
**ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS, ATIVIDADE HEMOLÍTICA E ANTIMICROBIANA
DOS EXTRATOS E FRAÇÕES DE *Buddleja stachyoides* Cham. & Schltl.
(Scrophulariaceae)**

**PHYSICO-CHEMICAL ASSAYS, HEMOLYTIC AND ANTIMICROBIAL ACTIVITY
OF EXTRACTS AND FRACTIONS OF *Buddleja stachyoides* Cham. & Schltl.
(Scrophulariaceae)**

¹Daniella Maria Soares de OLIVEIRA; ¹Fernanda Maria Marins OCAMPOS; ²Thais
Fernanda MOREIRA; ³Obdúlio Gomes MIGUEL; ⁴Marilis Dallarmi MIGUEL; ⁵Edvaldo
Antônio Ribeiro ROSA; ⁶Rosimeire Takaki ROSA

1- Doutoranda do Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da UFPR

1- Doutoranda do programa de Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia da Universidade
Estadual "Júlio de Mesquita Filho" – UNESP

3- Professor Adjunto de Fitoquímica do Curso de Farmácia UFPR.

4- Professor Adjunto de Farmacotécnica do Curso de Farmácia UFPR.

5- Professor Adjunto de Estomatologia, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da PUCPR

6- Técnica do Laboratório de Estomatologia, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da PUCPR

e-mail para correspondência: dani_mso@yahoo.com.br

RESUMO:

Buddleja stachyoides Cham. & Schltl. é uma espécie nativa do Brasil, não endêmica, comum nas regiões Nordeste (Bahia, Alagoas), Centro-Oeste (Distrito Federal), Sudeste e Sul. É conhecida popularmente como calção de velho ou verbasco, e pertence a família Scrophulariaceae. Apesar de ser usada na medicina tradicional, os estudos que caracterizam esta espécie quanto às suas atividades biológicas são escassos e não existem relatos sobre seus parâmetros físico-químicos. Uma vez que estes dados são necessários para a identificação e caracterização da espécie vegetal, os objetivos deste estudo foram determinar os teores de umidade e cinzas totais para a droga vegetal e a prospecção fitoquímica para os extratos hidroalcoólico e aquoso. Foram analisadas ainda as atividades hemolítica e antimicrobiana dos extratos alcoólicos brutos e frações, das partes aéreas e raízes, de *Buddleja stachyoides*. Os teores obtidos para umidade e cinzas totais foram especificados pela primeira vez na literatura, e estão dentro de especificações determinadas por farmacopéias. A prospecção fitoquímica revelou a presença dos grupamentos de metabólitos secundários: iridoídeos, triterpenos, saponinas, flavonoides, cumarinas e fenóis, os quais, após sua elucidação estrutural, poderão ser utilizados como marcadores fitoquímicos de extratos padronizados. Quando as amostras foram avaliadas quanto a

sua atividade hemolítica, apenas as frações clorofórmio das partes aéreas e hexano das raízes promoveram hemólise, isto pode ser atribuído à presença de saponinas, observada na prospecção fitoquímica. Nenhuma das amostras apresentou atividade antimicrobiana após 48 h de incubação. Estes testes são importantes para verificar a segurança e eficácia do uso da espécie vegetal *Buddleja stachyoides*.

Palavras-chave: *Buddleja stachyoides*. Atividade antimicrobiana. Atividade hemolítica. Verbascosídeo

ABSTRACT:

