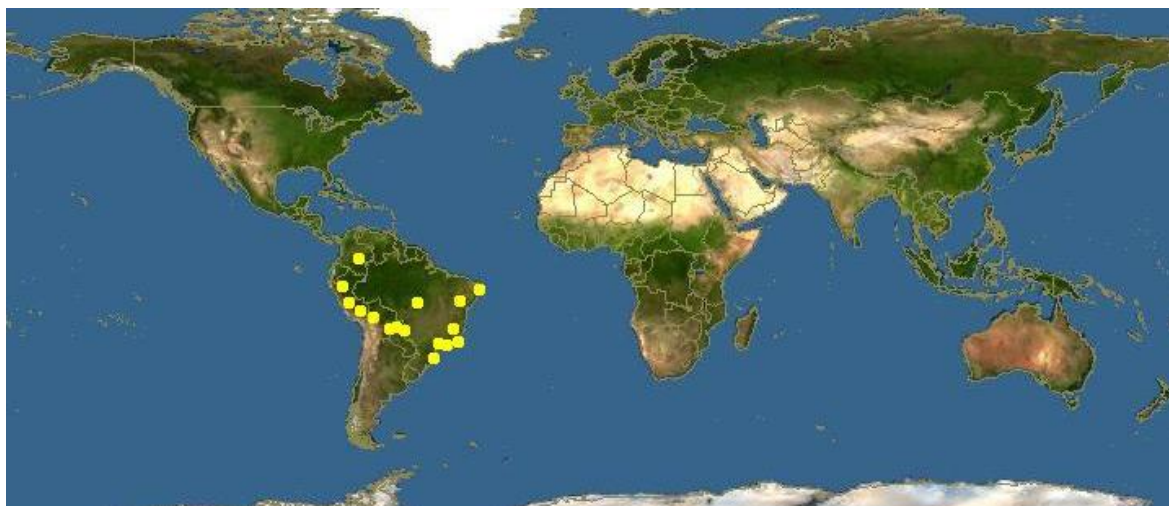
The species *Piptadenia gonoacantha* is a tree found in Mata-Atlantic region. In this study it was determined morpho-anatomical parameters for macro and microscopic analysis of the leaves and stems of this species, in order to assist in their identification. Macroscopically, its trunk has aculeadas ridges, irregular crown with thorns on twigs. The leaves are blended with petiole caniculado. Microscopically there is the presence of trichomes throughout the length of the stem and leaves. These morphological and anatomical, when taken together, contribute to the quality control of this botanical species, which have potential use as pharmaceutical ingredient.

**Keywords:** *Piptadenia gonoacantha*, Morpho-anatomy, pharmacobotany

**INTRODUÇÃO**

Denominam-se espécies os grupos de populações que possuem semelhanças relativamente grandes entre si, diferindo de outros grupos de populações menos semelhantes. No entanto, quando em uma espécie, existirem dois ou mais grupos de plantas com uma ou mais características constantes em cada grupo, a mesma pode ser dividida em subespécies (Simões et al. 2004).

O gênero *Piptadenia* (*Fabaceae*) contém cerca de 80 espécies tropicais frequentes no território brasileiro e na América do Sul (Figura 1) (Carvalho, 2009). A diversidade morfológica e taxonômica desta família está expressa em seu elevado número de táxons que se distribuem em quase todas as regiões do mundo. Lewis e colaboradores (2005) registraram 727 gêneros e 19.325 espécies subordinados a família Fabaceae (Morin e Barbosa, 2006).



**Figura 1.** Distribuição da espécie *Piptadenia gonoacantha*. (<http://www.discoverlife.org/mp/20m?kind=Piptadenia+gonoacantha>)

Os constituintes químicos desta família são compostos por várias classes de substâncias, destacando-se as classes dos flavonoides e alcaloides, que são considerados marcadores taxonômicos (Cardozo, 2006).

Especialmente por suas diferenças florais, os taxonomistas dividem suas espécies em três subfamílias visivelmente distintas: *Mimosoideae*, *Caesalpinoideae* e *Papilionoideae*. Um grande número de espécies de *Mimosoideae* e *Caesalpinoideae* possui amplo valor por sua madeira, pigmentos, taninos e propriedades medicinais (Morim e Barbosa, 2006). A subfamília *Mimosoideae* é encontrada, sobretudo nas regiões tropicais e subtropicais, com maior concentração no hemisfério sul (Cardozo, 2006).

De acordo com a etimologia, *Piptadenia* vem do grego *piptein* (cair) e *aden* (abundantemente); referência à caducidade das folhas; o termo *gonoacantha* também vem do grego *gonia* (ângulo) e *acanha* (acúleo), em referência aos acúleos sobre as arestas da casca (Burkart, 1979 ; Carvalho, 2004).

A espécie *Piptadenia gonoacantha* é uma árvore semicaducifólia de rápido crescimento. É identificada facilmente por suas asas lenhosas longitudinais características, repletas de acúleos presente nos galhos e no tronco quando novo (Carvalho, 2010).

É conhecida com angico, no Distrito Federal; angico-branco, camboeteiro, camoeteiro e serreiro, no Estado de São Paulo; caniveteiro e

monjolo, em Minas Gerais; casco-de-jacaré, em Santa Catarina; icarapé, na Bahia; jacaré, em Minas Gerais, no Paraná, nos Estados do Rio de Janeiro, Santa Catarina e São Paulo, jacarezeiro, no Paraná; e monjoleiro (Carvalho, 2004).

Esta espécie é classificada de acordo com o estágio sucessional como pioneira ou secundária inicial. Possui ampla ocorrência geográfica, sendo encontrada nos estados do Rio de Janeiro, Minas Gerais, Brasília, Goiás e na região do Mato Grosso do Sul até Santa Catarina, principalmente na floresta pluvial da encosta atlântica (Longui, 2009).

É uma espécie importante para uso em reflorestamentos destinados a recuperação de áreas degradadas e recomposição de áreas de preservação. É também muito utilizada como lenha e para produção de carvão. Já suas flores são de grande valor melífero (CARVALHO, 1994; Lorenzi, 2002).

Estudos realizados por Carvalho et al. (2010) permitiram a identificação em galhos de *Piptadenia gonoacantha* (Mart.) J.F. Macbr dos seguintes compostos: sitosterol, estigmasterol, o éster N-benzoilfenilalaninato de 2-N-benzoil-3-fenilpropila, conhecido como asperfenamato, 3-O- $\beta$ -D-glicopiranosil-sitosterol, além de três flavonóides, apigenina (5,7,40-triidroxiflavona), apigenina-5-O-metil éter e 7,40-dihidroxi-30, 5-dimetoxiflavona.

Os mesmos autores isolaram das folhas: galato de metila e dois flavonoides, conhecidos como vitexina e isovitexina. Das cascas, isolaram uma mistura de sitosterol, campesterol e estigmasterol; mistura de cicloartenona, cicloartan-25,26-en-3-ona e 24-metileno-cicloartanona, além dos triterpenos, 24-metilenocicloartenol, fridelina, lupeol e lupenona, sendo que, o éster conhecido como asperfenamato, os flavonóides e os cicloartanos foram registrados pela primeira vez no gênero *Piptadenia*.

Neste trabalho determinaram-se parâmetros morfo-anatômicos, por análise macro e microscópicas das folhas e caule desta espécie, com o objetivo de auxiliar na sua identificação.

## **METODOLOGIA**

Foram coletados folhas e caules da espécie *Piptadenia gonoacantha*, conhecida popularmente como Pau de Jacaré no município de Viçosa, MG, Brasil. Para a obtenção dos dados sobre a espécie *P. gonoacantha*, tomou-se como base a observação de diferentes indivíduos desta espécie. Foram utilizadas ainda, em paralelo à pesquisa de campo, referências bibliográficas como apoio.

A caracterização farmacobotânica foi realizada observando-se as características macroscópicas como a morfologia externa e algumas características microscópicas do caule e das folhas.

A análise macroscópica a morfologia externa foi comparada, sendo o material identificado e depositado no Horto Botânico da Universidade Federal de Viçosa (UFV), exsicata nº 35.530. Para a análise microscópica o estudo anatômico foi executado empregando-se lâminas histológicas obtidas pela microtécnica vegetal que consiste de cortes à mão livre do material vegetal fresco com auxílio de lâminas de aço inox, sendo os cortes observados em microscópio óptico.

As fotografias que ilustram este trabalho foram obtidas com máquina fotográfica digital (Nikon® - Modelo D90) acoplada a um microscópio estereoscópico (análise macroscópica) e a um microscópio óptico (análise microscópica).

## **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

Para sua identificação, a espécie estudada teve suas características analisadas e comparadas com a literatura existente. Taxonomicamente, a espécie examinada classifica-se de acordo com a Tabela 1.

Identificação e classificação são conceitos distintos, importantes para o estudo de uma espécie. Sempre que se deseja conhecer o nome de uma espécie a ser coletada, realiza-se sua identificação, que consiste na comparação com uma espécie já descrita. Já a classificação, agrupa um determinado ser em uma categoria específica dentro de uma hierarquia previamente estabelecida (Simões et al., 2004).

Tabela 1. Classificação taxonômica da espécie *P. gonoacantha* (Carvalho, 2004)

<b>Classificação taxonômica</b>	
<b>Divisão:</b>	Magnoliophyta (Angiospermae)
<b>Classe:</b>	Magnoliopsida (Dicotyledonae)
<b>Ordem:</b>	Fabales
<b>Família:</b>	Fabaceae (Leguminosae)
<b>Sub-família:</b>	<i>Mimosoidea</i>
<b>Gênero:</b>	<i>Piptadenia</i>
<b>Espécie:</b>	<i>Piptadenia gonoacantha</i> (Mart.) Macbr
<b>Variedade</b>	<i>gonoacantha</i>

#### **Descrição macroscópica**

*Piptadenia gonoacantha* (Figura 2A) é uma árvore semicaducifólia que atinge de 15–25 metros de altura e 20 a 50 cm de DAP (diâmetro à altura do peito, 1,30 m do solo), podendo atingir até 30 m de altura e 90 cm de DAP, na idade adulta. Possui copa irregular (Figura 2B), estreita, umbeliforme, com acúleos nos ramos finos (Figura 6). Segundo Carvalho (2004) a espécie *Piptadenia gonoacantha* pode ser dividida em duas variedades: *Piptadenia gonoacantha* (Martius) Macbride var. *gonoacantha* e *Piptadenia gonoacantha* (Martius) Macbride var. *inermis* Burkart. A variedade *inermis* difere da variedade típica (*gonoacantha*), pela ausência dos acúleos. Ainda segundo o autor, *P. gonoacantha* é uma espécie próxima de *Parapiptadenia rígida*, da qual se separa por apresentar ramos alados e râmulos estriados, com acúleos.



Figura 2 – Caracterização macroscópica de *Piptadenia gonoacantha*. A - Árvore conhecida com pau de jacaré; B - Copa irregular; C - Tronco com “cristas”; D - Acúleos nos ramos finos; E – Folhas; F - Glândula verruciforme e deprimida no centro; G - Flores.

A folha completa (Figura 2E) é constituída de peça laminar denominada limbo onde se observam duas faces, adaxial e abaxial, esta última percorrida por nervuras salientes, do tipo peninérvea, onde possui uma nervura central que se ramifica em nervuras secundárias. Seu contorno foliar é do tipo linear, caracterizando-se pelo contorno estreito e comprido, com bordas paralelas, exceto na base e no ápice. Sua margem foliar é do tipo inteira, apresentando bordas lisas. Possui tricomas em toda sua extensão, uma característica microscópica marcante também encontrada em várias espécies, como por exemplo, na espécie *D. viscosa* (Manfron et al., 2010). Este aspecto é grande importância, já que sua presença ou ausência pode ser útil no controle de qualidade de drogas vegetais.