Buddleja stachyoides Cham. & Schltdl. is a native of Brazil, has native origin, common in the Northeast (Bahia, Alagoas), Central West (Distrito Federal), Southeast and South is popularly known “calção de velho” or “verbascos” and belongs to the family Scrophulariaceae. Despite being used in traditional medicine, studies that characterize this species as to their biological activities are scarce and there are no reports on their physico-chemical parameters. Once these data are which would be required for the identification and characterization of plant species, the objectives of this study were to determine the humidity content and total ash for plant drug and phytochemical screening for the hydroalcoholic and aqueous extracts. Were analyzed further antimicrobial and hemolytic activities of alcoholic extracts and crude fractions of the aerial parts and roots of *Buddleja stachyoides*. The levels obtained for humidity and total ash were specified for the first time in the literature, and are within specifications determined by pharmacopoeias. The phytochemical screening revealed the presence of groups of secondary metabolites: iridoids, triterpenes, saponins, flavonoids, coumarins and phenols, which, after his structural elucidation, may be used as markers of phytochemicals standardized extracts. When the samples were evaluated for hemolytic activity, only the chloroform fractions of the aerial parts and hexane of roots promoted hemolysis, this can be attributed to the presence of saponins, observed in phytochemical. None of the samples showed antimicrobial activity after 48 h of incubation. These tests are important to verify the safety and efficacy of the use of plant species *Buddleja stachyoides*.

Key-words: *Buddleja stachyoides*. Antimicrobial activity. Hemolytic activity. Verbascoside.

1. INTRODUÇÃO

A Organização Mundial de Saúde (OMS) recomenda a difusão dos conhecimentos necessários para o uso racional de plantas medicinais e também de fitoterápicos para auxiliar a restauração e manutenção da saúde da população (AMARAL *et al.* 2005).

O principal órgão responsável pela regulamentação da produção e uso seguro de plantas medicinais e seus derivados, no Brasil, é a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) (BRASIL, 1999). O registro de medicamentos é a etapa na qual os mesmos são avaliados quanto a sua segurança, eficácia e qualidade antes de serem comercializados, nesta etapa, são rigorosamente analisados pela Anvisa, para garantir a segurança da população que fazem uso destas terapias (CARVALHO, 2008).

A regulamentação em vigor para o registro de medicamentos fitoterápicos é a Resolução de Diretoria Colegiada (RDC) 14/2010, que determina os aspectos essenciais ao registro, como identificação botânica das espécies vegetais utilizadas, padrão de qualidade, identidade e provas de eficácia e segurança que validem as indicações terapêuticas propostas.

Inúmeras espécies nativas são amplamente empregadas pela população, algumas possuem estudos químicos e/ou farmacológicos oferecendo suporte para a sua utilização, outras são empregadas baseadas apenas em conhecimento empírico ou tradicional. (SIMÕES *et al.*, 2001). Um exemplo de espécie pouco estudada, porém, utilizada popularmente para fins medicinais é *Buddleja stachyoides*, que possui poucos relatos sobre sua caracterização físico-química, biológica, segurança e eficácia.

A espécie *Buddleja stachyoides* Cham. & Schlttdl., pertencente à família Scrophulariaceae, e é conhecida popularmente como calção de velho ou verbasco. Tem origem nativa, não é endêmica do Brasil e cresce espontaneamente em pastagens e terrenos baldios, onde é considerada planta daninha. No Brasil está distribuída nas regiões Nordeste, Centro-Oeste, Sudeste e Sul. As sinônimas da espécie são *Buddleja brasiliensis* Jacq ex Spreng., *Buddleja australis* Vell., *Buddleja albotomentosa* R. E. Fr., *Buddleja otophylla* Hassk. É utilizada na medicina popular como anti-hemorroidal, béquica, analgésica, sudorífica, calmante, emoliente e anti-reumática (LORENZI, 2008). Suas raízes são usadas contra envenenamento por picadas de cobras e ainda, o uso externo do decocto de pedaços da planta é indicado para o tratamento de contusões e dores em geral.

Pesquisas sobre os metabólitos secundárias de diversas espécies de *Buddleja* resultaram no isolamento de inúmeras substâncias como terpenoides, flavonoides, iridoides, feniletanoides, fenilpropanoides, sesquiterpenos, lignanas e saponinas (MAHLKE, 2007). Atualmente um composto foi isolado da espécie *Buddleja stachyoides*. o fenilpropanoide glicosilado verbascosídeo [2-(3,4-dihidroxifeniletíl)-1-O- α -L-ramnopiranosil - (1 3)- β -D-(4-O-cafeil)-glucopiranosídeo] Este composto já foi encontrado em outras espécies e estudos demonstraram atividade antioxidante, antinociceptiva, inibição da enzima prolil oligopeptidase (POP) e da atividade enzimática da enzima conversora da angiotensina, entre outras (BACKHOUSEA *et al.*, 2008; GITZEL FILHO *et al.*, 2012; LEE, WOO, E KANG, 2005).