### Descrição microscópica

O caule, em corte transversal, apresenta caracteristicamente a estrutura apresentada na Figura 3A e B. Possui em toda área externa tricomas, que são formações epidérmicas encontrados com frequência nas angiospermas, assumindo funções variadas. Estes dados são semelhante aos resultados identificados por Zago et al., (2009) para a espécie *Cuphea glutinosa* Cham. & Schldl. Os tricomas (Figura 2C) estão fixados na epiderme, constituída de diversas camadas celulares, diferentemente do estudo realizado por Manfron et al., (2010) para a família *Sapindaceae*, onde a epiderme é constituída por uma única camada celular. Abaixo da epiderme observa-se a presença do esclerênquima, um tecido permanente simples adaptado à função mecânica de sustentação. Abaixo do esclerênquima há presença de um parênquima clorofiliano, responsável pela realização de fotossíntese, o floema com função de transporte da seiva elaborada e o xilema, responsável pelo transporte da seiva bruta, exercendo ainda a função mecânica de sustentação. Finalmente, no centro da estrutura, há presença de um parênquima do sistema de condução, constituído de células que integram o xilema e o floema. A projeção do caule, característica desta espécie, possui mesma organização celular do caule (Figura 3A e B).

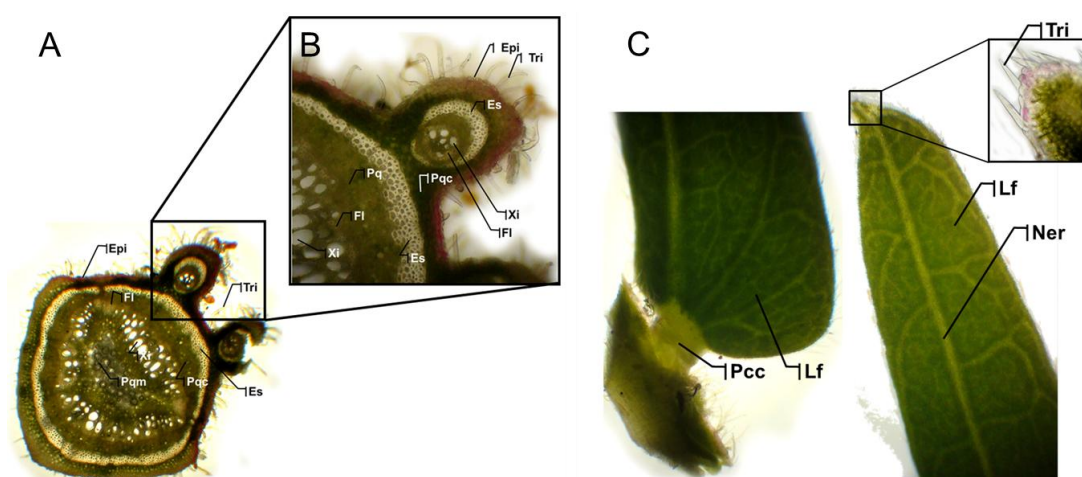


Figura 3 - Caracterização microscópica de *Piptadenia gonoacantha*. A - Corte transversal do caule (objetiva 4x); B - Detalhe da projeção do caule

(objetiva 40x); C - Folha (objetiva 10x). Pqm – Parenquima medular; Pqc – Parênquima clorofiliano; Xi – Xilema; Fl – Floema; Tri – Tricoma; Epi – Epiderme; Es – Esclerênquima; Pcc – Pecíolo cuniculado; Lf – Limbo foliar (Adaxial); Ner – Nervura central.

Incontestavelmente, uma das principais causas de falha na identificação de espécies vegetais corresponde ao uso indevido do nome vulgar das plantas. Segundo Toigo et al., (2004) com frequência uma mesma espécie vegetal possui diversos nomes vulgares comuns. Por outro lado, um único nome vulgar pode corresponder a inúmeras espécies vegetais.

A descrição de estruturas presentes em uma espécie vegetal permite a identificação correta da espécie, evitando sua identificação errônea e auxiliando na comparação entre espécies com características semelhantes. Além disso, serve como base para o estabelecimento de padrões de controle farmacobotânico da matéria-prima, através de técnicas simples e de baixo custo, garantindo a qualidade do produto final que utilize esta matéria prima.

## **CONCLUSÃO**

A descrição de estruturas presentes em uma espécie vegetal permite a identificação correta da espécie, evitando sua identificação errônea e auxiliando na comparação de espécies. Além disso, serve de base para o estabelecimento de padrões de controle farmacobotânico da matéria-prima, através de técnicas simples e de baixo custo, garantindo a qualidade do produto final que utilize esta matéria prima.

## **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

BURKART, A. *Leguminosas mimosoideas*. 1º ed. Itajaí: Herbário Barbosa Rodrigues, 1979. 299p.

CARDOZO, A. M. R. *Metabolitos Especiais Isolados de Galhos e Folhas de Piptadenia gonoacantha (Mart.) J.F. Macbr. (Leguminosae) e de Flores de*

*Laseguea erecta* Müll. Arg. (Apocynaceae). (2006). 112p. Dissertação (mestrado) apresentada ao Dpto de Química-ICE, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.

CARVALHO, M. G.; CARDOZOI, M. A.R.; CATUNDA JUNIOR, F. E. A.; CARVALHO, A. G.. Chemical constituents of *Piptadenia gonoacantha* (Mart.) J.F. Macbr (pau jacaré). *Anais da Academia Brasileira de Ciências*. Rio de Janeiro. v.82, n.3, pp. 561-567, 2010.

CARVALHO, P. E. R. Pau-Jacaré - *Piptadenia gonoacantha*. Embrapa. Circular Técnico. 2004.

CARVALHO, P. H. P.; MOURA, B. S.; CTUNDA JÚNIOR, A. F. E.; MENDES, M. F. Avaliação do Rendimento de Extração do Óleo Essencial das Folhas de *Piptadenia Gonoacantha* e *Piptadenia Rígida* utilizando extração com CO<sub>2</sub> supercrítico. In: *VIII Congresso Brasileiro de Engenharia Química em Iniciação Científica*. Uberlândia, Minas Gerais. 2009.

LEWIS, G.; SCHRIRE, B.; MACKINDER, B.; LOCK, M. *Legumes of the world*. Royal Botanic Gardens: Kew Scientist, n.28, p.577, 2005.

LONGUI, E. L., Anatomia comparada do lenho de *Piptadenia gonoacantha* (Mart.) J.F.Macbr. em dois tipos de vegetação. *Hoehnea*. São Paulo, v. 36, n.4, 2009.

LORENZI, H. e MATOS, F.J.A.. *Plantas Medicinais no Brasil: nativas e exóticas*. Nova Odessa, São Paulo: Instituto Plantarum, 2002. 512p.

MANFRON, M. P.; BAJERSKI, L.; MALESUIK, M. D.; ZANETTI, G. D. Morfoanatomia das Folhas de *Dodonaea viscosa* Jacq., Sapindaceae. *Rev. bras. farmacogn.* v. 20, n.4, 536-541, 2010.

MORIN, M. P.; BARROSO, G. M. Leguminosae arbustivas e arbóreas da Floresta Atlântica do Parque Nacional do Itatiaia, sudeste de Brasil: Subfamílias Caesalpinoideae e Mimosoideae. *Rodriguésia*. v. 58, n. 2, p. 423-468, 2006.

OLIVEIRA, F.; AKISUE, G. Fundamentos de Farmacobotânica. 2º ED. 2003. São Paulo: Editora Atheneu.

SIMÕES, C. M. O., SCHNKEL, E. P., GOSMANN, G., MELLO, J. C. P., MENTZ, L. A., PETROVICK, P. R., 2004. Farmacognosia: da planta ao medicamento. Editora da UFRGS Florianópolis.

TOIGO, L. Caracterização farmacobotânica, estudo do óleo essencial e atividade antimicrobiana da erva de São Simão *Vernonia scorpioides* (Lam.) Pers. *Rev. Bras. Farm.*, 85(2): 49-55, 2004.

ZAGO, M. A. MANFRON, M. P.; MOREL, F. e ZANETTI A. Morfonatomia do caule de *Cuphea glutinosa* Cham. & Schltdl. (Lythraceae). *Rev. bras. farmacogn.* 2009, vol.19, n.3, p. 720-726. I

## **CAPÍTULO 2**

### **ASPECTOS QUÍMICOS E ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DE *Piptadenia gonoacantha* (FABACEAE)**

## INTRODUÇÃO

O uso de plantas como medicamento não é um fato recente, surgiu na era primitiva, onde o ser humano, por experimentação e observação, descobria as propriedades das plantas. Porém, somente na primeira década do século XX a quimioterapia surgiu como ciência. No ano de 1920, Alexander Fleming descobriu o primeiro antibiótico, a penicilina, a partir do fungo *Penicillium notatum*. Essa descoberta permitiu o desenvolvimento de outros compostos antimicrobianos produzidos por organismos vivos (Peres et al., 2009).

Os termos antibiótico e antimicrobiano são considerados como sinonímia, indicando assim, toda substância originária de seres vivos, microrganismos ou vegetais, como também aquelas sintetizadas em laboratório com a capacidade de apresentarem atividade letal ou inibitória contra espécies microbianas em pequenas concentrações (Amato Neto et al., 1994; Ribeiro e Soares, 2008). Embora as indústrias químicas e farmacêuticas tenham produzido uma enorme variedade de diferentes antibióticos nos últimos tempos, cada vez mais tem sido observado o aumento de microrganismos resistentes aos antimicrobianos disponíveis no mercado, o que incentiva a busca de novas fontes de substâncias com atividades antimicrobianas (Ribeiro e Soares 2008). Entretanto, o controle de qualidade de fitoterápicos é imprescindível no meio comercial, pois muitas espécies vegetais são vendidas sem quaisquer garantia de qualidade, favorecendo, desde a venda de espécies falsificadas, até o armazenamento inadequado durante a sua comercialização (Carvalho et al., 2008).

Diante desta realidade, se torna fundamental a sistematização de técnicas para uma melhor comprovação científica da real utilização dos fitoterápicos e validação dos processos tecnológicos de cultivo e produção.

A escolha de um procedimento adequado capaz de identificar estruturalmente as inúmeras moléculas que podem vir a constituir uma espécie vegetal é um ponto fundamental no estudo de princípios ativos (Carvalho et al., 2008).

Dentre os procedimentos e técnicas empregados para a validação e/ou elucidação de compostos, destaca-se a espectrometria molecular na

região ultravioleta-visível (UV-VIS). Esta é uma técnica analítica que vem sendo há mais de 50 anos empregada para a identificação e determinação qualitativa e quantitativa de muitas espécies moleculares inorgânicas e orgânicas em diferentes tipos de materiais (Peres et al., 2009).

Além da escolha adequada do procedimento e técnica eficaz no processo de avaliação de amostras, os solventes destacam-se como um fator fundamental, uma vez que estes irão influenciar na solubilidade das amostras e assim nos resultados das análises (Simões et al., 2004).

Por influenciar diretamente nos resultados finais, a solubilidade tem extrema importância no método de extração, já que ela determina a quantidade máxima de soluto que pode ser solubilizada nas condições operacionais (Simões et al., 2004). Assim, quanto maior for a solubilidade do soluto maior será a quantidade de produto extraído. Por ser uma propriedade termodinâmica a solubilidade depende da pressão, temperatura, natureza e composição do solvente.

Os experimentos realizados neste trabalho tiveram como objetivo avaliar aspectos químicos da espécie *P. gonoacantha* com relação às variações do perfil espectral dos extratos de suas folhas, decorrentes das diferentes condições a que foram submetidos durante o processo de extração. Avaliou-se também a influência do pH nestes espectros e determinou-se o teor de compostos fenólicos totais. Além da avaliação da atividade antibacteriana *in vitro*, frente à *S. aureus* e *E. coli*.

## **MATERIAIS E MÉTODOS**

### **ASPECTOS BOTÂNICOS**

#### **Material botânico**

Foram coletadas plantas da espécie *Piptadenia gonoacantha*, conhecida popularmente como Pau de Jacaré no município de Viçosa, Minas Gerais – Brasil. O material coletado foi identificado e autenticado por comparação com espécies do Horto Botânico da Universidade Federal de

Viçosa (UFV), onde a espécie testemunho foi depositada (exsicata n° 35.530).

## **ASPECTOS QUÍMICOS**

### **Preparo do Extrato**

Os extratos de *Piptadenia gonoacantha* foram preparados separadamente, a partir da utilização de folhas na proporção de 20% (m/v - pulverizado da planta/solvente). Antes do preparo dos extratos as folhas foram secas em estufa de ar circulante  $40 \pm 2^{\circ}\text{C}$  e trituradas em moinho de facas Marconi<sup>®</sup> (Carvalho et al., 2011). Para as análises espectrofotométricas utilizaram-se os extratos diluídos na concentração de 1% (m/v - extrato da planta/solvente). Os espectros foram medidos no espectrômetro FEMTO 800XI<sup>®</sup>, com cubeta de quartzo de 1,0 cm de caminho óptico, intervalos de 2 nm e varreduras de 200 a 700 nm. Para o branco foi empregado o solvente usado em cada extração, garantindo assim que a absorbância resultante da leitura da amostra seria exclusivamente de cada extrato.