Porém, existem poucos estudos sobre as atividades biológicas de extratos e

frações das partes aéreas e raízes de *Buddleja stachyoides* e nenhum parâmetro físico-químico importante no controle de qualidade foi determinado para droga vegetal. Portanto, neste estudo foram avaliados parâmetros de qualidade como umidade e cinzas totais da droga vegetal, prospecção fitoquímica, atividade hemolítica e antimicrobiana dos extratos e frações das partes aéreas e raiz.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Material vegetal, extração e fracionamento

O material vegetal foi coletado na Universidade Federal do Paraná, campus Jardim Botânico, Curitiba, Paraná, nos meses de maio e junho de 2011. A identificação botânica da espécie foi realizada no Herbário do Museu Botânico Municipal de Curitiba, Estado do Paraná, e foi comparada com a exsicata registrada sob o número 339899 *Buddleja stachyoides* pelo curador Osmar do Santos Ribas.

As partes aéreas e raiz da planta seca foram rasuradas, pesadas e posteriormente extraídas em aparelho de Soxhlet modificado com etanol 96 °GL obtendo-se os extratos alcoólicos brutos (CARVALHO, 2001). As frações foram obtidas através do método de partição líquido-líquido, utilizando-se solventes de diferentes polaridades (n-hexano, clorofórmio, acetato de etila), em equipamento de Soxhlet modificado.

2.2. Análises físico-químicas

2.2.1. Umidade

O teor de umidade das partes aéreas e raízes foi determinado pela metodologia descrita na Farmacopéia Brasileira 5ª edição (2010).

2.2.2. Cinzas totais

Para determinação em porcentagem de cinzas totais presente na amostra, foi utilizada a metodologia, presente na Farmacopéia Brasileira 5ª edição (2010).

2.3 Ensaio sistemático de prospecção fitoquímica

Para identificação dos principais grupos do metabolismo secundário, presentes na espécie vegetal, foi realizado o ensaio fitoquímico, que identifica estes grupos através de reações de precipitação ou coloração. Este ensaio foi realizado de

de acordo com Moreira (1979), em extratos hidroalcoólico e aquoso ambos à 20% (m/v) das partes aéreas e raiz, ambos preparados por maceração.

No extrato aquoso foram pesquisados iridoides, saponinas, mucilagem, taninos, aminogrupos, ácidos voláteis, ácidos fixos e heterosídeos cianogênicos. E no extrato hidroalcoólico foi verificada a presença de alcaloides, ácidos orgânicos, fenóis, flavonoides, cumarinas, antraquinonas, triterpenos, antocianos.

2.4 Avaliação da atividade hemolítica

2.4.1 Atividade hemolítica em tubos

Uma suspensão de hemácias a 2% (v/v) foi preparada com sangue de carneiro obtido comercialmente (Newprov®). Inicialmente o mesmo foi lavado com solução de tampão fosfato (PBS) pH 7,4 gelado (4°C), para retirada de hemácias rompidas, e então as células foram diluídas até a concentração utilizada, e mantidas em refrigeração até o momento do experimento.

As amostras utilizadas fora os extratos alcoólicos brutos e frações das partes aéreas e raiz de *Buddleja stachyoides*, nas concentrações de 100, 200, 500 e 1000µg/mL em solução tampão fosfato, sendo 1mL o volume final do ensaio. Posteriormente, estes foram misturados com 1 mL da suspensão de hemácias a 2% e agitados suavemente, e incubados durante 30 minutos em temperatura ambiente. Após, foram agitados novamente, e incubados por 150 minutos, nas mesmas condições. Após o tempo de incubação, as amostras em contato com a suspensão de hemácias foram centrifugadas por 5 minutos, a 2500 r.p.m. e observou-se a ocorrência ou não da formação de hemólise total. Nos tubos onde ocorreu a formação de hemólise, foi realizado outro teste para a quantificação da menor concentração de amostra em que ocorre a atividade hemolítica, utilizando concentrações que variaram de 100 a 950 µg/mL, durante 24 horas, em temperatura ambiente (OMS, 1998).

2.4.2. Atividade hemolítica em ágar sangue

O ensaio de atividade hemolítica foi realizado segundo a metodologia de difusão das amostras em ágar sangue na concentração de 1000µg/mL, em duplicata. Como controle positivo foi utilizado padrão de saponina na mesma concentração e para controle negativo foi utilizado o solvente de diluição das amostras. Para este ensaio utilizou-se a técnica de antibiograma em discos. Papéis Whatmann n°1 (7 mm de diâmetro, esterilizados) foram distribuídos sobre placas de ágar sangue e em seguida foram impregnados com alíquotas de 20µL das amostras. Como controle negativo foi

utilizado solvente usado na diluição das amostras. Após a aplicação, as placas foram incubadas a 37°C durante 24 horas. Decorrido este período, as placas foram inspecionadas quanto à presença de halos de hemólise (medidos em milímetros).

2.5 Análise da atividade antimicrobiana

O potencial antimicrobiano da espécie vegetal foi avaliado através do Método de Microdiluição (Anvisa, M7-A6, 2003). As cepas dos microrganismos utilizadas foram: *Staphylococcus aureus* (ATCC® 25293™), *Staphylococcus epidermidis* (ATCC® 12228™), *Salmonella thyphimurium* (ATCC® 14028™), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC® 9027™), *Escherichia coli* (ATCC® 25922™) e *Candida albicans* (ATCC® Sc5314™).

As cepas foram inoculadas em um meio de cultura líquido contendo as amostras testadas em várias concentrações. Após incubação, efetuou-se a leitura da concentração mínima capaz de inibir o crescimento bacteriano. Os extratos e as frações foram dissolvidos em meio *Müller-Hinton* ou *YNB* e filtrados em membrana estéril, com poros de 0,22µm, para esterilização das soluções. Em seguida, foram transferidos 100µL de cada concentração (12,5 µg/mL; 25 µg/mL; 50 µg/mL; 100 µg/mL; 200 µg/mL e 400 µg/mL) para os poços da placa de cultura de células (96 poços).

As cepas bacterianas foram repicadas em caldo *Muller Hinton* para bactérias e *YNB* para fungos e incubadas à 37°C por 24 horas. Após este período as suspensões bacterianas foram comparadas e padronizadas de acordo com a turbidez do tubo 0,5 da escala Mac Farland. Em seguida, 100µL de cada bactéria foram inoculadas em 900µL do meio (caldo *Müller-Hinton* ou *YNB*), e 5µL desta mistura foram adicionados em cada poço da placa de cultura de células de 96 poços já contendo o meio com as amostras. As placas foram fechadas e mantidas em estufa a 35°C. Os resultados foram analisados nos tempos de 24 e 48 horas após a incubação. Os ensaios foram realizados em triplicata.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Análises físico-químicas

A determinação do teor de umidade em drogas vegetais é necessária, pois a presença excessiva de água permite o desenvolvimento de microrganismos e ocasiona reações enzimáticas que levam a degradação dos constituintes químicos.

A determinação do teor de cinzas totais permite avaliar a existência de impurezas inorgânicas não voláteis, ou seja, algum constituinte que não pertença à própria droga vegetal (SIMÕES, 2001). Portanto, após a secagem da droga vegetal foram realizadas as análises de determinação de umidade e cinzas totais. Os resultados destes testes estão expressos como média \pm desvio padrão de 6 determinações independentes, podendo ser visualizados na tabela 1.