### **Variáveis no Processo de Extração**

A etapa inicial da extração das amostras de folhas de *P. gonoacantha* consistiu em avaliar o efeito das variáveis (Tabela 1): método de extração, solvente e temperatura de extração sobre o coeficiente de extinção (absorbância de 200 a 700nm) das mesmas.

Para avaliar a eficiência dos métodos de extração utilizados realizaram-se leituras espectrofotométricas, determinando os perfis espectrais com a finalidade de verificar qual variável permitiu uma maior extração dos seus metabólitos secundários.

**Tabela 1.** Variáveis no processo de preparo de extratos de *P. gonoacantha*.

Parte do Vegetal	Solventes	Metodologias	
Folhas	*H <sub>2</sub> O, EtOH e H <sub>2</sub> O:EtOH (10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90% v/v)	Maceração dinâmica Ultrassonicação por 60"	
	H <sub>2</sub> O:EtOH (80% v/v)	Ultrassonicação por 60"	30 °C
			40°C
		50°C	

\* H<sub>2</sub>O - Água; EtOH - Etanol; H<sub>2</sub>O:EtOH – Graduações hidroalcólicas.

### Influência do pH

Para os estudos de protonação e desprotonação do extrato aquoso (20% m/v) da espécie *P. gonoacantha*, os extratos foram preparados e diluídos a 1% (m/v) em volumes definidos de NaOH 0,01 M ou HCl 0,01 M para avaliar a influência do pH sobre os extratos, sendo este medido potenciometricamente (pHmetro Quimis<sup>®</sup> - Q 400A), com eletrodo de vidro calibrado previamente com tampões pH 4,0, 7,0 e 10,0. Os espectros foram medidos no espectrômetro FEMTO<sup>®</sup> 800XI. Os extratos foram analisados na faixa de pH entre 2 e 12, considerando os dez pontos compreendidos nesta.

### Estudo da prospecção Fitoquímica

Os extratos foram submetidos às análises fitoquímicas para a caracterização de: alcaloides, antraquinonas, taninos, flavonóides, cumarinas, heterosídeos cardiotônicos, saponinas, terpenos e compostos fenólicos. As análises foram realizadas por meio de reações cromáticas e de precipitação, segundo metodologia descrita em Simões et al. (2004).

### Quantificação de Polifenóis Totais

Polifenóis totais foram quantificados em todos os extratos, preparados nas mesmas condições. Para a avaliação do conteúdo de fenólicos totais solúveis, foi utilizando o método colorimétrico Folin-Ciocalteu. Foram mantidas as proporções estabelecidas segundo a RDC nº313 (Brasil 2005).

O teor de compostos fenólicos foi determinado por espectrofotometria no visível construindo-se uma curva analítica utilizando padrão de ácido tânico 32, 25,6, 19,2, 12,8, 6,4 e 3,2  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ . A equação obtida pela regressão linear da curva de calibração foi utilizada para expressão dos valores. A absorvância das amostras e amostra-padrão foram medidas em espectrofotômetro ( $\lambda=750$  nm), exatamente 2 minutos após a adição do último reagente. Água destilada foi utilizada como branco. Os resultados foram expressos como mg de ácido gálico equivalentes (GAE) por grama de extrato (mg de GAE/g). Os experimentos foram realizados em triplicata. A Equação da curva de calibração do ácido gálico foi  $y = 0,0062x + 0,2623$  e o coeficiente de correlação  $R^2 = 0,9899$ . Todas as análises foram realizadas em triplicata.

## **ASPECTOS BIOLÓGICOS**

### **Avaliação microbiológica**

#### **Preparo do meio de cultura e das bactérias**

A análise da atividade antibacteriana da espécie *P. gonoacantha* foi realizada através da adaptação do método de difusão em meio sólido com perfuração em ágar. Os microrganismos utilizados nos testes foram obtidos no Laboratório de Imunobiologia Molecular e Glicobiologia da Universidade Federal de Viçosa - MG. Utilizou-se uma linhagem de *Staphylococcus aureus* (ATCC 29213) e *Escherichia coli* (ATCC 14948).

No ensaio foi empregado o meio de cultura Mueller-Hinton, (Himedia<sup>®</sup>, Lote:26206), preparado segundo as especificações do fabricante. As culturas de bactérias foram mantidas a 4°C em Mueller-Hinton. Antes dos testes, as linhagens foram repicadas para o meio citado e incubadas a  $36 \pm 2^\circ\text{C}$  por 24 horas. A partir de culturas recentes, foram preparadas suspensões bacterianas em solução salina NaCl 0,9% com turvação equivalente a Escala de McFarland 0,5 ( $1,5 \times 10^8$  células/mL) (NCCLS 2003). Foi realizado controle da absorvância destas suspensões de microrganismos; sendo a leitura realizada em espectrofotômetro ajustado para o comprimento de onda de 600 nm.

Posteriormente, 500µL da suspensão do microrganismo foram misturadas ao meio Mueller-Hinton estéril, em estado líquido (12,5 mL) a 37°C, sendo em seguida vertido em placas de Petri estéreis (diâmetro 90 mm). Os poços foram confeccionados utilizando-se uma bomba a vácuo acoplada a uma ponteira estéril previamente adaptada para tal fim. Em cada placa foram perfurados treze poços para aplicação das amostras.

Foram depositados 10µL dos extratos e dos controles nas cavidades correspondentes a cada um. Após a incubação por 24 horas, em estufa a 37°C, o diâmetro do halo de inibição foi mensurado em mm.

Posteriormente, 500µL do extrato (20% m/v) foram concentrados em estufa a 40°C; até volume final fixado em 200µL (50% m/v). Uma alíquota de 10µL de cada extrato foi inoculada em cada poço confeccionado nas placas contendo o meio Mueller-Hinton. Após a incubação por 24 horas, em estufa a 37°C o diâmetro do halo de inibição foi mensurado em mm, sendo os resultados organizados e descritos pela estatística descritiva.

### **Atividade antibacteriana e determinação da concentração inibitória mínima**

Todos os testes foram realizados em triplicata sendo considerado como resultado final de cada extrato a média das três medidas e como susceptível halo igual ou acima de oito mm de diâmetro (Parekh et al., 2007; Santos et al. 2007).

Para determinação da concentração inibitória mínima (CIM), a avaliação da atividade antimicrobiana foi realizada observando-se a formação de halos de inibição ao redor das cavidades padronizadas. Sendo considerada a CIM como a mais alta diluição de EPG que inibir o crescimento dos microrganismos (NCCLS 2012).

Foi verificada também a atividade antibacteriana do álcool utilizado para a preparação dos extratos, onde cada cavidade recebeu 10 µL água e de álcool etílico PA (Lafan Química Fina<sup>®</sup>) em todas as graduações alcoólicas, além do controle positivo Eritromicina 10µg.µL<sup>-1</sup> (Lote: 080616451 - Pharmanostra<sup>®</sup>) para *S. aureus* e Ciprofloxacino 0,1µg.µL<sup>-1</sup> (Lote:19428901- Ciprobacter<sup>®</sup>) para *E. coli*.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

A técnica de extração por ultrassom apresentou maiores valores de coeficiente de extinção (absorbância) ao longo dos comprimentos de onda analisados, indicando ser o método mais eficiente na extração das folhas da espécie *Piptadenia gonoacantha*.

Tomando-se, como exemplo, seis comprimentos de onda, 250, 270, 291, 311, 331, 351 nm (Tabela 3), escolhidos por serem os comprimentos de onda onde são analisadas as maiores absorbâncias ao longo dos espectros, pode-se comparar a proporção dos compostos extraídos por cada metodologia.

Pelo seu caráter, a técnica de maceração não conduz ao esgotamento da matéria-prima vegetal, seja devido à saturação do líquido extrator ou ao estabelecimento de um equilíbrio difusional entre o meio extrator e o interior da célula vegetal, neste caso (Vinatoru et al., 1997). Entretanto, o banho de ultrassom pode facilitar a dilatação e hidratação do material da planta e causar alargamento dos poros da parede celular. Dessa forma, o ultrassom promove: o aumento da transferência de massa, quebra das células vegetais, aumento na penetração do solvente e diminuição de efeitos capilares (Vale et al., 1998; Vinatoru et al., 1997). Portanto, as características desta técnica permitem que uma maior quantidade de compostos seja extraída.

**Tabela 3.** Influência do método de extração sobre coeficiente de extinção (absorbância) dos extratos de *Piptadenia gonoacantha*.

$\lambda$ /nm	Absorbância (nm)	
	Ultrassom	Maceração
250	2,990 ± 0,17	1,871 ± 0,11
270	2,990 ± 0,28	2,380 ± 0,11
291	2,990 ± 0,15	1,720 ± 0,08
311	2,990 ± 0,12	0,957 ± 0,10
331	1,922 ± 0,11	0,704 ± 0,08
351	1,573 ± 0,10	0,614 ± 0,12

Segundo Francony et al. (1996), a extração por ultra-sonificação, apresenta-se como técnica bastante robusta. Sendo os efeitos físicos provocados pelos ultrassons ocorrem devido ao fenômeno da cavitação acústica, que é o processo de nucleação, crescimento e colapso de bolhas transientes em líquidos expostos a ondas ultrassônicas de baixa frequência (< 1 MHz). A energia liberada durante a cavitação acústica fornece excelentes perspectivas para o preparo e/ou tratamento de amostras (Korn et al., 2005; Suslick 1990). No preparo de amostras, o colapso das microbolhas favorece a extração de espécies químicas a partir de materiais sólidos, bem como a dissolução destes (Ruiz-Jiménez et al., 2003; Nascentes et al., 2001).

Com relação aos diferentes gradientes hidroalcoólicos utilizados, pode-se observar que os extratos apresentaram perfis espectrais semelhantes, porém com extração de moléculas em quantidades diferentes (Figura 1A). Cada extrato apresentou uma faixa de comprimento de onda específico com absorvâncias em níveis equivalentes a concentração dos metabólitos extraídos nos respectivos comprimentos de ondas correspondentes ao coeficiente de partição de cada solvente extrator.

As diferenças espectrais analisadas, estão intimamente relacionadas com a diferença no gradiente hidroalcoólico utilizado no processo de extração. Onde ao utilizar o etanol a 80, 70, 60, 50 e 40% (v/v) como solvente houve uma maior extração dos constituintes globais de folhas da espécie *P. gonoacantha*, seguidos respectivamente pelo etanol 30, 90, 20, 100, 10 e 0% (v/v), respectivamente. Cabe ressaltar que estes valores são mantidos ao longo de todo o perfil espectral, exceto para os constituintes que absorvem nos comprimentos de onda acima de 370 nm extraídos com o solvente hidroalcoólico a 100% (v/v).

Os maiores valores de absorvâncias observados na extração utilizando o etanol a 80% (v/v) pode estar relacionado à maior concentração de metabólitos com polaridade semelhante a deste solvente. De acordo com Falkenberg et al. (2003) a grande maioria dos constituintes de interesse para a análise fitoquímica apresenta alguma solubilidade em misturas etanólicas ou metanólicas a 80%, de tal modo que estas costumam ser empregadas com frequência. Essa observação é compartilhada por Ferri (1996). Este

afirma que, a partir de extratos etanólicos podem ser realizadas várias extrações, caso se deseje obter frações específicas como alcalóides e flavonóides, por exemplo. Além do que, segundo o mesmo autor, a utilização de etanol nessa concentração é mais barata, rápida e atóxica para pesquisas dessa natureza.

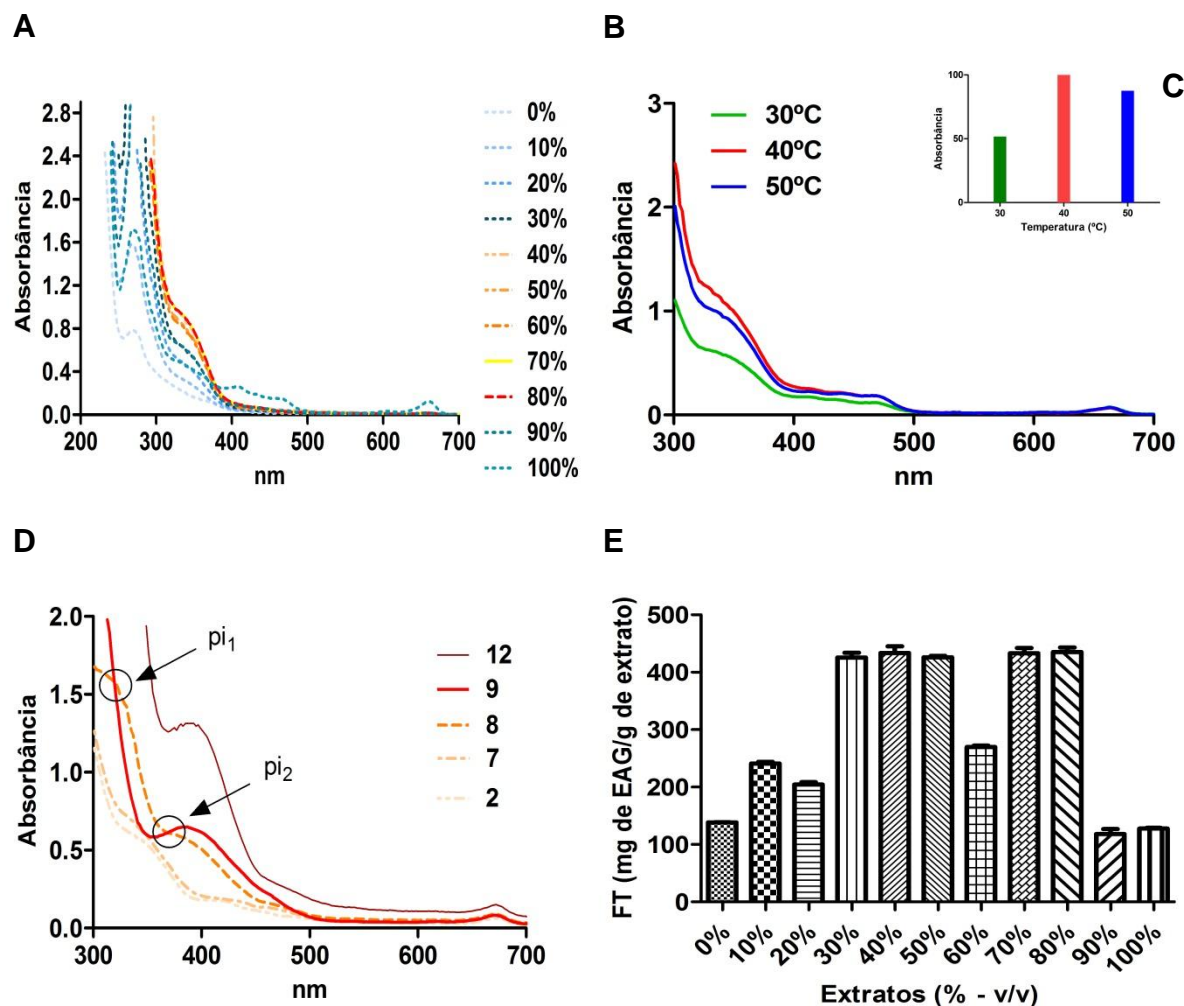
O extrato das folhas, utilizando etanol 80% (v/v) como solvente, foi selecionado para dar continuidade na análise da influência da temperatura em relação ao processo de extração e atividades biológicas, por este extrato apresentar valores elevados de absorvância dos constituintes. Este extrato, quando submetido às diferentes temperaturas de extração, apresentou a 40°C o maior coeficiente de extinção em todos os comprimentos de onda analisados, demonstrando ser a melhor temperatura para a extração dos constituintes globais desta espécie (Figura 1B e C).

De maneira geral, a temperatura de extração é um parâmetro a ser aperfeiçoado a fim de diminuir custo do processo de extração. Alguns autores, embora concordem que a temperatura poderá favorecer a extração de alguns compostos, dentre eles os fenólicos, ressaltam que também poderá desencadear a sua degradação com possível prejuízo da ação antioxidante (Spigno et al., 2007; Yilmaz et al., 2006; Pinelo et al., 2005).

Medidas de deslocamento batocrômico espectral em função da deprotonação forçada (adição de concentrações e/ou gotas conhecidos de NaOH) e formação de pontos isosbéticos (Skoog et al., 2002) em função do pH foram obtidos para todos os extratos aquosos das folhas de *P. gonoacantha*. Por meio dos resultados é possível verificar uma mudança significativa no perfil espectral do extrato aquoso das folhas de *P. gonoacantha*, para valores de pH > 8,0 (Figura 1D). O que indica uma plausível deprotonação de alguns grupamentos cromóforos da espécie *P. gonoacantha*. Espectros que foram medidos para valores de pH entre 2,0 e 7,0, não apresentaram modificações em suas estruturas, indicando uma protonação molecular para esta faixa de pH, bem como espectros medidos para valores de pH > 9. Estes, mantiveram o mesmo perfil espectral sendo portanto evidenciado apenas o último valor valor de pH analisado (pH 12).

Estes resultados são semelhantes ao encontrado por Carvalho et al. (2008) onde analisou-se o deslocamento espectral em função da hidrólise

forçada e formação de pontos isobésticos em função do pH em extratos vetais de *Brassica sp.*.



**Figura 1. Análises espectrofotométricas dos extratos de folhas de *Piptadenia gonoacantha* (EPG).** A - Perfil espectral da influência do gradiente hidroalcoólico sobre o coeficiente de partição de EPG; B - Espectros de absorção de EPG pelo método de ultrassom submetido a diferentes temperaturas de extração; C - Comparação da porcentagem relativa das três diferentes temperaturas utilizando a média de 5 comprimentos de onda; D - Influência do pH no perfil espectral do extrato aquoso de PG para valores de pH > 8, evidenciando o dois pontos isobésticos ( $pi_1$  e  $pb_2$ ), Ponto isobéstico: equilíbrio de uma parte protonada e deprotonada da molécula; E - Concentração de polifenóis totais em EPG;

De acordo com Connors (1987) o ponto de intersecção de um grupo de espectros sobrepostos expressos em função da concentração evidencia a presença de uma mistura de dois estados e é denominado ponto isosbético. Este ponto comprova a presença de uma mistura de dois estados, um protonado e outro deprotonado (Skoog et al., 2002). O conhecimento desta informação permite favorecer extrações de classes de constituintes de uma espécie, além de propor uma forma de auxiliar na validação, auxiliando assim na padronização dos extratos em estudos de formulações farmacêuticas posteriores.

Em termos dos resultados da prospecção fitoquímica, estes revelaram a presença positiva de compostos fenólicos, flavonóides, taninos e cumarinas para todos os extratos hidroalcoólicos analisados (Tabela 4). Contudo, os extratos com alcolaturas acima de 50%, não apresentaram resultados positivos para cumarinas, o que indica uma possível ausência da relação entre as atividades biológicas verificadas com este metabólito. A ausência deste metabólito nestes extratos se justifica pela diferença de polaridade entre o agente extrator e o metabólito em questão.

As plantas são capazes de produzir diferentes substâncias tóxicas em grandes quantidades, como alguns alcalóides, cumarinas e outras provenientes do metabolismo secundário, aparentemente justificado para sua própria defesa contra vírus, bactérias, fungos e animais predadores. Martinez-Florez et al. (2002) relatam que os flavonóides podem atuar na estabilização de espécies reativas de oxigênio, sendo considerados como antioxidantes, possuindo efeito antibacteriano frente a uma grade variedade de cepas. Segundo Sanches et al. (2005), várias espécies de *Stryphnodendron sp.*, como por exemplo o barbatimão, contém cerca de 20% de taninos e são usadas na medicina popular como cicatrizantes. Além de agirem como antimicrobianas e desativadoras de radicais livres, ou seja, antioxidantes. Tais espécies são derivados fenólicos, com uma boa solubilidade em água, de massa molecular entre 0,5 a 3 kDa. Muitas vezes, são os princípios ativos de plantas empregadas na medicina tradicional para o tratamento de diversas moléstias, por apresentarem atividades biológicas como a ação bactericida, fungicida, moluscicida e inibição enzimática, que

podem ser potencialmente empregadas como novos princípios ativos e/ou outras aplicações (Carvalho et al., 2009; Silva et al., 2004).

**Tabela 4** – Resultados da prospecção fitoquímica de Extratos hidroalcoólicos de *Piptadenia gonoacantha*.

Fitoquímica		EPG - gradiente hidroalcoólico (%)										
		0	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100
<b>Alcalóides</b>	Dragendorff	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Hager	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Mayer	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>Antraquinona</b>	Borntrager	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Acetato de magnésio	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<b>Heterosídeos</b>	Baljet	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>Cardiotônicos</b>	Kedde	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>Taninos</b>	Gelatina salgada	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	Acetato de chumbo	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<b>Cumarinas</b>	Hidróxido de potássio	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
<b>Compostos fenólicos</b>	Fólin-ciocalteau	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<b>Flavonóides</b>	Shinoda	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	Cloreto férrico	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	Cloreto de alumínio	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	Índice de espuma	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-
<b>Saponinas</b>	Libermann-burchard	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-

(-) ausência; (+) presença.

Através do método de Folin-Ciocalteu foram quantificados os compostos fenólicos totais (FT) presentes nas amostras de EPG. Os resultados experimentais estão representados na Figura 1, E e revelam a concentração de fenóis nos extratos de EPG obtidos através da curva padrão de ácido gálico expressa em equivalente de ácido gálico (EAG/g) no extrato. Esta análise mostrou que este extrato possui grande concentração de compostos fenólicos. Todos os extratos avaliados apresentaram altos teores de compostos fenólicos, quando comparados a dados de outras espécies descritos na literatura (Velioglu et al. 1998; Kahkonen et al. 1999). Os menores teores de FT foram registrados em EPG a 90 e 100 % (v/v), sendo os maiores teores encontrados em EPG 30, 40, 50, 70 e 80 % (v/v).

Carvalho et al. (2010) identificaram em extratos das folhas desta espécie, dois flavonoides: vitexina e isovitexina. Possivelmente, a presença destes dois flavonoides contribuiria para a elevada concentração de compostos fenólicos no extrato analisado.

Com relação à atividade antibacteriana de extratos vegetais não existe um consenso sobre o nível aceitável quando comparados com antibióticos padrões. Alguns autores consideram somente resultados similares aos de antibióticos conhecidos, desde que se trabalhe com uma fração já determinada (Aligiannis et al., 2001). Entretanto, como este trabalho foi realizado com frações hidroalcólicas de *P. gonoacantha*, seguiu-se os o critério sugerido por Holetz et al. (2002), considerando como resultado final de cada extrato a média das três medidas dos halos de inibição e como sensível halo igual ou acima de oito mm de diâmetro conforme critérios de Parekh e Chanda (2007); e Santos et al. (2007). O volume mínimo de extrato hidroalcoólico utilizado baseou-se em estudos anteriores, realizados em nosso laboratório, que apontaram o valor de 10  $\mu\text{L}$  como a menor quantidade de extrato necessária para verificar a atividade antibacteriana em placa pelo método de difusão (Miranda et al., 2013).

Todos os extratos das folhas de *P. gonoacantha* avaliados apresentaram atividade frente à *S. aureus*. Porém, na concentração de 200  $\text{mg.mL}^{-1}$  os EPG a 10 e 20%, não atingiram o tamanho do halo necessário para classificá-los como efetivos. Os resultados das respectivas médias dos

diâmetros dos halos de inibição e sua eficácia quando comparada ao controle positivo podem ser visualizados na Tabela 5.

**Tabela 5.** Eficiência relativa de extratos de *P. gonoacantha* frente à *Staphylococcus aureus* em relação a Eritromicina.