Os valores encontrados para umidade tanto das partes aéreas quanto das raízes estão dentro da especificação de 8 a 14% estabelecida em diferentes farmacopéias em diversas monografias (SIMÕES, 2001). Os teores de cinzas totais também apresentaram resultados aceitáveis. Estes parâmetros de qualidade são amplamente utilizados para garantir a confiabilidade dos vegetais utilizados na produção de medicamentos fitoterápicos (ANVISA, 2010).

TABELA 1. RESULTADOS DAS ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS PARA AS PARTES AÉREAS E RAIZ *Buddleja stachyoides*

Amostra	Teor de umidade (%)	Determinação de cinzas totais (%)
Partes aéreas	9,0228% \pm 0,3016	6,1428% \pm 0,2080
Raiz	8,6233% \pm 0,2423	5,5963% \pm 0,2606

3.2. Ensaio sistemático de prospecção fitoquímica

O ensaio fitoquímico consiste em testes preliminares de identificação de grupos de metabólitos secundários, mediante ensaios químicos de coloração e precipitação. Os metabólitos secundários são produzidos pelos vegetais com a função de defesa ou atração e apresentam atividades biológicas interessantes, com grande importância nas áreas farmacêutica, alimentar, agrônômica, perfumaria, etc. (SIMÕES, 2001). Conhecendo-se as classes de compostos presentes na espécie vegetal em estudo, permite direcionar a pesquisa em relação ao isolamento e identificação dos compostos. Os resultados do ensaio fitoquímico realizado para os extratos aquoso e hidroalcoólico 20% (m/v) da espécie vegetal estão demonstrados na tabela 2.

TABELA 2 - RESULTADOS DO ENSAIO SISTEMÁTICO FITOQUÍMICO REALIZADO PARA *Buddleja stachyoides*

Análises	Extrato Aquoso		Extrato Hidroalcoólico	
	Partes aéreas	Raiz	Partes aéreas	Raiz
Alcaloides			-	-
Ácidos orgânicos			+	+
Fenóis			+	+
Flavonoides			+	+
Cumarinas			+	+
Antraquinonas			-	-
Triterpenos			+	+
Antocianos			+: básico	+: ácido
Iridoides	+	+		
Saponinas	+	+		
Mucilagem	+	+		
Taninos	-	-		
Aminogrupos	+	+		
Ácidos voláteis	-	-		
Ácidos Fixos	+	+		
Heterosídeos cianogênicos	-	-		

NOTA: (+) positivo; (-) negativo

Pode-se notar que estão presentes os principais compostos (iridoides, triterpenos, saponinas, flavonoides, cumarinas e fenóis) mencionados na literatura para as diversas espécies do gênero *Buddleja*.

No teste de identificação de iridoides, as partes aéreas tiveram reação positiva no primeiro teste com a formação de coloração verde escura e no terceiro teste em que houve a formação de coloração rosa cereja. Para as raízes apenas no terceiro teste houve a formação de coloração rosa cereja, significando que provavelmente existe uma diferença estrutural entre os iridoides presentes nas partes aéreas e raízes.

Para triterpenos ocorreu a formação de coloração verde, indicando positividade, tanto para as partes aéreas quanto para raízes. As partes aéreas apresentaram uma espuma bastante persistente no teste para saponinas, já nas raízes a quantidade de espuma formada foi menor e menos persistente. No teste de flavonoides ocorreu o desenvolvimento de coloração rósea e para os fenóis houve uma mudança de coloração nos extratos.

Os compostos fenólicos contribuem para o sabor, odor e coloração em diversos vegetais, sendo economicamente interessantes como flavorizantes e corantes de alimentos e bebidas. Alguns ácidos fenólicos (ácido clorogênico, caféico e ferúlico) e seus ésteres com esteróis e triterpenos apresentam estudos relatando a atividade

antioxidante, importante atividade na indústria de alimentos. Do ponto de vista farmacológico existe o interesse nas atividades antibacteriana e antiviral de ésteres do ácido caféico (SIMÕES *et al.*, 2001).