Graduação alcoólica do extrato (% v/v)	Concentração do extrato			
	200 mg.mL <sup>-1</sup>		500 mg.mL <sup>-1</sup>	
	*Halos (mm)	**Eficiência (%)	Halos (mm)	Eficiência (%)
0	7,10 ± 0,2828	44,40	10,20 ± 0,1414	63,80
10	7,25 ± 0,1768	45,30	10,25 ± 0,5303	64,10
20	7,50 ± 0,4243	46,90	11,00 ± 1,061	68,80
30	8,50 ± 0,3536	53,10	11,00 ± 0,1414	68,80
40	8,50 ± 0,3536	53,10	11,50 ± 1,061	71,90
50	9,00 ± 0,3536	56,30	11,50 ± 0,3536	71,90
60	10,00 ± 0,7071	62,50	12,75 ± 0,5303	79,70
70	10,25 ± 0,1768	64,10	13,00 ± 0,3536	81,30
80	10,75 ± 1,237	67,20	13,50 ± 0,3536	84,40
90	8,50 ± 0,3536	53,10	11,00 ± 0,7071	68,80
100	7,50 ± 0,3536	46,90	10,00 ± 0,5657	62,50
***C+	16,0 ± 0,7071	100,00	16,00 ± 0,2121	100,00

\*Diâmetros médios em mm; \*\*Eficiência relativa ao controle positivo; \*\*\*C+, Controle positivo com Eritromicina a 10 µg.µL<sup>-1</sup>.

O extrato que apresentou melhor atividade foi o com graduação alcoólica de 80% (v/v) (Figura 2A). Nota-se que a atividade antibacteriana do extrato utilizando os diversos solventes mantém um perfil, sendo os resultados na concentração de 500 mg.mL<sup>-1</sup> mais expressivos em relação ao mesmo extrato a 200 mg.mL<sup>-1</sup> (Figura 2B). Além deste, foi realizada a

análise da CIM, onde considerou-se como CIM a menor concentração dos extratos que inibiu completamente o crescimento de *S. aureus*. O extrato hidroalcoólico (80%) de *P. gonoacantha* apresentou uma CIM igual a 31,25 mg.mL<sup>-1</sup> (Figura 2C). Quanto à atividade frente à bactéria *Escherichia coli* nenhum dos extratos estudados apresentaram atividade inibitória (Figura 2B).

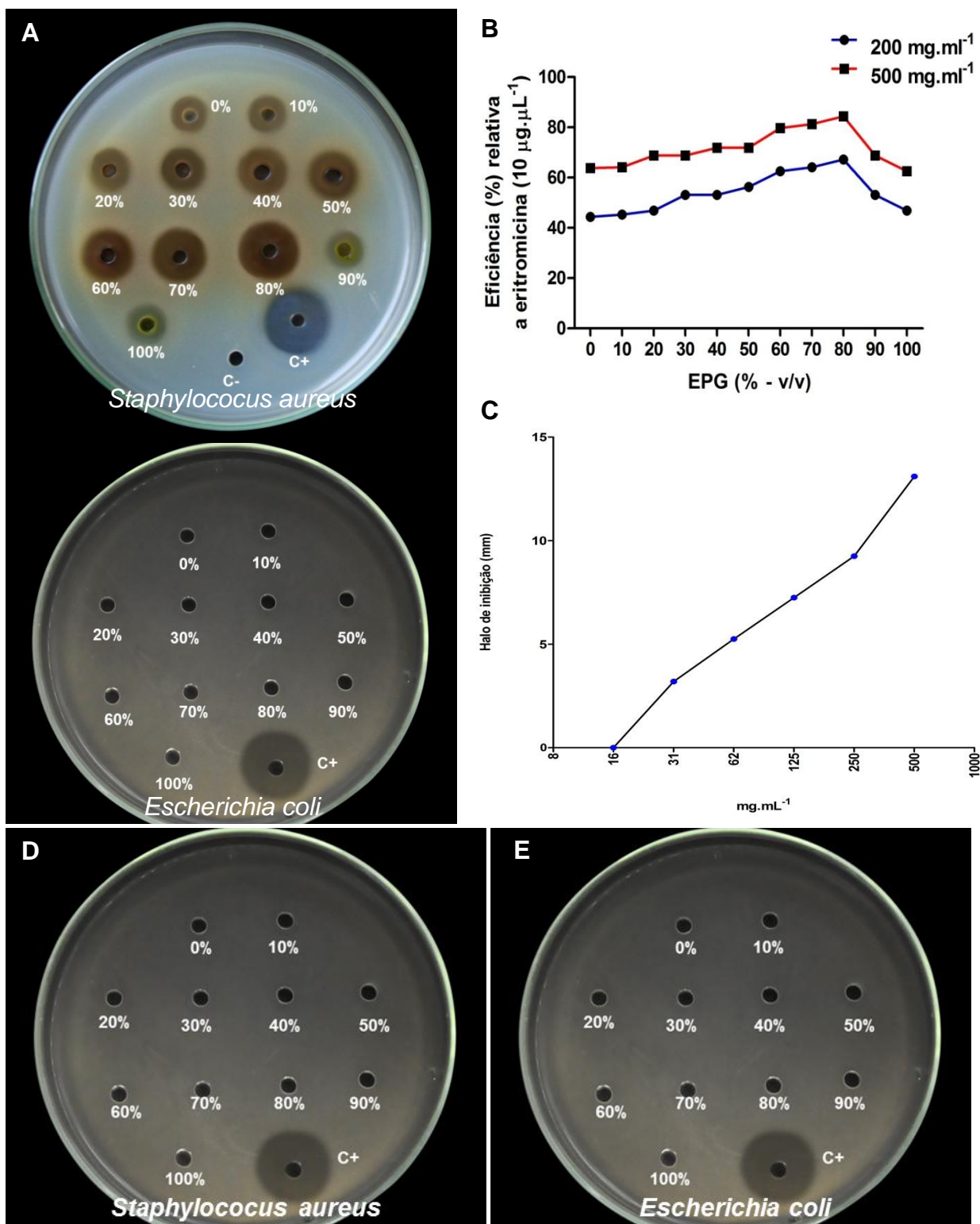
Com relação ao teste realizado a fim de verificar a atividade bactericida do álcool utilizado para a preparação dos extratos, nas diferentes graduações alcoólicas (0 a 100% - v/v), todos os resultados foram negativos exceto o controle positivo (Figura 2D e E). A não inibição do crescimento com o controle mostra que o etanol não exerceu influência sobre os resultados da atividade do extrato, resultado já descrito por Virtuoso et al. (2005). Assim ficou evidenciado que a função do álcool foi apenas de possibilitar a extração e veiculação do(s) composto(s) dotado(s) de atividade antibacteriana. Tal resultado atribui-se ao fato do álcool volatilizar rapidamente, não interferindo no crescimento dos microrganismos.

O composto galato de metila tem sido isolado de várias plantas como derivado do ácido gálico e apresenta atividade antibacteriana e antiviral (Meyre-Silva et al., 2001). Este composto foi isolado de folhas desta espécie e pode estar relacionado a atividade antibacteriana exposta. Além deste alguns flavonóides como vitexina e isovitexina, também foram isolados desta espécie (Carvalho et al., 2010).

Os flavonóides são compostos fenólicos de vasta ocorrência na natureza desempenhando diversas funções fisiológicas nos vegetais. Na família Fabaceae estes metabólitos secundários cumprem entre outras funções, o papel de antimicrobianos. Souza Filho (2004) demonstrou a atividade antibacteriana do flavonoide ramnosil-O-vitexina isolado da espécie *Lupinus lanatus* contra *S. aureus*, *Klebsiella pneumoniae* e *Escherichia coli*. Portanto, sendo as espécies *Lupinus lanatus* e *Piptadenia gonoacantha* pertencentes à mesma família, Fabaceae, pode-se inferir que tais compostos podem estar envolvidos na atividade antibacteriana apresentada.

A ação antimicrobiana dos flavonoides, provavelmente está relacionada à capacidade de complexar proteínas extracelulares e solúveis,

bem como estruturas da parede celular. Além disso, alguns flavonoides mais lipofílicos podem atuar provocando o rompimento de membranas microbianas (Cowan, 1999).



**Figura 2. Avaliação da atividade antibacteriana de extratos de folhas de *Piptadenia gonoacantha* (EPG). A - Atividade antibacteriana de EPG em**

diferentes graduações alcoólicas na concentração de 500 mg.mL<sup>-1</sup> frente a *S. aureus* e *E. coli*; B - Comparação do tamanho do halo de inibição apresentado pelas diferentes concentrações (200 e 500 mg.mL<sup>-1</sup>) utilizando EPG em diferentes graduações alcoólicas frente a *S. aureus*; C - Concentração inibitória mínima de EPG a 80 % (v/v); E e F - Ausência de halo de inibição quando utilizado apenas os solventes em diferentes graduações alcólicas. C+, Eri - Eritromicina a 10 µg.µL<sup>-1</sup> e Cip - Ciprofloxacino 0,1 µg.µL<sup>-1</sup>.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

Esses resultados colaboram na elucidação preliminar de que os compostos presentes nos extratos das folhas de *Piptadenia gonoacantha*, especialmente os já identificados (galato de metila, vitexina e isovitexina), estão envolvidos na atividade biológica testada, podendo futuramente direcionar novos estudos.

Cabe ressaltar que o uso abusivo e indiscriminado de agentes antimicrobianos na prática clínica humana e veterinária tem um efeito seletivo no surgimento e manutenção de resistência a drogas. Uma tentativa de manter o uso de antimicrobianos atuais poderia ser encontrada em sua combinação com outros produtos, como os produtos naturais, que representariam uma opção terapêutica no tratamento de infecções causadas por *S. aureus* e outros patógenos, no que diz respeito ao aparecimento crescente de resistência múltipla.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aligiannis N, Kalpoutzakis E, Mitaku S, Chinou IB. Composition and antimicrobial activity of the essential oils of two *Origanum* species. *J Agric Food Chem* 2001; 49 (9):4168-70.

Amato Neto V, Nicodemo AC, Lopes HV. Antibióticos na Prática Médica. São Paulo: Roca; 1994. 283 p.

Brasil. Resolução de Diretoria Colegiada (RDC) In: ANVISA., editor. Ministério da Saúde. . v. 313 *Series Resolução de Diretoria Colegiada (RDC)* 2005.

Carvalho CA, Fernandes KM, Matta SL, Silva MB da, Oliveira LL de, Fonseca CC. Evaluation of antiulcerogenic activity of aqueous extract of *Brassica oleracea var. capitata* (cabbage) on Wistar rat gastric ulceration. *Arq Gastroenterol* 2011; 48 (4):276-82.

Carvalho CA, Matta SLP, Melo FCSA, Andrade DCF, Carvalho LM, Nascimento PC, Silva MB da, Rosa MB da Rosa. Stem herb (*Tynnanthus fasciculatus* MIERS– Bignoniaceae): phytochemical and toxicological study involving *Artemia*. *Revista Eletrônica de Farmácia* 2009; 6 (1):51 - 8.

Carvalho CA, Silva MB, Oliveira TG, Lima JM, Rosa MB da. Spectrometric study at different phenologic stages of the cabbage (*Brassica oleraceae var. capitata*). *Brazilian Journal of Pharmacognosy* 2008; 18 (2):249 - 57.

Carvalho MG, Cardozo MA, Catunda Junior FE, Catunda Junior FEA, Carvalho AG. Chemical constituents of *Piptadenia gonoacantha* J.F. Macbr. *Anais da Academia Brasileira de Ciências* 2010; 82 (3):561-7.

Connors KA. Binding Constants: The Measurement of Molecular Complex Stability. New York: Wiley-Interscience; 1987. 432 p.

Cowan MM. Plant products as antimicrobial agents. *Clin Microbiol Rev* 1999; 12 (4):564-82.

Falkenberg MB, Santos RI, Simões CMO. Introdução à análise fitoquímica. In: 5ª, editor, translator and editor Farmacognosia: da planta ao medicamento. Florianópolis: Editora da UFRGS; 2003; p. 230-4.

Ferri PH. Química de produtos naturais: métodos gerais. In: LC DI STASI, editor, translator and editor Plantas Medicinais: arte e ciência: Um guia de estudo interdisciplinar. São Paulo: Unesp; 1996; p. 130 - 6.

Francony A, Pétrier C. Sonochemical degradation of carbon tetrachloride in aqueous solution at two frequencies: 20 kHz and 500 kHz. *Ultrasonics Sonochemistry* 1996; 3 (2):77 – 82.

Holetz FB, Pessini GL, Sanches NR, Cortez DAG Cortez, Nakamura CV, Dias Filho BP. Screening of some plants used in the Brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2002; 97 (7):1027-31.

Kähkönen MP, Hopia AI, Vuorela HJ, Rauha JP, Pihlaja K, Kujala TS, Heinonen M. Antioxidant activity of plant extracts containing phenolic compounds. *J Agric Food Chem* 1999; 47 (10):3954-62.