Cumarinas possuem um odor característico e eram utilizadas como aromatizantes em alimentos industrializados, porém foram consideradas tóxicas pela agência americana (FDA – Food and Drug Administration), mas devido às vantagens do odor, estabilidade e baixo custo ainda são utilizadas em indústrias de produtos de limpeza e cosméticos (SIMÕES *et al.*, 2001).

As saponinas são glicosídeos de esteróis ou de terpenos policíclicos e possuem uma parte com característica lipofílica (triterpeno ou esteróide) e outra parte hidrofílica (açúcares). Entre as atividades biológicas pode-se destacar a atividade hemolítica, ictiotóxica e molusquicida e anti-helmíntica. Possuem também ação hipocolesteremiante, mecanismo explicado pelo aumento da excreção do colesterol, por formação de complexo com as saponinas administradas por via oral ou por aumentar a eliminação de ácidos biliares nas fezes. Existe uma ampla utilização de drogas vegetais contendo saponinas com atividade antiinflamatória (castanha da índia), expectorante (polígala, primula, hera) e diurética (salsaparrilha e cavalinha). (SIMÕES *et al.*, 2001).

3.3. Avaliação da atividade hemolítica

No teste em tubos contendo sangue de carneiro em suspensão a 2%, a fração clorofórmio das partes aéreas apresentou atividade hemolítica a partir da concentração 50 µg/mL, e a fração hexano das raízes apresentou atividade hemolítica a partir da concentração 100 µg/mL, sendo estas as menores concentrações com capacidade hemolítica. Provavelmente, a atividade hemolítica dessas amostras deve-se a presença de saponinas que possuem ação sobre membranas (ação hemolítica), alterando sua permeabilidade e causando a destruição das células sanguíneas, após centrifugação, tornando a solução vermelha e límpida caracterizada pela liberação de hemoglobina (SIMÕES *et al.*, 2001). As demais amostras não apresentaram nenhuma atividade hemolítica, sendo interessante o resultado negativo, pois possibilita o uso como medicamentos ou outros produtos para uso humano e animal.

No teste de atividade hemolítica em ágar sangue dos extratos brutos e frações das partes aéreas e raiz de *Buddleja stachyoides*, verificou-se que apenas as frações clorofórmio das partes aéreas, hexano e acetato de etila da raiz apresentaram a formação de um pequeno halo de hemólise (8 mm de Ø). Essas amostras, com exceção da fração acetato de etila da raiz, apresentaram hemólise no teste com tubos. É importante ressaltar que os extratos alcoólicos bruto utilizados popularmente não apresentaram atividade hemolítica.

3.4. Análise da atividade antimicrobiana

Na avaliação do potencial antimicrobiano nenhuma das amostras (extrato bruto e frações das partes aéreas e raiz) apresentou atividade antimicrobiana após 48 horas. Ocorreu apenas uma inibição de crescimento em 24 horas da fração acetato de etila das partes aéreas na concentração 400 µg/mL sobre o microrganismo *Staphylococcus aureus* e da fração hidroalcoólica remanescente das partes aéreas na concentração 400 µg/mL sobre o microrganismo *Escherichia coli*. Isto indica que estas amostras devem apresentar atividade antimicrobiana em concentrações mais altas, mas não foram realizados testes para determinar qual a concentração exata, devido a pouca importância dada a substâncias que necessitam de altas doses para serem ativas. Os extratos que apresentam uma concentração inibitória menor que 100µg/mL têm uma atividade antimicrobiana considerada boa, entre 100-500µg/mL é moderada, de 500-1000µg/mL é fraca e acima de 1000µg/mL considera-se inativo (HOLETZ *et al.*, 2002). Porém, esta análise foi importante para direcionar os microrganismos mais susceptíveis às amostras e futuramente, poderão ser testados compostos isolados sobre esses microrganismos, podendo apresentar uma possível atividade antimicrobiana.

4. CONCLUSÃO

Neste estudo foram realizadas análises físico-químicas importantes para caracterização da espécie no controle de qualidade da droga vegetal e algumas atividades biológicas que auxiliam na comprovação da segurança e eficácia da espécie.