Korn M, Pereira MG, Borges SS. Algumas Aplicações Analíticas dos Ultrasons. *Boletim da Sociedade Portuguesa de Química* 2005; 96:51 - 6.

Martínez-Flórez S, González-Gallego J, Culebras JM, Tuñón MJ. Flavonoids: properties and anti-oxidizing action. *Nutr Hosp* 2002; 17 (6):271-8.

Meyre-Silva C, Yunes RA, Delle Monache F, Santos AR, Schmeling LO, Gadotti VM, Liz F, Cechinel-Filho V. Phytochemical and pharmacological analysis of *Bauhinia microstachya* (Raddi) Macbr. (Leguminosae). *Z Naturforsch C* 2001; 56 (11-12):939-42.

Miranda GS, Santana GS, Machado BB, Coelho FP, Carvalho CA. Atividade antibacteriana in vitro de quatro espécies vegetais em diferentes graduações alcoólicas. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais* 2013; 15 (1): **Prelo**.

Nascentes CC, Korn M, Arruda MAZ. A fast ultrasound-assisted extraction of Ca, Mg, Mn and Zn from vegetables. *Microchemical Journal* 2001; 69 (1):37 - 43.

NCCLS. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests. Approved standard, 8th ed. NCCLS document M2-A8. NCCLS, Wayne, Pa. In., Series Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests. Approved standard, 8th ed. NCCLS document M2-A8. NCCLS, Wayne, Pa.; 2003.

NCCLS. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Twelfth informational supplement. NCCLS document M100-S12. NCCLS, Wayne, Pa. 2002.

Parekh J, Chanda SV. In vitro antimicrobial activity and phytochemical analysis of some Indian medicinal plants. *Turkish Journal of Biology* 2007; 31:53 - 8.

Peres RL, Moraes SCS, Carvalho CA, Nascimento PC, Carvalho LM, Silva MB da, Rampelotto PH, Rosa MB da. *Achillea millefolium* – Asteraceae: Phytochemical, antifungal activity (*Colletotrichum musae*) and spectrophotometric study. *Revista Eletrônica de Farmácia* 2009; 6 (3):81 - 93.

Pinelo M, Rubilar M, Jerez M, Sineiro J, Núñez MJ. Effect of solvent, temperature, and solvent-to-solid ratio on the total phenolic content and antiradical activity of extracts from different components of grape pomace. *J Agric Food Chem* 2005; 53 (6):2111-7.

Ribeiro MC, Soares MMSR. *Microbiologia prática: roteiro e manual*. 2 ed. São Paulo: Atheneu; 2008.

Ruiz-Jiménez J, Luque-García JL, Castro MDL. Dynamic ultrasound-assisted extraction of cadmium and lead from plants prior to electrothermal atomic absorption spectrometry. *Analytica Chimica Acta* 2003; 480:231 - 7.

Sanches ACC, Lopes GC, Nakamura CV, Dias Filho BP, Mello JCP. Antioxidant and antifungal activities of extracts and condensed tannins from *Stryphnodendron obovatum* Benth. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas* 2005; 41 (1):101 - 7.

Santos SC, Ferreira FS, Rossi-Alva JC, Fernandez LG. “In vitro antimicrobial activity of the extract of *Abarema cochliocarpos* (Gomes) Barneby & Grimes. *Brazilian Journal of Pharmacognosy* 2007; 17 (2):215 - 9.

Silva HH, Silva IG, dos Santos RM, Rodrigues Filho E, Elias CN. Larvicidal activity of tannins isolated of *Magonia pubescens* St. Hil. (Sapindaceae) against *Aedes aegypti* (Diptera, Culicidae). *Brazilian Society for Tropical Medicine* 2004; 37 (5):396 - 9.

Simões CMO, Schnkel EP, Gosmann G, Mello JCP, Mentz LA, Petrovick PR, 2004. *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. Editora da UFRGS Florianópolis.

Skoog DA, Holler FJ, Nieman TA. *Principles of instrumental analysis*. 5ª, editor. Philadelphia Saunders College Publishing; 2002. (5ª editor).

- Souza Filho PAC. Estudo químico e biológico em *Lupinus lanatus Bentham* (Leguminosae-Faboideae) [Dissertação (mestrado)]. Porto Alegre: UFRGS; 2004. 100 p.
- Spigno G, Tramelli L, Faveri DM. Effects of extraction time, temperature and solvent on concentration and antioxidant activity of grape marc phenolics. *Journal of Food Engineering* 2007; 81 (1):200 - 8.
- Suslick KS. Sonochemistry. *Science* 1990; 247 (4949):1439-45.
- Vale MGR, Iuz LP, Martins AF, Caramão EB, Dariva C, Oliveira JV. Extraction of organic material in mineral coal by using supercritical fluid extraction, Soxhlet, and sonication methods. *Journal of Microcolumn Separations* 1998; 10 (3):259 - 63.
- Velioglu YS, Mazza G, Gao L, Oomah BD. Antioxidant Activity and Total Phenolics in Selected Fruits, Vegetables, and Grain Products *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 1998; 46 (10): 4113 - 7.
- Vinatoru M, Toma M, Radu O et al. The use of ultrasound for the extraction of bioactive principles from plant materials. *Ultrason Sonochem* 1997; 4 (2):135-9.
- Virtuoso S, Davet A, Dias JF, Cunico MM, Miguel MD, Oliveira AB, Miguel OG. Preliminary study of the antibacterial activity of *Erythrina velutina* Willd. Fabaceae (Leguminosae) bark. *Brazilian Journal of Pharmacognosy* 2005; 15 (2):137 - 42.
- Yilmaz Y, Toledo RT. Oxygen radical absorbance capacities of grape/wine industry byproducts and effect of solvent type on extraction of grape seed polyphenols. *Journal of Food Composition and Analysis* 2006; 19 (1):41 - 4.

## **CAPÍTULO 3**

### **Antinociceptive and Anti-inflammatory Effects of Hydroalcoholic Extract of Leaves of *Piptadenia gonoacantha* (Mart.) Macbr. in Experimental Animal Models**

***Antinociceptive and Anti-inflammatory Effects of Hydroalcoholic Extract of Leaves of Piptadenia gonoacantha (Mart.) Macbr. in Experimental Animal Models***

C.A. Carvalho<sup>a,b</sup>, G.S. Santana<sup>a</sup>, A.J. Franco, R. Pinto<sup>a</sup>, E.N.R. Vieira<sup>a</sup>, R.A. Zatti<sup>a</sup>, C.C. Fonseca<sup>c</sup>, S.A. Cardoso<sup>b</sup>, S.O. de Paula<sup>b</sup>, L.L. Oliveira<sup>b,\*</sup>

<sup>a</sup>Department of Pharmacy, School of Biological and Health Sciences – UNIVIÇOSA, Av. Maria Paula Santana, 3815, 36570-000, Viçosa, MG, Brazil.

<sup>b</sup>Department of General Biology, Federal University of Viçosa – UFV, Av PH Rolfs, s/n, 36570-000, Viçosa, MG, Brazil.

<sup>c</sup>Department Veterinary Medicine, Federal University of Viçosa – UFV, Av PH Rolfs, s/n, 36570-000, Viçosa, MG, Brazil.

\* Corresponding author:

Tel.:+55 31 3899 3142; fax:+55 31 3899 2549.

E-mail address: leandro.licursi@ufv.br (L.L. Oliveira).

## ABSTRACT

**Introduction:** *Piptadenia gonoacantha* is the native tree of the Atlantic Forest, popularly known as “pau jacaré” (alligator stick). **Objective:** This study aimed to evaluate the anti-inflammatory and antinociceptive effects of hydroalcoholic extract of *P. gonoacantha* leaves (EPG). **Methodology:** The toxic effect of the EPG was tested against *Artemia salina* in order to determine a secure dose for subsequent assays. The antinociception was evaluated using the acetic acid-induced writhing and hot plate tests in Wistar rats. The anti-inflammatory effect of EPG was evaluated by carrageenan-induced paw edema tests in rats. **Results:** The bioassay with *A. salina* showed low toxicity of EPG ( $LC_{50} = 1,508$  mg/L). Oral administration of EPG (50, 100 and 150 mg/kg) significantly decreased the number of acetic acid-induced writhes, around 61.3%, 71.8% and 64.9% respectively. However, EPG failed to prolong the latency time in the hot plate test, suggesting that EPG predominantly inhibits peripheral pain mechanisms. The oral administration of EPG at doses of 50 and 100 mg/kg significantly inhibited paw edema at 3rd h after the injection of the phlogistic agent (peak of edema formation) by 34.5% and 37.5%, respectively. **Conclusion:** These data suggest that EPG has both antinociceptive and anti-inflammatory activities, and these effects may be attributed to inhibition of COX-2 and prostaglandin release.

Keywords: Analgesic; Inflammation; Herbal Medicines.

## INTRODUCTION

The inflammatory reaction, typically characterized by redness, swelling, heat, and pain, is one of the most common manifestations of many diseases afflicting millions of people worldwide (Rang et al., 2011). The inflammation is the main of host defense mechanisms against invading pathogens. However, persistent or over inflammation leads to tissue damage and possibly failure of organs.

Numerous studies have been carried out to develop more powerful anti-inflammatory drugs with lesser side effects, and the interest researches on herbal medicines for producing drugs that are more efficient has been intensified in recent years (Rates, 2001; Castardo et al., 2008). Approximately 48% of drugs used in therapy come directly or indirectly from natural products, especially medicinal plants (Balunas and Kinghorn, 2005).

*Piptadenia gonoacantha* (Fabaceae) is a common tree species native to Atlantic Forest in southern and southeastern Brazil. This species is easily identified by its bark with longitudinal wings filled with woody spines present on the trunk and branches. The plant is commonly known as “pau jacaré” (alligator stick). Phytochemical studies have be performed on the composition of *Piptadenia gonoacantha*, and a number of compounds have been identified such as triterpenes (friedelin, lupenone, lupeol, cycloartenone, cycloartan-25-26-en-3-one, 24-methylene-cycloartanone, and 24-methylenecycloartanol), steroids (sitosterol, campesterol, and stigmasterol), saponin (sitosterol-3-O- $\beta$ -D-glucopyranoside), flavonoids (apigenin, 5-methylapigenin, 7,4'-dihydroxy-3',5-dimethoxyflavone, vitexin, and isovitexin), asperphenamate and methyl gallate (Carvalho et al., 2010).

However, no research has been investigated on the analgesic and anti-inflammatory activity of *P. gonoacantha* yet.

In this study, we investigated the analgesic and anti-inflammatory activities of the hydroalcoholic extract of *P. gonoacantha* (EPG) following oral administration in experimental animal models. The analgesic activity was evaluated by acetic acid-induced writhing response and hot plate test. Anti-inflammatory activity was determined by using carrageenan-induced paw edema model.

## **MATERIALS AND METHODS**

### **Plant material and extract preparation**

Fresh leaves of *Piptadenia gonoacantha* were collected in Viçosa, MG, Brazil. The plant material was identified and the voucher specimen (no. 35530) is deposited in the herbarium of Federal University of Viçosa.

The leaves of *P. gonoacantha* were air dried at 40 °C and the dried material was then powdered using a knife mill (Marconi, Brazil). The hydroalcoholic extract was prepared according to Carvalho et al. (2011). Briefly, 200g of dried powder was submitted to ultrasound-assisted extraction in aqueous ethanol (80%) for 1h at 40 °C. The extract was filtrated and evaporated to dryness using a rotavapor Q344B1 (Quimis, Brazil). The solutions of hydroalcoholic extracts of *P. gonoacantha* leaves (EPG) was prepared by dissolving a given quantity of the ethanolic extract in a small volume of dimethylsulfoxide (DMSO) and made up to the appropriate volume with physiological saline.

### **Phytochemical group tests**

The ethanolic extracts of *P gonoacantha* were screened by using standard procedures of phytochemical group tests (Simões et al., 2004). The extracts were screened for the presence of alkaloids, anthraquinones, cardiotonic heterosides, coumarins, flavonoids, phenolic compounds, saponins, tannins, and terpenoids. The reagents were first tested by using standard drugs of corresponding groups available in market.

### **Brine shrimp lethality assay**

In vitro preliminary cytotoxicity assay was performed according to the method of Meyer et al. (1982) adapted by Carvalho et al. (2009). Briefly, brine shrimp (*Artemia salina*) nauplii were hatched in sterile brine solution (prepared using sea salt 38 g/L and adjusted the pH to 8.5 using 1N NaOH) under constant aeration at 25 °C for 48 hours. After hatching, 10 nauplii were placed in each vial and various concentrations of EPG (250, 500, 1000, 1500, 2000 and 2500 mg/L) were added to each vial in a final volume of 5 mL and maintained at 37°C for 24 hours. The mortality end point of the bioassay was determined as the absence of controlled forward motion during 30 seconds of observation. Negative and positive controls were simultaneously performed using the same concentrations of the working solvent and  $K_2Cr_2O_7$  (0.33 mM), respectively. The assays were performed in triplicate and calculate  $LC_{50}$  (the concentration of extract which caused 50 per cent mortality) based on Litchfield & Wilcoxon method (Litchfield and Wilcoxon, 1949).

## **Animals**

Female albino Wistar rats (190-210 g) were obtained from the central animal house of the Federal University of Viçosa – UFV. They were kept at standard environmental conditions (12/12-h light/dark cycle) at the animal house of the School of Biological and Health Sciences – UNIVIÇOSA and were allowed free access to food and water. Before each test, the animals were fasted for 12 h with free access to water. The rats were randomly divided into tests and controls groups (n = 6) as will be described further below.

The experimental protocol used in this study was approved (0006/2011-I) by the Ethics Committee of the School of Biological and Health Sciences – UNIVIÇOSA, and conforms with the Brazilian College for Animal Experimentation (COBEA) and with actual Brazilian legislation.

## **Writhing test**

The antinociceptive activity of EPG was performed according to the method of Dutra et al. (2006). Acetic acid solution 0.6% (0.25 mL/animal) was injected intraperitoneally, and the constriction of the abdominal muscles together with stretching of the hind limbs was counted over a 20 min period starting 5 min after acetic acid injection. EPG (50, 100, and 150 mg/kg, P.O.), indomethacin (10 mg/kg, P.O.) as the standard drug (positive control), and vehicle (1 mL of 1% DMSO in saline, P.O.) as the negative control were administered 30 minutes before the acetic acid injection. The results were

expressed as the mean number of writhing accumulated over 20 min experimental evaluation.

### **Hot Plate Test**

The hot plate test was used to measure response latencies according to the method previously described by Eddy and Leimbach (1953). The hot plate was maintained at  $54 \pm 1^\circ\text{C}$ . The time taken (in seconds) to cause a discomfort reaction (licking paws or jumping) was recorded as the response latency 30 min after administration of EPG (50, 100, and 150 mg/kg, P.O.), indomethacin (10 mg/kg, P.O.) as positive control, and vehicle (1 mL of 1% DMSO in saline, P.O.) as the negative control. A latency period of 10 sec was defined as complete analgesia. To avoid tissue injury, the experiment was stopped if the latency period was exceeded.

### **Paw edema tests**

The anti-inflammatory effects of EPG were evaluated using the carrageenan-induced paw edema test in rats, according to the method of Ceccherelli et al. (1996). Briefly, rats were injected subplantarily into the right hind paw with 50  $\mu\text{L}$  of carrageenan suspension (1% in saline). The left hind paw was injected with 50  $\mu\text{L}$  of saline and used as a control. The paw diameters of each group were measured prior to and 1, 2, and 3 hours after carrageenan administration using a digital caliper (Marbeg). EPG (250, 500, and 750 mg/kg, P.O.) was administered 30 minutes prior to carrageenan injection. The control group received an equivalent volume of water.

Indomethacin (10 mg/kg, P.O.) was used as the reference drug. The percent inhibition of edema was calculated.

### **Statistical Analysis**

All data are expressed as Mean  $\pm$  SEM. The result was tested by One-Way ANOVA and Dunnett post test (GraphPad Prism 5.0, USA).  $P < 0.05$  was considered statistically significant.

## **RESULTS AND DISCUSSION**

The hydroalcoholic extracts of *P. gonoacantha* (EPG) submitted to phytochemical screening revealed the presence of flavonoids, phenolic compounds, and tannins. The resulting data are summarized in Table 1.

*In vitro* cytotoxic activity of EPG using brine shrimp lethality assay revealed that these compounds inhibited the *Artemia salina* nauplii in a dose dependent manner (fig. 1). The LC<sub>50</sub> values of EPG was found to be 1,508 mg/L, that indicates a low toxicity of the extract, the World Health Organization (WHO) considers a toxic substance that has LC<sub>50</sub> < 1000 mg/L for this test (WHO, 1965; Meyer et al., 1982). Anyway the LC<sub>50</sub> was 10 times greater than the greatest dose used in antinociceptive and anti-inflammatory assays, the EPG did not induce lethality or any other signs of toxicity at doses up to 250 mg/L. The high LC<sub>50</sub> values also suggest that EPG were relatively safe and nontoxic to the animals.

Two different antinociceptive testing methods were employed in the current investigation, with the objective of identifying possible peripheral

(acetic acid-induced writhing test) and central (hot plate test) effects of the EPG. Oral administration of 0.6% acetic acid produced a substantial number of writhes in control rats pretreated with vehicle (1 mL of 1% DMSO in saline) (Fig. 2). EPG (50, 100, and 150 mg/kg) significantly decreased the number of acetic acid-induced writhes (Fig. 2). 100 mg/kg of EPG showed best results reducing the writhes by 71.8%. 50 mg/kg and 150 mg/kg of EPG produced 61.3% and 64.9% reduction in writhes, respectively. These results were found to be highly significant compared with the control group. However, oral administration of EPG (50, 100, and 150 mg/kg) failed to prolong significantly the latency time compared with control animals in the hot plate test (Fig. 3). EPG exhibited significant antinociceptive activity against chemical stimuli (acetic acid tests), but not against thermal stimuli, suggesting that EPG predominantly inhibits peripheral, rather than central, pain mechanisms. Indomethacin (10 mg/kg) the positive control used in this study produced inhibition of writhing movements, about 43.1% and prolongs the latency time significantly (Fig. 3).

Acetic acid indirectly triggers the release of nociceptive endogenous mediators (such as bradykinin, serotonin, and prostaglandin) to cause painful sensation (Liao et al., 2012). Since EPG also attenuated acetic acid-induced writhing, it is probable that the plant species may be producing its antinociceptive activity by affecting the prostaglandin system.

Carrageenan (1%) injected into the subplantar of the right hind paws of the rats pretreated with vehicle (1% DMSO in saline) caused an acute inflammatory response. The edema reached its maximum intensity 3h after injection after administration of the phlogistic agent. The oral administration

of EPG at doses of 50, and 100 mg/kg significantly inhibited paw edema at 3rd h after the injection (Fig. 4 and Table 2). EPG at the concentrations of 50 and 100 mg/kg had about equal amount of inhibition as 34.5% and 37.5%, respectively. Indomethacin (10 mg/kg) profoundly reduced the carrageenan-induced edema in the right hind paws of rats, around 51.4% at 3rd h of measurement (Fig. 4).

Carrageenan-induced edema is an experimental animal model for acute inflammation and it is a biphasic response. In the early phase (1–2h) of this assay is mainly mediated by histamine, serotonin and an increasing synthesis of prostaglandins in the damaged tissue surroundings. The late phase is sustained by prostaglandin release (Antonio and Souza Brito, 1998).

Our data showed that EPG demonstrated antinociceptive activity against chemical stimuli and inhibited the formation of the carrageenan-induced rat paw edema, these effects might be partially related to inhibition of prostaglandin synthesis. Prostaglandins (PGs) are responsible for inflammation features, and cyclooxygenase (COX) enzymes catalyze the first steps in their biosynthesis (Teather et al., 2002). COX-2 is referred to as the inducible isoform of COX, since levels of COX-2 increase in response to several stimulus, including inflammation process (Berenguer et al., 2002; Teather et al., 2002).

Substances present in the plant extracts may interfering with the initiation of the inflammatory response (Castardo et al., 2008). In EPG was identified presence of flavonoids like apigenins, vitexin, and isovitexin (Carvalho et al., 2010), which have previously demonstrated to possess

antinociceptive and anti-inflammatory activities (Mills and Bone, 2000; Jeong et al., 2009; Alves et al., 2012). Some flavonoids may interfere with inflammatory response by inhibiting COX-2 (Havsteen, 2002). Therefore, based on the results of this study, we can suggest that the antinociceptive and anti-inflammatory effect of EPG may be attributed to inhibition of COX-2 and prostaglandin release.

## **CONCLUSION**

In conclusion, the data obtained show that *P. gonoacantha* has both antinociceptive and anti-inflammatory activities, and that it has been used in folk medicine to treat inflammatory disorders, the obtained results corroborate the folkloric use this plant. In addition, this plant would be a good candidate for further development of a new phytotherapeutical medicine. Also, the obtained results in this work contribute significantly to the pharmacological validation for the safe use of *P. gonoacantha*. However, more studies are needed to further elucidate the mechanism of the antinociceptive and anti-inflammatory actions of *P. gonoacantha*.

## **ACKNOWLEDGEMENT**

The authors are grateful to Mrs. Fernanda Lobão Gotti for authenticating the plant species. Also, we acknowledge the financial support supplied by CNPq, FAPEMIG and FUNARBE.

## REFERENCES

- Alves, C.Q., David, J.M., David, J.P., Villareal, C.F., Soares, M.B.P., Queiroz, L.P.d., Aguiar, R.M., 2012. Flavonoids and other bioactive phenolics isolated from *Cenostigma macrophyllum* (Leguminosae). *Quim. Nova* 35, 1137-1140.
- Antonio, M.A., Souza Brito, A.R., 1998. Oral anti-inflammatory and anti-ulcerogenic activities of a hydroalcoholic extract and partitioned fractions of *Turnera ulmifolia* (Turneraceae). *J. Ethnopharmacol.* 61, 215-228.
- Balunas, M.J., Kinghorn, A.D., 2005. Drug discovery from medicinal plants. *Life Sci.* 78, 431-441.
- Berenguer, B., Alarcon de la Lastra, C., Moreno, F.J., Martin, M.J., 2002. Chronic gastric ulcer healing in rats subjected to selective and non-selective cyclooxygenase-2 inhibitors. *Eur. J. Pharmacol.* (1-2), 125 - 135.
- Carvalho, C.A., Fernandes, K.M., Matta, S.L., Silva, M.B., Oliveira, L.L., Fonseca, C.C., 2011. Evaluation of antiulcerogenic activity of aqueous extract of *Brassica oleracea* var. *capitata* (cabbage) on Wistar rat gastric ulceration. *Arq. Gastroenterol.* 48, 276-282.
- Carvalho, C.A., Matta, S.L.P., Melo, F.C.S.A., Andrade, D.C.F., Carvalho, L.M., Nascimento, P.C., Silva, M.B.d., Rosa, M.B.d., 2009. Stem herb (*Tynnanthus fasciculatus* MIERS– Bignoniaceae): phytochemical and toxicological study involving *Artemia*. *Rev. Eletr. Farm.* 6, 51 - 58.
- Carvalho, M.G., Cardozo, M.A., Catunda Junior, F.E., Carvalho, A.G., 2010. Chemical constituents of *Piptadenia gonoacantha* J.F. Macbr. *An. Acad. Bras. Cienc.* 82, 561-567.

Castardo, J.C., Prudente, A.S., Ferreira, J., Guimaraes, C.L., Monache, F.D., Filho, V.C., Otuki, M.F., Cabrini, D.A., 2008. Anti-inflammatory effects of hydroalcoholic extract and two biflavonoids from *Garcinia gardneriana* leaves in mouse paw oedema. *J. ethnopharmacol.* 118, 405-411.

Ceccherelli, F., Gagliardi, G., Matterazzo, G., Visentin, R., Giron, G., 1996. The role of manual acupuncture and morphine administration on the modulation of capsaicin-induced edema in rat paw. A blind controlled study. *Acupuncture Electro.* 21, 7-14.

Dutra, R.C., Tavares, C.Z., Ferraz, S.O., Sousa, O.V., Pimenta, D.S., 2006. Investigation of analgesic and anti-inflammatory activities of *Echinodorus grandiflorus* rhizomes methanol extract. *Braz. J. Pharmacog.* 16, 469 - 474.

Eddy, N.B., Leimbach, D., 1953. Synthetic analgesics. II. Dithienylbutenyl- and dithienylbutylamines. *J. Pharm. Exp. Therap.* 107, 385-393.

Havsteen, B.H., 2002. The biochemistry and medical significance of the flavonoids. *Pharmacol. Therapeut.* 96, 67-202.