Os teores de umidade e cinzas totais, determinados pela primeira vez para a espécie, encontram-se dentro das especificações farmacopeicas descritas para diversas drogas vegetais.

O ensaio sistemático fitoquímico evidenciou a presença de grupamentos do metabolismo secundário que podem ser utilizados como marcadores da espécie na padronização dos extratos de *Buddleja stachyoides*.

Na atividade hemolítica testada com suspensão de sangue de carneiro 2% e difusão em ágar sangue pelo método antibiograma, apenas as frações clorofórmio das partes aéreas e hexano da raiz apresentaram atividade hemolítica. Essa atividade hemolítica deve-se provavelmente a presença de saponinas descrita na literatura e evidenciada no teste realizado no ensaio sistemático de fitoquímica. Porém, os extratos alcoólicos brutos das partes aéreas e raiz não apresentaram atividade hemolítica.

Na atividade antimicrobiana verificada pelo método de microdiluição, após 48

Mas este estudo foi importante para direcionar os microrganismos mais afetados e outros compostos que serão isolados podem apresentar uma possível atividade antimicrobiana.

5. REFERÊNCIAS

AMARAL, A. C. F.; SIMÕES, E. V.; FERREIRA, J. L. P. **Coletânea científica de plantas de uso medicinal**. Curitiba: Farmanguinhos, Fiocruz, Ministério da Saúde, 2005.

ANVISA, Metodologia dos Testes de Sensibilidade a Agentes Antimicrobianos por Diluição para Bactéria de Crescimento Aeróbico: Norma Aprovada - Sexta Edição. M7-A6, v. 23, n. 2, 2003.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC 14 de 31 de março de 2010. Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos.

Backhousea, N.; Delportea, C.; Apablazaa, C.; Farías, M.; Goitya, L.; Arraua, S.; Negrete, R.; Castroa, C.; Mirandab, H. Antinociceptive activity of *Buddleja globosa* (matico) in several models of pain. *Journal of Ethnopharmacology* **2008**, 119, 160-165.

BRASIL. Congresso Nacional. Lei no. 9.782, de 26 de janeiro de 1999. Define o Sistema Nacional de Vigilância Sanitária, cria a Agência Nacional de Vigilância Sanitária, e dá outras providências. DOU. Poder Legislativo, Brasília, DF, 27 jan. 1999.

BRASIL. **Farmacopeia Brasileira**. 5 ed. Volume 1. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brasília: Anvisa, 2010.

CARVALHO, A.C.B.; BALBINO, E.E.; MACIEL, A.; PERFEITO, J.P.S.; Situação do registro de medicamentos fitoterápicos no Brasil. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, Brasil, v. 18, n. 2, p. 314-319, Abr./Jun. 2008.

CARVALHO, J. L. de C. **Contribuição ao estudo fitoquímica e analítico do *Nasturtium officinale* R. BR., Brassicaceae**. 88 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 2001.

Gitzel Filho, A.; Morel, A. F.; Adolpho, L.; Ilha, V.; Giralt, E.; Tarragó, T.; Dalcol, I. I. Inhibitory effect of verbascosídeo isolated from *Buddleja brasiliensis* Jacq. ex Spreng on prolyl oligopeptidase activity. *Phytother. Res.* **2012**, 10, 26, 1472-1475.

Lee, J. Y.; Woo, E.; Kang, K. W. Inhibition of lipopolysaccharide-inducible nitric oxide synthase expression by acteoside through blocking of AP-1 activation. *J. Ethnopharmacology* **2005**, 97, 3, 561–566.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. **Plantas medicinais no Brasil: nativa e exóticas**. 2 ed. São Paulo: Instituto Plantarum de Estudos da Flora Ltda, 2008. p. 487.

MOREIRA, E. A. Marcha sistemática de análise em fitoquímica. **Tribuna farmacêutica**. v. 47, n. 1, p. 1-19, 1979.

SIMÕES, C.M. O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L. APETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 3 ed. Porto Alegre/ Florianópolis: Editora Universidade/ UFRGS/ Ed. Da UFSC, 2001.