Jeong, G.S., Lee, S.H., Jeong, S.N., Kim, Y.C., Kim, E.C., 2009. Anti-inflammatory effects of apigenin on nicotine- and lipopolysaccharide-stimulated human periodontal ligament cells via heme oxygenase-1. *Inter. Immunopharmacol.* 9, 1374-1380.

Liao, C.R., Kao, C.P., Peng, W.H., Chang, Y.S., Lai, S.C., Ho, Y.L., 2012. Analgesic and Anti-Inflammatory Activities of Methanol Extract of *Ficus pumila* L. in Mice. *Evid. Based Complement. Alternat. Med.*, e340141.

Litchfield, J.T., Wilcoxon, F., 1949. A simplified method of evaluating dose-effect experiments. *J. Pharm. Exp. Therap.* 96, 99-113.

Meyer, B.N., Ferrigni, N.R., Putnam, J.E., Jacobsen, L.B., Nichols, D.E., McLaughlin, J.L., 1982. Brine shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents. *Planta Med.* 45, 31-34.

Mills, S., Bone, K., 2000. Principles and practice of phytotherapy. Churchill Livingstone, Edinburgh.

Rang, H.P., Dale, M.M., Ritter, J.M., Flower, R.J., Henderson, G., 2011. Anti-inflammatory and immunosuppressant drugs. Rang and Dale's Pharmacology. Elsevier Publications, Edinburgh, UK, pp. 226–245.

Rates, S.M., 2001. Plants as source of drugs. *Toxicon* 39, 603-613.

Simões, C.M.O., Schnkel, E.P., Gosmann, G., Mello, J.C.P., Mentz, L.A., Petrovick, P.R., 2004. Farmacognosia: da planta ao medicamento. Editora da UFRGS Florianópolis.

Teather, L.A., Magnusson, J.E., Wurtman, R.J., 2002. Platelet-activating factor antagonists decrease the inflammatory nociceptive response in rats. *Psychopharmacol.* 163, 430-433.

WHO, 1965. Molluscicide screening and evaluation. *Bulletin of the World Health Organization* 33, 567-581.

## FIGURE LEGENDS

Figure 1. *Artemia salina* (brine shrimp) lethality test of EPG. Dilutions of a hydroalcoholic extracts of *P. gonoacantha*, were incubated with *A. salina* and the percentage mortality was monitored after 24 h exposure on different concentrations of the extracts.

Figure 2: Antinociceptive effects of oral administration of EPG (50, 100, and 150 mg/kg) and indomethacin (10mg/kg) on acetic acid-induced writhing response in rats. Each value represents mean  $\pm$  SEM (n = 6). The number of abdominal writhes was counted over the time period of 5–25min after acetic acid injection. \*P < 0.05, \*\*P < 0.01 and \*\*\*P < 0.001 as compared to the control group (one-way ANOVA followed by Dunnett's test).

Figure 3. Effect of oral administration of EPG (50, 100, and 150 mg/kg) and indomethacin (10mg/kg) on the pain threshold of mice in the hot plate test. Data are mean  $\pm$  SEM values for response time. \*P < 0.05 compared to the control group (one-way ANOVA followed by Dunnett's test).

Figure 4. Effect of oral administration of EPG (50, 100 and 150 mg/kg) and indomethacin (10mg/kg) on carrageenan-induced rat paw edema. The paw edema volume was taken at the 3rd hour after carrageenan injection. Each column represents the mean  $\pm$  SEM. (n = 6). \*P < 0.05 and \*\*P < 0.01 as compared to the control group (one-way ANOVA followed by Dunnett's test).

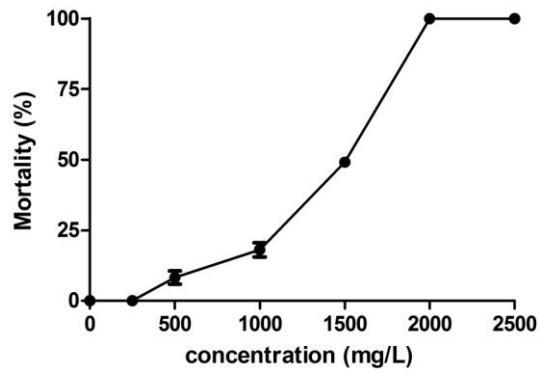


Figure 1

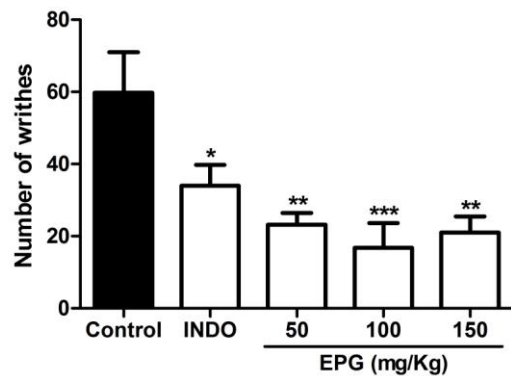


Figure 2

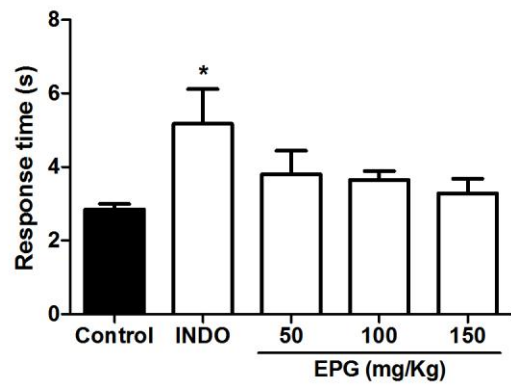


Figure 3

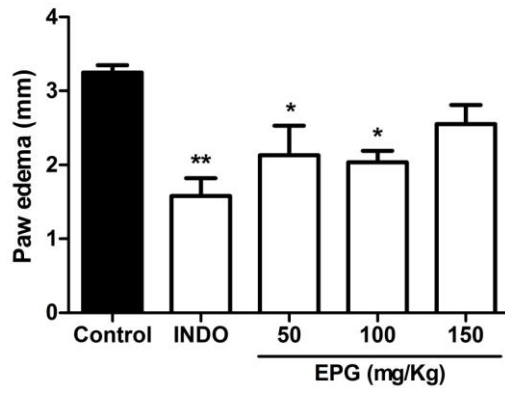


Figure 4

Table 1. Phytochemical analysis of EPG.

Phytochemical	Test	EPG
Alkaloids	Dragendorff	–
	Hager	–
	Mayer	–
Anthraquinones	Borntrager	–
Cardiotonic heterosides	Baljet	–
	Kedde	–
Coumarins	Potassium hydroxide	–
	Shinoda	+
Flavonoids	Ferric chloride	+
	Aluminum chloride	+
	Folin–Ciocalteu	+
Phenolic compounds	Honeycomb froth	–
Saponins	Iron salts	+
Tannins	Gelatin-salt	+
	Liebermann- Burchard	–

–: Absent; +: present

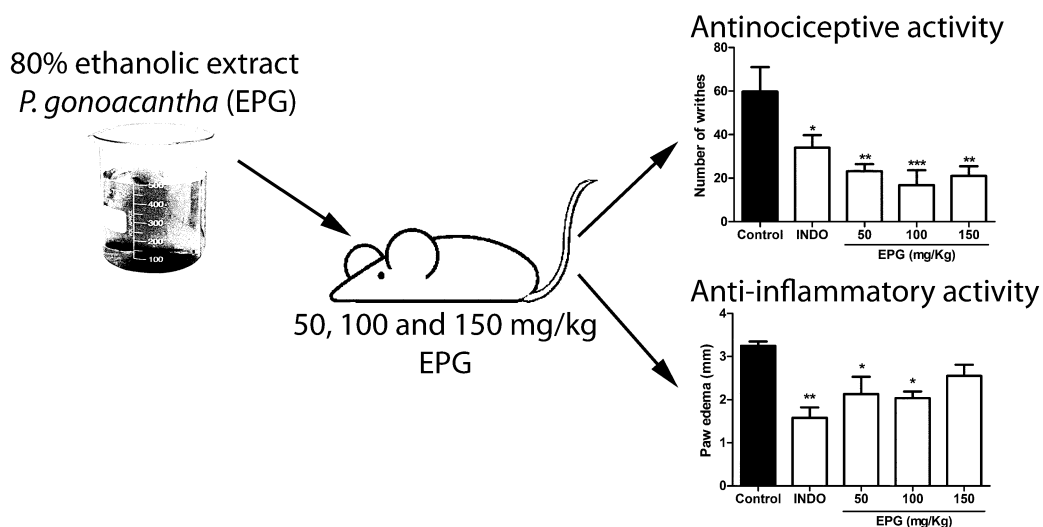
Table 2. Effect of the administration of hydroalcoholic extracts of *P. gonoacantha* (EPG) on carrageenan-induced edema rat paw.

Groups	Dose (mg/kg)	Paw volume increase			Inhibition (%)		
		1 h	2 h	3 h	1 h	2h	3 h
Control		1.54 ± 0.37	2.35 ± 0.17	3.25 ± 0.10			
INDO	10	0.75 ± 0.17	1.38 ± 0.27	1.58 ± 0.24**	51.3	41.3	51.4
EPG	50	0.86 ± 0.13	1.59 ± 0.36	2.13 ± 0.40*	44.1	32.3	34.5
EPG	100	0.68 ± 0.02*	1.42 ± 0.12	2.03 ± 0.15*	55.8	39.6	37.5
EPG	150	1.24 ± 0.14	2.32 ± 0.12	2.55 ± 0.26	19.5	1.3	21.5

The results are expressed as Mean ± SEM (n = 6). INDO - indomethacin.

\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , ANOVA followed by Dunnett's test.

### Graphic abstract



## CONSIDERAÇÕES FINAIS

Baseado nos resultados obtidos e nas condições experimentais do presente trabalho, conclui-se que:

➤ Considerando-se que não há estudos sobre o potencial biológico da espécie *Piptadenia gonoacantha*, este trabalho tem por objetivo avaliar aspectos farmacobotânicos, químicos e biológicos do extrato hidroalcolico das folhas desta espécie, representando uma promissora e inovadora descoberta científica.

➤ A descrição de estruturas presentes em uma espécie vegetal permite a identificação correta da espécie, evitando sua identificação errônea e auxiliando na comparação de espécies. Além disso, serve de base para o estabelecimento de padrões de controle farmacobotânico da matéria-prima, através de técnicas simples e de baixo custo, garantindo a qualidade do produto final que utilize esta matéria prima. Os resultados colaboram na elucidação preliminar de que os compostos presentes nos extratos das folhas de *Piptadenia gonoacantha*, especialmente os já identificados (galato de metila, vitexina e isovitexina), estão envolvidos na atividade biológica testada, podendo futuramente direcionar novos estudos. Cabe ressaltar que o uso abusivo e indiscriminado de agentes antimicrobianos na prática clínica humana e veterinária tem um efeito seletivo no surgimento e manutenção de resistência a drogas. Uma tentativa de manter o uso de antimicrobianos atuais poderia ser encontrada em sua combinação com outros produtos, como os produtos naturais, que representariam uma opção terapêutica no tratamento de infecções causadas por *S. aureus* e outros patógenos, no que diz respeito ao aparecimento crescente de resistência múltipla.

➤ Os extratos de *P. gonoacantha* revelaram ser um bom candidato para o desenvolvimento de um medicamento novo fitoterápicos, tanto para a atividade antinociceptiva como para a atividade anti-inflamatória. Este tem sido utilizado na medicina popular para o tratamento de distúrbios inflamatórios, comprovando os resultados aqui evidenciados. Além disso, os resultados obtidos neste trabalho contribuem significativamente para a validação farmacológica para a utilização segura de *P. gonoacantha*. No

entanto, mais estudos são necessários para elucidar o mecanismo das ações antinociceptiva e anti-inflamatória de *P. gonoacantha*.

Os dados obtidos sugerem que a espécie *P. gonoacantha* tem uma promissora atividade biológica. A grande ocorrência deste vegetal em nossa região e sua característica de rápido crescimento, somado ao fato de poucos estudos serem publicados avaliando tais ações, tornam de extrema relevância os resultados deste trabalho, que pode ser usado como estratégia para o desenvolvimento farmacêutico de novas drogas, com propriedades antibacterianas e/ou analgésicas.